

MECANISMOS COEVOLUTIVOS ENTRE LOS RETROVIRUS Y SUS HUESPEDES

EL MODELO DEL TUMOR MAMARIO MURINO

IRENE NEPOMNASCHY*, VALERIA BUGGIANO*, ALEJANDRA GOLDMAN*, ISABEL PIAZZON*

División Medicina Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Resumen El virus del tumor mamario murino (MMTV) se considera actualmente un modelo de interés para investigar los mecanismos co-evolutivos entre los retrovirus y sus huéspedes. El MMTV es un retrovirus de tipo B que se transmite a través de la leche e induce adenocarcinomas mamarios por activación insercional de proto-oncogenes celulares. Existen también formas endógenas de estos virus integrados permanentemente en el genoma del ratón. Estos provirus se consideran el resultado de la infección de células de la línea germinal ocurridas en los últimos 4 a 5 millones de años. El marco de lectura abierto presente en el LTR 3' de los virus integrados codifica para un superantígeno (SAg) que es capaz de estimular una gran proporción de células T que comparten la región variable de la cadena β del TCR. La expresión de este SAg es crítica para el ciclo de vida del virus. Cuando un MMTV exógeno infecta al huésped, las células B resultan infectadas tempranamente y expresan el SAg viral. Las células T reactivas al SAg son reclutadas para responder al mismo y, como consecuencia, tanto las células T reactivas como los linfocitos B infectados se activan y comienzan a proliferar. Este hecho facilita la integración del MMTV y el incremento del número de linfocitos infectados, dando lugar a un importante aumento en la carga viral. Los linfocitos transfieren los virus a la glándula mamaria en la cual, bajo la influencia de hormonas esteroideas, se produce una gran amplificación de la carga viral. Se ha hipotetizado que la presencia de provirus Mtv endógenos conferiría una ventaja selectiva a la población murina, ya que al inducir la delección clonal temprana de las células T reactivas a los mismos, protegería al huésped de la infección con un virus exógeno que codifique para un SAg con reactividad cruzada. Sin embargo, resultados recientes discutidos en este trabajo sugieren que los provirus Mtv pueden resultar desventajosos para la población murina ya que son capaces de recombinar con variantes exógenas, dando lugar a partículas virales altamente tumorigénicas. Estos resultados se discuten en relación a trabajos recientes que sugieren la participación de secuencias virales altamente homólogas a los virus MMTV en la carcinogénesis mamaria humana.

El genoma humano contiene múltiples secuencias retrovirales endógenas (HERVs) que representan probablemente las huellas de infecciones

ancestrales por retrovirus en células de la línea germinal. Se ha estimado que entre el 5 y el 10% del genoma de los mamíferos estaría compuesto por elementos introducidos por mecanismos que involucran transcripción reversa¹. Alrededor del 10% de éstos pueden identificarse estructuralmente como provirus, es decir que contienen regiones LTR y sitios de unión a primers que flanquean regiones codificantes internas relacionadas a los genes *gag* y *pol*. Se ha postulado también que estas secuencias podrían ser el re-

Recibido: 2-X-1996

Aceptado: 16-X-1996

Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

* Becaria del CONICET

Dirección postal: Dra. Irene Nepomnaschy, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires. Argentina

sultado de procesos evolutivos que habrían afectado a estructuras ancestrales más simples, sugiriendo que los retroelementos habrían evolucionado junto con el gen de la transcriptasa reversa².

Los provirus parecen haber sufrido adaptaciones específicas a su estilo de vida endógeno. En primer lugar suelen ser transcripcionalmente silenciosos, fundamentalmente por efectos epigenéticos asociados a la metilación de su genoma³. En segundo lugar, son a menudo defectivos debido a la presencia de deleciones o mutaciones puntuales que los incapacitan para generar virus infecciosos⁴. Por último, muchos virus endógenos, aunque competentes para su replicación, son incapaces de hacerlo en sus propios huéspedes⁵.

Estas características llevaron a considerar que la presencia de los provirus endógenos no involucraba, salvo contadas excepciones, efectos patogénicos. Por el contrario, en los últimos años la utilización de modelos experimentales ha permitido hipotetizar que algunos provirus endógenos podrían conferir protección frente a la infección por virus exógenos relacionados⁶⁻⁸. Se ha sugerido recientemente que la falta de detección de virus infecciosos humanos relacionados a los HERVs podría deberse a la extinción de las variantes exógenas como consecuencia de la adquisición evolutiva de estos provirus. En este mismo sentido se ha propuesto que la ausencia de secuencias endógenas relacionadas a los lentivirus y spumavirus podría ser consecuencia del hecho de que, en términos evolutivos, estos virus sean muy jóvenes y su integración permanente al genoma como virus endógenos no haya ocurrido aún⁹.

Sólo muy recientemente se han encontrado evidencias de que la presencia de estos retrovirus integrados permanentemente al genoma podría estar asociada a diversas patologías. Entre éstas, la carcinogénesis en el hombre¹⁰⁻¹³.

