

Implicación de la proteína HBx del virus de la hepatitis B en la respuesta inmune y la progresión tumoral

E. Lara-Pezzi^a, R. Moreno-Otero^b y M. López-Cabrera^a

^aUnidad de Biología Molecular. Hospital Universitario de La Princesa. Madrid. ^bUnidad de Hepatología. Hospital Universitario de La Princesa. Madrid. España.

EL VIRUS DE LA HEPATITIS B

La infección

El virus de la hepatitis B (VHB), descubierto en 1966, es un virus no citopático directo que infecta a más de 350 millones de personas en todo el mundo¹. La infección por el VHB es la principal causa de hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular². A pesar de existir una vacuna desde 1981, unas 300.000 personas resultan infectadas cada año sólo en Estados Unidos y se produce un millón de muertes anuales debido a fallos hepáticos relacionados con el virus. Actualmente, el tratamiento con interferón alfa (IFN- α) o con el análogo del nucleósido lamivudina consigue un aclaramiento del antígeno viral AgHBe hasta en un 33% de los pacientes³. Sin embargo, estos tratamientos están lejos de ser perfectos, ya que el interferón alfa sólo está indicado en un determinado grupo de pacientes y la eficacia de la lamivudina está condicionada por la aparición de resistencias.

El virus

El virión completo, o partícula Dane, es una esfera de 42 nm formada por una nucleocápsida, rodeada de un envoltorio lipídico, que contiene la polimerasa viral unida a una molécula de ADN¹. Este ADN de doble cadena, circular, abierto e incompleto, está compuesto por una hebra completa de 3,2 kb (hebra negativa) y otra incompleta (positiva), y constituye el genoma viral (figs. 1 y 2). El ADN viral contiene 4 marcos de lectura solapados: *S/preS*,

C/preC, *P* y *X*⁴. El gen *S/preS* codifica para las 3 isoformas del antígeno de superficie AgHBs (grande, mediana y pequeña), que son generadas a partir de tres codones de iniciación distintos (*preS1*, *preS2* y *S*). Las regiones *preS1* y *preS2* representan dos de las regiones más inmunogénicas y variables de AgHBs. La región *S* también es muy inmunogénica, lo que explica que la vacuna contra el VHB esté basada en el desarrollo de la inmunidad celular y humoral contra la proteína AgHBs recombinante. En ocasiones la integración del genoma viral da lugar a la producción de una forma truncada del AgHBs mediana, que presenta capacidad transactivadora⁵. El gen *C/preC* codifica para la proteína de la nucleocápsida viral, proteína *core* o AgHBC, que se ensambla rápidamente tras sintetizarse. El AgHBe es un péptido generado a partir de AgHBC, cuya presencia en la sangre es un marcador de replicación viral. El gen *P* codifica para la polimerasa viral, que contiene una señal empaquetadora del ARN viral y tiene múltiples actividades enzimáticas, incluyendo transcriptasa inversa, ADN polimerasa y ARNsa, necesarias para la replicación viral⁶. El gen *X* codifica para una proteína, llamada HBx, que funciona como un transactivador viral y puede desempeñar un papel en la infección viral y en el desarrollo de hepatocarcinomas⁷.

El genoma viral se organiza en 4 unidades transcripcionales, dirigidas por 4 promotores distintos y dos *enhancers*, que comparten un sitio de poliadenilación común y dan lugar a 4 ARN virales (de 3,5, 2,4, 2,1 y 0,7 kb) solapados ampliamente entre sí. El transcripto de 3,5 kb produce la polimerasa viral y las dos isoformas de la proteína de la nucleocápsida (*C/preC*), y constituye el ARN pregenómico que sirve de molde en el primer paso de la replicación viral, ya que, aunque el VHB es un virus con genoma de ADN, se replica a través de intermediarios de ARN⁸. Los transcriptos de 2,4 y 2,1 kb producen las proteínas del envoltorio, y el de 0,7 kb, la proteína HBx.

