

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS
ONCOGENES E6/E7 POR LA PROTEÍNA E2 DE LAS
VARIANTES ASIÁTICO-AMERICANAS DEL VIRUS
DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ROSA MA. ORDOÑEZ RAZO

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS

MÉXICO, D.F.

Septiembre, 2004

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



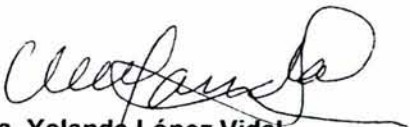
Doctorado
en Ciencias Biomédicas
FACULTAD DE MEDICINA

ING. LEOPOLDO SILVA
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION
ESCOLAR DE LA UNAM.
PRESENTE.

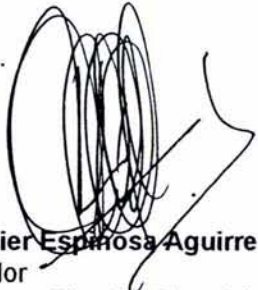
Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevó a cabo el día 11 de febrero del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la BIOL. ORDÓÑEZ RAZO ROSA MARIA, con número de expediente 12925012 y número de cuenta 8318069-7 con la tesis titulada: "**REGULACION DE LA EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES E6/E7 POR LA PROTEINA E2 DE LAS VARIANTES ASIÁTICO-AMERICANAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16**", dirigida por el Dr. Jaime Berumen Campos.

PRESIDENTE: DR. GREGORIO PEREZ PALACIOS
SECRETARIO: DRA. SUSANA KOFMAN EPSTEIN
VOCAL: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS
VOCAL: DR. GUILLERMO ALFARO MARTINEZ
VOCAL: DRA. MARIA DE LOURDES GIRARD CUESY
SUPLENTE: DR. MARCO ANTONIO MERAZ RIOS
SUPLENTE: DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 11 de febrero del 2004.



Dra. Yolanda López Vidal
Responsable
Facultad de Medicina



Dr. J. Javier Espinosa Aguirre
Coordinador
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

C.c.p. Biol. Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.
Tutor(a) Dr. Jaime Berumen Campos.

**AGRADEZCO A LAS SIGUIENTES INSTITUCIONES POR
EL APOYO BRINDADO PARA LA REALIZACIÓN DE
ESTA TESIS:**

CONACYT

**ESCUELA MILITAR DE GRADUADOS DE SANIDAD DEL
EJERCITO Y FUERZA AEREA MEXICANA**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

A Efrén, Pepe y mi madre:

**Por las grandes enseñanzas en vida y la gran
tristeza de su ausencia.**

A Aarón:

Por llenar de amor, esperanza y alegría mi vida

A Víctor:

**Por su amor y apoyo para no dejar de
intentarlo.**

A mi padre:

Por sus enseñanzas y apoyo de siempre.

A toda mi familia:

Por su cariño y confianza en mí.

¡ GRACIAS !

Al Dr. Jaime Berumen Campos por su amistad y apoyo para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado: por sus observaciones y comentarios.

A todos mis compañeros y amigos de los laboratorios donde tuve la oportunidad de realizar los experimentos: Miriam Guido, Néstor, Olga, Carla, José Villalba, José Manuel, Esther, Silvia Espejel, Cristina, Alicia, Paty Zamora, Kareem, Icela, Ely, Ana María, Ernesto, Elena, América, Meche, Cynthia.

Al Dr. Alejandro García Carrancá por su apoyo y comprensión.

A la Dra. Susana Kofman por apoyo para la realización de los últimos experimentos.

A la Dra. Edna Aizpuru por darme todas las facilidades para terminar este trabajo.

A mis amigas de siempre: Sandy, Paty Cocolletzi, Laura, Lety, Edith y Ana Luisa porque a pesar del tiempo siempre han estado a mi lado.

A mis nuevas compañeras y amigas: Yadira, Renata, Sofía, Miriam, Esther, Denisse e Ivonne, por darme ánimos para concluir con este trabajo.

Y a todos aquellos que de una u otra manera intervinieron en el desarrollo de este trabajo.

INDICE

	Página
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. JUSTIFICACIÓN.....	6
IV. OBJETIVOS.....	8
V. MATERIAL Y METODOS.....	10
1. Diseño general.....	10
2. Muestras biológicas.	11
3. Análisis de transcritos de los genes E6/E7, E1/E2 y E6-E2 por RT-PCR.....	11
4. Análisis de la actividad represora de la transcripción de las variantes del gen E2 del HPV16.....	13
a. Cultivo celular.....	15
b. Transfecciones y ensayos β -galactosidasa.....	16
5. Determinación del número de copias virales y nivel de expresión de E6/E7 por captura de híbridos.....	17
6. Ensayos de apoptosis.....	19
7. Análisis estadístico.....	20
VI. RESULTADOS.....	21
VII. DISCUSIÓN.....	36
VIII. CONCLUSIONES.....	41
IX. REFERENCIAS.....	42
ANEXO I. ARTICULO.....	49

I. RESUMEN

Durante la integración del Virus de Papiloma Humano (HPV) al genoma celular la región que involucra los genes E1 y E2 generalmente es destruida y en consecuencia, la proteína E2 no se produce. Si la proteína E2 está ausente, la transcripción de los oncogenes virales E6/E7 no está regulada induciendo la transformación celular. Se ha reportado que los genes E1/E2 se encuentran íntegros en la mayoría de los carcinomas positivos para las variantes Asiático-Americanas (AA) y en algunos con variantes Europeas (E) del HPV16. Esto sugiere que la desregulación de la transcripción de los oncogenes E6/E7 en estos tumores se lleva a cabo por mecanismos alternos a la integración. En México, las variantes AA a diferencia de las E se han asociado a una mayor incidencia de cáncer cervical. Esta mayor oncogenicidad puede ser resultado de diferencias en la regulación de la transcripción de los oncogenes E6/E7 por las proteínas E2 o bien, por la inactivación de la función de las proteínas E2 de estas variantes.

En este trabajo se investigó si la mayor oncogenicidad de las variantes AA está asociada a las diferencias en la transcripción de los oncogenes E6/E7 y/o al mecanismo de desactivación de la proteína E2. Se exploró la presencia de transcritos para los genes E6/E7 y E1/E2 mediante la técnica de Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de Polimerasa (RT-PCR) en 53 muestras de cáncer cervical positivas para HPV16, 39 con los genes E1/E2 retenidos (20 E y 19 AA) y 14 con los genes deletados (12 E y 2 AA). La actividad de represión de la transcripción de los genes E2 de las variantes AA fue analizada en líneas celulares que expresan constitutivamente el gen reportero β -galactosidasa o los genes E6/E7 guiados por la Región Larga de Control (LCR) viral. Los transcritos E6/E7 fueron detectados en todos los carcinomas. Los transcritos de E2 solo se detectaron en los tumores positivos para variantes AA con los genes E1/E2 retenidos. Se observó que los transcritos E2 de los tumores positivos para variantes E con los genes E1/E2 retenidos fueron regulados por "splicing" alternativo y que los genes E2 de las variantes AA no reprimieron la transcripción de los oncogenes E6/E7 *in vivo*. Los resultados obtenidos sugieren que en las variantes E es necesario que el gen E2 sea destruido o regulado por "splicing alternativo", en tanto que, en las variantes AA la función de la proteína E2 está disminuida debido a la presencia de mutaciones. Lo anterior sugiere que la expresión de E6/E7 inicia más tempranamente en infecciones con variantes AA en comparación con las infecciones con variantes E y en consecuencia, las variantes AA podrían ser más oncogénicas que las E.

II. INTRODUCCION.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es un problema importante de salud pública, ya que en el ámbito mundial es el segundo cáncer más común entre las mujeres. En México es el cáncer más frecuente entre la población femenina, su incidencia es de 50 casos por 100,000 mujeres, y se detectan 16,000 nuevos casos al año (Lazcano-Ponce et al., 1999 y Secretaría de Salud, 1999).

Se conocen más de 40 tipos de Virus de Papiloma Humano (HPV, por sus siglas en inglés) que infectan el tracto genital (Hildesheim y Wang, 2002) y de ellos más de 20 se asocian con la patogénesis del cáncer cervical.

En la mayoría de los estudios a nivel mundial se ha encontrado la presencia de algún tipo de HPV en más del 95% de los tumores invasores del cérvix, predominando el tipo 16 (Bosh y cols., 1995; Berumen et al, 1994; Hernández et al., 1997).

A pesar de su variabilidad, los virus de papiloma, comparten una organización genómica similar, aunque con diferencias tanto en las funciones de sus genes virales individuales como en la regulación de los mismos. Estos virus tienen forma icosaédrica y contienen un genoma circular de DNA de doble cadena. Este se encuentra formado por tres regiones: 1) La región larga de control (LCR), en la cual se encuentran codificadas las secuencias que controlan la replicación y la expresión genética del virus; 2) una región temprana (denominada E) que es la que codifica para las proteínas virales involucradas en la replicación del DNA (proteínas E1 y E2), en la regulación de la transcripción (E2), en la ruptura de citoqueratinas citoplásmicas (E4) y en la transformación celular (E5, E6 y E7); y, 3) una región

tardía (denominada L) que codifica para las proteínas de la cápside viral (denominadas L1 y L2). Las proteínas más estudiadas son: la E6, E7 y E2. Las dos primeras se consideran responsables del inicio y mantenimiento del proceso de transformación maligna y la última por estar involucrada en la represión de la expresión de los oncogenes E6 y E7.

Los virus de papiloma humano fueron clasificados de acuerdo a la comparación de su genoma con un grupo de referencia (de Villiers et al., 1989) y actualmente se ha confirmado la existencia de variantes de HPV. Se han identificado seis ramas filogenéticas para el HPV16 distribuidas diferencialmente en los cinco continentes (Ho et al., 1993 y Yamada et al., 1997). Estas variantes se encuentran distribuidas geográficamente de la siguiente manera: Asiático-Americanas (AA) en Centro y Sudamérica, España y Sudeste de Asia; Africanas (Af) en África; Asiáticas (As) en el Sudeste de Asia y Europeas (E) en todas las regiones excepto en África.

Algunas de las variantes de HPV16 se han asociado con lesiones de alto grado y cánceres histológicamente más agresivos (Zehbe et.al, 1998; Xi et.al., 1997; Stoppler et.al., 1996 y Ellis et al., 1995). Diversos estudios realizados en Norteamérica y América Latina han demostrado claramente la existencia de un patrón de riesgo asociado a infección con variantes de HPV16 no europeas. Cuando se comparan individuos infectados con variantes de HPV16 no europeas con individuos infectados con variantes europeas, se encuentra que, la infección con variantes no europeas se asocia a un riesgo de 2 a 9 veces mayor para el desarrollo de cáncer cervical (Berumen et al., 2001; Hildesheim et al., 2001 y 2002). Un estudio

realizado en Asia muestra que también las variantes asiáticas confieren un mayor riesgo que las variantes europeas para el cáncer de cérvix (Matsumoto et al., 2000). En México, se ha reportado que cerca de la cuarta parte de los casos de cáncer cervical pueden ser atribuidos a la presencia de variantes Asiático-Americanas (AA) del HPV16, principalmente las subclases AA-a y AA-c (Berumen et al., 2001). Las variantes AA se consideran más oncogénicas que las europeas debido a que en un estudio de casos y controles, se observó que éstas confieren un riesgo 9 veces mayor para cáncer cervical que las variantes Europeas (Berumen et al., 2001). Asimismo, otro estudio mostró que las variantes no Europeas (incluyendo las AA), confieren un riesgo 4.5 veces mayor que las variantes Europeas para el desarrollo de lesiones intraepiteliales de alto grado (Xi et al., 1997).

Debido a que se ha detectado que en la mayoría de las líneas celulares derivadas de cáncer cervical el genoma del HPV frecuentemente se encuentra integrado al DNA celular (Schneider-Maunoury et al., 1987), se ha propuesto que la integración viral puede ser el proceso mediante el cual se acelera el tránsito de una lesión preinvasora a cáncer invasor. Durante el proceso de integración al genoma celular, el DNA viral frecuentemente se abre en la región donde se localizan los genes E1 y E2. Esto provoca que la proteína E2 no se produzca y como resultado se presente un aumento en la expresión de los oncogenes E6 y E7 y por consiguiente se estimule la oncogénesis. (Romanczuk y Howley, 1992). Sin embargo, la habilidad de E2 para reprimir la transcripción de E6 y E7 ha sido demostrada solo en células con el DNA viral integrado, esto es, en células en donde el ciclo viral ha sido interrumpido, pero no en células que contienen al virus

III. JUSTIFICACIÓN.

La mayor oncogenicidad de las variantes AA puede ser el resultado de un incremento en la actividad neoplásica intrínseca de los oncogenes E6/E7, de una mayor eficiencia en la replicación viral, de una mejor estimulación de la expresión de los oncogenes o bien, de diferencias en la regulación de la transcripción de los oncogenes E6/E7 debida a la proteína E2. Se ha observado que la proteína E6 de la variante AA-a (aislado 512) produce consistentemente colonias más resistentes a diferenciación por suero y calcio en cultivos de keratinocitos y estimula la degradación de p53 mucho más que la proteína E6 de las variante E (Stoppler et al., 1996). Además, se ha reportado que la actividad del promotor p97 en las variantes AA es de 1.7 (AA-a) a 3.3 (AA-c) veces mayor que el virus E de referencia, sugiriendo una mayor expresión de los oncogenes (Veress et al., 1999, Kammer et al., 2000). Por otra parte, en carcinomas cervicales positivos para las variantes AA, el número de copias virales de DNA es mucho mayor que en las variantes E, lo cual sugiere que en las variantes AA la replicación es mayor que en las E (Casas et al., 1999).

En las variantes Europeas, la transcripción de los oncogenes E6 y E7 es reprimida por la proteína E2, y frecuentemente es des-regulada por la destrucción de E2 durante la integración viral (Schwarz et al., 1985; Schneider-Maunoury et al., 1987; Wilczynski et al., 1988; Cullen et al., 1991). En contraste, el gen E2 se encuentra completo en la mayoría de los carcinomas positivos para variantes Asiático-Americanas (Casas et al., 1999) y en una parte de los tumores positivos para variantes Europeas. Esto sugiere la existencia de mecanismos alternativos a

la ruptura de E2, que originan el incremento en la transcripción de los oncogenes virales tales como: las diferencias en la actividad transcripcional de los oncogenes E6 y E7 y la inactivación de la función de la proteína E2 de estas variantes.

IV. OBJETIVOS.

General:

Conocer sí la mayor oncogenicidad de las variantes AA está asociada a las diferencias en la transcripción de los oncogenes E6/E7 y/o a la inactivación de la proteína E2 de éstas variantes.

Específicos:

- a) Analizar la expresión de los genes E6/E7 y E1/E2 en carcinomas cervicales positivos para las variantes Asiático-Americanas y Europeas mediante RT/PCR.
- b) Determinar si el número de copias virales de DNA se correlaciona con el número de copias virales de RNA en las muestras en estudio, utilizando captura de híbridos.
- c) Determinar el estatus del genoma viral mediante "Southern blot", en las muestras positivas para E1/E2 por PCR.
- d) Analizar sí las proteínas E2 provenientes de las variantes AA-a y AA-c reprimen la transcripción de los oncogenes virales E6/E7 en líneas celulares C33a y HaCat mediante transfección y de ensayos β -galactosidasa. Y mediante transfección y captura de híbridos en las líneas SiHa y HeLa.
- e) Analizar sí existen diferencias en la actividad apoptótica de E2 entre las variantes E y AA, mediante la técnica de TUNEL medida por citometría

de flujo y microscopia confocal en células SiHa y HeLa transfectadas con los genes E2 de cada variante.

V. MATERIAL Y METODOS.

Diseño General.

Se detectaron los transcritos de las regiones E6/E7 y E1/E2 mediante la técnica de transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT/PCR) en 53 biopsias de cáncer cervical positivas para HPV16. De estas muestras, 39 presentaron retenidos a los genes E1/E2 (20 positivos para variantes E y 19 para AA) y 14 negativos para estos genes (12 E y 2 AA). Se determinó la correlación del número de copias virales de DNA con el número de copias virales de RNA, en 26 tumores (20 positivos y 6 negativos para los genes E1/E2) mediante la técnica de captura de híbridos. Se analizó el estatus del genoma viral mediante la técnica de "Southern blot" de 11 muestras positivas para E1/E2.

Se exploró la actividad represora de las proteínas E2 asiático-americanas sobre la transcripción de los oncogenes E6/E7 de dos líneas celulares negativas para HPV (C33a y HaCat) transfectadas en forma estable utilizando como gen reportero el gen que codifica para la β -galactosidasa bajo el control de la región reguladora del HPV16; en una línea positiva para HPV16 (SiHa) y mediante ensayos de transfección transitoria con los diferentes genes E2 en una línea positiva para HPV18 (HeLa) .

Finalmente, se analizó la actividad de las diferentes proteínas E2 sobre la apoptosis celular en las líneas celulares SiHa y HeLa, mediante la transfección de los genes E2 y la técnica de TUNEL (marcaje con dUTP-Rodamina del extremo terminal mediante deoxinucleotidiltransferasa). La intensidad de la señal fue medida por citometría de flujo y microscopia confocal.

Muestras biológicas.

Se utilizaron 53 muestras de pacientes que fueron tipificadas y analizadas para la presencia de los genes E1/E2 del HPV16 en un estudio previo (Berumen et al., 2001).

Análisis de transcritos de los genes E6/E7, E1/E2 y E6-E2 por la técnica de RT-PCR.

El RNA total fue purificado con la técnica de Trizol (Invitrogene) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Antes de realizar el procedimiento de transcripción reversa, el RNA fue tratado con DNasa I. Para la reacción de RT-PCR se utilizó 1µg del RNA total el cual fue retro-transcrito utilizando el kit comercial "GeneAmp RNA PCR kit" de Perkin-Elmer en una reacción final de 20 µl que contenía: 5 mM MgCl₂, 1X PCR "buffer" (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3), 1 mM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 mM inhibidor de RNasas, 2.5 µM de hexámeros al azar y 1U de transcriptasa reversa. La reacción fue realizada a 42°C por 15 min y se inactivó a 95 °C por 5 min. Cinco microlitros de la reacción fueron amplificados por PCR, en la siguiente mezcla de reacción: 2 mM MgCl₂, 1X PCR buffer, 1 µM de cada oligonucleótido y 2.5 U de Amplitaq DNA polymerasa (Perkin-Elmer). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador "DNA GeneAmp PCR System 9600" (Applied Biosystems) de la siguiente manera: un ciclo inicial de desnaturalización de 2min a 94°C seguido por 40 ciclos con desnaturalización de 94 °C por 30seg, 60°C por 60seg y 72°C por 60seg y, un ciclo final de extensión a 72°C

por 7min. De acuerdo a la temperatura de alineamiento (Tm) de los oligonucleótidos utilizados se fijó la temperatura de alineamiento en cada reacción de amplificación.

Como un control de estabilidad del RNA utilizado se amplificó un transcrito para el gen de actina utilizando los oligonucleótidos publicados por Dodd et al, 1992.

La localización y secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar cada región se encuentra en la siguiente tabla y en la figura 2.

Tabla 1. Secuencia y posición de los oligonucleótidos utilizados para amplificar cada región.