El virus del tumor mamario murino (MMTV) se considera actualmente un modelo de interés para investigar los mecanismos co-evolutivos entre los retrovirus y sus huéspedes. A diferencia de los HERVs, en los que no se observan variaciones importantes en el número de copias y los sitios de integración de secuencias completas de los mismos, indicando un equilibrio evolutivo estable⁹, los MMTV estarían aún en plena evolución ya que

en las poblaciones de ratones se detecta una gran variabilidad en cuanto a la presencia de provirus endógenos y a la existencia de variantes exógenas¹⁴⁻²⁴. Por otra parte, el interés de este modelo experimental se ve aumentado por la reciente descripción de retrovirus endógenos humanos altamente relacionados al virus del tumor mamario murino.^{11, 25}

Retrovirus

Ningún otro tipo de virus ha recibido tanta atención por parte de los científicos en los últimos años como los retrovirus^{5, 26}. Este hecho refleja su importancia como patógenos del hombre y otros animales. Las infecciones que inducen pueden ser benignas, moderadas y fatales, como las ocurridas por infección con el virus HIV. La característica más remarcable de estos virus es su ciclo de replicación, el que conlleva consecuencias biológicas especiales, tales como la capacidad de adquirir y alterar la estructura y función de secuencias génicas del huésped y la de insertarse en la línea germinal y comportarse como un elemento transposable, con consecuencias genéticas que han tenido una fuerza importante en la evolución de los vertebrados. Poseen además una gran plasticidad ya que su genoma sufre rápidas alteraciones por mutación y recombinación²⁶⁻²⁷. A pesar de la variedad de interacciones que mantienen con sus huéspedes, todos los retrovirus conocidos son similares en cuanto a la estructura del virión, la organización de su genoma y el modo de replicación. El virión posee una envoltura, codificada en el gen *env*; la nucleocápside interna está compuesta por tres o cuatro productos codificados en el gen *gag*. En el core se incluyen además varias proteínas que juegan un rol catalítico importante durante la replicación. Estas proteínas incluyen una proteasa y dos productos derivados del gen *pol*: la transcriptasa reversa cuyas actividades enzimáticas intervienen en convertir la información genética de una cadena simple de RNA a una cadena doble de DNA, y una integrasa, necesaria para la unión covalente del DNA viral al DNA celular para formar así el provirus.

Los retrovirus poseen genomas diméricos: dos cadenas positivas de RNA homólogas o heterólogas, unidas en o cerca del extremo 5'²⁸, mo-

dificadas de manera reminiscente a los RNA mensajeros celulares. El orden de los genes que codifican para las proteínas estructurales es invariablemente *gag-pol-env*. En algunos grupos de retrovirus, existen otros genes involucrados en la regulación de la expresión viral^{5, 26}. En cuanto al ciclo de replicación, puede considerarse la existencia de dos fases: la primera incluye la entrada del core del virión al citoplasma y la síntesis de una cadena doble de DNA usando como template a la cadena simple de RNA viral; la transferencia de esta estructura al núcleo y la integración del DNA al genoma del huésped. Estos pasos están mediados por proteínas que se encuentran dentro del virión y no requieren expresión de los genes virales. La segunda fase incluye la síntesis y el procesamiento del genoma viral, RNAm y proteínas, utilizando la maquinaria celular (por ej, la RNA polimerasa). El armado del virión ocurre por encapsidación del genoma por fusión de proteínas codificadas en los genes *gag* y *pol* y por proteínas codificadas en el gen *gag*, asociación de la nucleocápside con la membrana celular; la salida del virus ocurre por brotación²⁶.

Una de las características de los provirus (DNA viral integrado al genoma) es la de presentar secuencias repetitivas en sus extremos terminales 3' y 5', denominadas LTR. Los LTR se originan como consecuencia de la actividad de la transcriptasa reversa durante el proceso de retrotranscripción, en que esta enzima es capaz de «saltar» de un template a otro^{26-27, 29}. Los LTR contienen virtualmente todas las secuencias necesarias para la integración y posterior expresión del provirus.

Virus del tumor mamario murino (MMTV)

El virus del tumor mamario murino (MMTV) es un retrovirus de tipo B descubierto hace más de 50 años como una entidad transmisible a través de la leche que induce carcinomas mamarios en su huésped³⁰. El tipo celular más permisivo para la replicación del MMTV es el epitelio alveolar de la glándula mamaria³¹. Durante la lactancia, la expresión de este virus se incrementa marcadamente por influencia de las hormonas esteroideas. La aparición de tumores ocurre después de un largo período de latencia, lo que sugirió inicialmente que los MMTV no codifican para

oncogenes. En efecto, se ha determinado que los tumores que se desarrollan a partir de la integración de estos virus al genoma celular son el resultado de la activación de oncogenes celulares³²⁻³³.

El MMTV es un retrovirus típico que contiene un genoma de 8,5- kb. La cápside contiene dos cadenas simples de RNA asociadas con moléculas de transcriptasa reversa, proteínas derivadas del gen *gag* y tRNA^{Lys} del huésped utilizado como primer para la retrotranscripción.

Los MMTV no sólo existen como virus infecciosos exógenos sino también como provirus endógenos (*Mtv*) integrados permanentemente al genoma del ratón³³ y heredados de manera mendeliana. Tanto las cepas de ratones mantenidas en los bioterios como los ratones de poblaciones naturales poseen entre 2 y 14 provirus *Mtv* distintos en su genoma³⁴. La mayoría de los virus *Mtv* endógenos han perdido su capacidad para producir partículas virales infecciosas. Tanto los MMTV exógenos como los endógenos codifican para un superantígeno en la región ORF localizada en el extremo 3' del LTR^{14, 35}.