Este estudio ha sido financiado en parte por los proyectos SAF 01/0305 (Manuel López-Cabrera) y SAF 2001-1414 (Ricardo Moreno-Otero) del Plan Nacional del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Correspondencia: Dr. E. Lara-Pezzi.
 Unidad de Biología Molecular. Hospital Universitario de La Princesa.
 Diego de León, 62. 28006 Madrid. España.

Recibido el 19-12-2002; aceptado para su publicación el 7-1-2003.

El ciclo vital del virus

Aunque no se conoce el mecanismo de entrada del virus en la célula, se piensa que la interacción entre la partícu-

Fig. 1. Ciclo vital del virus de la hepatitis B. Después de la entrada y la pérdida del envoltorio, se completa la síntesis de la hebra positiva de ADN viral dentro de la nucleocápsida, que transporta el genoma viral al núcleo. En el núcleo, las dos hebras de ADN se procesan y unen dando lugar al ADN circular covalentemente cerrado de 3,2 kb (cccADN), que sirve de molde para la transcripción. Los 4 transcriptos virales son exportados al citoplasma y traducidos. La proteína preC entra en el retículo endoplásmico, donde se procesa y secreta como AgHBc. Las proteínas del envoltorio se insertan en la membrana del retículo, donde se agregan y bien se unen a la cápsida madura bien se secretan como partículas subvirales. La cápsida se ensambla alrededor del ARN pregenómico (ARNp) y la polimerasa, el ARNp se retrotranscribe dando lugar a la hebra negativa de ADN viral, que a su vez servirá como molde para la hebra positiva. La cápsida migra dentro del citoplasma con un doble destino. Una ruta termina en el retículo endoplásmico, donde da lugar a la formación de viriones que son transportados fuera de la célula a través del aparato de Golgi. Una segunda ruta transporta la cápsida madura al núcleo para amplificar la reserva de cccADN viral. (Adaptada de Chisari¹.)

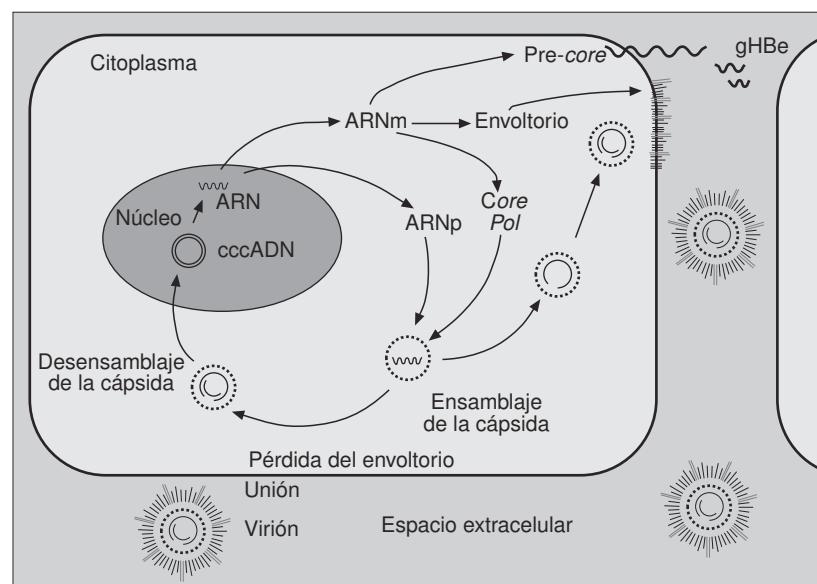
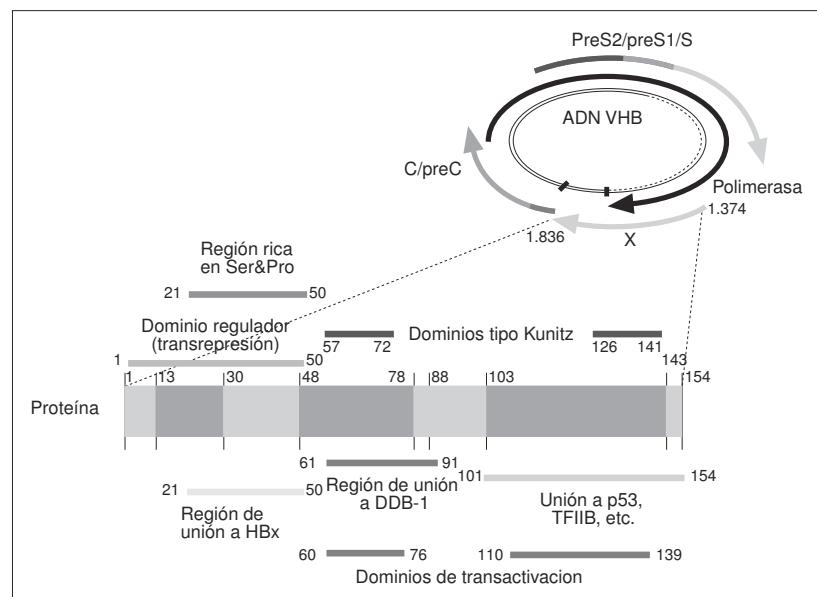


