

XXI CONGRESO NACIONAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO

Mecanismos moleculares de la progresión tumoral inducida por la proteína HBx del virus de la hepatitis B

**E. Lara-Pezzi, P.L. Majano, F. Molina-Jiménez, A. Maldonado-Rodríguez, I. Benedicto, R. Moreno-Otero
y M. López-Cabrera**

Unidad de Biología Molecular. Hospital Universitario de la Princesa. Madrid. España.

EL VIRUS DE LA HEPATITIS B. ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y PROTEÍNAS VIRALES

El virus de la hepatitis B (HBV) es un virus hepatotrópico y no citopático cuyo genoma está formado por un ADN circular de doble cadena parcial de 3,2 kb, con la cadena de sentido negativo completa y la de sentido positivo incompleta. La infección por HBV afecta a más de 350 millones de personas en todo el mundo, causa hepatitis tanto aguda como crónica y se la considera un factor de riesgo de hepatocarcinoma^{1,2}. Tras la infección, la polimerasa viral, que se incluye en la partícula viral, completa la cadena de sentido positivo y el ADN se cierra de forma covalente, lo que da lugar a una molécula circular cerrada covalentemente (ADNccc), que sirve de molde para la transcripción viral³. El genoma de HBV contiene 4 genes, C/PreC, S/PreS, X y Pol, que se solapan total o parcialmente entre sí y están controlados por 4 promotores y un par de *enhancers* (fig. 1)^{3,4}. El gen C/PreC codifica para el antígeno *core* (HBcAg), que forma la cápsida del virus, y para el antígeno e (HBeAg) que se secreta y se utiliza como marcador de replicación viral, y se piensa que tiene propiedades tolerogénicas que podrían favorecer el fenómeno de persistencia viral¹. El gen S/PreS codifica para 3 proteínas, HBsAg, PreS1 y PreS2, mediante la utilización de codones de iniciación diferentes. El antígeno HBsAg es el componente principal de la envuelta del virus y las proteínas Pre-S1 y Pre-S2 originan la interacción inicial entre el virus y el receptor celular^{1,3}. El gen Pol codifica para la polimerasa viral que posee diversas actividades enzimáticas como la transcriptasa inversa, la ADN polimerasa y la actividad RNasa H, necesarias para la replicación viral^{1,3}. El gen X recibió su nombre porque la proteí-

na para la que codifica, HBx, carecía de homología con otras proteínas virales o celulares y porque se desconocía su función³. Hoy se sabe que la HBx puede regular diferentes funciones tanto del virus como del huésped, y su capacidad transactivadora de la transcripción es la función mejor documentada⁵.

LA PROTEÍNA HBX. FUNCIÓN TRANSACTIVADORA Y REGULADORA DE LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

La HBx es una proteína de 154 aminoácidos y 17 kDa que, aunque no presenta homología con ninguna proteína humana o viral conocida, está bastante conservada entre los distintos hepadnavirus de mamíferos. Existe una gran controversia acerca de la localización subcelular de la HBx. En estudios con células en cultivo, se ha descrito en algunos casos una localización citoplásica⁶, en otros nuclear⁷ y en otros tanto citoplásica como nuclear⁸. La localización nucleocitoplásica de la HBx se ha estudiado también en biopsias de hígados infectados, y se ha observado una localización principalmente citoplásica, con un 20% de las células positivas presentando señal nuclear⁹. Estos estudios de inmunohistoquímica han mostrado tinción de HBx tanto en casos de hepatitis crónica como en cirrosis y hepatocarcinoma^{5,10}. Se ha señalado que el grado de expresión de la proteína podría afectar a su localización subcelular, pues se observa una acumulación citoplásica cuando la expresión es mayor, mientras que en células con pobre expresión de HBx se localizaría en el núcleo¹¹. En la fracción citoplásica, la HBx se asocia a la mitocondria y el proteosoma^{6,11,12}. La interacción de la HBx con la mitocondria da lugar a una alteración de su potencial de membrana, lo que produce un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) y una movilización del calcio intracelular¹²⁻¹⁴. En ciertos casos esta interacción entre HBx y la mitocondria conduce a la agresión mitocondrial y a la muerte celular¹⁵.

En cuanto a las funciones de la HBx, se ha descrito que esta proteína viral puede ser importante en el proceso de

Este estudio ha sido financiado por los proyectos SAF 2004-07855, del Ministerio de Educación y Ciencia, y C03/02, del Instituto de Salud Carlos III.