El virus MMTV se ha desarrollado una estrategia para explotar el sistema inmune de manera tal que la infección de ratones recién nacidos o adultos lleva a una infección crónica que dura toda la vida. La ruta natural de entrada es a través de la leche. Una vez que el virus atraviesa el tubo digestivo, interacciona con el sistema inmune en las placas de Peyer, infectando a los linfocitos allí presentes¹⁵. Es necesario que el sistema inmune esté intacto para que el MMTV complete su ciclo de vida²⁸. La expresión de superantígenos colabora a la amplificación viral y posteriormente las células del sistema inmune trasladan al virus a la glándula mamaria^{36, 37}.

Inducción de tumores de mama por MMTV

El MMTV es un virus transformante no agudo que no codifica para ningún oncogén. Sin embargo, su integración en el genoma del huésped constituye un evento que es potencialmente mutagénico. En efecto, se ha demostrado que estos virus actúan como un mutágeno insercional que causa la desregulación de los genes celulares adyacentes, siendo un potente inductor de

tumores mamarios³⁸. La desregulación de oncogenes celulares designados *Int* está altamente implicada en la tumorigénesis mamaria. El principal mecanismo por el cual el MMTV activa la expresión de estos oncogenes es una consecuencia del efecto de secuencias *enhancer* ubicadas dentro del LTR del genoma provisional sobre el promotor transcripcional del gen adyacente afectado. Se ha descrito sin embargo otro tipo de alteraciones de la expresión de oncogenes derivada de la integración del genoma viral dentro de la secuencia del oncogén afectado, lo que resulta en algunos casos en un transcripto quimérico truncado del gen rearrreglado³⁹. Estos virus pueden ser considerados entonces carcinógenos biológicos que inducen mutaciones somáticas como consecuencia de su integración en el genoma celular del huésped.

Cada estadio de la tumorigénesis mamaria parecería ser el resultado del crecimiento clonal de células que contienen nuevas integraciones virales. Este hallazgo ha permitido una aproximación a la identificación de genes que, al estar afectados, pueden contribuir a la progresión a través de diferentes estadios de la carcinogénesis mamaria.

Se han detectado alteraciones genéticas en por lo menos ocho genes diferentes (*Int1/Wnt1*; *Wnt3*; *Wnt10b*; *Int2/Fgf3*; *Fgf4*; *Fgf8*; *Int3* e *Int6*) en múltiples tumores mamarios como consecuencia de la integración de estos retrovirus⁴⁰. Los genes *Wnt* pertenecen a una familia de doce o más genes relacionados al gen *wingless* (*wg*) de *Drosophila*. En base a estudios desarrollados en *Drosophila*, se ha sugerido que una de las funciones de este gen sería aumentar la adhesión celular dependiente de calcio a través de la transducción de señales que regulan el nivel del pool de β -catenina intracitoplasmática y estabiliza su unión a la caderina. Los genes *Wnt1* y *Wnt3* no se encuentran expresados normalmente en la glándula mamaria, aunque se expresan durante el desarrollo embrionario y en otros tejidos adultos. Varios de los otros miembros de esta familia de genes se expresan en estadios definidos de la diferenciación y el desarrollo de la glándula mamaria. Los genes *Fgf 3*, *4* y *8* son miembros de la familia del gen del factor de crecimiento fibroblástico. Estos genes sólo se expresan durante el desarrollo embrionario temprano o en el adulto, pero no en el tejido mamario normal. Los

miembros de esta familia exhiben un rango de actividades biológicas superpuestas pero no idénticas: pueden actuar como mitógenos, quimio-atractantes, mediadores de la diferenciación celular y como potentes factores angiogénicos⁴⁰. El gen *Int3* posee una secuencia nucleotídica con homología al gen *Notch* de la *Drosophila*, aunque no es el homólogo murino de este gen sino uno de los miembros de la familia. El producto normal de este gen se encuentra en la glándula mamaria de hembras vírgenes, preñadas y lactantes. Las integraciones virales que se observan dentro de este gen determinan la sobreexpresión del dominio intracelular de la proteína. Ratones transgénicos que expresan *Int3* activado por MMTV, desarrollan 100% de tumores mamarios focales. Otro sitio común de inserción para el MMTV es el gen *Int6*. Este gen se expresa en todos los tejidos adultos, incluyendo la glándula mamaria y ha sido altamente conservado durante la evolución. La secuencia aminoacídica de los productos de este gen son idénticos en el ratón y en el hombre⁴⁰.

Superantígenos

El término superantígenos (SAg) se aplica a un grupo de moléculas que, unidas a antígenos mayores de histocompatibilidad (MHC) de clase II, estimulan células T portadoras de una cadena V β particular en su receptor, independientemente de la cadena que éste posea^{41, 42}. Este hecho hace que posean una muy potente actividad estimuladora de los linfocitos T⁴³.

El impacto del sistema inmune con superantígenos implica una fase inicial de proliferación celular de las células T reactivas al mismo. Esta expansión linfoidea es seguida por la inducción de delección clonal o inactivación funcional (anergia) de estas células^{16, 44, 45}.