Fig. 2. Estructura de la proteína HBx. La capacidad activadora de la transcripción parece estar localizada en el extremo C-terminal de la proteína, y entre los aminoácidos 60 y 76. Estas dos regiones son también las responsables de la interacción de HBx con numerosas proteínas celulares. Además, HBx es capaz de interaccionar consigo misma, a través de los aminoácidos 21 a 50.



la viral y la célula huésped se realiza a través de la región preS1 de la proteína AgHBs del virus¹. Como se muestra en la figura 1, después de la entrada y la pérdida del envoltorio, se completa la síntesis de la hebra positiva de ADN viral dentro de la nucleocápsida, que transporta el genoma viral al núcleo. En el núcleo, las enzimas celulares reparadoras del ADN procesan y unen las dos hebras, lo que da lugar al ADN circular covalentemente cerrado de 3,2 kb (cccADN) que sirve de molde para la transcripción. Los 4 transcriptos virales comparten una secuencia en su extremo 3' que les facilita la interacción con proteínas celulares exportadoras de ARN y su salida al citoplasma, donde son traducidos. La proteína preC contiene un péptido líder que le permite entrar en el retículo endoplásmico, donde se procesa y finalmente se secreta como HBe. Las proteínas del en-

voltorio se insertan en la membrana del retículo, donde se agregan y bien se unen a la cápsida madura o bien se secretan como partículas subvirales de 22 nm. La proteína AgHBc y la polimerasa se ensamblan alrededor del ARN pregenómico (ARNp), formando la cápsida dentro de la cual tiene lugar la transcripción inversa del ARNp, que da lugar a la hebra negativa de ADN viral, que, a su vez, servirá como molde para la síntesis de la hebra positiva. Mientras el ARNp madura a ADN, la cápsida migra dentro del citoplasma con un doble destino. Una ruta termina en el retículo endoplásmico, donde interacciona con las proteínas del envoltorio y da lugar a la formación de viriones que son transportados fuera de la célula a través del aparato de Golgi. Una segunda ruta transporta la cápsida madura al núcleo para amplificar la reserva de cccADN viral¹.

LA PROTEÍNA HBx

Estructura de la proteína HBx

El gen *X*, de unas 0,7 kb, fue el último en ser identificado, y se le asignó la letra *X* debido a que la proteína que codifica no presentaba homología con ninguna otra proteína viral o celular y su función se desconocía⁷. La HBx es una proteína de 154 aminoácidos y 17 kDa, que está bastante conservada entre los distintos hepadnavirus de mamíferos⁷. Aunque no presenta homología con ningún gen humano conocido, esta proteína viral contiene una secuencia rica en cisteínas similar al dominio tipo Kunitz encontrado en serinproteasas⁹. La HBx es capaz de formar homodímeros a través de puentes disulfuro, y se han descrito formas acetiladas y fosforiladas de la proteína en diversos sistemas de expresión, que podrían explicar la rápida degradación que sufre esta proteína^{10,11}. Existen dos dominios funcionales (fig. 2), localizados alrededor del aminoácido 69 y entre los aminoácidos 110 y 139, que son indispensables para la capacidad transactivadora^{12,13}. Además, se piensa que los primeros 50 aminoácidos podrían contener una secuencia represora, que permitiría la autorregulación de la función transactivadora de HBx y explicaría algunos efectos paradójicos que se observan al sobreexpresarla¹⁴.