Correspondencia: Dr. M. López Cabrera.
Unidad de Biología Molecular. Hospital Universitario de la Princesa.
Diego de León, 62. 28006 Madrid. España.
Correo electrónico: mlopez.hlpr@salud.madrid.org

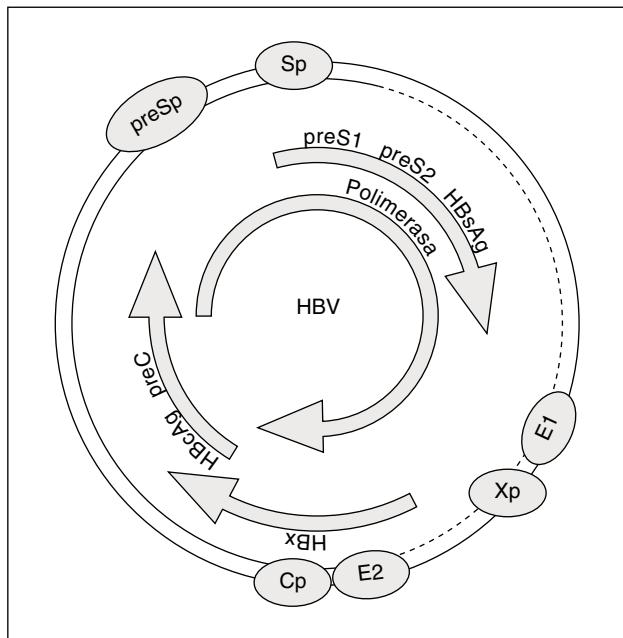


Fig. 1. Esquema del genoma del virus de la hepatitis B (HBV). Se representan las proteínas codificadas por el virus (flechas) y los elementos reguladores de la transcripción (promotores Cp, PreSp, Sp, Xp y enhancers E1, E2).

replicación viral. Sin embargo, la función de HBx mejor caracterizada es su capacidad transactivadora. Así, se ha descrito la capacidad de HBx de inducir transcripcionalmente diferentes genes celulares implicados en la respuesta inflamatoria y la carcinogénesis¹⁶⁻²⁷, lo que indica un papel activo de la HBx en el desarrollo de la enfermedad. Es interesante destacar además que la HBx es capaz de activar promotores dependientes no sólo de la ARN-polimerasa II, sino también de las ARN-polimerasas I y III^{28,29}.

Debido a su distribución nucleocitoplásica, la HBx es capaz de funcionar de forma dual dependiendo de su localización subcelular⁸. Así, en el núcleo la HBx puede funcionar como un coactivador gracias a su capacidad de interactuar tanto con factores de transcripción como con componentes de la maquinaria basal de transcripción. Se ha descrito que la HBx interacciona con varios factores de transcripción como: CREB, ATF-2, NF-IL6, NF-AT, Smad4 y HNF-1, lo que se traduce en un aumento en la capacidad de unión a ADN o en la capacidad transactivadora³⁰⁻³⁴. Respecto a la interacción de la HBx con componentes de la maquinaria basal de transcripción, se ha descrito que la HBx se une a TBP³⁵, TFIID³⁶, TFIIB^{7,37} y RPB5, que es una subunidad de la ARN-polimerasa II^{37,38}. Además, se ha señalado que la transactivación mediada por la HBx depende de la formación de un complejo trimérico HBx/TFIIB/RPB5³⁷.

Por otra parte, desde su localización citoplasmática, la HBx es capaz de interactuar con la mitocondria, lo que genera un aumento de ROS que conduce a la activación de diferentes factores de transcripción como NF-κB y STAT-

3¹³. Además, se ha observado que esta interacción induce la movilización de calcio desde la mitocondria, lo que explicaría parte de la gran variedad de efectos de la HBx¹⁴. El aumento de calcio intracelular inducido por HBx activa las tirosincinasas citosólicas Pyk-2 y Src^{39,40}. A través de Src, HBx activa la GTPasa Ras, lo que estimula a su vez dos rutas independientes, las de Raf-ERK y MEKK1-JNK^{41,42}, que convergen en la activación de los factores de transcripción AP-1^{42,43} y NF-κB^{44,45}. Asimismo, se ha descrito que la HBx es capaz de activar las cascadas de Jak-Stat y PI3K-Akt, lo que interfiere con la apoptosis inducida por TGFβ^{46,47}. La movilización del calcio intracelular inducida por HBx da lugar también a la activación y la translocación al núcleo del factor de transcripción NF-AT por la activación de la fosfatasa calcineurina⁴⁸. La capacidad de HBx de interactuar con el proteosoma y con las serinproteasas podría inhibir la degradación de distintos factores de transcripción y favorecer la activación de diversos genes^{5,49}. Además de AP-1, NF-κB, STAT-3 y NF-AT, la inducción de estas rutas conduce a la activación de gran cantidad de factores de transcripción, como Smad4, SP-1, Egr-1, AP-2, C/EBPα o CREB, que favorece la activación de gran variedad de genes e implica directamente a esta proteína viral en los procesos fisiopatológicos inducidos por la infección con HBV^{16,31,32}.