GEN	NOMBRE DEL OLIGONUCLEÓTIPO	POSICIÓN	SECUENCIA 5'- 3'
E6/E7	F104 R858	104-123 858-838	ATGTTTCAGGACCCACAGGA TTATGGTTTCTGAGAACAGA
E1/E2 (incluyendo E4)	F856 R3467	856-876 3467-3447	TAATCTACCATGGCTGATCC AGTCGTCTGTGTTTCTTCGG
E1/E2 (sin E4)	F856 R2865	856-876 2865-2845	TAATCTACCATGGCTGATCC GCGCATGTGTTTCCAATAGT
E2 (sin E4)	F2975 R3124 F3192 R3624	2975-2994 3124-3105 3192-3211 3624-3605	GAACTGCAACTAACGTTAGA TCCATCAAACCTGCACTTCCA CTGTGGTAGAGGGTCAAGTT TGACTATGGGTGTAGTGTT
E2C	F1244 R3467	1244-1263 3467-3447	TTGAAAGCGAAGACAGCGGG AGTCGTCTGTGTTTCTTCGG
E6-E2	F104 R3624	104-123 3624-3605	ATGTTTCAGGACCCACAGGA TGACTATGGGTGTAGTGTT
ACTINA	ACT1 ACTinv	1854-1874 2172-2152	ATCATGTTTGAGACCTTCAA CATCTCTTGCTCGAAGTCCA
Clonación E2	E2-Bam E2-Eco	2756-2784 3853-3825	AGC GGATCC ATGGAGACTCTTTGCCAACGTTTAAATG AGC GAATTC CATATAGACATAAATCCAGTAGACACT

Para confirmar la ausencia de contaminación con DNA humano en el RNA utilizado como templado, 2 µl de RNA de cada una de las muestras fueron utilizados en una reacción de PCR utilizando oligonucleotidos específicos para el gen de actina. Para descartar contaminación con DNA viral se exploró en paralelo el DNA obtenido de biopsia de placenta. Como control de sensibilidad de PCR se utilizó DNA de placenta (500ng) con 100 fg de DNA viral. Para confirmar que los productos de PCR obtenidos correspondían a las regiones en estudio (E6/E7 y E1/E2), éstos productos fueron transferidos a membranas de nylon para su hibridación tipo "Southern blot" bajo condiciones de astringencia severas (datos no presentados).

Finalmente, la identificación de los transcritos amplificados para cada región se realizó mediante la secuenciación directa de cada uno de los productos obtenidos por RT/PCR. Para ello se utilizó el método de secuenciación cíclica con dideoxinucleótidos fluorescentes utilizando el kit "BigDye Terminator Ready Reaction" de Applied Biosystems, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y se analizaron con un analizador genético "ABI PRISM 310" (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las que reportadas en el banco de datos de HPV publicado en 1997 (Los Alamos National Laboratory, NM).

Análisis de la actividad represora de la transcripción de las variantes de E2 del HPV16.

El gen E2 de cada una de las variantes (E y AA-a y AA-c), fue amplificado por PCR utilizando la enzima Pfu DNA polimerasa (Stratagene) con los oligonucleótidos específicos que E2-Bam y E2-Eco (5'-AGCGGATCCATGGAGACTCTTTGCCAAC

GTTTAAATG-3' y 5'- AGCGAATTCTCATATAGACATAAATCCAGTAGACT-3'; tabla 1) los cuales contienen el sitio de restricción para la enzima BamHI en el extremo 5' y el sitio EcoRI en el 3' (indicados en la secuencia).

Los genes E2 fueron amplificados del DNA genómico obtenido de las muestras MX68 (positiva para AA-a), MX70 (para AA-c) y del HPV16 de referencia para la variante E. La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera: 500 ng de DNA tumoral (ó 1 ng del HPV16 de referencia) fueron adicionados a un volumen final de 50 µl que contenían 30 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 200 µM de cada nucleótido (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) 1 µM de cada oligonucleótido, 100 ng/µl BSA y 1.0 U de enzima DNA polimerasa (Pfu, Stratagene). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador "GeneAmp PCR System 9600" de Applied Biosystems de la siguiente manera: 1 ciclo de desnaturalización de 30seg a 94 °C, seguido de 15 ciclos de 3 min a 94°C, 1.5 min a 54°C y 1.5min a 72°C. Se realizaron 25 ciclos adicionales en las mismas condiciones incrementando la temperatura de alineamiento a 58°C y una extensión final de 7min a 72°C. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados con dos extracciones de fenol-cloroformo y digeridos con las enzimas adecuadas (BamHI/EcoRI) y nuevamente purificados por gel utilizando "Quiaex II" (Qiagen). Los fragmentos obtenidos fueron clonados en los sitios BamHI y EcoRI del vector Bluescript SK+ utilizando 6U de T4 DNA ligasa (GIBCO BRL-Life Technologies) en una reacción de 20 µl con 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT y 5% polietilenglicol-8000, incubada en un baño de agua a 16°C por 16 hrs. Los vectores recombinantes fueron introducidos por transformación a la cepa de E. coli DH5α.

De las transformantes obtenidas, se tomaron 10 al azar y se purificó el DNA plasmídico con la técnica de “miniprep” utilizando el kit comercial SNAP de invitrogene. 2 μ l del DNA plasmídico fueron digesridos para confirmar el fragmento clonado correspondía con el tamaño esperado. Finalmente, de las clonas seleccionadas se realizó una subclonación de los genes E2 para cada una de las variantes (E, AA-a y AA-c) en el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen) en los sitios de clonación BamHI/EcoRI, generando los plásmidos p16E2/E, p16E2/AA-a y p16E2/AA-c, respectivamente (Figura 8a). Por otra parte, para los ensayos β -galactosidasa se utilizó el plásmido pLCR16- β -gal (donado por el Dr. Alejandro García Carrancá), el cual contiene completa la Región Larga de Control (LCR; nucleótidos 7036 al 103) del HPV16 de referencia, clonado río arriba del gen reportero β -galactosidasa, ambos insertados en el vector pc4-AUG vector (Thummel et al., 1988) (Figura 8a). Finalmente, todas las construcciones fueron verificadas por secuenciación.

Cultivo celular y transfecciones. Las líneas celulares C33a (proveniente de cáncer cervical, y negativa para HPV), HaCat (keratinocitos inmortalizados, negativos para HPV), SiHa (proveniente de cáncer cervical, positiva para HPV16) y HeLa (proveniente de cáncer cervical, positiva para HPV18) fueron cultivadas con el medio de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle’s Médium” (GIBCO BRL-Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (GIBCO BRL-Life Technologies) y 120 μ g/ml de penicilina y estreptomycin en una atmósfera de 5% de CO₂. Las células fueron sembradas 24 hrs antes de la transfección a una densidad de 7.5×10^5 células por caja de cultivo de 60 mm. Posteriormente fueron

co-transfectadas transitoriamente utilizando el método de fosfato de calcio (Guido et al., 1992) con 10 μ g de cada plásmido de HPV16 y 10 μ g del plásmido pQBI25-f que expresa a la proteína verde fluorescente (Q-Biogene). Después de 16 horas las células fueron lavadas con PBS y se les suministró medio fresco y 40 horas después de que las células fueron transfectadas se realizaron los experimentos correspondientes. El rango de la eficiencia de transfección fue de 50% a 70%, ésta fue medida por inmunofluorescencia. La línea C33a fue la que presentó la mayor eficiencia, seguida de HeLa, SiHa y HaCat sucesivamente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Transfecciones estables y ensayos β -galactosidasa. Para generar transfectantes estables se utilizaron las líneas C33a y HaCat. Las líneas fueron transfectadas con 10 μ g de plásmido pLCR16- β -gal y después de 40 hrs se inició la selección de transfectantes estables. Se adicionaron de 800 μ g/ml de geneticina (GIBCO BRL-Life Technologies) a los cultivos en cada cambio de medio durante dos meses. Las clonas estables fueron seleccionadas mediante dilución limitante en cajas de 96 pozos. Una vez que se obtuvieron las clonas, se realizaron los ensayos de expresión de la proteína β -galactosidasa para seleccionar aquellas clonas con la mayor expresión de la proteína, las cuales fueron denominadas β -C33 y β -HaCat. Posteriormente, estas clonas fueron transfectadas con los plásmidos de los genes E2 de cada una de las variantes (p16E2/E, p16E2/AA-a y p16E2/AA-c). Después de 40 hrs de transfección se obtuvo el extracto celular de ambas líneas. El extracto celular se obtuvo mediante 4 ciclos de congelamiento-calentamiento en un mezcla de 250 mM Tris-HCl pH 8.0, 15% glicerol y 5 mM DTT (Norton & Coffin, 1985). Las

proteínas obtenidas fueron cuantificadas por el método de Bradford (Bradford, 1976) para normalizar de acuerdo con la concentración de proteínas. A 50 μ l de extracto celular se le adicionaron 750 μ l de "buffer" de fosfatos (40 mM NaH₂PO₄, 60 mM Na₂HPO₄, 10 mM KCl y 1 mM MgCl₂) y a esta mezcla se le agregaron 200 μ l de una solución preparada en fresco con 4 mg/ml orthonitrofenil-galactosido (ONPG). La mezcla final fue incubada a 37°C hasta que la presencia de color amarillo fue obvia. Cuando el color amarillo fue evidente, la reacción fue detenida de inmediato colocando el tubo en hielo y agregando 500 μ l de 1M Na₂CO₃. La cantidad de ONPG hidrolizado fue determinada mediante espectrofotometría y la actividad específica de β -galactosidasa fue estimada con la formula:

$$\text{Unidades } \beta\text{-galactosidasa} = (A_{420} \times 380) / \text{min.}$$

Determinación del número de copias virales y el nivel de expresión de los genes E6/E7 mediante captura de híbridos.

La determinación del número de copias virales de DNA y de RNA se realizó mediante la detección de los transcritos para los genes E6/E7, E2 y β -actina mediante la técnica de captura de híbridos modificada para dicho fin. Se utilizó el "Kit HPV-Test Hybrid Capture II" (Digene), el cual se modificó, para detectar RNA utilizando sondas de DNA. Se generaron sondas de DNA para los genes E6/E7 de HPV16 y HPV18, para el gen E2 de HPV16 y para el gen β -actina humano mediante PCR (Berumen et al., 1994; Dodd et al., 1992). Se utilizó 1 μ g de RNA total extraído de las líneas celulares SiHa y HeLa así como de 26 muestras de

cáncer cervical, 20 E1/E2-positivas (10 AA y 10 E) y 6 E1/E2-negativas (todas positivas para variantes E) y 10 ng de cada una de las sondas. La sonda fue resuspendida en 75 μ l de solución de desnaturalización y se incubó a 65°C por 45 minutos. El RNA fue disuelto en 25 μ l de solución diluyente para la sonda. Ambas soluciones fueron mezcladas agitando por 3 minutos a 1100 rpm a 25 °C, posteriormente, se realizó la hibridación del RNA y la sonda mediante incubación por 60 minutos a 65°C. La reacción de hibridación fue transferida al plato de captura, se agitó a 1100 rpm por 60 minutos y se le agregaron los 75 μ l del reactivo de detección 1. El plato fue incubado por 30 minutos a 25°C y posteriormente fue decantado el reactivo 1 y lavado 6 veces con solución de lavado. Finalmente, se adicionaron 75 μ l de reactivo de detección 2, se incubó por 15 minutos e inmediatamente se midió la señal. La detección de la señal de híbridos fue medida con un luminómetro modelo DML-2000 (Digene). La expresión de los genes E6/E7 fue normalizada con la expresión del gen β -actina.

El número de copias virales de DNA se determinó midiendo el nivel de expresión de los transcritos E6/E7 de las células SiHa y HeLa transfectadas con los genes E2 de variantes AA. La cuantificación se realizó mediante captura de híbridos de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se utilizó una curva estándar de número de copias de DNA construida previamente (Berumen et al., 1994), para la cual se ocuparon los puntos que van de 1, 10, 50, 100, 500, 1000, 3000 y 10,000 copias medidos por la técnica de dot blot y confirmada con la captura de híbridos. Se realizó el análisis de regresión lineal para estos datos los cuales caen dentro de una ecuación de hipérbola ($r=0.98$, $p<0.001$) y el número de

copias/célula fue extrapolado en esta curva. La cantidad de RNA fue normalizada por la detección de transcritos para β -actina.

Ensayos de Apoptosis.

La inducción de apoptosis debida a E2 fue medida en las líneas celulares HeLa y SiHa por citometría de flujo y microscopía confocal usando la técnica de TUNEL (marcaje con dUTP-Rodamina del extremo terminal mediante deoxinucleotidiltransferasa). Para la citometría de flujo, se utilizaron las mismas condiciones de cultivo de células y transfecciones mencionadas en los ensayos de represión de E2. Cuarenta horas después de la transfección las células fueron lavadas con PBS y fijadas 1 hora con paraformaldehído al 4% a 22°C. Las células fueron permeabilizadas con una mezcla de PBS, 0.1% Triton X -100 y 0.1% de citrato de sodio e incubadas con 50 μ l de mezcla de enzima del TUNEL siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las células fueron analizadas con un citómetro de flujo FACScan de Becton-Dickinson. Las células que contenían el plásmido GFP (proteína verde fluorescente) fueron analizadas para apoptosis. Para la microscopia confocal, las líneas SiHa y HeLa se sembraron a una densidad de 2×10^4 células por pozo de cultivo en un portaobjetos (Lab-Tek, Naperville, Illinois) 4 horas antes de la transfección. Las co-transfecciones se realizaron utilizando 250 ng de cada plásmido en las mismas condiciones descritas anteriormente. 40 horas después, los pozos de cultivo fueron lavados con PBS, fijados, permeabilizados y analizados por la técnica de TUNEL de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las células teñidas fueron escaneadas en un microscopio confocal

(LSM-5 Pascal confocal láser scanning microscope de Carl Zeiss) ligado a un microscopio invertido Axiovert 200 M (Carl Zeiss). Para detectar la señal de la proteína verde fluorescente (GFP) se utilizó la línea de 488 nm para el láser de Argón, la señal de 543 nm para el láser de Helio–Neón fue usada para detectar la señal roja de TUNEL. La resolución de las imágenes fue de 1024 x 1024 píxeles (8 bits, 256 colores). Los experimentos fueron realizados independientemente por triplicado.

Análisis Estadístico.

Para los experimentos en los cuales se midió el número de copias de DNA y de RNA así como la actividad de E2, los resultados fueron expresados como la media \pm la desviación estándar y las pruebas estadísticas utilizadas fueron t de estudent o U de Mann-Whitney, de acuerdo al análisis requerido para grupo de datos y a las diferencias entre los mismos. En el caso de las diferencias en la frecuencia de detección de los transcritos se utilizaron las pruebas chi cuadrada o prueba exacta de Fisher. La asociación del número de copias de DNA con el número de copias de RNA fue medida mediante regresión lineal. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas sí la $p < 0.05$. El programa mediante el cual se realizaron las pruebas estadísticas fue el Sigma Stat y todas fueron de dos colas.

VI. RESULTADOS.

La presencia de transcritos correspondientes a los genes E6 y E7 (E6/E7) fue explorada mediante RT/PCR utilizando un oligonucleótido al inicio del gen E6 y otro al final del gen E7 (F104-R858; figura 2 y tabla 1). Se detectaron 4 transcritos diferentes con una longitud de 754, 571, 454 y 238 pb (figura 3A). Los tres primeros corresponden a los reportados previamente en la literatura (Doorbar et.al., 1990; Sherman et.al., 1992), y son los denominados E6,E7 (el cual no presenta "splicing"); E6*I,E7 ("splicing" del nucleótido 226 al 409) y el E6*II,E7 (el "splicing" va del nucleótido 226 al 526), respectivamente, ver figuras 2, 3A y 3C. El cuarto transcrito de 238pb se describe por primera vez en este trabajo y presenta "splicing" del nucleótido 226 al 742 (figuras 2Q, 3A y 3C). Este fue denominado E6^E7, ya que codifica para una proteína de fusión de 79 aminoácidos, de los cuales 41 provienen de la proteína E6 y los restantes 38 de la proteína E7. En los 53 tumores analizados se detectaron uno o varios de estos transcritos independientemente de la presencia de los genes E1 y E2 (E1/E2). El transcrito E6*I,E7 se detectó en 48 de las 53 muestras exploradas (90.6%; Tabla 2) y fue el más frecuente. Mientras que los transcritos E6,E7; E6*II,E7 y el E6^E7 se detectaron sólo en 66.0%, 60.4 y 32.1%, respectivamente (tabla 2).

El transcrito más frecuente en las muestras positivas para los genes E1/E2 fue el E6*I,E7 (97.4%), el cual solo se encontró en el 71.4% ($p=0.014$, prueba exacta de Fisher; Tabla 2) de las negativas.

HPV16

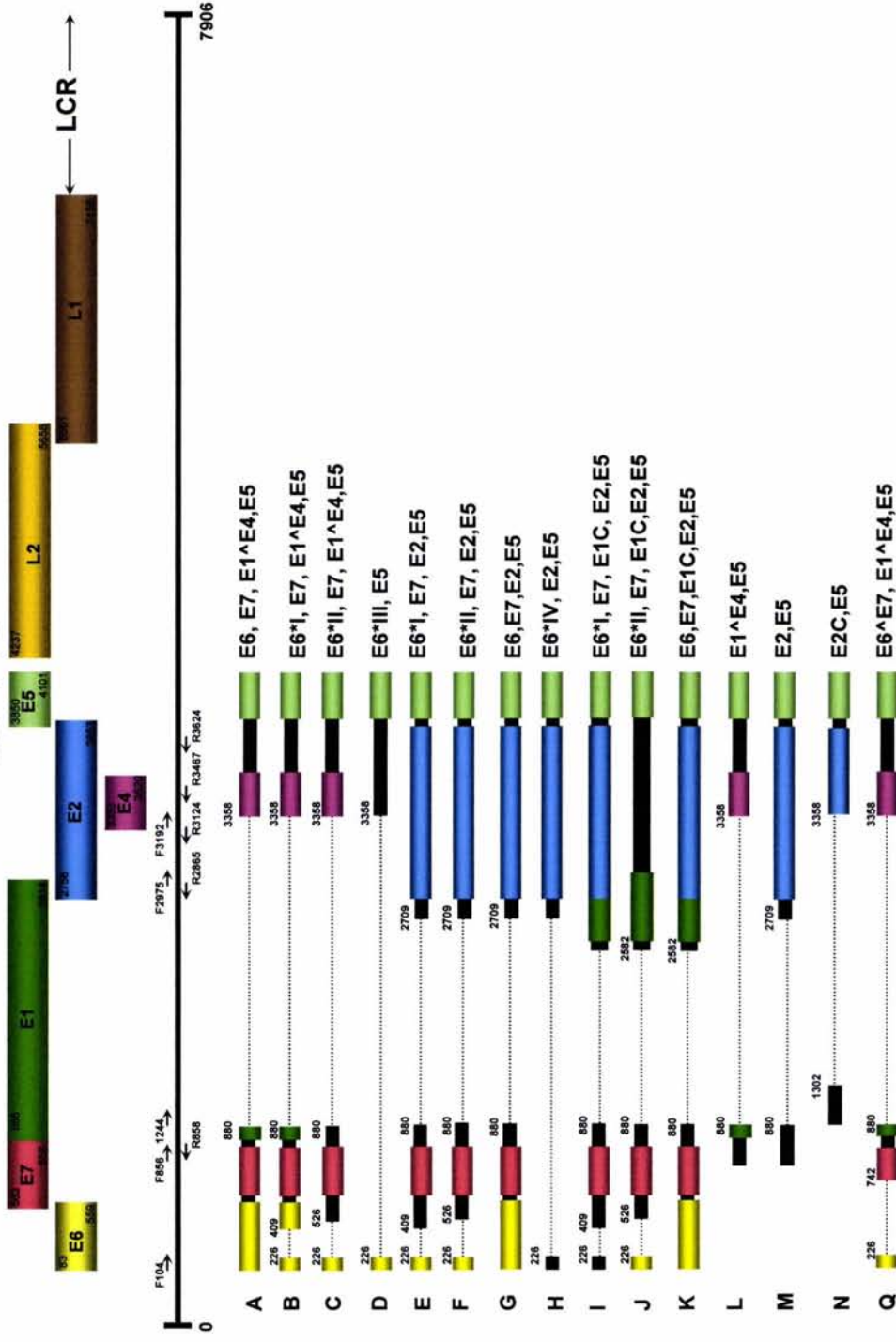


Figura 2. Mapa del genoma y transcritos del HPV16 de referencia. La figura muestra el mapa genómico (panel superior) y la representación esquemática de los transcritos reportados para la región temprana (panel inferior) del HPV16 de referencia. El mapa genómico muestra los marcos de lectura abierta (ORF) para cada gen representados por rectángulos. En la representación esquemática de los transcritos, los rectángulos a color representan las regiones traducidas, las líneas punteadas negras las regiones que se pierden por el "splicing" y los rectángulos negros las regiones que no se pierden por "splicing" pero que no codifican. Las flechas representan la posición de los oligonucleótidos usados para "splicing" y secuenciar cada transcrito. El nombre de cada transcrito o especie es listada a la derecha de cada esquema. Los transcritos están nombrados de acuerdo a la base de datos de HPV de 1996 (Los Alamos National Laboratory, NM) y solo fue incluido un transcrito no reportado anteriormente, el cual fue denominado E6^E7, E1^E4, E5.