Los superantígenos difieren de los antígenos convencionales en muchos aspectos en cuanto a su interacción con el receptor T (TCR). En el caso de los péptidos antigénicos convencionales, todos los elementos variables de ambas cadenas α y β (V α , J α , V β , D β , J β) contribuyen a la interacción del TCR con el complejo péptido-MHC. Los complejos superantígeno-MHC clase II, en contraposición, interaccionan exclusivamente con el elemento V β del TCR en una región de la cara late-

ral que no está involucrada normalmente en el reconocimiento de los antígenos convencionales⁴⁶. Como consecuencia del gran número de posibles combinaciones de todos los elementos variables de las cadenas α y β del TCR, la frecuencia de la respuesta T a un determinado péptido antigénico es por lo general muy baja (10^{-4} a 10^{-6}). Por el contrario, cada superantígeno es capaz de reconocer entre uno y cuatro de un número limitado de productos de genes V β (aproximadamente 20 en ratones y 50 en humanos) y de estimular todas las células T que posean dichos productos V β . Esto resulta en la estimulación de un gran número de células T. Algunos superantígenos son así capaces de afectar hasta el 40% del total de la población T^{47, 48}.

Además, a diferencia de los péptidos antígenicos convencionales, los superantígenos no requieren de procesamiento previo a la presentación por las moléculas de MHC clase II⁴⁹ y se unen a dichas moléculas en sitios diferentes del hueco en que se presenta el antígeno convencional⁵⁰.

Superantígenos endógenos y exógenos

Dentro del grupo de los superantígenos endógenos se encuentran los antígenos murinos del sistema menor de estimulación linfocitaria (Mls). Estos fueron descubiertos originalmente por su capacidad de estimular fuertemente la proliferación de células con el mismo haplotipo MHC en reacciones de cultivo mixto de linfocitos⁵¹. En estas reacciones, un gran número de células T vírgenes responden al estímulo de los antígenos Mls. Existen alelos estimulatorios (designados a) y alelos nulos (designados b). Recientemente se han identificado estos y otros superantígenos, como los productos de genes de distintas variantes de retrovirus del tumor mamario murino endógenos (Mtv)^{17, 18}.

Los superantígenos exógenos son producidos por una variedad de microorganismos. Incluyen proteínas secretadas tanto por bacterias grampositivas *Staphylococcus aureus*⁴³ y *Streptococcus pyogenes*⁵², como por *Mycoplasma arthritidis*⁵³. Dentro de los superantígenos exógenos, también se incluyen los codificados por los virus MMTV^{16, 19}, por el virus de la rabia^{54, 55} y por *Mycobacterium tuberculosis*⁵⁶.

Ambos tipos de superantígenos (endógenos y exógenos) inducen *in vitro* una intensa prolifera-

ción de las células T que expresan los productos V β correspondientes; pero una continua exposición *in vivo* a cualquiera de los dos tipos de superantígenos induce la eliminación o inactivación funcional de dichas células T.

Superantígenos codificados por retrovirus MMTV

Se ha demostrado que todos los superantígenos endógenos Mls están codificados por virus Mtv endógenos^{17, 25, 56}. Por ejemplo, el retrovirus Mtv-7 cosegrega con el superantígeno Mls-1a en el cromosoma 1, el Mtv-6 con el superantígeno Mls-3a en el cromosoma 16 y el Mtv-13 con el SAg Mls-2a.

Los MMTV exógenos presentes p.e. en la cepa de ratones C3H, también codifican para un superantígeno que puede ser transmitido verticalmente por la leche de ratones infectados por el virus, el cual induce la delección de las células T V β 14+¹⁶. Dos grupos han demostrado que este superantígeno está codificado por un gen del ORF (marco de lectura abierto) del LTR 3' (long terminal repeat) del MMTV^{14, 18}.

Se ha demostrado que las distintas variantes de los MMTV codifican para diferentes SAg^{14, 19, 21-24}. Estos son glicoproteínas de superficie de tipo 2, que presentan una gran variabilidad en su extremo carboxiterminal. Esta variabilidad determina la especificidad de reconocimiento por la región V β del receptor T.

La expresión de superantígenos resulta crítica para el ciclo de vida del MMTV. Las primeras fases de la infección afectarían casi exclusivamente a las células B para más tarde infectar a los linfocitos T. Como ocurre con otros virus, la infección y replicación de los MMTV es más eficiente en células en división. Los linfocitos B infectados expresan el superantígeno en su superficie, asociado a moléculas de clase II. Este complejo SAg/moléculas MHC de clase II estimula a las células T portadoras de una cadena V β apropiada en su receptor. La estimulación de estos clones T reactivos al superantígeno induce la proliferación de las células B infectadas, lo que da lugar a la amplificación viral. Posteriormente, las células T reactivas entran en un estado de inactivación funcional y/o son progresivamente delecionadas.

Complejidad de la interacción virus MMTV-huésped. Los provirus endógenos del MMTV protegen al huésped de la infección con virus MMTV exógenos relacionados

Cuando el huésped posee un provirus del tumor mamario murino endógeno, expresa constitutivamente el superantígeno codificado en su ORF. La expresión del superantígeno induce la delección intratímica temprana de las células T reactivas al mismo^{16, 28, 31, 45}. Si este huésped es infectado por un virus que expresa un SAg con reactividad cruzada con el codificado por el Mtv endógeno, estaría protegido de la infección ante la ausencia de las células T que, al reconocerlo, permiten su amplificación. Se ha postulado que la integración de provirus Mtv endógenos en el genoma del ratón constituiría entonces una ventaja selectiva, ya que protegería al mismo de la infección con virus exógenos. Resultados obtenidos utilizando diferentes modelos experimentales apoyan esta hipótesis^{6, 7}. Así, ratones transgénicos para el ORF del virus MMTV exógeno de C3H que expresan el superantígeno correspondiente a este virus, y muestran en consecuencia una delección temprana de las células TVβ14+ reactivas al mismo, se muestran resistentes a la infección con el virus MMTV C3H exógeno, desarrollando un porcentaje significativamente menor de tumores mamarios. Correlativamente, el título de virus en leche se ve muy disminuido. Cuatro generaciones más tarde, la transmisión del virus exógeno no puede detectarse. Estos resultados indican que en los ratones portadores del provirus endógeno opera una presión de selección negativa para el virus infeccioso que expresa un superantígeno igual al codificado por el provirus. Este y otros experimentos similares permitieron hipotetizar que la adquisición permanente de estos provirus en el genoma del ratón protege al mismo de la infección con virus exógenos relacionados.