HBX Y EL DESARROLLO DE HEPATOCARCINOMAS

Desde el punto de vista epidemiológico, ha quedado establecido desde hace más de 2 décadas una clara asociación entre la infección por HBV y el desarrollo de hepatocarcinomas^{1,2,5}. En este contexto se ha detectado la presencia de ADN viral en la práctica totalidad de los hepatocarcinomas asociados a hepatitis B. Sin embargo, no parece que la activación de genes celulares potencialmente onco-génicos por la integración del ADN viral participe en el desarrollo de hepatocarcinomas, ya que todos los estudios de integración de HBV realizados hasta ahora han demostrado que la activación ocurre en diferentes sitios del genoma, y sólo en unos pocos casos ha tenido lugar cerca de algún gen celular^{1,2,5}. Tradicionalmente, se ha considerado que el desarrollo de hepatocarcinomas en individuos infectados crónicamente por HBV se debe principalmente a procesos fisiopatológicos generales de respuesta a la infección viral, tales como necrosis, inflamación y regeneración hepática, que tras varios años pueden dar lugar al desarrollo de cirrosis y posteriormente a la formación de tumores hepáticos. Sin embargo, en la actualidad está adquiriendo cada vez más fuerza la hipótesis de que la proteína HBx también es importante, al menos como cofactor, en la formación de tumores hepáticos^{5,50,51}. En este contexto se ha observado la presencia de esta proteína en un elevado número de hepatocarcinomas asociados a HBV^{10,20,21}. Asimismo, en algunos ratones transgénicos para HBx se ha observado el desarrollo de hepatocarcinomas histológicamente muy parecidos a los que se desarrollan en seres humanos^{52,53}. Otros investigadores han observado que, aunque la HBx no es capaz de inducir *per se*

la formación de tumores en ratones transgénicos, si es capaz de potenciar la formación de focos neoplásicos en presencia de c-myc, en dobles transgénicos, o al tratar los ratones con determinados carcinógenos^{54,55}. Por otro lado, se ha demostrado que la HBx es capaz de alterar el ciclo celular y de inducir la transformación celular *in vitro* en varios tipos celulares, entre ellos los hepatocitos⁵⁶.

El mecanismo exacto del potencial prooncogénico de la HBx no ha quedado aún claramente establecido. Además de la capacidad de activar distintas cascadas de señalización celular y de inducir la transcripción de algunos proto-oncogenes, existen otras actividades de la HBx que pueden explicar su potencial procarcinogénico. Primero, la HBx se une a p53 e inhibe su unión al ADN, su actividad transcripcional y su interacción con el factor de transcripción ERCC3, que participa en la reparación del ADN^{57,58}. Segundo, la HBx facilita la acumulación de mutaciones en el ADN de dos maneras: induciendo la síntesis de agentes que pueden dañar el ADN, como el NO²⁶, e interfiriendo con la reparación del ADN al unirse directamente con la proteína reparadora DDB-1⁵⁹. Tercero, la HBx interfiere con las señales apoptóticas y favorece la selección positiva de las células que expresan este transactivador viral⁵. Aunque también se ha descrito que la HBx induce la progresión del ciclo celular, activando CDK2 y CDC2 y acele-

rando el tránsito por los puntos de control G₀/G₁ y G₂/M^{60,61}, parece ser que esta capacidad depende de la cantidad de p53 en las células⁶². En presencia de gran cantidad de p53, la HBx inhibiría la división celular, mientras que si la expresión de p53 es muy baja o nula, la HBx tendría el efecto opuesto y favorecería la progresión del ciclo celular. En general, estos datos dan gran sustento a la teoría de que la HBx desempeña un papel principal en la generación y el desarrollo del tumor, y el hecho de que se exprese incluso cuando el tumor ya se ha establecido^{10,63} indica que podría desempeñar una función no sólo en el establecimiento del hepatocarcinoma, sino también en los estadios posteriores que dan lugar a la metástasis.