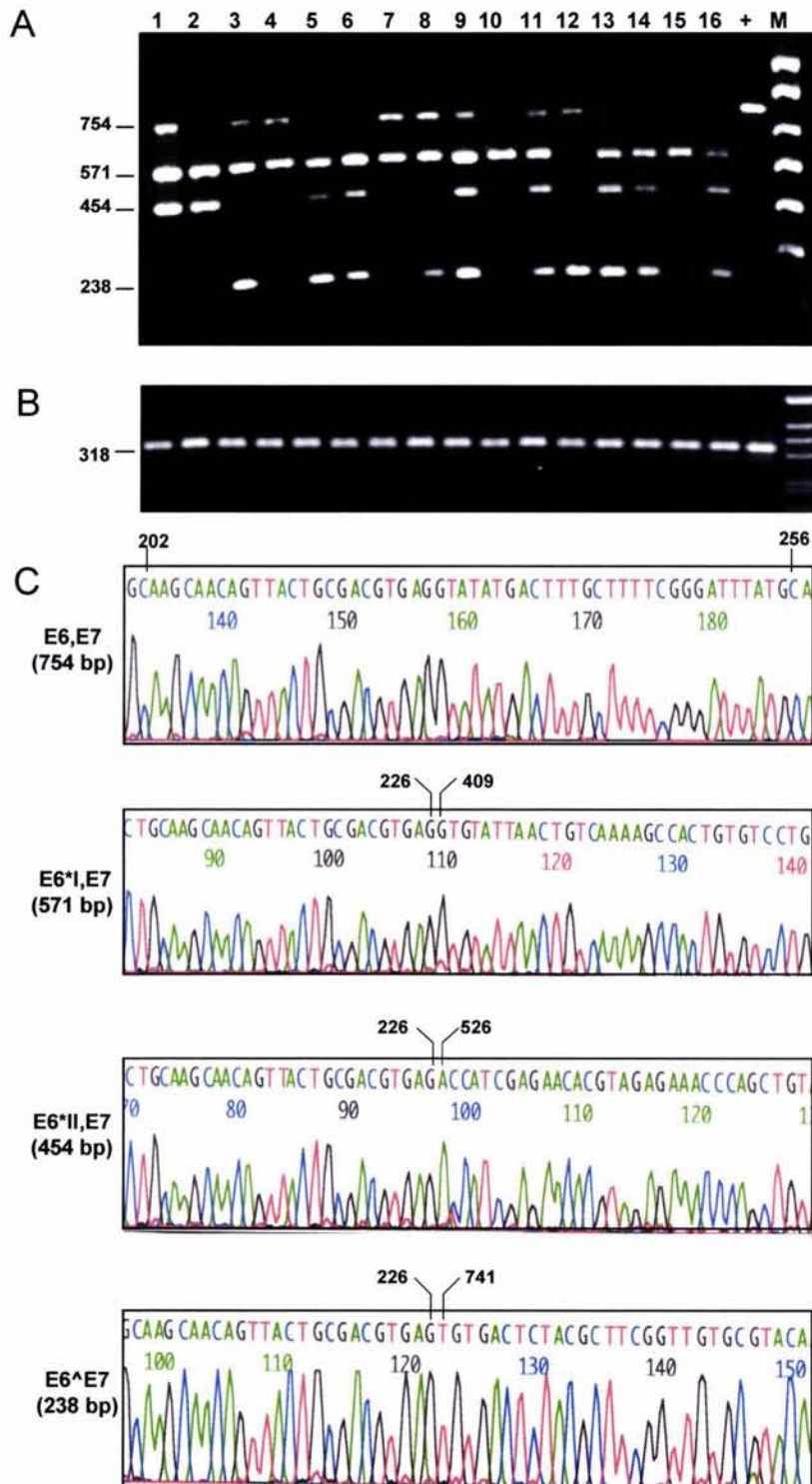


Figura 3. Expresión de los genes E6/E7 de carcinomas cervicales positivos para HPV16 con la región E1/E2 completa explorada por RT-PCR. Panel A. muestra los transcritos para los genes E6/E7 de 16 muestras representativas de carcinomas cervicales. Carriles 1-4: carcinomas positivos para las variantes Europeas y los carriles 5-16 para Asiático-Americanas. Los transcritos fueron amplificados con los oligonucleótidos F104 y R858. Panel B. Muestra el transcrito de β -actina para cada una de los carcinomas del panel A. Panel C. Muestra un fragmento de las secuencias realizadas para confirmar cada uno de los transcritos para E6/E7 mostrados en el panel A. +, es el control positivo de PCR y M, es el marcador de peso molecular de 1Kb plus.

No se observó diferencia en los transcritos E6/E7; E6*I/E7 y E6*II/E7 entre las muestras positivas para variantes AA y E (tabla 2). Sin embargo, la frecuencia del transcrito E6^E7 si mostró diferencias ya que éste se detectó principalmente en las muestras positivas para las variantes AA (66.7%) y solo en el 9.4% de las muestras positivas para las variantes E ($p < 0.001$, prueba chi cuadrada; Tabla 2).

Tabla 2

Frecuencia de transcritos para los genes E6/E7 en muestras de cáncer cervical positivas para HPV16 clasificados por clases virales y estado de los genes E1/E2.

Grupos	n	Transcritos para los genes E6/E7			
		Frecuencia (%)			
		E6,E7	E6*I,E7	E6*II,E7	E6^E7
Estado de E1/E2					
Positivo	39	26 (66.7)	38 (97.4) ^b	25 (64.1)	15 (38.5)
Negativo	14	9 (64.3)	10 (71.4) ^c	7 (50.0)	2 (14.3)
Clases virales					
AA	21	14 (66.7)	19 (90.5)	12 (57.1)	14 (66.7) ^d
E	32	21 (65.6)	29 (90.6)	20 (62.5)	3 (9.4) ^e
Total ^a	53	35 (66.0)	48 (90.6)	32 (60.4)	17 (32.1)

a. Los 53 tumores explorados mostraron uno o varios transcritos para E6/E7.

b vs. c: $p = 0.014$, prueba exacta de Fisher; d vs. e: $p < 0.001$, prueba chi cuadrada.

Dado que la retención de E1/E2 esta directamente asociada con el número de copias (Berumen et al., 1994), se exploraron adicionalmente las diferencias cuantitativas en la expresión de los genes E6/E7 entre los grupos. El número de copias de transcritos de E6/E7 y el número de copias de DNA viral fueron cuantificados utilizando el método de captura de híbridos en 20 muestras positivas y en 6 negativas para los genes E1/E2. Nuestros resultados indican que todas las muestras positivas para E1/E2 tienen un alto

número de copias de transcritos de E6/E7 y el promedio (1352 ± 636.5) fue 13.8 veces mayor que el promedio para las negativas (98.3 ± 45.4 ; tabla 2; $p=0.001$, prueba U de Mann-Whitney). En las muestras positivas para AA el promedio del número de copias de transcritos de E6/E7 fue 2.1 veces mayor (1563 ± 682) que en los tumores positivos E (750.6 ± 669.3 ; $p=0.006$, t de student). Sin embargo, esta diferencia desaparece cuando los tumores se clasificaron de acuerdo a la presencia o ausencia de E1/E2 ($p=0.14$, t de student; Tabla 3). Interesantemente, analizando la población total de carcinomas explorados ($n=26$; figura 4) se encontró una correlación positiva, estadísticamente significativa ($r=0.96$, $p<0.001$; regresión lineal), entre el número de copias de transcritos de E6/E7 y el número de copias del DNA viral.

Tabla 3

Número de copias virales (DNA y RNA) en carcinomas positivos para HPV16 clasificados por estatus de los genes E1/E2 y por variantes virales.

Grupos	Número de Copias Virales/Célula		
	Media \pm Desviación Estándar (n)		
	E1/E2+	E1/E2-	Total
E6/E7-DNA			
E	$146.3 \pm 67.4 (10)^a$	$14.2 \pm 6.8 (6)$	$96.8 \pm 84.3 (16)^e$
AA	$215 \pm 95.4 (10)^b$	N.E.	$215 \pm 95.4 (10)^f$
Ambas	$180.7 \pm 87.8 (20)^c$	$14.2 \pm 6.8 (6)^d$	
E6/E7-RNA			
E	$1142 \pm 540 (10)^g$	$98.3 \pm 45.4 (6)$	$750.6 \pm 669.3 (16)^k$
AA	$1563 \pm 682 (10)^h$	N.E.	$1563 \pm 682 (10)^l$
Ambas	$1352 \pm 636.5 (20)^i$	$98.3 \pm 45.4 (6)^j$	

AA= variantes Asiático-Americanas. E= variantes Europeas. N.E.= No explorados
 c vs. d, $p<0.001$, U de Mann-Whitney; e vs. f, $p=0.003$, t de student; a vs. b, $p=0.079$, t de student;
 i vs. j, $p=0.001$, U de Mann-Whitney; k vs. l, $p=0.006$, t de student; g vs. h, $p=0.14$, t de student

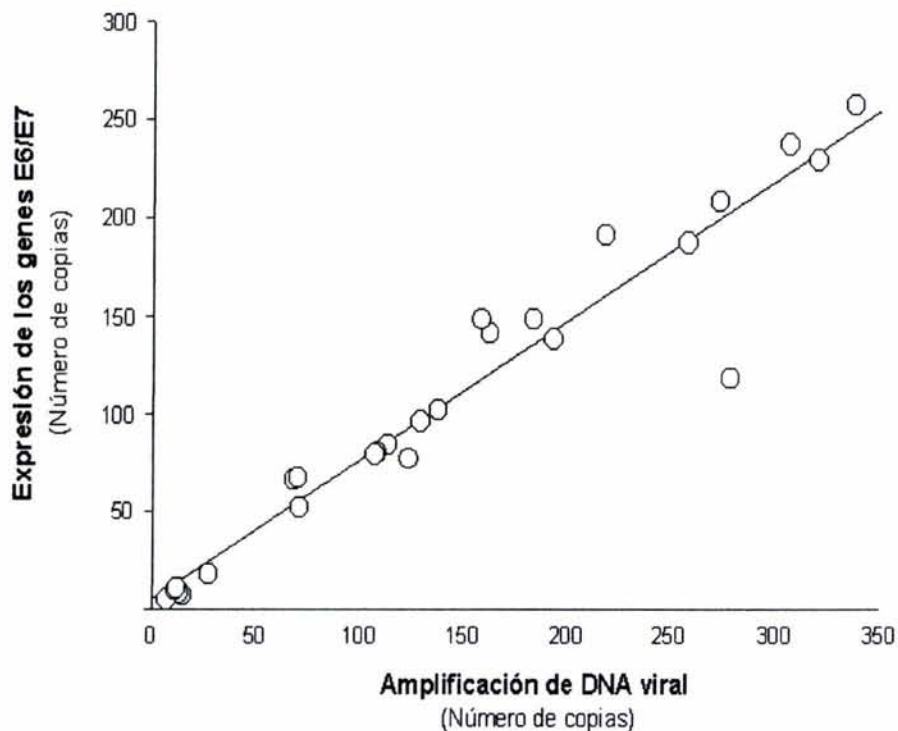


Figura 4. Correlación Lineal entre el nivel de expresión de los genes E6/E7 y el número de copias del DNA viral. Se muestra la correlación lineal entre el nivel de transcritos de E6/E7 y el número de copias virales de DNA en 26 carcinomas de los 53 en estudio ($r=0.96$, $p<0.001$; regresión lineal). Ambas mediciones se realizaron mediante captura de híbridos en ensayos por triplicado.

Para determinar si el gen E2 presente en las muestras tumorales es expresado, se realizó la detección de los transcritos reportados para la región E1/E2 (E1^{E4}, E2, E1C y E2C; figura 2). En las muestras negativas para los genes E1/E2 ($n=14$) no se detectó ninguno de los transcritos anteriormente mencionados, en tanto que, en las muestras positivas para estos genes ($n=39$) se detectaron uno o varios de los transcritos generados por la región E1/E2. Cuando se amplificaron los transcritos para la región E1/E2 completa utilizando un oligonucleótido al inicio del gen E1 (F856)

y otro la final del gen E2 (R3467; figura 2), se obtuvo únicamente una banda de 133 pb (figura 5, línea a), la cual después de haber sido secuenciada se identificó como el transcrito E1^{E4}. Este transcrito contiene una región de "splicing" que va del nucleótido 881 al 3357 (figuras 2 y 5B), y codifica para la proteína E4. Este transcrito se detectó en todas las muestras positivas para ambas variantes (E o AA). Debido a que con los oligonucleótidos utilizados sólo se detectaba el transcrito E1^{E4}, fue necesario amplificar una región en donde no fuera posible que el transcrito E1^{E4} interfiriera. Se utilizó un par de oligonucleótidos que van del nucleótido 2975 hasta el 3124 (figura 2), que corresponde a la región 5' del gen E2 e interesantemente en todas las muestras positivas para AA se obtuvo un producto de 149 pb (figura 5A, línea b y 5B) que corresponde al transcrito esperado, en tanto que ninguno de los carcinomas positivos para la variante E mostró este transcrito ($P < 0.001$, chi cuadrada). Dado que el transcrito de 149 pb puede ser parte de cualquiera de los ocho diferentes transcritos policistrónicos (E, F, G, H, I, J, K y M; figura 2) que pueden dar origen a la proteína E2, tres de los cuales (I, J y K) contienen un fragmento 3' del gen E1 (E1C). Para saber exactamente que transcritos de E2 se detectaban, se utilizó entonces la región que comprendida entre el nucleótido 856 al 2865, la cual correspondía al extremo 5', pero que incluía los sitios de splicing de los transcritos de E2 (figura 2). Se detectaron 2 transcritos; uno de 307 pb, que corresponde al denominado E1C,E2 (figuras 2I, 2J, 1K, 5A línea c y 5B) y el otro de 180 pb denominado E2 (figuras 2E, 2F, 2G, 2H, 2K, 5A línea c y 5B). Ambos transcritos fueron detectados en todas las muestras positivas para las variantes AA, pero no en las muestras positivas para las variantes E.

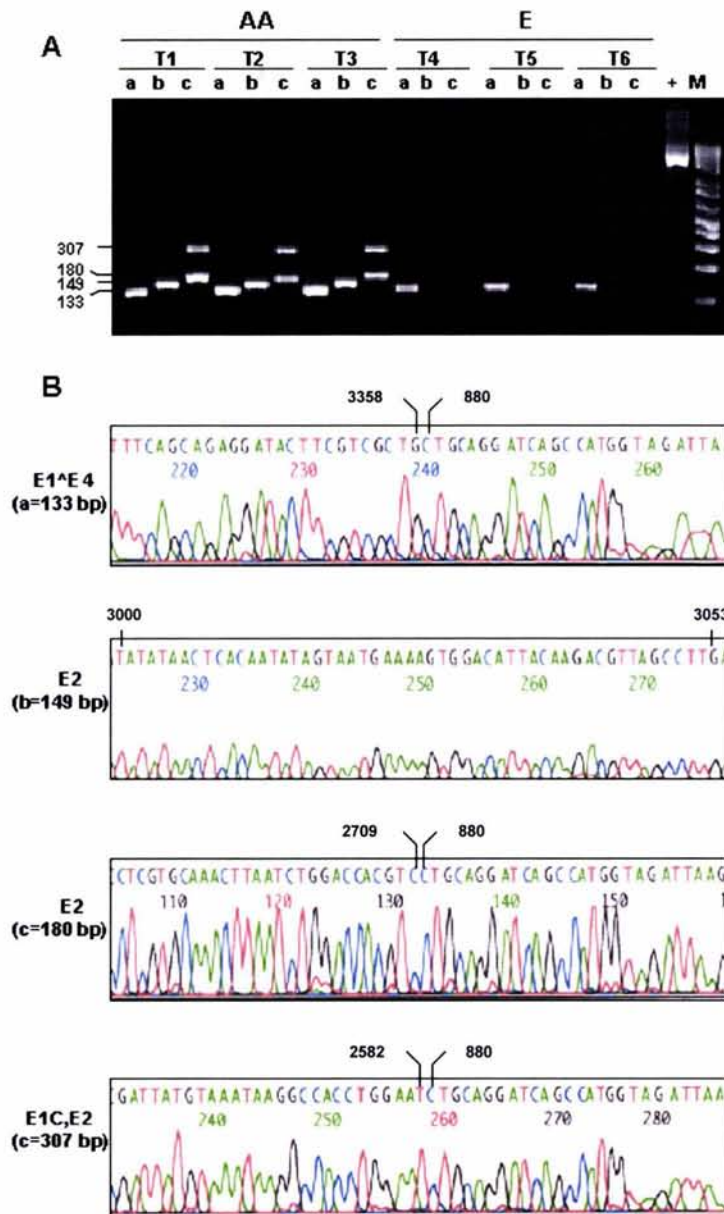


Figura 5. Expresión de la región E1/E2 de carcinomas positivos para HPV16 que mantienen retenida esta región. Panel A. muestra los transcritos para los genes E1/E2 detectados por RT-PCR en 6 carcinomas cervicales positivos para variantes AA (T1, T2 y T3) y para variantes E (T4, T5 and T6). La banda de 133 pb corresponde al transcrito E1^ΔE4, la banda de 149 pb es el transcrito de la región 5' de E2 y las de 180 pb y 307 pb corresponden a los transcritos E2 y E1C,E2, respectivamente. Panel B. Muestra las secuencias de cada uno de los transcritos detectados en el panel A. +, es el control positivo de PCR y M es el marcador de peso molecular 1kb plus.