Sin embargo, la presencia de provirus Mtv integrados permanentemente al genoma del huésped presenta también ventajas selectivas para el virus, al permitir la aparición de nuevas variantes infecciosas a través de mecanismos de recombinación.

Recombinación entre virus MMTV exógenos y provirus endógenos. Surgimiento de variantes virales con alta patogenicidad.

La recombinación entre genomas de retrovirus fue demostrada por primera vez durante infecciones con distintas variantes del virus del tumor aviario^{57, 58} y con virus de la leucemia murina⁵⁹. Se ha demostrado que los virus exógenos de la leucemia murina y del tumor aviario pueden recombinar además con secuencias virales endógenas^{60, 61}. Finalmente, se ha establecido que estos retrovirus pueden recombinar con secuencias celulares para dar lugar a virus transformantes⁶².

Los genomas retrovirales consisten en dos cadenas positivas de RNA que, en el virión maduro, están unidas cerca de sus extremos 5'. Algunos de los viriones producidos luego de infecciones mixtas contendrían cadenas de RNA heterólogas correspondientes a cada uno de los virus infectantes. Los intercambios genéticos ocurrirían cuando estos viriones heterocigotas infectan una célula. La hipótesis más aceptada actualmente sugiere que la recombinación puede ocurrir durante la retrotranscripción que da lugar a la cadena negativa de DNA debido a un salto de la transcriptasa reversa de un templado de RNA al otro^{63, 64}.

La existencia de fenómenos de recombinación entre virus MMTV ha sido descrita muy recientemente. En 1994, Golovkina y col.⁶⁵ reportaron que el virus MMTV exógeno de C3H y transcriptos del Mtv-1 endógeno pueden recombinar dando lugar a la expresión de nuevas variantes virales. El provirus Mtv-1 endógeno está altamente expresado en la glándula mamaria de las hembras C3H durante el período de lactancia⁶⁶. Estos autores demostraron que existía empaquetamiento de RNA viral endógeno codificado por el Mtv-1 por los viriones del virus exógeno. El Mtv-1, sin embargo, es uno de los pocos provirus endógenos capaces de producir partículas virales completas, si bien en baja cantidad⁶⁷.

En colaboración con estos autores hemos demostrado recientemente la existencia de recombinación entre un MMTV exógeno y un provirus Mtv no productivo e incapaz de expre-

sarse en tejido mamario. El virus MMTV exógeno (BALB14) expresa un SAg que interactúa con células T V β 14+ e induce adenocarcinomas de mama sólo en el 30-35% de las hembras de la cepa BALB/c multíparas. Cuando este virus infecta huéspedes de cepas portadoras del provirus endógeno Mtv-7, es capaz de recombinar con éste dando lugar a una variante viral exógena que expresa el SAg del virus endógeno. Este virus recombinante (MMTV-7) no puede amplificarse en el huésped en el que se origina, ya que éste carece de los clones T capaces de reconocer al SAg adquirido. En efecto, su expresión en mama no se evidencia mediante ensayos de protección de RNasa T1, aunque puede ser detectado después de ser amplificado por técnicas de RT-PCR. Sin embargo, si las hembras en las que se origina el virus recombinante amamantan recién nacidos que no hayan heredado el provirus endógeno Mtv-7 y que por lo tanto posean clones T reactivos al SAg del virus, éste puede amplificarse notablemente. Así, dos generaciones más tarde, la incidencia de tumores de mama supera el 80% y la gran mayoría de estos tumores expresan el virus recombinante.

Estos resultados permiten hipotetizar que la presencia en el genoma del ratón de provirus endógenos no productivos —considerada hasta ahora como protectora frente a la infección con virus MMTV exógenos— ofrecería además ventajas selectivas para el virus al aumentar su variabilidad poblacional, permitiendo así la ampliación del rango de huéspedes susceptibles y la expansión de variantes con alta patogenicidad.

Secuencias humanas altamente homólogas a secuencias de MMTV

Desde el descubrimiento de que los virus MMTV eran un agente etiológico de los tumores mamarios murinos, ha existido un gran interés en la búsqueda de agentes similares en el hombre. Numerosos trabajos sugirieron la existencia de tal agente, aunque los resultados obtenidos se consideraron durante mucho tiempo controvertidos⁶⁸⁻⁷¹. Se han descrito retrovirus endógenos altamente relacionados al virus del tumor mamario murino (HERV-K10, NMWV4, HML (Human endogenous MMTV-like))^{11, 72}. Recientemente, se ha reportado la existencia de partículas

virales con actividad de transcriptasa reversa que empaquetan secuencias que poseen un 97,4% de homología con la familia HERV-K10 en una línea celular derivada de un carcinoma mamario humano^{10, 13}. La expresión de estas secuencias se incrementaba alrededor de 30 veces luego de la estimulación con hormonas esteroideas. Otros autores han reportado que las partículas retrovirales producidas por esta misma línea celular (T47-D) podrían generarse por complementación de varios provirus endógenos y podrían empaquetar transcriptos virales de orígenes diferentes¹².