HBX Y ADQUISICIÓN DE PROPIEDADES METASTÁSICAS

La metástasis de tumores de origen epitelial es un proceso complejo que requiere la separación de células del tumor primario, la degradación de la membrana basal, la invasión de las células tumorales de la matriz extracelular, la intravasación de los vasos linfáticos y sanguíneos y, por último, la extravasación de los vasos para formar los tumores secundarios. El fenotipo metastásico de las células

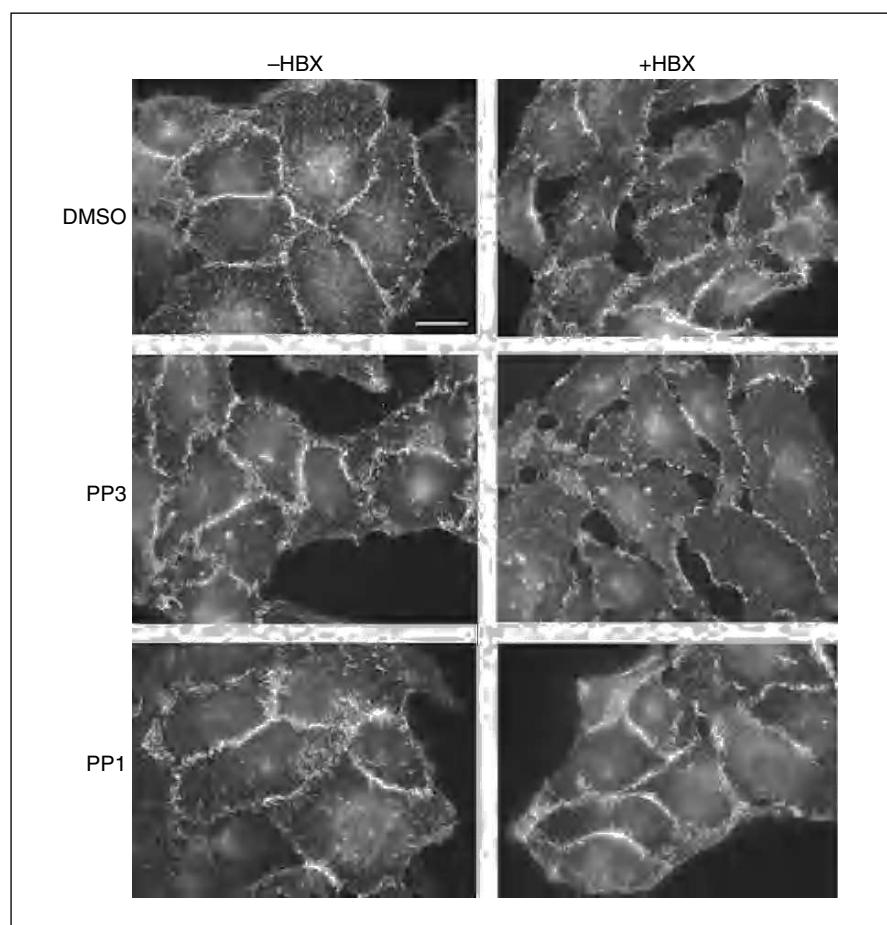


Fig. 2. La HBx induce la rotura de las uniones adherentes de manera dependiente de las tirosincinasas de la familia Src. Se aprecia que el inhibidor específico de la familia Src PP1 previene la rotura de las uniones intercelulares inducida por HBx, mientras que PP3, análogo a PP1 pero no permeable a la membrana celular, no tiene efecto en la rotura de las uniones.

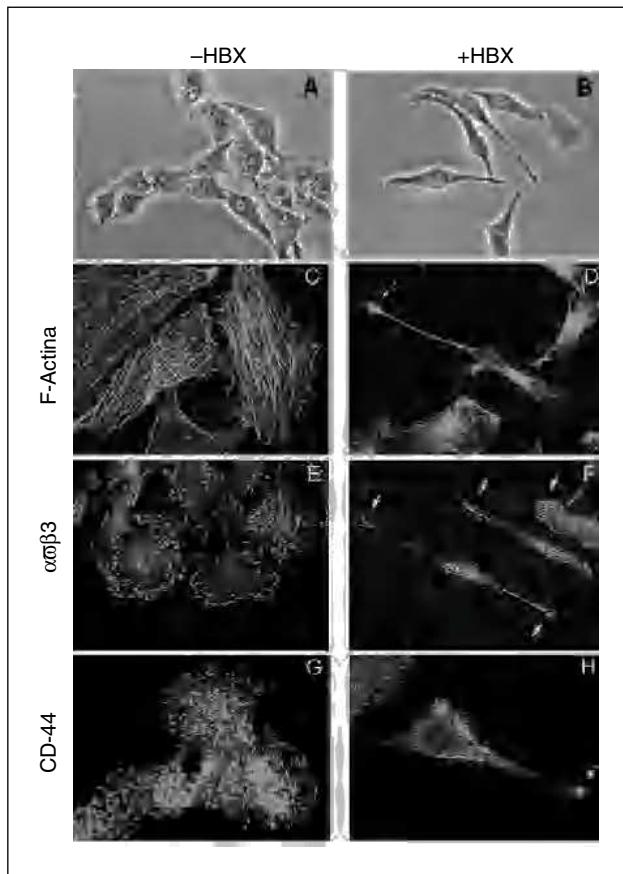


Fig. 3. La HBx induce el cambio morfológico, el reordenamiento del citoesqueleto de actina y la polarización de las moléculas de adhesión como $\alpha\beta 3$ y CD44.