Para determinar si las diferencias en la expresión del gen E2 entre los carcinomas positivos para las variantes AA y E se deben a diferencias en el estatus del genoma viral, se analizaron 11 de los 39 carcinomas positivos para los genes

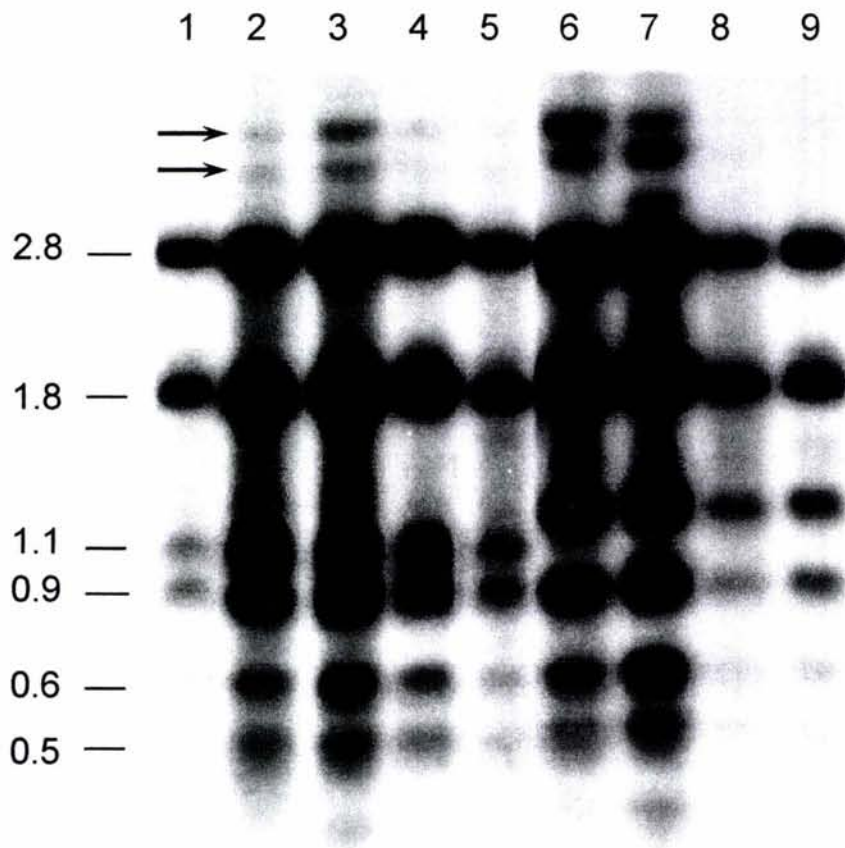


Figura 6. Análisis del estatus del DNA genómico de las variantes Europeas y Asiático-Americanas del HPV16 en carcinomas positivos para para la región E1/E2. La figuramuestra la intensidad de señal y el patrón de restricción de las enzimas PstI y BamHI en 9 muestras de cancer cervical hibridadas con una sonda de DNA de HPV16 mediante Southern-blot. Se observó una banda de 2.8 kb, la cual corresponde a la región E1/E2. Los carcinomas 1-5 son positivos para las variantes E y los 6-9 para variantes AA. Los carriles 2, 3, 4, 6 y 7 presentaron bandas extras (indicadas con flechas) de tamaño mayor al esperado y sugieren un patrón de integración en tandém . Los carriles 1, 5, 8 y 9 muestran un patrón episomal. El tamaño de las bandas obtenido al digerir con PstI/BamHI el HPV16 se indica del lado izquierdo en kilobases.

E1/E2 mediante la técnica de "Southern blot" (SB), 5 muestras positivas para variantes E y 6 para las variantes AA (9 de ellas se muestran en la figura 6). Los 11 tumores analizados contienen los genes E1/E2 intactos (figura 6; banda de 2.8-Kb) y mostraron el patrón de restricción PstI/BamHI que corresponde al HPV16 no integrado. Sin embargo, 7 de ellos (3 positivas para E y 4 para AA) presentaron bandas adicionales con tamaños superiores a 2.8 Kb (figura 6; carriles 2, 3, 4, 6 y 7) lo que indica que el genoma viral se encuentra integrado en tandém o bien como un episoma multimérico. Los restantes 4 (2 E y 2 AA) mostraron patrones episomales monoméricos (carriles 1, 5, 8 y 9 en la Figura 6). Además, se observó que los 11 tumores analizados tuvieron más de 50 copias virales por célula. Estos datos indican claramente que en los tumores analizados no hay diferencias en el estatus del genoma viral entre las variantes AA y E y en consecuencia las diferencias en la expresión del gen E2 no podrían ser explicada por este factor.

Debido a que los transcritos de E6/E7 presentes en los tumores positivos para E1/E2 no necesariamente provienen de células que contienen los genes E1/E2 intactos. La habilidad para amplificar E1/E2 por PCR no excluye la presencia de formas virales integradas con los genes E1/E2 destruidos en algunas células. De hecho, tumores positivos para E1/E2 pueden contener células con los genes completos y células con los genes incompletos o interumpidos (Berumen et al., 1995). Para determinar si los transcritos E6/E7 y E1/E2 provienen del mismo genoma viral (como parte de la región temprana completa) se exploraron 7 muestras que contenían los genes E1/E2 completos (1 AA y 6 E) utilizando un par de oligonucleótidos localizados al comienzo del gen E6 (F104) y al final de E2 (R3624, figura 2). Todas las

muestras analizadas presentaron transcritos compuestos de las regiones E6/E7 y E1/E2 (figura 7A). Se detectaron seis transcritos diferentes en las muestras estudiadas, 5 de los cuales ya han sido reportados y corresponden a los transcritos policistrónicos conocidos en la literatura como E6,E7,E1^E4 (figuras 2A y 7A producto de 1042 pb); E6*IV,E2 (figuras 2H y 7A producto de 1037 pb); E6*I,E7,E1^E4 (figuras 2B y 7A producto de 859 pb); E6*II,E7,E1^E4 (figuras 2C y 7A producto de 742 pb); E6*III (figuras 2D y 7A producto de 388 pb) y E6^E7 y E1^E4 (figuras 2Q y 7A producto de 527 pb). Este último no ha sido descrito previamente y contiene el híbrido E6^E7. Estos datos indican que los transcritos de los genes E6/E7 provenían del mismo genoma viral y que además mantenían el gen E2 intacto.

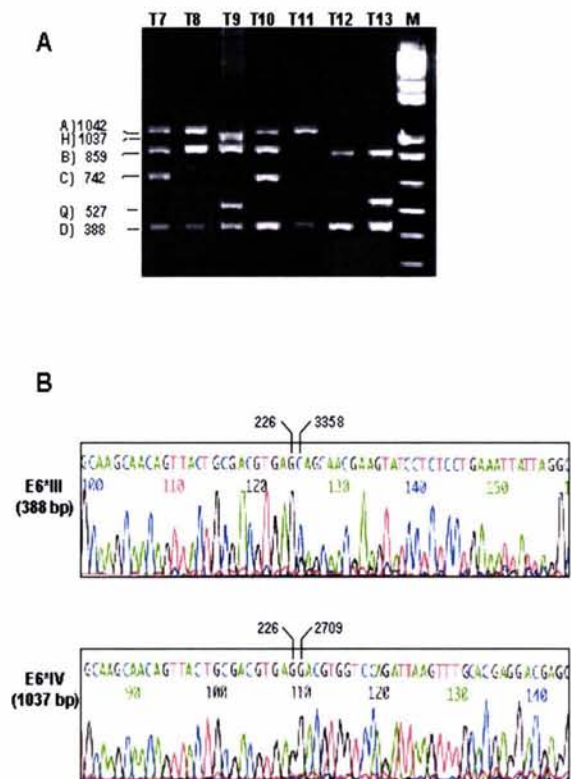


Figura 7. Análisis de los transcritos para la región E6-E2 del HPV16 en carcinomas cervicales positivos para E1/E2. Panel A: muestra los transcritos obtenidos para la región E6-E2 de 7 carcinomas cervicales. Carril T9 muestra un tumor positivo para las variantes AA y el resto corresponden a variantes E. Los nombres de cada especie se encuentran del lado izquierdo junto al tamaño de cada banda y corresponden a las especies policistrónicas mostradas en la Figura 1. Carril M es el marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder. Panel B: muestra los electroferogramas que corresponden a las secuencias de los transcritos E6*III y E6*IV que fueron los únicos no mostrados en las figuras anteriores.

Debido a que las muestras positivas para variantes AA presentan 24 mutaciones a lo largo de todo el marco de lectura del gen E2 (figura 1), se analizó si las proteínas provenientes de estas variantes reprimen la transcripción de los oncogenes virales E6/E7. Se exploraron las líneas celulares C33a, HaCat, SiHa y HeLa transfectada con los plásmidos que contienen los genes E2 de cada una de las variantes. Nuestros datos indican que la construcción con el gen E2 de la variante Europea (p16E2/E) reprime fuertemente tanto la expresión basal del gen reportero β -galactosidasa (de 59.5 a 18.5%) como la expresión de los oncogenes E6/E7 (de 51.4 a 40.1%). La construcción con el gen E2 de la variante AA-c (p16E2/AA-c) casi no reprime el LCR en las cuatro líneas celulares analizadas (Figuras 9b, 9c) siendo esta diferencia estadística significativa ($P < 0.05$, t de student). La represión por la proteína E2 de la variante AA-a sobre el LCR es menor que la presentada por la proteína E2 del virus Europeo (Figuras 9b, 9c). Esta diferencia es estadísticamente significativa solo para C33a, SiHa y HeLa ($P < 0.05$, t de student). La diferencia de la actividad de represión entre las variantes AA-c y AA-a fue estadísticamente significativa en todas las líneas celulares ($P < 0.05$, t de student). No hubo diferencia en el nivel de transcripción de los genes E2 transfectados en los experimentos con las diferentes variantes (Figura 9).

Varios grupos han reportado que la expresión del gen E2 induce apoptosis en muchos tipos de células (Sánchez-Pérez et al., 1997. Webster et al., 2000, 2001). Por lo tanto, es posible que el efecto de represión demostrado en este trabajo pueda ser debido a la apoptosis celular. Para confirmar que las diferencias en la actividad represora de E2 entre las variantes AA y E no están asociadas a diferencias en la

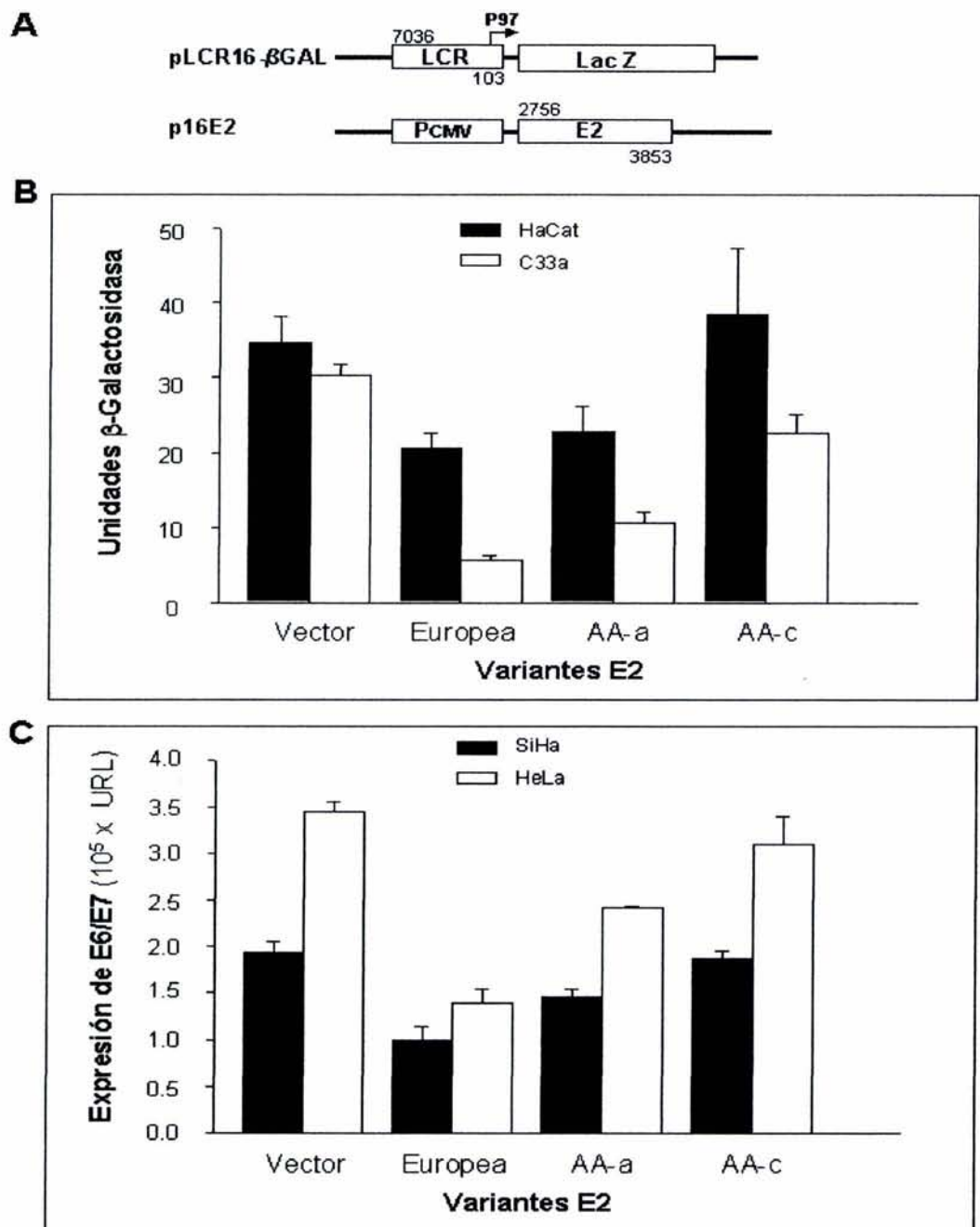


Figura 9. Regulación de la expresión génica de los oncogenes virales E6/E7 por la proteína E2 de las variantes *in vivo*. Panel A. representación esquemática de las construcciones utilizadas. El LCR (posiciones 7036-103) del HPV16 de referencia fue clonado río arriba del gen reportero β -galactosidasa dentro del vector pc4-AUG- β gal. Los genes E2 de las variantes (E de referencia, AA-a y AA-c) (posiciones 2756-3853) fueron clonados después del promotor de CMV dentro del vector de expresión pcDNA3. Panel B. Muestra la función reguladora de los genes E2 de cada una de las variantes sobre la actividad β -galactosidasa en experimentos de transfección estable en las líneas celulares C33a y HaCat. Panel C, represión de la expresión de los oncogenes E6/E7 por E2 de cada variante en ensayos de transfección transitoria en las líneas celulares SiHa y HeLa. La actividad β -galactosidasa se midió con ensayo colorimétrico y el nivel de represión de la expresión de los genes E6/E7 fue detectado por captura de híbridos. Las barras muestran la media \pm DS de 3 experimentos. Vector= plásmido pcDNA3; AA= Variante Asiático-Americana; URL= Unidades Relativas de Luz.

capacidad de E2 para inducir apoptosis, se evaluó la apoptosis en las líneas celulares SiHa y HeLa mediante la técnica de TUNEL. Las células fueron co-transfectadas con los plásmidos de E2 de cada una de las variantes y la proteína verde fluorescente (pQBI25-f). Los niveles de apoptosis observados en las tres variantes fueron similares cuando se analizaron mediante citometría de flujo. La proporción de apoptosis inducida por los genes E2 de las variantes E, AA-a y AA-c en las células HeLa fue de $26.1\% \pm 6.7$, $17.5\% \pm 13.6$ y $25.9\% \pm 9.8$, respectivamente, y en SiHa de $52.2\% \pm 19.1$, $51.7\% \pm 43.4$ y $41.1\% \pm 23.2$, respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos por análisis de microscopía confocal. Un bloque de experimentos representativos explorados mediante microscopía confocal se muestra en la figura 10.

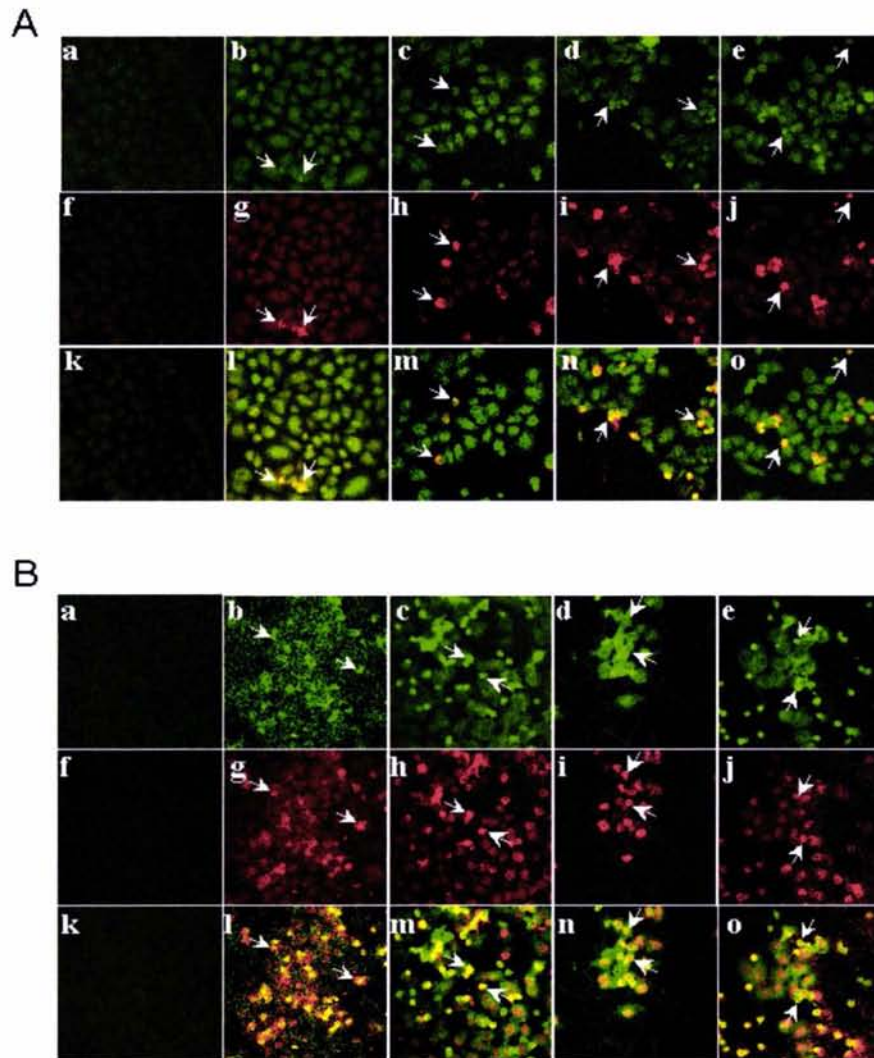


Figura 10. Microscopía confocal de células SiHa y HeLa co-transfectadas con plásmidos que expresan E2 y proteína verde fluorescente teñidas con la técnica de TUNEL para apoptosis. Panel A, muestra los experimentos de co-transfección de los plásmidos de E2 y de la proteína verde fluorescente en las células SiHa. Panel B, muestra experimentos con células HeLa. Para ambos paneles el análisis se realizó utilizando microscopía confocal y el primer renglón (a-e) muestra la detección del gen verde con el canal verde, el segundo (f-j) la detección de la señal del TUNEL con el canal rojo y en el tercero (k-o) se observa la co-localización de ambas señales. La columna (a, f y k) muestra las células no transfectadas, la segunda (b, g y l) células transfectadas solo con el plásmido de la proteína verde (pBQI25), la tercera (c, h y m) células co-transfectadas con pBQI25 y el plásmido con el gen E2 de la variante E, la cuarta (d, i y n) células co-transfectadas con pBQI25 y el gen E2 de la variante AA-a y la quinta columna (e, j y o) células co-transfectadas con pBQI25 y el gen E2 de la variante AA-c. Las flechas indican las señales apoptóticas. Fotos a 400X.