Localización subcelular de la proteína HBx

Varios estudios de inmunohistoquímica realizados en biopsias de pacientes infectados por el VHB han mostrado tinción de HBx tanto en casos de hepatitis crónica como en cirrosis y hepatocarcinoma^{7,15}. Sin embargo, su localización subcelular ha sido y sigue siendo objeto de controversia. Parece ser que HBx estaría localizada preferentemente en el citoplasma, aunque una pequeña cantidad se encontraría en el núcleo¹⁶. Estudios con la proteína WHx (homóloga de HBx en el virus de la hepatitis B de *marmota monax* [WHV]) han inducido a pensar en una cinética de degradación bimodal, que vendría condicionada por su localización¹⁷. Por una parte existiría una fracción citosólica (70-75%) de WHx, la mitad de la cual tendría una vida media de 20 min y la otra mitad de 3 h, y otra fracción asociada a la matriz nuclear (20%) o al citosqueleto (5-10%), que tendría una vida media de unos 10-30 min. Recientemente se ha descrito que HBx puede encontrarse en la mitocondria, donde se colocaría con el canal aniónico dependiente de voltaje HVDAC3, alteraría su potencial de membrana y produciría un incremento en las especies reactivas de oxígeno que median la activación de los factores de transcripción NF-κB y STAT-3^{18,19}. En ciertos casos, esta interacción entre HBx y la mitocondria conduce a la agregación mitocondrial y a la muerte celular²⁰.

Regulación de la expresión de HBx

Durante la infección viral aguda, la expresión de HBx es baja y se relaciona directamente con el nivel de replicación

del virus. Sin embargo, al evolucionar hacia hepatitis crónica, cirrosis y hepatocarcinoma el ADN viral se integra en el genoma del huésped y la expresión de HBx se desregula y se convierte en la única proteína viral detectada en muchos pacientes con carcinoma hepatocelular⁷.

La transcripción del gen *X* está dirigida tanto por su propio promotor como por el *enhancer I*, que se encuentra justo delante y contiene elementos de respuesta específicos de hígado, como HNF-1 y HNF-3^{21,22}. Estos elementos confieren cierta especificidad al gen *X*, aunque menor que la de los genes *C/preC* y *S/preS*. El *enhancer I* posee elementos de respuesta a HBx y a otros estímulos, lo que permite a HBx regular su propia transcripción^{23,24}.

Activación de la maquinaria de señalización celular

La proteína HBx puede regular diferentes funciones tanto del virus como del huésped. Lo consigue modulando varios mecanismos celulares, tal como lo hacen las proteínas reguladoras de otros virus, como E1A (adenovirus), Tax (virus de la leucemia de células T humano) o Tat (virus de la inmunodeficiencia humana). La mayoría de las funciones atribuidas a HBx se deben a su capacidad de modular gran variedad de cascadas de señalización, implicadas en el control de la proliferación celular, la apoptosis o la respuesta a citocinas y factores de crecimiento²⁵. Como ya se ha descrito, HBx puede localizarse tanto en el citoplasma como en el núcleo, donde desarrolla funciones independientes²⁶.