Por otra parte, Wang y col.⁷³ utilizando una sonda para el gen env del virus MMTV, pudieron detectar la presencia de secuencias con alta homología con este gen en 121 de 314 (38,5%) biopsias de adenocarcinomas mamarios humanos, en 2 de 29 (6,9%) fibroadenomas mamarios y en 2 de 107 (1,8%) muestras de mamoplastías reductoras. La secuencia no fue detectada en tejidos mamarios normales ni en otras neoplasias humanas. Estas secuencias mostraron una homología del 95 al 99% con las secuencias del gen env del MMTV. Estos datos indican que alrededor del 40% de los tumores mamarios humanos contienen secuencias génicas homólogas al gen env del MMTV, que están ausentes en otros tumores y tejidos normales. Estos resultados abren la posibilidad de que agentes infecciosos con alta homología con el virus MMTV puedan desempeñar un rol en esta patología.

Agradecimientos: Este trabajo fue realizado mediante subsidios de la Fundación Antorchas, de FUNDALEU y del CONICET. Agradecemos a la Fundación de la Hemofilia el uso del citómetro de flujo y a la Dra. C.D. Pasqualini por su colaboración en la discusión de este trabajo.

Summary

Coevolutive mechanisms between retroviruses and their hosts. The murine mammary tumor model

Mouse mammary tumor virus (MMTV) is a type B retrovirus that is transmitted as an infectious milk-borne particle and that causes mammary carcinomas by insertional activation of cellular protooncogenes. Germ line infections result in

endogenous Mtv proviruses integrated in the genome of most mouse strains. These endogenous proviruses have been integrated into the genomes of mice for only the past 3-5 million years. The open reading frame present in the 3' long terminal repeat (LTR) of the provirus encodes a superantigen (SAg) which is able to stimulate a large proportion of T cells sharing a common T-cell receptor β chain variable domain ($v\beta$). Expression of this SAg is critical to the MMTV life cycle. After expression of the SAg in B cells a significant number of T cells are recruited to respond to these MMTV infected cells. As a consequence both the T cells expressing the relevant TCR $v\beta$ domain and the infected B cells become activated and start dividing. This would facilitate integration of MMTV and amplify the number of virus infected lymphocytes. Most likely during lactation the mammary glands become receptive to viral infection. The presence of endogenous Mtv induces an early clonal deletion of reactive T cells. For this reason it has been argued that the presence of these proviruses confers a selective advantage to the mouse population by protecting the host from infection with an exogenous MMTV coding for a cross-reactive SAg. However, recent results discussed herein suggest that Mtv proviruses may also be detrimental to the mouse population by participating in recombinations with exogenous MMTVs, giving rise to highly tumorigenic recombinant particles. These results are discussed in the light of recent reports suggesting the involvement of viral sequences with a high homology to MMTV in human mammary tumorigenesis.

Bibliografía

1. Temin HM. Reverse transcription in the eukaryotic genome: retroviruses, pararetroviruses, retro transposons, and retrotranscripts. *Mol Biol Evol* 1985; 6: 455-68.
2. Temin HM. In: The Retroviridae, Levy JA (ed), Plenum; New York, 1992; 1-18.
3. Conklin KF, Coffin JM, Robinson HL, et al. Role of methylation in the induced and spontaneous expression of the avian endogenous virus ev-1: DNA structure and gene products. *Mol Cell Biol* 1982; 2: 638-52.
4. Copeland NG, Jenkins NA, Nexo B et al. Poorly expressed endogenous ecotropic provirus of DBA/2 mice encodes a mutant Pr65gag protein that is not myristylated. *J Virol* 1988; 62: 479-87.
5. Coffin JM. In Fields Virology, (3rd ed. Fields BN et al. Philadelphia, Lipincott-Raven Pub, 1996; 1767-1847.
6. Golovkina TV, Chervonsky A, Dudley JP, Ross SR. Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* 1992; 69: 637-45.
7. Ross SR, Golovkina T. The role of endogenous Mtv loci in resistance to MMTV-induced mammary tumors. *J Virol* 1996; (in press).
8. Weiss RA. In: The Retroviridae, Vol 2, Levy JA (ed) New York, Plenum, 1993; 1-72.
9. Lower R, Lower J, Kurth R. The viruses in all of us: Characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5177-84.
10. Patience C, Simpson GR, Polletta AA, et al. Human endogenous retrovirus expression and reverse transcriptase activity in the T47-D mammary carcinoma cell line. *J Virol* 1996; 70: 2654-7.
11. Ono M, Yasunaga T, Miyata T, et al. Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol* 1986; 60: 589-98.
12. Seifarth W, Skladny H, Krieg-Schneider F, et al. Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenous retroviral sequences. *J Virol* 1995; 69: 6408-16.
13. Faff O, Murray AB, Schmidt J, et al. Retrovirus-like particles from the human T47-D cell line are related to mouse mammary tumor virus and are of human endogenous origin. *J Gen Virol* 1992; 73: 1087-97.
14. Choy Y, Kappler JW, Marrack P. A superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumor virus. *Nature* 1991; 350: 203-7.
15. Held W, Acha-Orbea H, MacDonald HR, Waanders GA. Superantigens and retroviral infection: insights from mouse mammary tumor virus. *Immunol Today* 1994; 15: 184-90.
16. Marrack P, Kishnir E, Kappler J. A Maternally Inherited Superantigen Encoded by a Mammary Tumor Virus. *Nature* 1991; 349: 524-6.
17. Frankel WN, Rudy C, Coffin JM, Huber BT. Linkage of Mls genes to endogenous mammary tumor viruses of inbred mice. *Nature* 1991; 349: 526-8.
18. Pullen AM, Choy Y, Kishnir E, et al. The open reading frames in the 3' long terminal repeats of several mouse mammary tumor virus integrants encode $v\beta$ 3-specific superantigen genes. *J Exp Med* 1992; 175: 41-7.
19. Held W, Shakhov A, Waanders G, et al. An exogenous mouse mammary tumor virus with properties of Mls-1a (Mtv-7) *J Exp Med* 1992; 175: 1623-33.
20. Dyson PJ, Knight AM, Fairchild S. Genes encoding ligands for deletion of V β 11 T cells cosegregate with mammary tumor virus genomes. *Nature* 1991; 349: 531-2.
21. Luther S, Shakhov AN, Xenarios I, et al. New infectious mammary tumor virus superantigen with $v\beta$ -specificity identical to bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB). *Eur J Immunol* 1994; 24: 1757-64.
22. Shakhov AN, Wang H, Acha-Orbea H et al. A new infectious mouse mammary tumor virus in the milk of mice implanted with C4 hyperplastic alveolar nodules. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2765-9.