VII. DISCUSION.

La presencia de transcritos de los oncogenes virales E6/E7 en los tumores positivos para los HPV16 AA que retienen y expresan transcritos del gen E2 sugiere que la integración no es esencial en el proceso de carcinogenesis cervical asociada estas variantes y la desregulación de la transcripción de los oncogenes E6/E7 puede ser provocada por otro mecanismo diferente. En el análisis en cultivos celulares de la actividad represora de la proteína E2 de los virus AA se observó falta (AA-c) o disminución (AA-a) de la función represora. Esta disminución de la función de E2 puede ser provocada por la presencia de variaciones en su secuencia (Casas et. al., 1999). Los genes E2 de los virus AA tienen 16 mutaciones no conservadas distribuidas a lo largo de todo el marco de lectura (Casas et. al., 1999). 4 de ellas (T310K, W341C, D344E y H136Y) se podrían considerar importantes para originar las diferencias observadas en la actividad represora de E2, tres se encuentran dentro del dominio de unión al DNA, el cual es esencial para la función represora de la proteína (Casas et al., 1999). La última (H136Y), se encuentra localizada en el dominio de transactivación y se presenta sólo en la proteína E2 de la variante AA-c. La variante AA-c fue la que presentó la menor actividad represora en comparación con las otras dos proteínas exploradas. La mutación T310K parece ser la que más afectaría a la actividad de E2, puesto que se encuentra un aminoácido después de la región de unión a la hélice de DNA (Casas et al., 1999) y además origina el cambio de un aminoácido con carga parcial (treonina) por un aminoácido básico con carga positiva (lisina). Este cambio podría ser suficiente para modificar la estructura conformacional

de la proteína y provocar una menor afinidad en la unión al DNA. Por otro lado, la mutación encontrada en el aminoácido 136 (H136Y) del dominio de transactivación en la subclase AA-c, origina el cambio de una histidina por una tirosina. Este cambio podría ser importante, ya que, la histidina es un aminoácido básico con carga positiva en tanto que la tirosina es un aminoácido con carga parcial, lo cual podría cambiar la estructura de la proteína y afectar su función.

Existe la posibilidad de que las diferencias en el “efecto de represión” demostrado en las células en cultivo pueda ser más bien debido a diferencias en la actividad apoptótica que a la represión inducida por E2, ya que se ha reportado que la expresión del gen E2 induce apoptosis en muchos tipos de células (Sánchez-Pérez et al., 1997; Webster et al., 2000, 2001). Sin embargo, en este caso parece ser improbable, ya que el nivel de expresión del gen β -actina no fue diferente entre los grupos experimentales y además, existen reportes previos en donde se muestra que E2 no induce apoptosis en las líneas celulares C33 y HaCat (Desaintes et al., 1997), dos de las líneas utilizadas y en las que se demostró la disminución en la actividad represora de E2 de las variantes AA. Por otra parte, los niveles de apoptosis analizados por citometría de flujo y microscopía confocal en células SiHa y HeLa transfectadas con los genes E2 de cada una de las variantes, fueron similares. Estos datos claramente indican que las diferencias en la expresión de los oncogenes E6/E7 entre las células transfectadas con los genes E2 Europeo y Asiático-Americano están directamente relacionadas a las diferencias en la actividad de represión de las proteínas E2 y no con diferencias en la actividad de apoptosis de estas proteínas.

La expresión elevada del transcrito E1^{E4} y la carencia de transcritos con potencial para codificar la proteína E2 en los tumores positivos para el HPV16 Europeo con los genes E1/E2 retenidos, sugiere que E2 en estos carcinomas está siendo regulado por "splicing" alternativo y por consiguiente, esto puede explicar la expresión de los oncogenes E6/E7 aún en presencia del gen E2. La expresión elevada del transcrito E1^{E4} es un resultado consistente con los resultados encontrados en otros estudios realizados en líneas celulares y tumores (Stoler et al., 1992; Bohm et al., 1993; Sherman et al., 1992). Por otra parte, se ha descrito que el transcrito E1^{E4} ocurre esencialmente en células en cultivo bien diferenciadas (Pray y Laimins, 1995; Frattini et al., 1996) o en las células más superficiales bien diferenciadas de las muestras tumorales (Stoler et al., 1992). Lo anterior sugiere que cuando el genoma viral Europeo permanece en las células basales no diferenciadas, se favorece la ruptura del gen E2 durante la integración viral al genoma celular, mientras que, cuando se encuentra en las células bien diferenciadas, se retiene la región E1/E2 y la expresión de E2 es excluida por "splicing" favoreciendo la presencia del transcrito E1^{E4}.

Las diferencias observadas en la expresión del gen E2 entre los carcinomas positivos para variantes AA y E podría deberse también a diferencias en el estatus del genoma viral. Sin embargo, los resultados obtenidos en el "Southern blot", mostraron que no existen diferencias en el estatus del genoma viral, entre las muestras positivas para variantes AA y E, y en consecuencia, las diferencias en la expresión del gen E2 no pueden ser explicadas por este factor. Los datos indican que la expresión de los genes E6/E7 parece ser independiente del estatus del genoma viral, ya que tanto los

tumores que mostraron patrones virales episomales multiméricos o integrados en tandém presentaron un alto nivel de expresión de E6/E7.

Adicionalmente a las diferencias en la actividad biológica de la proteína E6 (Stoppler et al., 1996), al número de copias virales (Casas et al., 1999) y a la mayor regulación del promotor p97 (Veress et al., 1999; Kammer et al., 2000), la mayor oncogenicidad de las variantes AA podría ser asociada con la expresión del nuevo transcrito E6^ΔE7 y con la menor represión del promotor p97 por la proteína E2 variante (Ordoñez et al., 2004). La asociación del transcrito E6^ΔE7 con los carcinomas positivos para variantes AA es clara, sin embargo, no todos los tumores AA presentan este transcrito y se encuentra también en algunos casos de variantes E. Además, este transcrito no incluye regiones de los genes E6 y E7 involucradas con la transformación e inmortalización celular (Myers y Androphy, 1995; Halper y Munger, 1995). Por otro lado, este transcrito probablemente juegue algún papel en la regulación de la expresión de los oncogenes E6/E7 debido a que contiene 41 de los 43 aminoácidos del transcrito E6*1, el cual está asociado con una función de transactivador del promotor p97 (Shirasawa et al., 1994).

En síntesis, la inactivación de E2 por splicing alternativo (en variantes E) o variación en la secuencia (en variantes AA), puede sugerir, que no existe una presión selectiva que necesariamente lleve a la ruptura del gen E2. La ruptura de los genes E1/E2 puede estar asociada con variación genética de E1/E2 y con la diferenciación celular ya que se ha reportado que todos los tumores positivos para HPV16 que se encuentran bien diferenciados retienen la región E1/E2 intacta, mientras que sólo una tercera parte de los carcinomas poco diferenciados mantienen la región (Berumen et al.,

1994). Por otro lado, la ruptura de los genes E1/E2 ocurre mucho más frecuentemente en variantes Europeas que en las variantes Asiático-Americanas (Casas et al., 1999). Lo anterior sugiere, que la integración el genoma viral Europeo y por ende la ruptura del gen E2 se favorece cuando éste permanece en las células basales no diferenciadas, en tanto que, cuando se encuentra en las células bien diferenciadas, la región E1/E2 es retenida, sin embargo, la transcripción de los oncogenes E6/E7 se mantiene debido a que los transcritos que codifican a la proteína E2 son excluidos por "splicing" alternativo. En contraste, debido a que el gen E2 de variantes AA no reprimen la transcripción de los oncogenes virales no deberían estar sujetas a presión selectiva para inducir la ruptura o splicing de E2.

Finalmente, la baja actividad de represión de E2 sugiere que el aumento en la expresión de los oncogenes E6/E7 puede ocurrir mucho mas temprano en tumores positivos para variantes AA, y por consiguiente, el periodo de tiempo que transcurre entre la infección viral y el establecimiento de un cáncer invasivo puede ser mucho menor al compararlo con variantes Europeas. Esta hipótesis podría explicar la asociación de la variante AA-c con pacientes 11 años más jóvenes (Berumen et al., 2001). Por el contrario, en las variantes Europeas, la expresión incrementada de los oncogenes E6/E7 esta ligada principalmente con la ruptura del gen E2 durante la integración viral (Schwarz et al., 1985; Schneider-Maunoury et al., 1987; Romanczuk et al., 1990) o bien, con la disminución de la represión de E2 debida a la presencia de splicing alternativo (citado en este trabajo), consecuentemente el lapso de tiempo entre la infección y el desarrollo de un tumor invasivo, puede ser mas largo que para variantes AA.

VIII. CONCLUSIONES

1. En las variantes Europeas con los genes E1/E2 retenidos, la transcripción de los oncogenes E6/E7 se mantiene debido a que los transcritos que codifican a la proteína E2 son excluidos por "splicing" alternativo.
2. En las variantes Asiático-Americanas la transcripción de los oncogenes E6/E7 no está reprimida debido a que los transcritos que codifican a la proteína E2 presentan variaciones en su secuencia lo que provoca que la función de esta se encuentre disminuida.
3. No existe una presión selectiva que necesariamente lleve a la ruptura del gen E2.
4. El periodo de tiempo que transcurre entre la infección viral y el establecimiento de un cáncer invasivo puede ser mucho menor en los carcinomas positivos para variantes AA en comparación con las E.

IX. REFERENCIAS.

Berumen, J., Casas, L., Segura, E., Amezcua, J., García-Carrancá A. (1994). Genome amplification of human papillomavirus type 16 and 18 in cervical carcinomas is related to retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer* **56**, 640-645.

Berumen, J., Unger, E., Casas, L., Figueroa, P. (1995). Amplification of Human Papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer. *Human Pathol* **26**, 676-681.

Berumen J, Ordoñez R, Salmeron J, & 6 other authors (2001). Asian-American variants of Human Papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* **93**, 1325-1330.

Bechtold, V., Bread, P., Raj, K., (2003). Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol* **77** 2021-2028

Bohm S, Wilczynski Sp, Pfister H, Iftner T (1993). The predominant mRNA class in HPV16-infected genital neoplasias does not encode the E6 or the E7 protein. *Int J Cancer* **155**(5), 791-798.

Bosch, F., Manos, M., Muñoz, N., Sherman, N., Hansen, A., Peto, J. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl Cancer Inst* **87**:796-802.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Casas, L., Galvan, S., Ordoñez, R., Lopez, N., Guido, M., Berumen, J. (1999). Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in

the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* **83**(4), 449-455

Cullen, A., Reid, R., Campion, M., & Lörincz, A. (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* **65**, 606-612.

Desaintes, C., Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M., Thierry, F. (1997). Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J* **16** 504-514.

De Villiers, E., Hirsch-Behnam, A., von Knebel-Doerberitz, C. Neumann, C., zur Hausen H. Two newly identified human papillomavirus types (HPV40 and 57) isolated from mucosal lesions. *Virology* **171**, 248-253.

Dodd, J., Paraskevas, M., & McNicol, P. (1992). Detection of human papillomavirus 16 transcription in human prostate tissue. *J Urol* **149**, 400-402.

Doorbar, J., Parton, A., Hartley, K., Banks, L., Crook, T., Stanley, M. & Crawford, L. (1990). Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* **178**, 254-262.

Ellis, J., Keating, P., Baird, J., Hounsell, E., Renouf, D., Rowe, M., et al. (1995). The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med* **1**:464-470.

Frattini MG, Lim HB, Laimins LA. (1996). In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 3062-7.

Guido, M., Zamorano, R., Garrido-Guerrero, E., Gariglio, P., Garcia-Carrancá, A. (1992). Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *J Gen Virol* **73**, 1395-1400.

Halpern, A., & Munger, K. (1995). HPV16 E7: Primary structure and biological properties. In: Myers G, Delius H, Icenogel J, Bernard HU, Baker C, Halpern A, Wheeler C, editors. *Human Papillomaviruses 1995: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory; p. III-58-III-73.

Hildesheim, A., Wang, S. (2002). Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res* **2**, 229-240.

Hildesheim, A., Schiffman, M. Bromley, C., Walcholder, S., Herrero, R., Rodríguez, A., Bratti, M., Sherman, M., et al. (2001). Human papillomavirus type16 and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* **93**, 315-318.

Hernández-Avila, M., Lazcano-Ponce, E., Berumen-Campos, J., Cruz-Valdez, A., Alonso de Ruiz, P., González-Lira, G. (1997). Human papillomavirus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: a case-control study. *Arch Med Res* **28**:265-271.

Ho, L., Chan, S., Burk, R., Das, B., Fujinaga, K., Icenogle, J., et al. (1993). The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J. Virol.* **67**:6413-6423.

Kammer, C., Warthorst, U., Torres-Martínez, N., Wheeler, C., Pfister, H. (2000). Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants

and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* **81**(Pt 8), 1975-1981.

Lazcano, E., Moss, S., Alonso De Ruiz, P., Salmeron, J., Hernandez, M. (1999). Cervical cancer in developing countries: why it is ineffective, the case of Mexico. *Arch Med Res* **30**, 240-250.

Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Nakagawa, S., Tang, X., Yasugi, T., Kawana, K., et al., (2000). Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Lett* **156**, 159-65.

Myers, G. & Androphy, E. (1995). The E6 protein. In: Myers G, Delius H, Icenogel J, Bernard HU, Baker C, Halpern A, Wheeler C, editors. *Human Papillomaviruses: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory; p. III-47-III-57.

Norton, P. & Coffin, J. (1985). Bacterial β -galactosidase as a marker of Rous sarcoma virus gene expression and replication. *Mol Cell Biol* **5**, 281-290.

Ordoñez R.M., Espinosa A.M., Sanchez-Gonzalez D.J., Armendariz-Borunda J, Berumen J (2004). Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J. Gen. Virol.* **85**,1433-1444.

Pray, T. & Laimins, L. (1995) . Differentiation-dependent expression of E1^{E4} proteins in cell lines maintaining episomes of human papillomavirus type 31b. *Virology* **206**(1), 679-685.

Romanczuk, H., Thierry, F., Howley, P. (1990). Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 p97 and type 18 p105 promoters. *J Virol* **64**,2849-2859.

Romanczuk, H., Howley, P. (1992). Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 3159-3163.

Sanchez-Perez, A.M., Soriano, S., Clarke, R., Gaston, K. (1997). Disruption of the human papillomavirus type 16 E2 gene protects cervical carcinoma cells from E2F-induced apoptosis. *J Gen Virol* **78**: 3009-3018.

Schneider-Maunoury, S., Croissant, O. & Orth, G. (1987). Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J Virol* **61**(10), 3295-3298.

Schwarz, E., Freese, U.K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., Zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**(6006), 111-114.

Secretaria de Salud (1999) Registro Histopatológico de Neoplasias en México. México: Secretaria de Salud, México D.F.

Sherman, L. & Alloul, N. (1992). Human Papillomavirus type 16 expresses a variety of alternatively spliced mRNAs putatively encoding the E2 protein. *Virology* **191**, 953-959.

Sherman, L., Alloul, N., Golan, I., Durst, M., Baram, A. (1992). Expression and splicing patterns of human papillomavirus type-16 mRNAs in pre-cancerous lesions

Falta página

N° 47

Wilczynski, S., Pearlman, L. & Walker, J. (1988). Identification of HPV16 early genes retained in cervical carcinomas. *Virology* **166**, 624-627.

Xi, L.F. Koutsky, L.A., Galloway, D.A., Kuypers, J., Hughes, J.P., Wheeler, C.M., Holmes, K.K., Kiviat, N. (1997). Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **89**, 796-802.

Yamada, T., Manos, M., Peto, J., Greer, C., Muñoz, N., Bosch, F., Wheeler, C. (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol.* **71**, 2463-2472.

Zehbe, I., Wilander, E., Delius, H., Tommasino, M (1998). Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* **58**:829-833.

ANEXO I.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription

Rosa M. Ordóñez,¹ Ana María Espinosa,¹ Dolores Javier Sánchez-González,² Juan Armendáriz-Borunda³ and Jaime Berumen¹

Correspondence
Jaime Berumen
jaimeberumen@hotmail.com

¹Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital General de México/UNISER-Facultad de Medicina, UNAM, Dr Balmis # 148, Colonia Doctores, Delegación Cuahutémoc, CP 06726 Ciudad de México, Mexico

²Departamento de Biología Celular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cerrada de Palomas s/n, Colonia Lomas de San Isidro, Ciudad de México, Mexico

³Instituto de Biología Molecular y Terapia Génica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Apartado Postal 2-123, 44281 Guadalajara, Jalisco, Mexico

Asian-American (AA) variants of human papillomavirus 16 (HPV-16) are linked to a high incidence of cervical cancer in Mexico, with some evidence strongly suggesting that they are more oncogenic than European (E) variants, including their association with younger women and their higher associated risk of cervical cancer. Differences in the regulation of viral E6/E7 oncogene transcription by the E2 protein may be involved in the higher oncogenicity of AA variants. In E variants, E6/E7 oncogene transcription is repressed by the E2 protein and is frequently up-regulated by the destruction of the E2 gene during viral integration. In contrast, the E2 gene is retained in full in most AA-positive carcinomas, raising the possibility of alternative mechanisms for increasing viral oncogene transcription. The authors investigated whether the higher oncogenicity of AA variants is linked to differences in E6/E7 oncogene transcription and the mechanism of E2 deactivation. E6/E7 and E1/E2 transcripts were explored by RT-PCR in 53 HPV-16-positive cervical carcinomas, 39 retaining (20 European and 19 AA) and 14 having lost (12 European and 2 AA) the E1/E2 genes, and transcription repression activity of the AA E2 genes was tested in four cell lines that constitutively express the β -galactosidase reporter or E6/E7 genes driven by the viral long control region. E6/E7 oncogene transcripts were found in all carcinomas, but only those positive for AA variants with E1/E2 genes had complete E2 transcripts. E2 transcripts were down-regulated by splicing in E-positive carcinomas retaining E1/E2. AA E2 genes were impaired for repression of E6/E7 oncogene transcription *in vivo*. These results suggest that E6/E7 oncogene expression starts earlier in AA than E variant infections, since E variants need E2 to be destroyed or down-regulated.

Received 25 April 2003

Accepted 5 December 2003

INTRODUCTION

Almost a quarter of all cervical carcinomas in Mexico are attributable to Asian-American (AA) variants (subclasses AA-a and AA-c) of human papillomavirus type 16 (HPV-16) (Berumen *et al.*, 2001). The high incidence of cervical cancer in Mexico may be explained in part by the poor coverage of the PAP screening programme, which reaches only 30% of adult women (Lazcano *et al.*, 1999). However, the high frequency of HPV-16 AA variants may also contribute to the high incidence of cervical cancer in Mexican women, as there is some clinical and epidemiological evidence suggesting that AA variants of HPV-16 are more oncogenic than E variants. AA variants confer a nine times higher risk than E variants for cervical cancer (Berumen

et al., 2001) and, together with other non-E variants, a 4.5 times higher risk than E variants for high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) lesions (Xi *et al.*, 1997). Furthermore, AA variants are associated with women on average 8 years younger and with more aggressive tumours compared with E variants (Berumen *et al.*, 2001).

The higher oncogenicity of an HPV-16 variant could result from increased neoplastic activity of the E6/E7 oncogenes, more efficient virus replication or better stimulation of viral oncogene expression. Some experimental evidence supports a higher oncogenicity of AA variants. The E6 protein from an AA-a variant (isolate 512) consistently produced more serum and calcium differentiation-resistant colonies in primary human foreskin keratinocytes and

stimulated p53 degradation better than the E variant E6 reference protein (Stoppler *et al.*, 1996). Activity of the p97 promoter in AA variants was 1.7 (AA-a)- to 3.3 (AA-c)-fold higher than that of the E reference virus, suggesting increased expression of viral oncogenes (Veress *et al.*, 1999; Kammer *et al.*, 2000). The viral DNA copy number of AA variants is also much higher than that of E variants in cervical carcinomas, suggesting that AA variants replicate better (Casas *et al.*, 1999).