tumorales está relacionado con la rotura de las uniones intercelulares mediadas por E-cadherina, la reorganización de los componentes del citoesqueleto y la adquisición de propiedades migratorias e invasivas, que están reguladas por ciertas moléculas de adhesión, como integrinas y CD44, y por metaloproteasas de matriz extracelular⁶⁴.

En la actualidad hay cada vez más datos que apuntan a que la HBx puede ser importante en la progresión de los hepatocarcinomas hacia un fenotipo más agresivo y metastático. Se ha observado que la expresión de HBx en líneas tumorales hepáticas induce la rotura de las uniones intercelulares mediadas por E-caderina, mediante un mecanismo dependiente de la tirosincinasa c-Src (fig. 2)⁶⁵. Este mecanismo consiste en la disociación de la interacción del complejo E-caderina-β-catenina con el citoesqueleto por la fosforilación de β-catenina por c-Src. Asimismo, se ha descrito que la HBx también es capaz de reprimir la expresión de E-caderina mediante un mecanismo epigenético e inducir la metilación de su promotor mediante la inducción de la ADN-metiltransferasa I⁶⁶. Por otro lado, se ha descrito que los transfectantes de la HBx adquieren, en subconfluencia, una morfología polarizada (fibroblástica) asociada a una reorganización de los componentes del citoesqueleto⁶⁷. Estudios de inmunofluorescencia han demostrado que ciertas integrinas, así

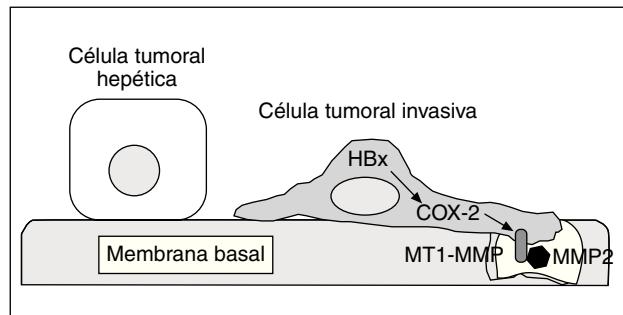


Fig. 4. La HBx induce la invasión de células tumorales a través de la inducción de la ciclooxygenasa 2 (COX-2). La inducción de COX-2 da lugar, a su vez, a la expresión de metaloproteasa asociada a membrana MT1-MMP y a la activación de la metaloproteasa de matriz extracelular MMP-2.

como CD44, se redistribuyen en los extremos distales de los seudópodos (fig. 3). La polarización de CD44 inducida por la HBx parece estar mediada por la asociación de esta molécula de adhesión con la proteína de anclaje al citoesqueleto moesina, que da lugar a una mayor afinidad de CD44 por su ligando natural, el ácido hialurónico⁶⁷. Además, se ha observado que la polarización de CD44 y la interacción de CD44-moesina están reguladas por la activación de las GTPasas Rac y Rho por HBx. Estos cambios fenotípicos inducidos por HBx están asociados con la adquisición de una mayor capacidad migratoria, que se ha demostrado dependiente de CD44 e integrinas β1^{67,68}.

Recientemente, se ha demostrado que la HBx induce también la invasión de células tumorales tanto *in vivo* como *in vitro* y que dicha invasión está mediada por una inducción de la ciclooxygenasa 2 (COX-2). La inducción de la expresión de COX-2 por la HBx tiene lugar en sitios de unión para NF-AT en su promotor. La inducción de COX-2 da lugar, a su vez, a la expresión de metaloproteasa asociada a membrana MT1-MMP y a la activación de la metaloproteasa de matriz extracelular MMP-2 (fig. 4)⁶⁹. Otros autores han descrito que la HBx puede inducir la expresión de otras metaloproteasas como MMP-3 y MMP-9^{70,71}.