En el citoplasma, HBx puede interaccionar con la mitocondria generando un aumento de especies reactivas de oxígeno, que conduce a la activación de diferentes factores de transcripción, como se ha comentado anteriormente. Además, se ha señalado que esta interacción induce una salida de calcio de la mitocondria, lo que explicaría parte de la gran variedad de efectos de HBx²⁷. El aumento de calcio intracelular inducido por HBx activa las tirosincininas citosólicas Pyk-2 y Src²⁸, lo que favorece la replicación viral²⁹. A través de Src, HBx activa Ras, lo que estimula a su vez dos rutas independientes, las de Ras-Raf-ERK y MEKK1-JNK^{30,31}, que convergen en la activación del factor de transcripción AP-1^{31,32}. Además, Ras es necesario para la activación de NF-κB inducida por HBx, que parece estar mediada por las especies reactivas de oxígeno^{7,9,37}. Asimismo se ha descrito que HBx es capaz de activar las cascadas de Jak-Stat y PI3K-Akt, interfiriendo con la apoptosis inducida por el factor transformador de crecimiento beta (TGF-β)^{35,36}. La capacidad de HBx de interaccionar con el proteosoma y con serinproteasas podría inhibir la degradación de distintos factores de transcripción, lo cual favorecería la activación de diversos genes^{7,9,37}.

Además de AP-1 y NF-κB, 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, de modo que se favorece la activación de gran variedad de genes^{25,38-42}. HBx también es capaz de activar el fac-

tor de transcripción NF-AT, implicado en la transcripción de citocinas y quimiocinas (como factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α] o la interleucina [IL] 8, inducidas por HBx). En el núcleo, HBx no se une directamente al ADN y actúa fundamentalmente como coactivador de la transcripción, e incluso es capaz de suplir la ausencia de otros coactivadores, como los TAF (factor asociado a proteína de unión a cajas TATA [TBP])⁴³. En concreto, se ha propuesto un modelo en el que el transactivador viral actuaría como puente entre los activadores unidos a elementos distales y el complejo de iniciación⁴⁴, interaccionando directamente con TFIIB, TFIH (que forma parte también del complejo de elongación), TBP y las subunidades de la ARN polimerasa II RPB5 y RMP⁴⁵⁻⁴⁹. La especificidad de esta función coactivadora viene determinada por los factores de transcripción distales, sin cuya presencia la unión a la maquinaria basal resulta estéril. HBx también es capaz de interaccionar con proteínas implicadas en el control del ciclo celular y la reparación del ADN, como se explica más adelante.

Hay que tener en cuenta que lo más probable es que HBx no induzca todas estas cascadas de señalización al mismo tiempo, sino que vaya activando selectivamente en cada etapa de la enfermedad las más adecuadas para la supervivencia del virus.

Capacidad transactivadora de HBx

Una de las funciones mejor documentadas de HBx es su capacidad transactivadora⁷, es decir, que esta proteína es capaz de activar promotores de genes tanto virales como celulares. En el contexto del virus, se ha descrito que HBx es capaz de transactivar el *enhancer* I y el promotor C, sinergizando con C/EBP α , y que esta activación es esencial para la expresión de la proteína *core* en modelos transgénicos^{23,41,50}. Asimismo, es capaz de inducir promotores de otros virus, como SV40, RSV y virus de la inmunodeficiencia humana⁵¹⁻⁵³. El caso de este último es especialmente interesante, ya que el VHB también infecta células del sistema inmune, que le sirven de reservorio^{54,55}. En este sentido, se ha descrito que los pacientes con coinfección virus de la inmunodeficiencia humana-VHB desarrollan antes el sida que los pacientes que no han sido infectados por el VHB, lo que indicaría que HBx, al activar el LTR de virus de la inmunodeficiencia humana, podría desempeñar un papel en la aparición más temprana de la enfermedad^{56,57}.

Por otra parte, también se ha descrito la capacidad de HBx de transactivar diferentes genes celulares, especialmente los implicados en carcinogénesis y en la respuesta inflamatoria, como *c-fos*, *c-myc*, *EGF-R*, *TGF β* , *galecina-3*, *IGF-R*, *Fn-14*, *Fas-L*, *IL-6*, *ICAM-1*, *HLA-DR* o *IL-18*^{40,58-68}, lo que lleva a pensar en un papel activo de HBx en la respuesta inmune y el desarrollo del hepatocarcinoma. Es interesante destacar además que HBx es capaz de activar promotores dependientes no sólo del ARN polimerasa II, sino también del ARN polimerasa I y III⁶⁹⁻⁷⁰.