Differences in the regulation of viral E6/E7 oncogene transcription by the E2 protein may be also involved in the higher oncogenicity of AA variants. For E variants, E6/E7 oncogene transcription is repressed by the E2 protein and is frequently up-regulated by the destruction of the E2 gene during viral integration (Schwarz *et al.*, 1985; Schneider-Maunoury *et al.*, 1987; Wilczynski *et al.*, 1988; Cullen *et al.*, 1991). In contrast, the E2 gene is retained in full in most AA-positive carcinomas (Casas *et al.*, 1999), raising the possibility of alternative mechanisms for increasing viral oncogene transcription. The E2 protein of AA variants has 16 non-synonymous mutations distributed throughout the protein. This E2 variant protein could regulate the expression of E6/E7 genes differently. However, other factors not related to E2 variation may also be associated with the deregulation of E2, since half of the E1/E2-positive carcinoma samples in a study by Casas *et al.* (1999) had E variants.

The aim of this work was to analyse the E6/E7 and E1/E2 gene transcripts in cervical carcinomas positive for AA or E variants retaining the E1/E2 genes and to analyse the E6/E7 transcription repression activity of E2 from AA variants *in vivo*.

METHODS

Samples. Fifty-three samples of invasive cervical carcinoma positive for HPV-16 DNA, 39 retaining (20 E and 19 AA) and 14 having lost (12 E and 2 AA) the E1/E2 genes, were included in this study. Samples were selected from a previous study where HPV-16 variants were detected (Berumen *et al.*, 2001), based essentially on the availability of a tissue biopsy fragment stored at -70°C when the analysis of RNA was performed. The status of the E1/E2 region was investigated by PCR as described previously (Berumen *et al.*, 1994). Tissue samples were obtained by direct open biopsy procedures; one fragment was used for routine pathological diagnosis and the other was snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C for molecular analysis.

Analysis of the HPV-16 genome by Southern blotting. Southern blot analysis was performed in 11 of the 39 carcinomas

positive for E1/E2 (five positive for E variants and six positive for AA variants). For Southern blots, 10 μg sample DNA was digested with *Bam*HI and *Pst*I (Gibco-BRL Life Technologies), following the manufacturer's recommendations. In each experiment, the first lane contained a molecular mass standard (*Hind*III-digested phage lambda) and the second lane contained 50 copies per cell of HPV-16 linear DNA (725 pg) and 1450 pg HPV-16 DNA plus 10 μg human placental genome (Sigma) as carrier, digested with *Bam*HI/*Pst*I. HPV-16 DNA was used as a probe under stringent conditions and hybridization was conducted as described previously (Casas *et al.*, 1999).

Analysis of transcripts from E6/E7, E1/E2 and E6-E2 early regions by RT-PCR. Total RNA was extracted with Trizol (Gibco-BRL Life Technologies) following the manufacturer's recommendations. Purified RNA was treated with DNase I before being reverse-transcribed. One microgram total RNA was reverse-transcribed using the GeneAmp RNA PCR kit (Perkin-Elmer) in a 20 μl reaction containing 5 mM MgCl_2 , 1 \times PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.3), 1 mM each dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 1 mM RNase inhibitor, 2.5 μM random hexamer primers and 1 U reverse transcriptase. The reaction was allowed to proceed for 15 min at 42°C and was inactivated at 95°C for 5 min. Five microlitres of this reaction was used for the amplification of specific cDNA by the addition of 20 μl of reaction mix containing 2 mM MgCl_2 , 1 \times PCR buffer, 1 μM each primer and 2.5 U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer). Reactions were carried out in a DNA GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer). After denaturing for 2 min at 94°C , 40 cycles were performed of 94°C for 30 s, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min. The annealing temperature was varied according to the T_m of the primers used for each region. A final elongation step was carried out at 72°C for 8 min. The location of the primers used to detect the different transcripts is shown in Fig. 1. The sequence and position of forward (F) and reverse (R) primers were as follows.

F104 (5'-ATGTTTCAGGACCCACAGGA-3', nt 104-123)

F856 (5'-TAATCTACCATGGCTGATCC-3', nt 856-876)

F1244 (5'-TTGAAAGCGAAGACAGCGGG-3', nt 1244-1263)

F2975 (5'-GAACTGCAACTAACGTTAGA-3', nt 2975-2994)

F3192 (5'-CTGTGGTAGAGGGTCAAGTT-3', nt 3192-3211)

R858 (5'-TTATGGTTTCTGAGAACAGA-3', nt 858-838)

R2865 (5'-GCGCATGTGTTTCCAATAGT-3', nt 2865-2845)

R3124 (5'-TCCATCAAACACTGCACCTCCA-3', nt 3124-3105)

R3467 (5'-AGTCGTCTGTGTTTCTTCGG-3', nt 3467-3447)

R3624 (5'-TGTACTATGGGTGTAGTGT-3', nt 3624-3605)

Transcripts from the E6/E7 region were detected with primers F104/R858; from the E1/E2 region, including E4, with primers F856/R3467; from the E1/E2 region, excluding E4, with primers F856/R2865; from the E2 gene alone, excluding E4, with primers F2975/R3124 and

Fig. 1. Genome map and schematic representation of mRNA transcripts from the early region of the reference HPV-16 strain. The upper panel shows the genome map with the ORFs in their proper reading frames shown as coloured rectangles. The location of the primers used for RT-PCR and sequencing are indicated by arrows on the genome. In the lower panel, coloured boxes represent the translated regions, bold black lines represent unspliced non-translated regions and dotted lines show the spliced regions. The donor and acceptor splice sites are shown by nucleotide numbers above each box. The proteins encoded by each transcript are shown on the right. The species of transcripts were named according to the 1996 sequence database (Los Alamos National Laboratory), and a new polycistronic transcript, described in this report (named Q and including the E6^ΔE7 transcript), has been added. LCR, long control region.

F3192/R3624; from the E2C region with primers F1244/R3467; and from the E6–E2 region with primers F104/R3624. As a control for the stability and concentration of RNA, two primers to detect actin transcripts were used: ACT1 (5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAA-3', nt 1854–1874) and ACTinv (5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3', nt 2172–2152) (Dodd *et al.*, 1992). To confirm the absence of DNA, an aliquot of each RNA sample was analysed by PCR for the E6/E7 region before the reverse transcription reaction was carried out. Biopsies of placentas were used to control the contamination of HPV DNA and were explored in parallel with the tumour samples. To control the sensitivity of PCR, 500 ng placental DNA with 100 fg viral DNA were used in each series of experiments. The analysis of PCRs was performed by electrophoresis in agarose gels, and the presence of transcripts from each viral region (E6/E7 and E1/E2) was confirmed by Southern blotting (data not shown), performed as described previously (Berumen *et al.*, 1994). Precise identification of transcripts from the E6/E7, E1/E2 and E6–E2 regions was carried out by sequencing the bands obtained by RT-PCR in both directions. For sequencing, the fluorescent cycle sequencing method (BigDye Terminator Ready Reaction Kit; Perkin-Elmer) was used as described previously (Casas *et al.*, 1999). Sequence analysis was performed using an ABI PRISM 310 Genetic Analyser System (Perkin-Elmer). Data analysis was carried out using the DNASIS software (Hitachi Software Engineering Co.). HPV sequences and base positions are numbered according to the 1997 sequence database (Los Alamos National Laboratory).

Measurement of the transcription repression activity of HPV-16 E2 variants

Plasmid constructions. The E2 genes from the E reference and AA-a and AA-c variants were amplified by PCR using the *Pfu* DNA polymerase (Stratagene) using the following primers containing restriction sites in the 5' ends (underlined in the following primers): 5'-AGCGGATCCATGGAGACTCTTTGCCAACGTTTAAATG-3' (nt 2756–2784) and 5'-AGCGAATTCTCATATAGACATAAAATCCAGT-AGACT-3' (nt 3853–3825). E2 variant genes were amplified from genomic DNA derived from AA-a-positive (isolate MX68) and AA-c-positive (isolate MX70) cervical carcinomas, and the reference E2 gene was amplified from the cloned HPV-16 reference genome. The PCR mixture was as follows: 500 ng tumour DNA (or 1 ng cloned HPV-16) was added to achieve a final volume of 50 µl containing 30 mM Tris/HCl, pH 8.8, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 200 µM each dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 1 µM each primer, 100 ng BSA µl⁻¹ and 1.0 U *Pfu* DNA polymerase (Stratagene). The reaction was carried out in a DNA GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer). After denaturing for 3 min at 94 °C, 15 cycles were performed of 94 °C for 30 s, 54 °C for 1.5 min and 72 °C for 1.5 min. A further 25 cycles were then carried out under the same conditions but with an annealing temperature of 58 °C. A final elongation step was carried out at 72 °C for 7 min. PCR products were purified by two phenol/chloroform extractions, digested with the appropriate restriction enzymes (*Bam*HI/*Eco*RI), purified using the Qiaex II Kit (Qiagen) and then inserted into the *Bam*HI/*Eco*RI sites of the Bluescript SK+ vector using 6 U T4 DNA ligase (Gibco-BRL, Life Technologies) in 20 µl 50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT and 5% PEG-8000 at 16 °C for 16 h. Recombinant vectors were cloned in *Escherichia coli* DH5α. E2 genes from the E reference and AA-a and AA-c variants were subcloned into the *Bam*HI/*Eco*RI restriction sites of pcDNA3 expression vector (Invitrogen) generating plasmids p16E2/E, p16E2/AA-a and p16E2/AA-c, respectively (see Fig. 5a). The complete long control region (LCR) of the E HPV-16 reference (nt 7036–103), cloned upstream from the β-galactosidase reporter gene into the pc4-AUG vector (Thummel *et al.*, 1988) (construction pLCR16-β-gal; see Fig. 5a), was kindly provided by Alejandro García-Carrancá. All molecular constructs were verified by DNA sequencing on an Applied Biosystems automated sequencer.

Cell cultures and transfections. The human cervical carcinoma cell lines C33a, HaCat, SiHa and HeLa were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco-BRL, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL, Life Technologies) and 120 mg penicillin and streptomycin l⁻¹ in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were transfected by the standard calcium phosphate co-precipitation method in 60 mm Petri dishes, as described previously (Guido *et al.*, 1992). Briefly, 24 h before transfection, the cells were grown in 60 mm tissue culture dishes to a density of 7.5 × 10⁵ cells per dish. C33A and HaCat cell lines were transfected with 10 µg plasmid pLCR16-βgal and stable transfectants were selected with 800 µg geneticin ml⁻¹ (Gibco-BRL Life Technologies) over a 2-month period. Single-cell clones were generated by limiting dilution in 96-well plates. The cell clones were frozen in liquid nitrogen until required. Selected clones of C33a and HaCat, which constitutively express the β-galactosidase protein, as well as SiHa and HeLa cell lines, which constitutively express the E6/E7 oncogenes of HPV-16 and HPV-18, respectively, were transiently co-transfected with 10 µg of the empty vector (pcDNA3) or the E2 expression vectors plus 10 µg green fluorescent protein (GFP)-expressing plasmid pQBI25-f (Q-Biogene). Sixteen hours after transfection, the cells were washed, supplied with fresh medium and cultured for another 24 h. For C33a and HaCat experiments, the cells were harvested and cellular extracts were obtained by four freeze-thaw cycles in 250 mM Tris/HCl, pH 8.0, 15% glycerol and 5 mM DTT buffer. Proteins were quantified (Bradford, 1976) and cellular extracts were normalized for protein concentration. For experiments with all four cell lines, total RNA was extracted with guanidine isothiocyanate using the GlassMax RNA microisolation kit (Gibco-BRL, Life Technologies) following the procedure recommended by the manufacturer. Transfection efficiency, measured by immunofluorescence, ranged between 50 and 70%, being highest in C33a cells followed successively by HeLa, SiHa and HaCat cells. Experiments were performed in triplicate and repeated independently at least three times.

β-Galactosidase assays. Extracts of C33a and HaCat cells were prepared and assayed for β-galactosidase activity essentially as described previously (Norton & Coffin, 1985). Briefly, 50 µl lysate was made up to a final volume of 800 µl with PBS, mixed with 200 µl freshly prepared 4 mg orthonitrophenol galactoside (ONPG) ml⁻¹ and then incubated at 37 °C until a yellow colour was apparent. The samples were placed on ice and enzyme reactions were terminated by the addition of 500 µl 1 M Na₂CO₃. The amount of ONPG hydrolysed was determined spectrophotometrically and β-galactosidase activity was estimated as follows: units = (A₄₂₀ × 380)/min.

Transcript detection by hybrid capture assay. Transcripts from E6/E7, E2 and β-actin genes were determined using a modified hybrid capture method using the HPV-Test Hybrid Capture II Kit (Digene), adapted to analyse total RNA with DNA probes. Probes for the E6/E7 genes of HPV-16 and HPV-18, the E2 gene of HPV-16 and β-actin were generated by PCR using primers and a PCR protocol described previously (Berumen *et al.*, 1994; Dodd *et al.*, 1992). For hybrid capture, 1 µg total RNA extracted from cell lines and 10 ng probes were used. Probe DNA was dissolved in 75 µl denaturation reagent and incubated for 45 min at 65 °C in a water bath. Cellular RNA was dissolved in 25 µl probe diluent solution. Both solutions were then mixed for 3 min at 1100 r.p.m. and 25 °C in an orbital shaker and incubated for 60 min at 65 °C in a water bath for hybridization. The hybridization reactions were transferred to the capture microplate wells and the procedure to detect the signal was performed as recommended by the manufacturer. The capture microplate was read in a DML-2000 Luminometer (Digene). Expression of E6/E7 was normalized against expression of the β-actin gene.

Determination of viral DNA and RNA copy number by hybrid capture assay. Viral DNA copy number and the level of E6/E7

transcripts were measured in 26 tumours [20 E1/E2-positive (10 AA and 10 E variants) and 6 E1/E2-negative (all E variants)] by the hybrid capture method using the HPV-Test Hybrid Capture II Kit. For viral DNA copy number, the method was used with the RNA probes provided with the kit under the conditions recommended by the manufacturer. To measure the level of E6/E7 transcripts, the method was adapted to analyse total RNA with DNA probes, as has been described above. For hybrid capture, 500 ng total RNA or DNA from each sample was used. To calculate the viral DNA or RNA copy number per cell, a standard curve was constructed as described previously (Berumen *et al.*, 1994), but instead of measuring the curve points (1, 10, 50, 100, 500, 1000, 3000 and 10000 viral DNA copies) by the dot blot technique, they were measured by the hybrid capture method. A non-linear regression analysis of this data gave the best fit into a hyperbolic equation ($r=0.98$, $P<0.001$) and the copy number per cell of a given tumour was extrapolated from this curve. The amount of RNA was normalized against the levels of β -actin transcripts.

Apoptosis assays. The induction of apoptosis by E2 was measured in HeLa and SiHa cells by flow cytometry and confocal laser-scanning microscopy using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-rhodamine nick end labelling (TUNEL) technique (*In situ* Cell Death Detection kit, TMR red; Roche Applied Science). For flow cytometry, culture cells and transfections were performed under the same conditions as E2 repression assays (see above). Forty hours after transfection, cells were washed in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde/PBS at 22°C for 1 h. Cells were permeabilized with PBS containing 0.1% Triton X-100 and 0.1% sodium citrate and incubated with 50 μ l TUNEL enzyme mixture following the manufacturer's recommendations. Cells were analysed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). Cells positive for GFP were gated for analysis of apoptosis. For confocal microscopy, SiHa and HeLa cells were seeded at 2×10^4 cells per well on to a tissue culture chamber or slide (Lab-Tek) 24 h before transfection. The co-transfections were carried out using 250 ng of each plasmid under the same conditions described above. Forty hours after transfection, the chamber/slides were washed in PBS, fixed, permeabilized and analysed by the TUNEL technique under the conditions recommended by the manufacturer. Labelled specimens were scanned with an LSM-5 Pascal confocal laser-scanning microscope (Carl Zeiss) linked to a Zeiss inverted microscope Axiovert 200 M equipped with a Zeiss 40 \times plan-neofluar oil immersion lens with a numerical aperture of 1.3 (Carl Zeiss). The 488 nm line from an argon laser was used for the GFP signal and the 543 nm line from a helium-neon laser was used for the TMR red TUNEL signal. Fluorescence signals from GFP were observed using a dichroic beam splitter (HFT 488/543/633; Carl Zeiss) and emission filter (BP505-530; Carl Zeiss). Optical fluorescence signals of apoptotic cells labelled with TMR red were observed using a dichroic beam splitter (HFT 488/543/633; Carl Zeiss) and emission filter (LP560; Carl Zeiss). A computer equipped with KS-300 software version 3.0 (Carl Zeiss) was used for operating the system. Detector gain and pinhole aperture were automatically adjusted. The image resolution was 1024 \times 1024 pixels (8 bits, 256 colour levels). Experiments were performed in triplicate and repeated independently three times.

Statistical analyses. All experiments in culture cells were performed in triplicate and repeated independently at least three times. Representative experiments are shown. For DNA and RNA copy number and E2 activity, the results were expressed as the mean \pm SD, and the Student's *t*-test or Mann-Whitney U-test were used, as appropriate, to assess the statistical significance of differences between the groups. The χ^2 test or Fisher's exact test was used, as appropriate, to assess the statistical significance of differences in the frequency of transcript detection. The association of DNA copy number and RNA copy number was measured by linear regression.

Differences were considered statistically significant if $P<0.05$. The Sigma Stat (SPSS Inc.) software program was used for statistical analyses. All statistical tests were two-sided.

RESULTS AND DISCUSSION

E6/E7 transcripts were explored by RT-PCR using primers at the start of E6 (F104) and at the end of E7 (R858; Fig. 1). Four different E6/E7 transcripts were detected in the total population analysed, which were 754, 571, 454 and 238 bp in length (Fig. 2a). The first three transcripts have been reported previously (Doorbar *et al.*, 1990; Sherman *et al.*, 1992) and correspond to unspliced E6,E7, E6*I,E7 (spliced from nt 226 to 409) and E6*II,E7 (spliced from nt 226 to 526) products, respectively (Figs 1 and 2e). The transcript of 238 bp was spliced from nt 226 to 742 and included the 5' region of E6 (nt 104–226) and the 3' region of E7 (nt 742–855) (Figs 1 and 2a and e). This novel transcript, named E6 \wedge E7, encoded a truncated E6/E7 fused protein of 79 aa, 41 derived from the N terminus of the E6 protein and 38 from the C terminus of the E7 protein. All 53 tumours explored, irrespective of the status of the E1/E2 genes, showed one or more of the four detected E6/E7 transcripts. The E6*I,E7 transcript was detected in almost all the samples explored (48 out of 53; 90.6%), whereas the full E6,E7, E6*II,E7 and the E6 \wedge E7 transcripts were detected only in 66.0, 60.4 and 32.1% of tumour samples, respectively. All but one (E6*I,E7) transcripts were distributed evenly between the E1/E2-positive and E1/E2-negative tumours (Table 1). The detection of the E6*I,E7 transcript was higher in E1/E2-positive samples (97.4%) than in E1/E2-negative ones (71.4%; $P=0.014$, Fisher's exact test). On the other hand, the frequency of the known E6/E7 transcripts (full E6,E7, E6*I,E7 and E6*II,E7) was not different between AA- and E-positive samples (Table 1). However, the novel E6 \wedge E7 transcript was detected mostly in the AA-positive samples. This transcript was detected in 66.7% of AA-positive samples, but only in 9.4% of E-positive samples ($P<0.001$, χ^2 test; Table 1). These data indicated that, for both AA and E variants, the expression of E6/E7 genes was not impaired by the presence of the E2 gene and suggested that the E2 gene was not expressed or was functionally inactive in the E1/E2-positive tumours.