23. Hodes RJ, Novick MB, Palmer LD, Knepper JE. Association of a V β 2-specific superantigen with a tumorigenic milk-borne mouse mammary tumor virus. *J Immunol* 1993; 150: 1422-28.
24. Brand-Carlson C, Butel JS, Wheeler D. Phylogenetic and structural analysis of MMTV LTR ORF sequences of exogenous and endogenous origins. *Virology* 1993; 193: 171-85.
25. Kambhu S, Ealldorf P, Lee J. Endogenous retroviral LTR within the HLA-DQ locus. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; 87: 4927-31.
26. Coffin JM. In *Virology*. 2nd. ed. Fields BN, Knipe DM. et al (eds) New York Raven Press, 1990; 1437-1500.
27. Goodrich DW, Duesberg PH. Retroviral recombination during reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 2052-6.
28. Coffin JM. Introduction to Retroviruses. In: AIDS and other manifestations of HIV infection. Second Edition. Wormser GP (ed) New York: Raven Press 1992; 37-77.
29. Hu W, Temin HM. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* 1990; 250: 1227-33.
30. Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 1936; 84: 162-9.
31. Golovkina TV, Prescott JA, Ross SR. Mouse mammary tumor virus-induced tumorigenesis in sag transgenic mice: a laboratory model of natural selection. *J Virol* 1993; 67: 7690-4.
32. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982; 31: 99-109.
33. Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus, integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1992; 69: 1073-87.
34. Acha-Orbea H, MacDonald HR. Superantigens of mouse mammary tumor virus. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 459-86.
35. Acha-Orbea H, Shakhov AN, Scarpellino I, et al. Clonal Deletion of V β 14-bearing T Cells in Mice Transgenic for Mammary Tumor Virus. *Nature* 1991; 350: 207-10.
36. Golovkina TV, Chervonsky A, Dudley JP, Ross SR. Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* 1992; 69: 637-45.
37. Held W, Waanders G, Shakhov AN, et al. Superantigen-induced immune stimulation amplifies mouse mammary tumor virus infection and allows virus transmission. *Cell* 1993; 74: 529-40.
38. Varmus HE. Recent evidence of oncogenesis by insertional mutagenesis. *Cancer Surv* 1982; 1: 309-39.
39. Kordon EC, Smith GH, Callahan R, Fallahan D. A novel non-mouse mammary tumour virus activation of the Int-3 gene in a spontaneous mouse mammary tumor. *J Virol*. 1995; 69: 8066-9.
40. Callahan R. MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: Their potential relevance to human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 39: 33-44.
41. Gascoigne NR, Ames KT. Direct Binding of Secreted T cell Receptor Beta Chain to Superantigen Associated with Class II Major Histocompatibility Complex Protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 613-6.
42. Happ MP, Woodland DL, Palmer E. A third T cell receptor V β gene encodes reactivity to Mls-1a gene products. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 6293-6
43. Marrack P, Kappler J. The Staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990; 248: 705-11.
44. Webb SR, Sprent J. T-cell responses and tolerance to Mls-1 determinants. *Immunol Rev* 1989; 107: 141-58.
45. Chatila T, Geha RS. Superantigens. Current Opinion in. *Immunology* 1992; 4: 74-8.
46. Pullen AM, Wade T, Marrack P, Kappler JW. Identification of the Region of T Cell Receptor Beta Chain that Interacts with Self-superantigen Mls-1a. *Cell* 1990; 61: 1365-74.
47. Janeway CA. Immune recognition: Mls-makes a little sense. *Nature* 1991; 349: 459-61.
48. Janeway CA, Lerner EA, Jason JM, Jones B. T lymphocytes responding to Mls-locus antigens are Lyt 1+2- and I-A restricted. 1980. *Immunogenetics* 1980; 10: 481-97.
49. Lafon M, Lafage M, Martínez-Arends A, et al. Evidence for a viral superantigen in humans. *Nature* 1992; 358: 507-10.
50. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with Sag. *Nature* 1994; 368: 711-18.
51. Festenstein H. Pertinent features of Mls locus determinants including revised nomenclature and strain distribution. *Transplantation*. 1974; 18: 555-7.
52. Tomai M, Kotb M, Majumdar G. Beachey. Superantigenicity of Streptococcal M protein. *J Exp Med* 1990; 172: 359-62.
53. Cole BC, Kartchner DR, Wells DJ. Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from Mycoplasma arthritis (MAM). VIII. Selective activation of T cells expressing distinct V β T cell receptors from various strains of mice by the 'superantigen' MAM. *J Immunol* 1990; 144: 425-31.
54. Paliard X, West SG, Lafferty JA, et al. Evidence for the Effects of a Superantigen in Rheumatoid Arthritis. *Science* 1991; 253: 325-9.
55. Lafon M, Scott-Algara D, Marche PN, et al. Neonatal deletion and selective expansion of mouse T cells by exposure to rabies virus nucleocapsid superantigen. *J Exp Med* 1994; 180: 1207-15.
56. Woodland DL, Happ MP, Golob KJ, Palmer E. An Endogenous Retrovirus Mediating Deletion of Alpha Beta T Cells? *Nature* 1991; 349: 529-30.
57. Voght PK. Genetically stable reassortment of markers during mixed infection with avian tumor viruses. *Virology* 1971; 46: 947-52.
58. Wyke JA, Beamand JA. Genetic recombination in Rous sarcoma virus: the genesis of recombinants and lack of evidence for linkage between pol, env and src genes in three factor crosses. *J Gen Virol* 1979; 43: 349-56.
59. Faller DV, Hopkins N. T1 oligonucleotides that segregate with tropism and with properties of gp70