CONCLUSIONES

Tras la infección por HBV, durante la fase aguda de la enfermedad, se produce una potente respuesta inmunitaria que da lugar a una muerte masiva de las células infectadas y a la eliminación del virus mediante una serie de mediadores inflamatorios que interfieren la replicación viral. En muchos casos, la respuesta inmunitaria no es tan eficiente y se produce la cronificación de la infección. Durante la fase crónica de la enfermedad sigue habiendo muerte celular, pero de forma mucho menos intensa, y se produce una progresiva sustitución de las células por matriz extracelular, y esto, con el tiempo, conduce al desarrollo de cirrosis y hepatocarcinoma. En parte, el desarrollo del hepatocarcinoma se favorece por el daño crónico

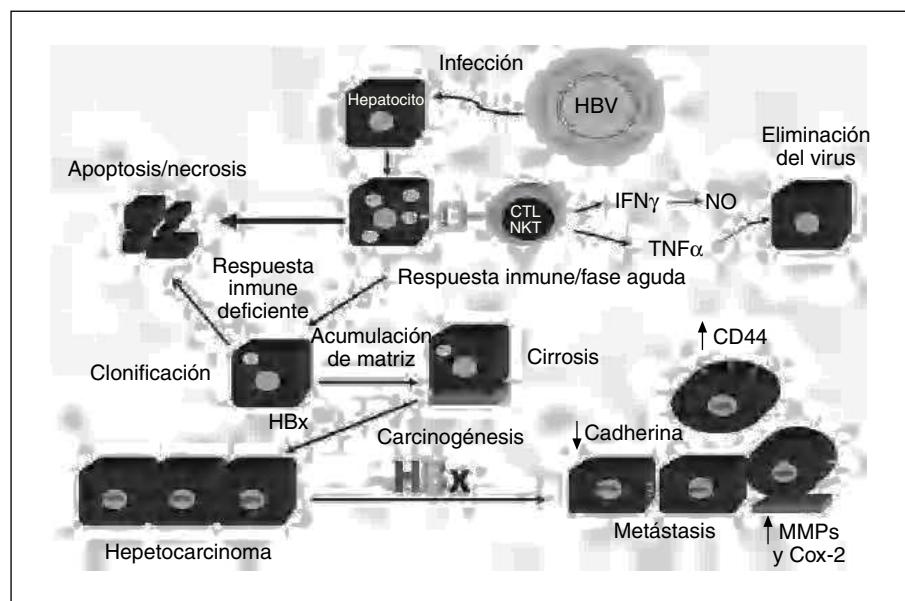


Fig. 5. Durante la fase aguda de la hepatitis B se produce una potente respuesta inmunitaria que da lugar a una muerte masiva de las células infectadas y a la eliminación del virus mediante una serie de mediadores inflamatorios, como el interferón gamma (IFN γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), que interfieren la replicación viral. Durante la fase crónica de la enfermedad, sigue habiendo muerte celular, pero de forma mucho menos intensa, y se produce una progresiva sustitución de las células por matriz extracelular, lo que conduce al desarrollo de cirrosis y hepatocarcinoma. El propio virus también puede ser activo en la génesis de los tumores, gracias a la acción de la proteína HBx. La expresión de HBx en tumores ya formados posibilita, a su vez, que esta proteína viral regular procesos como la adhesión intercelular, la migración y la invasión que dan lugar a la metástasis.

que produce la respuesta inmunitaria, que se caracteriza por la aparición de ciclos de muerte y regeneración que favorecen la aparición de mutaciones y alteraciones cromosómicas. Además, el propio virus puede ser activo en la génesis de los tumores, gracias a la acción de la proteína HBx. De hecho, se ha observado la integración del ADN de HBV y la presencia de HBx en un elevado número de hepatocarcinomas asociados a hepatitis B. La expresión de HBx en tumores ya formados posibilita, a su vez, que esta proteína viral pueda regular procesos como la adhesión intercelular, la migración y la invasión que tienen lugar en las etapas tardías de la progresión tumoral y dan lugar a la metástasis (fig. 5).