As the retention of E1/E2 is directly associated with copy number (Berumen *et al.*, 1994), quantitative differences in E6/E7 expression between these groups were further explored. E6/E7 transcripts and DNA viral copy number were analysed by hybrid capture in 20 E1/E2-positive and six E1/E2-negative samples. All E1/E2-positive samples had a high number of E6/E7 transcripts and the mean copy number of these transcripts (1352 ± 636.5) was 13.8-fold higher than that of E1/E2-negative (98.3 ± 45.4) samples (Table 2; $P=0.001$, Mann-Whitney U-test). The mean copy number of E6/E7 transcripts was 2.1-fold higher in the AA-positive (1563 ± 682) than in the E-positive (750.6 ± 669.3) tumours ($P=0.006$; *t*-test). However, this difference disappeared when the tumours were classified according to the presence ($P=0.14$; *t*-test) or absence of

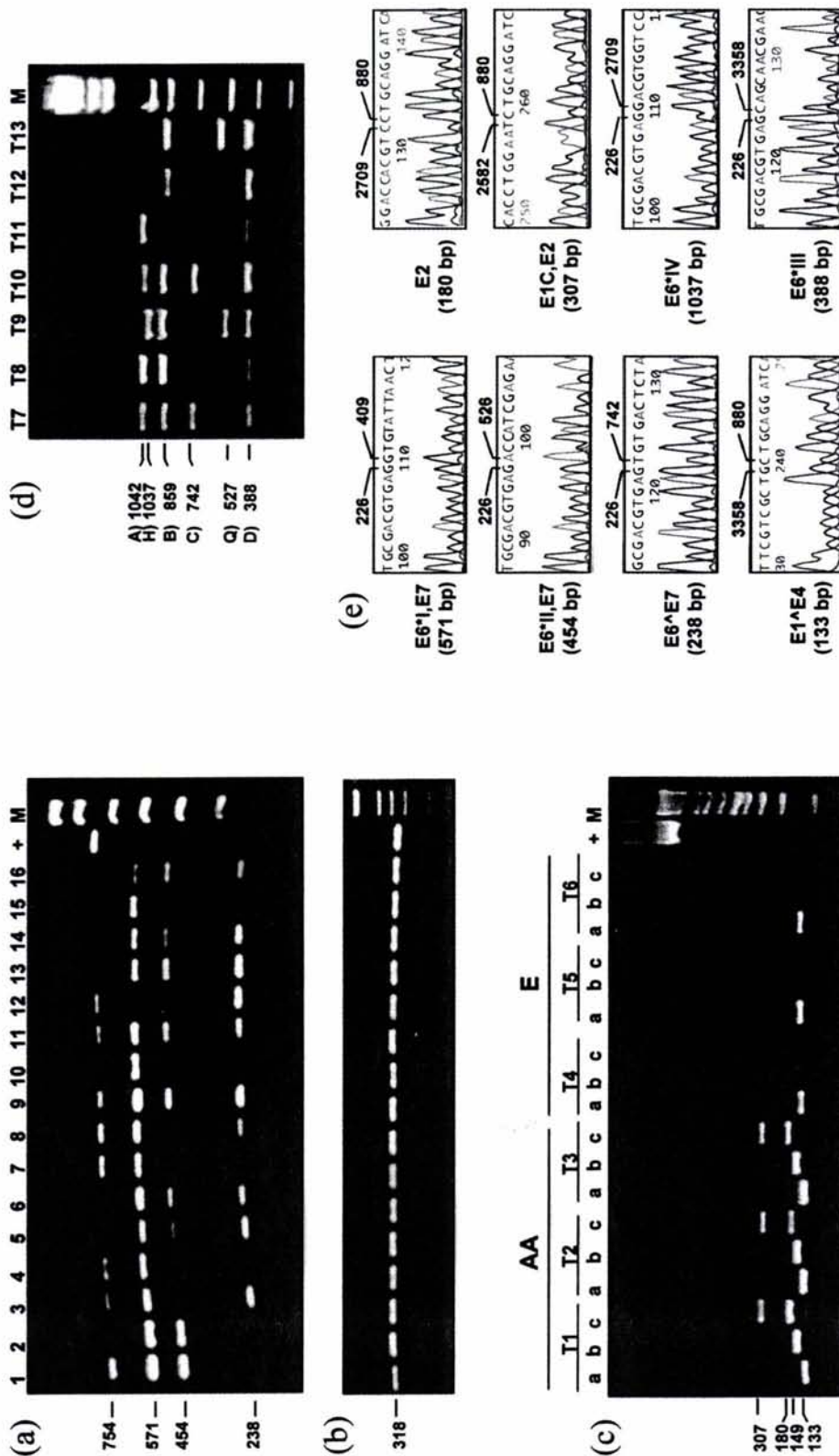


Fig. 2. Expression of the E6/E7, E1/E2 and E6-E2 regions in HPV-16-positive cervical carcinomas retaining the E1/E2 region detected by RT-PCR. (a) Transcripts from E6/E7 genes of representative cervical carcinomas. Experiments with E carcinomas are shown in lanes 1-4 and AA carcinomas in lanes 5-16. Transcripts were amplified with primers F104/R858. Bands of 754, 571, 454 and 238 bp correspond to transcripts E6^I,E7, E6^{II},E7 and E6^ΔE7, respectively. (b) Transcripts from β-actin of the samples shown in (a). (c) RT-PCR of the E1/E2 region from cervical carcinomas samples positive for AA (T1-T3) and E (T4-T6) variants. A band of 133 bp was amplified with primers F856/R3467 and corresponded to the E1^ΔE4 transcript; a band of 149 bp, obtained with primers F2975/R3124, corresponded to the 5' region of the E2 transcript; and bands of 180 and 307 bp were amplified with primers F856/R2865 and corresponded to the E2 and E1C,E2 transcripts, respectively (Fig. 1). (d) RT-PCR of the E6-E2 region from seven cervical carcinoma samples positive for AA (T9) and E (T7, T8, T10-T13) variants. Bands are labelled with the same letter as the polycistronic species in Fig. 1. The bands were amplified using a primer at the beginning of E6 (F104) and one at the end of E2 (R3624). Lane M contains a 1 kb marker plus DNA ladder. (e) Electropherograms of the partial DNA sequence of some of the transcripts in (a), (c) and (d). Sequences show the nucleotides around the splice junction, which are indicated above the electropherograms.

Table 1. Frequency of E6/E7 gene transcripts in cervical carcinomas positive for HPV-16 classified by virus class and the status of E1/E2 genes

Groups	n	Frequency of E6/E7 gene transcripts (%)			
		E6,E7	E6*1,E7	E6*II,E7	E6^E7
E1/E2 status					
Positive	39	26 (66.7)	38 (97.4) ^a	25 (64.1)	15 (38.5)
Negative	14	9 (64.3)	10 (71.4) ^b	7 (50.0)	2 (14.3)
Virus class					
AA	21	14 (66.7)	19 (90.5)	12 (57.1)	14 (66.7) ^c
E	32	21 (65.6)	29 (90.6)	20 (62.5)	3 (9.4) ^d
Total†	53	35 (66.0)	48 (90.6)	32 (60.4)	17 (32.1)

†All 53 tumours explored showed one or more of the four detected E6/E7 transcripts.

a vs b, $P=0.014$, Fisher's exact test; c vs d, $P<0.001$, χ^2 test.

E1/E2 (Table 2). Interestingly, a statistically significant positive correlation ($r=0.96$, $P<0.001$; linear regression) between the copy number of E6/E7 transcripts and DNA viral copy number was found in the overall population of carcinomas ($n=26$) (Fig. 3). The fact that the expression of E6/E7 is much higher in E1/E2-positive than in E1/E2-negative tumours also supports the hypothesis that the E2 gene could be down-regulated in these carcinomas and that E6/E7 expression levels depend on the amount, rather than the status, of the viral genomes.

To determine whether the E2 gene is expressed, all transcripts reported from the E1/E2 region were analysed (E1^E4, E2, E1C and E2C; Fig. 1). While none of these transcripts was detected in E1/E2-negative samples ($n=14$),

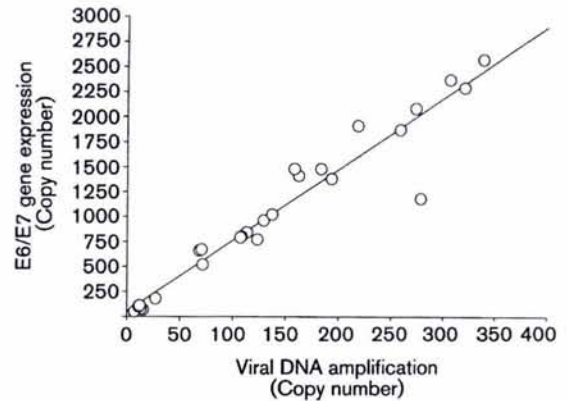
Table 2. Viral copy number (DNA and RNA) in HPV-16-positive carcinomas classified by the status of E1/E2 genes and viral classes

Groups	Viral copy number per cell (mean \pm SD) (n)		
	E1/E2-positive	E1/E2-negative	All
E6/E7 DNA			
E	146.3 \pm 67.4 (10) ^a	14.2 \pm 6.8 (6)	96.8 \pm 84.3 (16) ^c
AA	215 \pm 95.4 (10) ^b	NI	215 \pm 95.4 (10) ^f
Both	180.7 \pm 87.8 (20) ^c	14.2 \pm 6.8 (6) ^d	
E6/E7 RNA			
E	1142 \pm 540 (10) ^g	98.3 \pm 45.4 (6)	750.6 \pm 669.3 (16) ^k
AA	1563 \pm 682 (10) ^h	NI	1563 \pm 682 (10) ^j
Both	1352 \pm 636.5 (20) ⁱ	98.3 \pm 45.4 (6) ^j	

a vs b, $P=0.079$, t -test; c vs d, $P<0.001$, Mann-Whitney U-test; e vs f, $P=0.003$, t -test; g vs h, $P=0.14$, t -test; i vs j, $P=0.001$, Mann-Whitney U-test; k vs l, $P=0.006$, t -test.

AA, Asian-American variants; E, European variants.

NI, Not included.

**Fig. 3.** Linear correlation between the level of E6/E7 transcripts and DNA viral copy number in all the tumour samples investigated ($n=26$) ($r=0.96$, $P<0.001$; linear regression). The level of E6/E7 transcripts and viral DNA copy number were measured by the hybrid capture method. Assays were performed in triplicate.

one or more were detected in all E1/E2-positive samples explored ($n=39$). With primers located at the start and end (F856/R3467; Fig. 1) of the E1/E2 region, only the E1^E4 transcript (133 bp band; Fig. 2c, lane a) was detected in all E- or AA-positive samples. This transcript excluded a spliced region from nt 881 to 3357, including E2 (Figs 1 and 2e) and encodes the E4 protein. Since E1^E4 is the most abundant transcript detected in tumours (Stoler *et al.*, 1992; Bohm *et al.*, 1993; Sherman *et al.*, 1992) and cell lines (Sherman & Alloul, 1992; Rohlfes *et al.*, 1991), the lack of other E1/E2-derived transcripts could be the result of preferential PCR amplification. Therefore, a short 5' region of the full E2 transcript, not including E1^E4, was investigated with primers F2975/R3124 (Fig. 1). Surprisingly, all AA-positive samples showed the expected band for this E2 transcript (149 bp; Fig. 2c, lane b), but it was not found in any E-positive carcinomas ($P<0.001$; χ^2 test). This E2 transcript can be part of eight different polycistronic transcripts (E-K and M in Fig. 1) and includes a 3' region from the E1 gene, of either 106 bp (transcript E2; Fig. 1) or 233 bp (transcript E1C,E2; Fig. 1). Both transcripts were detected with primers F856/R2865 (Fig. 1) in all AA-positive samples, but not in E-positive samples [E2: 180 bp, Fig. 2c (lane c) and e; and E1C,E2: 307 bp; Fig. 2c (lane c) and e]. To determine whether the mRNAs contained the entire E2 transcript and encoded the full-length E2 protein, the 3' end of this RNA species was investigated with primers located at the 3' end of E2 (F3192/R3624; Fig. 1). Only the AA-positive samples were positive for this transcript and a PCR product of 432 bp was detected (data not shown). The E2C transcript was analysed in only six AA-positive samples and was present in them all. The abundant expression of E1^E4 and the lack of E2 and E1 transcripts strongly suggest that E2 is down-regulated

by alternative splicing in E-positive carcinomas retaining complete E1 and E2 genes. These results are in agreement with the detection of high levels of E1^ΔE4 in the cytosol and E1 and E2 transcripts in the nuclei of cancer cells from cervical carcinomas positive for HPV-16 (Stoler *et al.*, 1992). Similar E1/E2 transcript patterns have been found in cervical carcinomas derived from Caucasian patients (Stoler *et al.*, 1992), in whom it is assumed that E variants predominate (Yamada *et al.*, 1997). E2 transcripts have been previously found mainly in CIN lesions and in the cell lines HPKII and CaSki (Sherman *et al.*, 1992; Bohm *et al.*, 1993; Rohlf *et al.*, 1991; Sherman & Alloul, 1992). The nucleotide changes in the sequence of the E2 gene from AA variants (Casas *et al.*, 1999) could be related to differences in the transcription pattern. However, there are no changes in the sequence of known consensus splicing sites located in the E2 gene (Doorbar *et al.*, 1990; Sherman *et al.*, 1992), nor in primer annealing sites. The translation of E2 from such transcripts in *in vitro* and *in vivo* experiments (Alloul & Sherman, 1999) suggests that E2 could also be translated in tumour samples.

To determine whether differences in E2 gene expression between AA- and E-positive carcinomas are related to differences in the status of the viral genome, 11 of the 39 carcinomas positive for E1/E2 genes by PCR were further investigated by Southern blot analysis, including five samples positive for E variants and six positive for AA variants (nine are shown in Fig. 4). All tumours had intact E1/E2 genes (2.8 kb band; Fig. 4) and showed the typical seven-band *Pst*I/*Bam*HI cleavage pattern of HPV-16; however, seven (three E and four AA) also showed larger-sized bands above the E1/E2 band (Fig. 4; lanes 2, 3, 4, 6 and 7), a pattern consistent with tandem integration or episomal multimeric forms. The remaining four (two E and two AA) showed episomal patterns (Fig. 4; lanes 1, 5, 8 and 9). All 11 E1/E2-positive tumours contained more than 50 viral copies per cell and the bands observed were reasonably strong, including the E1/E2-containing band (2.8 Kb). These patterns are similar to those reported previously in a larger sample of carcinomas positive for E1/E2 by PCR (Casas *et al.*, 1999). Since Southern blotting is much less sensitive than PCR, the Southern blotting pattern found in a specific tumour may represent the predominant pattern in most of its tumour cells. These data indicate that there were no important differences in the viral genome status between AA- and E-positive samples, and thus differences in the expression of the E2 gene cannot be explained by this factor. The data also suggest that expression of E6/E7 genes seems to be independent of the status of the viral genome, since those tumours showing either episomal or tandem integration patterns both had high levels of E6/E7 expression.

E6/E7 transcripts in tumours positive for E1/E2 by either PCR or Southern blot do not necessarily come from tumour cells that contain intact E1/E2 genes. The ability to amplify E1/E2 by PCR does not exclude the presence

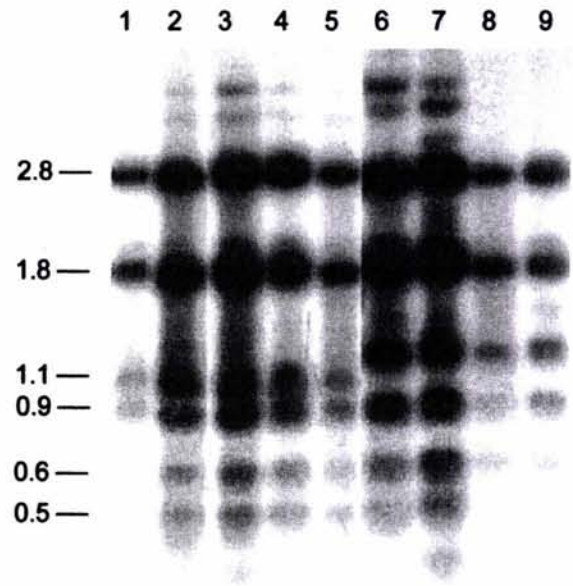


Fig. 4. Genomic Southern blot analysis of European and Asian-American HPV-16 carcinomas positive for the E1/E2 region by PCR. The signal intensity and restriction pattern of DNA samples derived from cervical carcinomas digested with *Pst*I and *Bam*HI and hybridized with the HPV-16 DNA probe in the Southern blot experiments are shown. Both European-positive (samples 1–5) and Asian-American-positive (samples 6–9) tumour DNAs contained the E1/E2 band (2.8 kb). Lanes 2, 3, 4, 6 and 7 show additional larger bands, suggesting tandem integration or multimeric episomal viral genomes, and lanes 1, 5, 8 and 9 show the episomal pattern. The restriction pattern of the reference HPV-16 genome digested with *Pst*I/*Bam*HI (kb) is indicated on the left.

of integrated viral forms with E1/E2 genes destroyed in some cells. In fact, tumours positive for E1/E2 may contain both cells with complete E1/E2 genes and cells with the E1/E2 genes disrupted (Berumen *et al.*, 1995). Therefore, in these tumours, the expression of viral oncogenes could come rather from those cells containing the interrupted the E2 gene. To investigate whether the E6/E7 and E1/E2 transcripts came from the same viral genomes containing a complete early region, we explored seven E1/E2-positive samples (one AA and six E) with primers located at the start of the E6 gene and at the end of the E2 gene (F104/R3624, Fig. 1). All seven samples showed transcripts composed from the E6/E7 and E1/E2 regions (Fig. 2d). Six different composed transcripts were detected in the samples analysed, including five reported previously (A, H, B, C and D) and one non-reported transcript containing the hybrid E6^ΔE7 transcript and the spliced product E1^ΔE4 (Q in Figs 1 and 2d). These and previously reported data (Sherman *et al.*, 1992; Sherman & Alloul, 1992) clearly indicate that transcripts from E6/E7 genes can arise from genomes with an intact E2 gene.

Since the E2 gene of AA-a and AA-c variants has 16 non-conserved mutations distributed throughout the entire open reading frame (Casas *et al.*, 1999), we determined whether these proteins repressed the viral oncogene transcription in four cell lines, two stably transfected with the β -galactosidase reporter gene driven by the LCR of the reference HPV-16 strain (C33a and HaCat) and two cell lines derived from cervical carcinomas with integrated HPV-16 (SiHa) or HPV-18 (HeLa) genomes, which constitutively express the E6/E7 oncogenes and do not express the E2 gene (Schwarz *et al.*, 1985; Sherman *et al.*, 1992). While the construct with the E2 reference gene (p16E2/E) strongly repressed the basal β -galactosidase activity (59.5% and 18.5% activity compared with the vector only) or E6/E7 oncogene expression (51.4% and 40.1% activity compared with the vector only), the construct with the AA-c E2 variant gene (p16E2/AA-c) repressed the LCR to a much lesser degree in all four cell lines tested, although the difference was statistically significant (Fig. 5b, c) ($P < 0.05$; *t*-test). The E2 protein of the AA-a variant repressed the LCR to a lesser degree than the European E2 protein in the four cell lines (Fig. 5b, c), but was statistically significant for C33a, SiHa and HeLa cells ($P < 0.05$; *t*-test). The difference in E2 repression activity between the AA-c and AA-a variants was statistically significant in all cell lines ($P < 0.05$; *t*-test). No difference in the transcription level of E2-transfected genes was detected in experiments with the three E2 variant genes (data not shown). These results could suggest that E2 repression is impaired by sequence variation in AA variants and may explain the expression of E6/E7 oncogenes in all AA-positive carcinomas, even the presence of transcripts with coding potential for the complete E2 protein. Although AA-a and AA-c E2 proteins were examined in the context of the reference E LCR, it can be reasonably assumed that they could behave similarly in the context of their own LCR, since the three LCRs do not differ in the nucleotide sequence of E2-binding sites (Veress *et al.*, 1999; Kammer *et al.*, 2000). Furthermore, E2 proteins from AA-a and E variants had similar transactivation effects on the LCR of both variant classes in transient transfection assays (Veress *et al.*, 1999), and in the present work the repressor activity of E2 from the three HPV-16 variants tested was not significantly different for the LCR of HPV-16 or HPV-18 (Fig. 5). We cannot exclude the possibility that the lower transcription repression activity of AA E2 variant proteins could be also associated with a decreased stability or impaired nuclear localization of these proteins (Abrio *et al.*, 1996).