- in recombinants between N- and B-tropic murine leukemia viruses. *J Virol* 1978; 26: 153-8.
60. Clavel F, Hoggan MD, Willey RL, Strebel K, Martin MA, Repaske R. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *J Virol* 1989; 63: 1455-9.
 61. Stephenson JR, Anderson GR, Tronick SR, Aaronson SA. Evidence for genetic recombination between endogenous and exogenous mouse RNA type C viruses. *Cell* 1974; 2: 87-96.
 62. Elder JH, Gautsch JW, Jensen FC, Lerner RA, Hartley JW, Rowe WP. Biochemical evidence that MCF murine leukemia viruses are envelope (env) gene recombinants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 4676-80.
 63. Linial M, Blair D. Genetics of retroviruses. In R. Weiss, N. Teich, H. Varmus and J. Coffin eds. *RNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY .1984; p: 649.
 64. Stuhlmann H, Berg P. Homologous recombination of copackaged retrovirus RNAs during reverse transcription. *J Virol* 1992; 66: 2378-88.
 65. Golovkina TV, Jaffe AB, Ross SR. Coexpression of exogenous and endogenous mouse mammary tumor virus RNA in vivo results in viral recombination and broadens the virus host range. *J Virol* 1994; 68: 5019-25.
 66. Golovkina TV and Ross SR (comunicación personal).
 67. van Nie R, Verstraeten AA. Studies of genetic transmission of mammary tumor virus by C3Hf mice. *Int J Cancer* 1975; 16: 922-31.
 68. Al-Sumidaie AMC, Hart A, Leinster SJ, Green CD, McCarthy K. Particles with properties of retroviruses in monocytes from patients with breast cancer. *Lancet* 1988; 5-8.
 69. Keydar I, Gilead Z, Karby S, Harel E. Production of virus bt embryonic cultures co-cultivated with breast tumor cells or infected with milk from breast cancer patients. *Nature New Biol* 1994; 214: 49-52.
 70. Seman G, Gallager HS, Lukeman JM, Dmochowski L. Studies on the presence of particles resembling RNA virus particles in human breast tumors, pleura effusions, their tissue cultures and milk. *Cancer* 1971; 28: 1431-42.
 71. Segal-Eiras M, Croce V, Pasqualini CD. Antibodies presumably cross-reacting with mouse retrovirus type B and C in the sera of both leukemia-lymphoma and mammary cancer patients. *Arch Geschwulstforsch* 1983; 53: 321-7.
 72. Medstrand P, Blomberg J. Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential transcription in normal human tissues. *J Virol* 1993; 67: 6778-87.
 73. Wang Y, Holland JF, Bleiweiss IJ, et al. Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 5173-9.

... for young molecular biologists, history does exist, but it is divided into two epochs: the past two years, and everything that went before. That these two have equal weight is a reflection of the exponential growth of the subject, and the urgent need to possess the future and acquire it more rapidly than anybody else does not make for empathy with the past.

....para los jóvenes biólogos moleculares, la historia existe, pero se divide en dos épocas: los últimos dos años y todo lo que vino antes. Que estas dos épocas tengan el mismo peso es un reflejo del crecimiento exponencial del tema, y la urgente necesidad de poseer el futuro y alcanzarlo antes que ningún otro no permite simpatizar con el pasado.

Sydney Brenner

Book review: *The lac operon: a short history of a genetic paradigm*. Benno Muller-Hill, New York: Walter de Gruyter, *Nature* 1997; 386:235