BIBLIOGRAFÍA

- Chisari FV. Viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B. *Am J Pathol*. 2000;156:1118-32.
- Schafer DF, Sorrell MF. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 1999;353:1253-7.
- Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B virus. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:651-93.
- Schaller H, Fischer M. Transcriptional Control of Hepadnavirus Gene Expression. *Curr Topics Microbiol Immunol*. 1991;168: 21-39.
- Féitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*. 1997;150:1141-57.
- Sirma H, Weil R, Rosmorduc O, et al. Cytosol is the prime compartment of hepatitis B virus X protein where it colocalizes with the proteasome. *Oncogene*. 1998;16:2051-63.
- Haviv I, Shamay M, Doitsh G, et al. Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol Cell Biol*. 1998; 18:1562-9.
- Doria M, Klein N, Lucito R, et al. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors. *EMBO J*. 1995;14: 4747-57.
- Hoare J, Henkler F, Dowling J, et al. Subcellular localization of the X protein in HBV infected hepatocytes. *J Med Virol*. 2001; 64:419-26.
- Su Q, Schröder CH, Hofmann WJ, et al. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology*. 1998;27:1109-20.
- Henkler F, Hoare J, Waseem N, et al. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol*. 2001;82:871-82.
- Rahmani Z, Huh KW, Lasher R, et al. The hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential. *J Virol*. 2000;74:2840-6.
- Waris G, Huh KW, Siddiqui A. Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF- κ B via oxidative stress. *Mol Cell Biol*. 2001;21:7721-30.
- Bouchard MJ, Wang LH, Schneider RJ. Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science*. 2001;294:2376-8.
- Takada S, Shirakata Y, Kaneniwa N, et al. Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death. *Oncogene*. 1999;18:6965-73.
- Yoo YD, Ueda H, Park K, et al. Regulation of transforming growth factor- β 1 expression by the hepatitis B virus (HBV) X transactivator. *J Clin Invest*. 1996;97:388-95.
- Avantaggiati ML, Natoli G, Balsano C, et al. The hepatitis B virus (HBV) pX transactivates the c-fos promoter through multiple cis-acting elements. *Oncogene*. 1993;8:1567-74.
- Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, et al. Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the c-myc protooncogene at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;176:985-92.
- Menzo S, Clementi M, Alfani E, et al. Trans-activation of epidermal growth factor receptor gene by the hepatitis B virus-X gene product. *Virology*. 1993;196:878-82.
- Kim S-O, Park J-G, Lee YI. Increased expression of the Insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene in hepatocellular carcinoma cell lines: Implications of IGF-I receptor gene activation by Hepatitis B Virus X gene product. *Cancer Res*. 1996; 56:3831-6.
- Shin EC, Shin JS, Park JH, et al. Expression of Fas ligand in human hepatoma cell lines: role of hepatitis-B virus X (HBx) in induction of Fas ligand. *Int J Cancer*. 1999;82:587-91.
- Lee Y, Park U-S, Choi I, et al. Human interleukin 6 gene is activated by hepatitis B virus-X protein in human hepatoma cells. *Clin Cancer Res*. 1998;4:1711-7.
- Hu KQ, Yu CH, Vierling JM. Up-regulation of intercellular adhesion molecule 1 transcription by hepatitis B virus X protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:11441-5.