Several groups have reported that full-length E2 expression induces apoptosis in many types of cell (Sanchez-Perez *et al.*, 1997; Webster *et al.*, 2000, 2001). Although it is possible that the 'repression' effect demonstrated above could be due to cell apoptosis rather than E2-induced repression of the target gene, this seems to be unlikely, since the expression level of the β -actin gene was not different among the experimental groups (data not shown). Furthermore, in previous reports some authors have

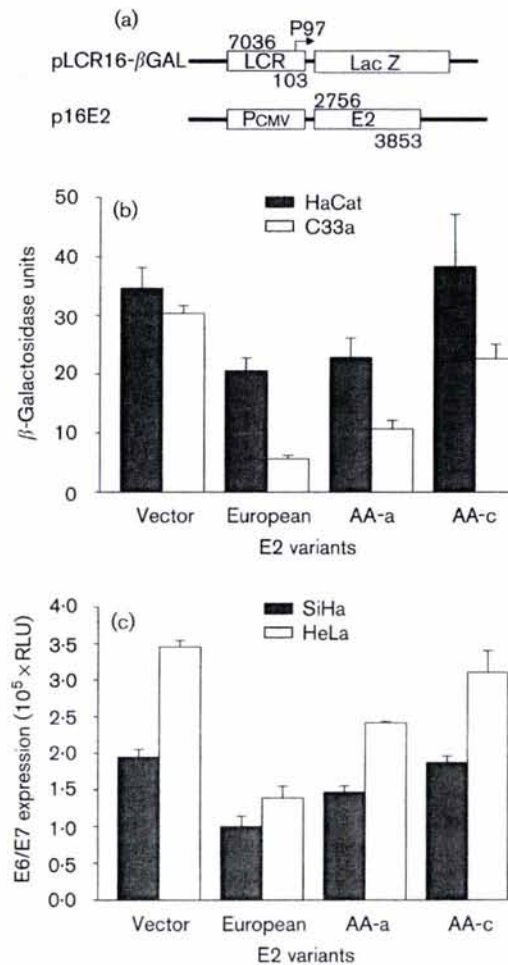


Fig. 5. Gene expression regulation of the viral E6/E7 oncogenes by E2 variant genes *in vivo*. (a) Partial schematic representations of genetic constructions. The complete long control region (LCR) (nt 7036–103) of the reference HPV-16 strain was cloned upstream from the β -galactosidase reporter gene into the pc4-AUG- β gal vector. The E2 genes of the E reference strain and AA-a and AA-c variants (nt 2756–3853) were cloned into the pcDNA3 plasmid in front of the cytomegalovirus (CMV) promoter. (b, c) The gene regulatory function of the HPV-16 E2 variant genes was measured after transitory transfection experiments in C33a and HaCat cell lines (b), which were permanently transfected with the pLCR16- β gal construct constitutively expressing β -galactosidase, and in SiHa and HeLa cell lines (c) constitutively expressing the E6/E7 oncogenes of HPV-16 and HPV-18, respectively (see Methods). β -Galactosidase activity was measured using a colorimetric assay and the level of E6/E7 transcripts was detected by the hybrid capture method, adapted to analyse total RNA with DNA probes. The bars show the mean \pm SD of three experiments. Vector, plasmid pcDNA3; AA, Asian-American; RLU, relative light units.

shown that E2 failed to induce apoptosis in C33 and HaCat cell lines (Desaintes *et al.*, 1997), two of the cell lines where we demonstrated the lower E2 repression

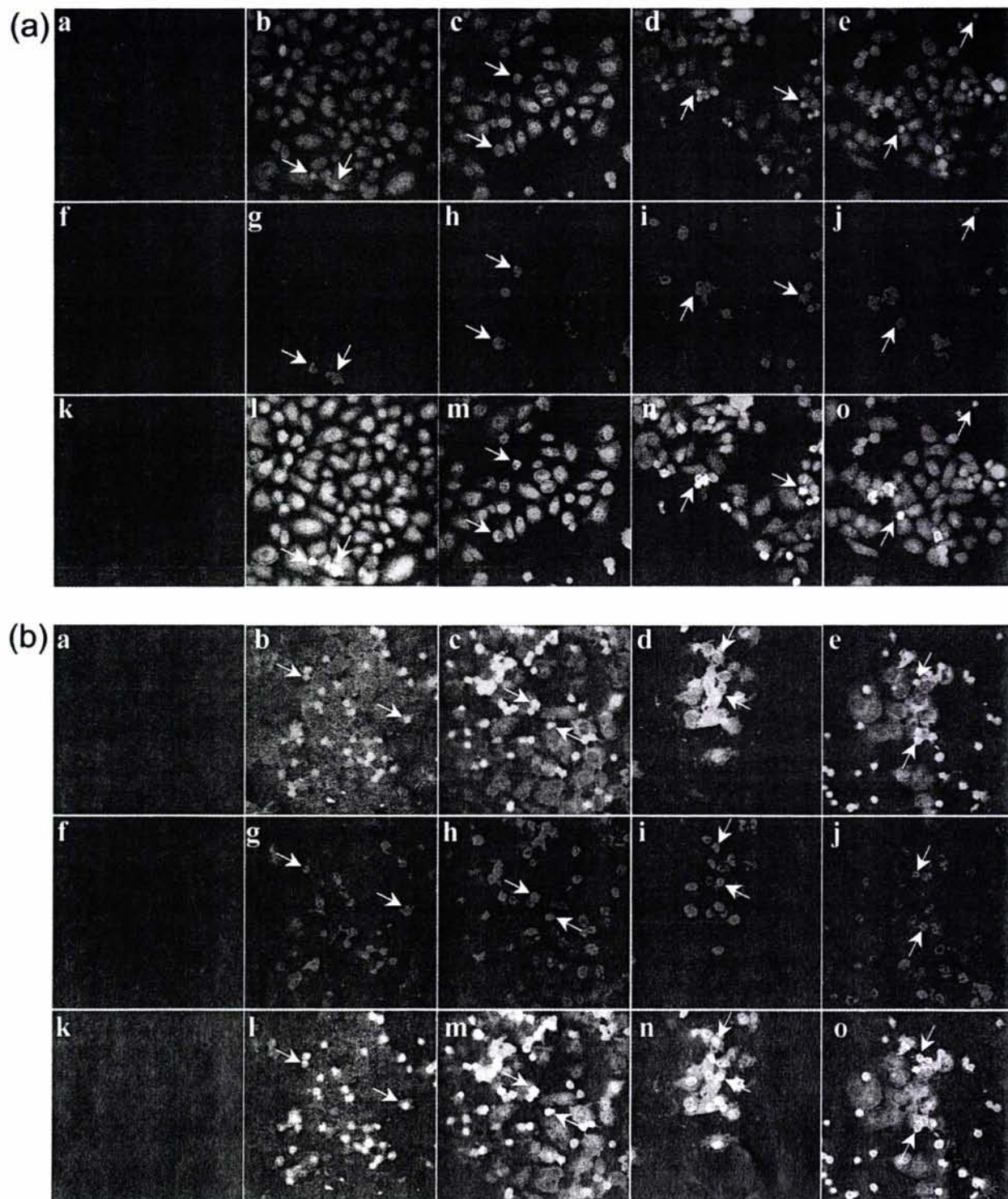


Fig. 6. Confocal laser-scanning microscopy of SiHa (a) and HeLa (b) cells co-transfected with E2- and GFP-expressing plasmids and stained using the TUNEL apoptosis assay. For both panels, the first row (a–e) shows the green channel, which detects GFP; the second row (f–j) shows the red channel, which detects the TUNEL signal; and the third row (k–o) shows the co-localization channel. The first column (a, f and k) shows non-transfected cells, the second column (b, g and l) shows cells transfected only with pBQI25 plasmid, the third column (c, h and m) shows cells co-transfected with pBQI25-f and p16E2/E, the fourth column (d, i and n) shows cells co-transfected with pBQI25-f and p16E2/AA-a, and the fifth column (e, j and o) shows cells co-transfected with pBQI25-f and p16E2/AA-c. Examples of apoptotic signals are indicated with arrows. The apoptotic signals in transfected cells stain yellow in the third channel. Magnification $\times 400$.

activity of AA variants. To confirm that differences in the E2 repression activity between the AA and E variants was not associated with differences in the capacity of E2 to induce apoptosis, we measured apoptosis using the TUNEL technique in SiHa and HeLa cells after co-transfection with E2 plasmids and a GFP-expressing plasmid (pQBI25-f) under the same conditions used for the E2 repression assays. Similar levels of apoptosis were observed with the three E2 variant genes by flow cytometry analysis. The proportion of apoptosis induced by E, AA-a and AA-c E2 genes in the transfected cells was 26.1 ± 6.7 , 17.5 ± 13.6 and 25.9 ± 9.8 %, respectively, in HeLa cells, and 52.2 ± 19.1 , 51.7 ± 43.4 and 41.1 ± 23.2 %, respectively, in SiHa cells. Similar results were obtained by confocal microscopy analysis. A representative set of experiments explored by confocal microscopy is shown in Fig. 6. These data indicated that differences in the expression of E6/E7 oncogenes between cells transfected with E and AA E2 variant genes are directly related to differences in the repression activity of E2 proteins, rather than differences in the apoptosis activity of E2 proteins.

E2 inactivation by alternative splicing or sequence variation suggests that a selective pressure would not be exerted that would lead to the obliteration of the E2 gene. Disruption of E1/E2 genes could instead be associated with cellular differentiation and sequence variation of the E1/E2 genes. For instance, whereas all well-differentiated tumours retained the complete E1/E2 genes, only one-third of less-differentiated carcinomas did so (Berumen *et al.*, 1994). In agreement with these data, the splicing of E2 through the formation of E1^ΔE4 transcripts occurs essentially in well-differentiated cells *in vitro* (Pray & Laimins, 1995; Frattini *et al.*, 1996) or in the upper well-differentiated cells of tumour samples (Stoler *et al.*, 1992). The disruption of E1/E2 genes occurs much more frequently in E than in AA variants (Casas *et al.*, 1999). Therefore, as the E viral genome remains in the basal undifferentiated cells, the integration and disruption of the E2 gene could be favoured. In contrast, in well-differentiated cells, the E viral genome retaining the complete E1/E2 region could deactivate E2 by splicing. On the other hand, for AA variants there would not be a selective pressure to induce the disruption or splicing of the E2 gene.

In addition to differences in the biological activities of the E6 protein (Stoppler *et al.*, 1996), viral copy number (Casas *et al.*, 1999) and up-regulation of the p97 promoter (Veress *et al.*, 1999; Kammer *et al.*, 2000), the enhanced oncogenicity of AA variants could be further associated with the novel E6^ΔE7 transcript and with the lower p97 promoter repression of E2 variant proteins. The association of the E6^ΔE7 transcript with AA-positive tumours is clear; however, not all AA tumours had this transcript, while some of the E variants did. Furthermore, the protein encoded by this transcript does not include regions involved with cell transformation and immortalization (Myers & Androphy, 1995; Halpern & Munger, 1995). This protein contained 41 of

the 43 amino acids of the E6^ΔI truncated protein and, like this protein, could function as a transactivator of the p97 promoter (Shirasawa *et al.*, 1994). The low repression activity of E2 suggests that increased expression of E6/E7 oncogenes may occur much earlier in AA tumours. Therefore, the time period between viral infection and the emergence of a frankly invasive cancer may be decreased. This hypothesis could explain the association of the AA-c variant with patients 11 years younger than those with E variants (Berumen *et al.*, 2001). In the case of E HPV-16 variants, the increased expression of the E6/E7 oncogenes is linked with disruption of the E2 gene during viral integration (Schwarz *et al.*, 1985; Schneider-Maunoury *et al.*, 1987; Romanczuk *et al.*, 1990) or down-regulation of E2 by splicing (this paper), which may depend on cellular factors. Consequently, the lapse from infection time to development of an invasive tumour could be longer. These hypotheses need to be confirmed since, in the W12 cell line, E2 has no effect on transcription of E6/E7 from episomal viral DNA (Bechtold *et al.*, 2003).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT), grant number 8135/A1 (to J.B.) and was undertaken mainly in the Postgraduate School of Medicine of the Mexican Army. We are grateful to Dr Susana Kofman and Alejandro Garcia for help with laboratory resources.

REFERENCES

- Abrio, A., Kurg, R. & Ustav, M. (1996). Transcriptional and replicational activation functions in the bovine papillomavirus type 1 E2 protein are encoded by different structural determinants. *J Virol* **70**, 6169–6179.
- Alloul, N. & Sherman, L. (1999). The E2 protein of human papillomavirus type 16 is translated from a variety of differentially spliced polycistronic mRNAs. *J Gen Virol* **80**, 29–37.
- Bechtold, V., Bread, P. & Raj, K. (2003). Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol* **77**, 2021–2028.
- Berumen, J., Casas, L., Segura, E., Amezcua, J. & Garcia-Carrancá, A. (1994). Genome amplification of human papillomavirus type 16 and 18 in cervical carcinomas is related to retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer* **56**, 640–645.
- Berumen, J., Unger, E., Casas, L. & Figueroa, P. (1995). Amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer. *Hum Pathol* **26**, 676–681.
- Berumen, J., Ordoñez, R., Lazcano, E. & 7 other authors (2001). Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* **93**, 1325–1330.
- Bohm, S., Wilczynski, S. P., Pfister, H. & Iftner, T. (1993). The predominant mRNA class in HPV16-infected genital neoplasias does not encode the E6 or the E7 protein. *Int J Cancer* **155**, 791–798.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Casas, L., Galvan, S., Ordoñez, R., Lopez, N., Guido, M. & Berumen, J. (1999). Asian-American variants of human

- papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* **83**, 449–455.
- Cullen, A., Reid, R., Campion, M. & Lörincz, A. (1991).** Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* **65**, 606–612.
- Desaintes, C., Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M. & Thierry, F. (1997).** Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J* **16**, 504–514.
- Dodd, J., Paraskevas, M. & Mcnicol, P. (1992).** Detection of human papillomavirus 16 transcription in human prostate tissue. *J Urol* **149**, 400–402.
- Doorbar, J., Parton, A., Hartley, K., Banks, L., Crook, T., Stanley, M. & Crawford, L. (1990).** Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* **178**, 254–262.
- Frattoni, M. G., Lim, H. B. & Laimins, L. A. (1996).** In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3062–3067.
- Guido, M., Zamorano, R., Garrido-Guerrero, E., Gariglio, P. & Garcia-Carrancá, A. (1992).** Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *J Gen Virol* **73**, 1395–1400.
- Halpern, A. & Munger, K. (1995).** HPV16 E7: Primary structure and biological properties. In *Human Papillomaviruses 1995: a Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences*, pp. III-58–III-73. Edited by G. Myers, H. Delius, J. Icenogel, H. U. Bernard, C. Baker, A. Halpern & C. Wheeler. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory.
- Kammer, C., Warthorst, U., Torrez-Martínez, N., Wheeler, C. & Pfister, H. (2000).** Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* **81**, 1975–1981.
- Lazcano, E., Moss, S., Alonso De Ruiz, P., Salmeron, J. & Hernandez, M. (1999).** Cervical cancer in developing countries: why it is ineffective, the case of Mexico. *Arch Med Res* **30**, 240–250.
- Myers, G. & Androphy, E. (1995).** The E6 protein. In *Human Papillomaviruses: a Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences*, pp. III-47–III-57. Edited by G. Myers, H. Delius, J. Icenogel, H. U. Bernard, C. Baker, A. Halpern & C. Wheeler. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory.
- Norton, P. & Coffin, J. (1985).** Bacterial β -galactosidase as a marker of Rous sarcoma virus gene expression and replication. *Mol Cell Biol* **5**, 281–290.
- Pray, T. & Laimins, L. (1995).** Differentiation-dependent expression of E1^AE4 proteins in cell lines maintaining episomes of human papillomavirus type 31b. *Virology* **206**, 679–685.
- Rohlf, M., Winkenbach, S., Meyer, S., Rupp, T. & Durst, M. (1991).** Viral transcription in human keratinocyte cell lines immortalized by human papillomavirus type-16. *Virology* **183**, 331–342.
- Romanczuk, H., Thierry, F. & Howley, P. (1990).** Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 p97 and type 18 p105 promoters. *J Virol* **64**, 2849–2859.
- Sanchez-Perez, A. M., Soriano, S., Clarke, R. & Gaston, K. (1997).** Disruption of the human papillomavirus type 16 E2 gene protects cervical carcinoma cells from E2F-induced apoptosis. *J Gen Virol* **78**, 3009–3018.
- Schneider-Maunoury, S., Croissant, O. & Orth, G. (1987).** Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J Virol* **61**, 3295–3298.
- Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. & Zur Hausen, H. (1985).** Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**, 111–114.
- Sherman, L. & Alloul, N. (1992).** Human papillomavirus type 16 expresses a variety of alternatively spliced mRNAs putatively encoding the E2 protein. *Virology* **191**, 953–959.
- Sherman, L., Alloul, N., Golan, I., Durst, M. & Baram, A. (1992).** Expression and splicing patterns of human papillomavirus type-16 mRNAs in pre-cancerous lesions and carcinomas of the cervix, in human keratinocytes immortalized by HPV 16, and in cell lines established from cervical cancers. *Int J Cancer* **50**, 356–364.
- Shirasawa, H., Jin, M., Shimizu, K., Akutsu, N., Shino, Y. & Simizu, B. (1994).** Transcription-modulatory activity of full-length E6 and E6*1 proteins of human papillomavirus type 16. *Virology* **15**, 36–42.
- Stoler, M., Rhodes, C., Whitbeck, A., Wolinsky, S., Chow, L. & Broker, T. (1992).** Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol* **123**, 117–128.
- Stoppler, M., Ching, K., Stoppler, H., Clancy, K., Schlegel, R. & Icenogel, J. (1996).** Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* **70**, 6987–6993.
- Thummel, C., Boulet, A. & Lipshitz, H. (1988).** Vector for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene* **74**, 445–456.
- Veress, G., Szarka, K., Dong, X., Gergely, L. & Pfister, H. (1999).** Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* **80**, 1035–1043.
- Webster, K., Parish, J., Pandya, M., Stern, P. L., Clarke, A. R. & Gaston, K. (2000).** The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem* **275**, 87–94.
- Webster, K., Taylor, A. & Gaston, K. (2001).** Oestrogen and progesterone increase the levels of apoptosis induced by the human papillomavirus type 16 E2 and E7 proteins. *J Gen Virol* **82**, 201–213.
- Wilczynski, S., Pearlman, L. & Walker, J. (1988).** Identification of HPV16 early genes retained in cervical carcinomas. *Virology* **166**, 624–627.
- Xi, L. F., Koutsky, L. A., Galloway, D. A., Kuypers, J., Hughes, J. P., Wheeler, C. M., Holmes, K. K. & Kiviat, N. (1997).** Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **89**, 796–802.
- Yamada, T., Manos, M., Peto, J., Greer, C., Muñoz, N., Bosch, F. & Wheeler, C. (1997).** Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* **71**, 2463–2472.