24. Hu K, Vierling J, Siddiqui A. Trans-activation of HLA-DR gene by hepatitis B virus X gene product. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:7140-4.
25. Lee M, Choi Y, Shin E, et al. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol*. 2002;37:380-6.
26. Majano PL, García-Monzón C, López-Cabrera M, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. *J Clin Invest*. 1998;101:1343-52.
27. Lara-Pezzi E, Majano PL, Gómez-Gonzalo M, et al. Hepatitis B virus X protein up-regulates Tumor Necrosis Factor- α gene expression in hepatocytes. *Hepatology*. 1998;28:1013-21.
28. Aufiero B, Schneider R. The hepatitis B virus X-gene product trans-activates both RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J*. 1990;9:497-504.
29. Wang H-D, Trivedi A, Johnson DL. Regulation of RNA polymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated ras and TATA-binding protein. *Mol Cell Biol*. 1998;18:7086-94.
30. Maguire HF, Hoeffler JP, Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science*. 1991;252:842-4.
31. Choi BH, Park GT, Rhee HM. Interaction of hepatitis B viral X protein and CCAAT/enhancer-binding protein a synergistically activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter. *J Cell Biol*. 1999;274:2858-65.
32. Lee, DK, Park SH, Yi Y, et al. The hepatitis B virus encoded oncoprotein pX amplifies TGF- β family signaling through direct interaction with Smad4: potential mechanism of hepatitis B virus-induced liver fibrosis. *Genes Dev*. 2001;15:455-66.
33. Li J, Xu Z, Zheng Y, et al. Regulation of Hepatocyte Nuclear Factor 1 activity by wild-type and mutant hepatitis B virus X proteins. *J Virol*. 2002;76:5875-81.
34. Carretero M, Gómez-Gonzalo M, Lara-Pezzi E, et al. The hepatitis B virus X protein binds to and activates the NH₂-terminal trans-activation domain of nuclear factor of activated T cells-1. *Virology*. 2002;299:288-300.
35. Qadri I, Maguire H, Siddiqui A. Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:1003-7.
36. Qadri I, Conaway JW, Conaway RC, et al. Hepatitis B virus transactivator protein, HBx, associates with the components of TFIIH and stimulates the DNA helicase activity of TFIIH. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:10578-83.
37. Lin Y, Tang H, Nomura T, et al. The hepatitis B virus X protein is a co-activator of activated transcription that modulates the transcription machinery and distal binding activators. *J Biol Chem*. 1998;273:27097-103.
38. Cheong J, Yi M, Lin Y, et al. Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation. *EMBO J*. 1995;14:143-50.
39. Klein NP, Schneider RJ. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol Cell Biol*. 1997;17:6427-36.
40. Klein NP, Bouchard MJ, Wang L-H, et al. Src kinases involved in hepatitis B virus replication. *EMBO J*. 1999;18:5019-27.
41. Benn J, Schneider RJ. Hepatitis virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signalling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:10350-4.
42. Benn J, Su F, Doria M, et al. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol*. 1996;70:4978-85.
43. Natoli G, Avantaggiati M, Chirillo P, et al. Ras- and Raf-dependent activation of c-jun transcriptional activity by hepatitis B virus transactivator pX. *Oncogene*. 1994;9:2836-43.
44. Chirillo P, Falco M, Puri PL, et al. Hepatitis B virus pX activates NF- κ B dependent transcription through a Raf-independent pathway. *J Virol*. 1996;70:641-6.
45. Lucito R, Schneider RJ. Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF- κ B without a requirement for protein kinase C. *J Virol*. 1992;1992:983-91.
46. Lee Y-H, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem*. 1998;273:25510-5.
47. Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, et al. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem*. 2000;275:25858-64.
48. Lara-Pezzi E, Armesilla AL, Majano PL, et al. The hepatitis B virus X protein activates nuclear factor of activated T cells (NF-AT) by a cyclosporin A-sensitive pathway. *EMBO J*. 1998;17:7066-77.
49. Huang J, Kwong J, Sun E, et al. Proteosome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein. *J Virol*. 1996;70:5582-91.
50. Cromlish JA. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: Possible roles for HBx. *Trends Microbiol*. 1996;4:270-4.
51. Koike K. Hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis. *Intervirology*. 1995;38:134-42.
52. Kim CM, Koike K, Saito I, et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*. 1991;351:317-20.
53. Yu D-Y, Moon H-B, Son J-K, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis B virus X-protein. *J Hepatol*. 1999;31:123-32.
54. Terradillos O, Billet O, Renard C-A, et al. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene*. 1997;14:395-404.
55. Slagle BL, Lee TH, Medina D, et al. Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene. *Mol Carcinog*. 1996;15:261-9.
56. Höhne M, Schaefer S, Seifer M, et al. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *EMBO J*. 1990;9:1137-45.
57. Truant R, Antunovic J, Greenblatt J, et al. Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. *J Virol*. 1995;69:1851-9.
58. Wang XW, Forrester K, Yeh H, et al. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:2230-4.
59. Becker SA, Lee T-H, Butel JS, et al. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol*. 1998;72:266-72.
60. Koike K, Moriya K, Yotsuyanagi H, et al. Induction of cell cycle progression by hepatitis B virus HBx gene expression in quiescent mouse fibroblasts. *J Clin Invest*. 1994;94:44-9.
61. Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:11215-9.
62. Ahn JY, Jung EY, Kwun HJ, et al. Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle control depending on the status of cellular p53. *J Gen Virol*. 2002;83:2765-72.
63. Paterlini P, Poussin K, Kew M, et al. Selective accumulation of the transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1995;21:313-21.
64. Koukoulis GK, Patriarca C, Gould V. Adhesion molecules and tumor metastasis. *Hum Pathol*. 1998;29:889-92.
65. Lara-Pezzi E, Roche S, Andrisani OM, et al. The hepatitis B virus HBx protein induces adherens junction disruption in a src-dependent manner. *Oncogene*. 2001;20:3323-31.
66. Lee J-O, Kwun JH, Jung JK, et al. Hepatitis B virus X represses E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1. *Oncogene*. 2005;24:6617-25.
67. Lara-Pezzi E, Serrador JM, Montoya MC, et al. The hepatitis B virus X protein (HBx) induces a migratory phenotype in a CD44-dependent manner: possible role of HBx in invasion and metastasis. *Hepatology*. 2001;33:1270-81.
68. Lara-Pezzi E, Majano PL, Yáñez-Mo M, et al. Effect of the hepatitis B virus HBx protein on integrin-mediated adhesion to and migration on extracellular matrix. *J Hepatol*. 2001;34:409-15.
69. Lara-Pezzi E, Gómez-Gaviro MV, Gálvez BG, et al. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing MT1-MMP and COX-2 expression. *J Clin Invest*. 2002;110.
70. Yu FL, Liu HJ, Lee JW, et al. Hepatitis B virus X protein promotes migration by inducing matrix metalloproteinase-3. *J Hepatol*. 2005;42:520-7.
71. Chung TW, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J*. 2004;18:1123-5.