PAPEL DE HBx EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

HBx e infección viral

La contribución de HBx a la diseminación del virus se ha estudiado principalmente en el sistema del virus de la hepatitis de marmota (WHV). En este contexto, WHx es necesaria tanto para el establecimiento de la infección por WHV como para su progresión hacia la cronicidad^{71,72}. Recientemente se han generado diferentes mutantes del gen X de marmota para estudiar su influencia en la infección viral. Incluso los mutantes sin capacidad transactivadora o sin un WHx funcional mostraban algo de replicación viral y, aunque algunos animales no presentaban los antígenos WHs (superficie) o WHc (cápsida) en suero, todos ellos estaban protegidos frente a una nueva infección. Estos resultados indicarían que al menos un bajo nivel de replicación viral puede tener lugar en ausencia de WHx y que la infección con estos virus atenuados confiere inmunidad protectora al huésped. Así pues, parece que, aunque WHx puede inducir la replicación viral, por ejemplo, activando la tirosincinasa src, su papel en la infección viral debe explorarse con mayor profundidad.

HBx y respuesta inmune

Puesto que el VHB no es un virus citolítico, la causa del daño hepático producido durante la infección hay que buscarla en el ataque del sistema inmune del huésped contra las células infectadas. El vigor de la respuesta inmune es la principal condición que determina la eliminación o no del virus⁷³. La respuesta inmune contra el virus está mediada fundamentalmente por las células T citotóxicas (CTL), que realizan su función en dos ámbitos. Por una parte, reconocen el antígeno viral en la célula infectada y la eliminan mediante una señal apoptótica, lo que provoca el grave daño necroinflamatorio hepático producido durante la respuesta inmune contra el virus. Durante mucho tiempo se pensó que éste era el único modo de acción de las CTL. Sin embargo, existe un segundo, y más importante, mecanismo de acción de las CTL para eliminar el virus: la secreción de citocinas⁷⁴, especialmente interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), así como de óxido nítrico, produce una drástica disminución de la replicación viral, debido tanto a la degradación del ARN viral en el núcleo como a la desestabilización de la cápsida en el citoplasma^{1,75,76}. El efecto de las citocinas sobre la replicación viral es más eficaz que el efecto destructivo de las CTL. El resultado de la infección depende del equilibrio entre estos dos efectos, de manera que si prevalece la secreción de citocinas se elimina el virus, y si prevalece la respuesta destructiva el virus persiste y la infección se cronifica¹. Paradójicamente, si la respuesta mediada por citocinas es incompleta y sólo se inhibe parcialmente la expresión de los genes virales, el virus continúa replicándose a bajo nivel, lo que conduce a una situación donde el sistema inmune no es capaz



Fig. 3. Modulación de las rutas de supervivencia y apoptosis por HBx. El efecto de HBx sobre la señalización celular se muestra mediante una línea discontinua. HBx inhibe las caspasas 8 y 3, disminuye la expresión de Bid e inhibe la liberación de citocromo c por la mitocondria. Por otra parte, HBx induce la proliferación celular mediante la activación de las rutas de señalización de ERK, JNK, Jak/Stat, PI3K y NF-κB. TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; NO: óxido nítrico; IL: interleucina.

de detectar las células infectadas, el virus escapa y se produce una infección crónica. De esta forma, el hepatocito cobra una importancia fundamental en la eliminación del virus, ya que, en respuesta a las citocinas, activa determinadas rutas de señalización que llevan a la interrupción del ciclo vital del virus¹.

Al igual que otros virus, el VHB ha desarrollado diferentes estrategias para evadir el sistema inmune. Debido al pequeño tamaño de su genoma, con sólo 4 marcos de lectura abierta, la mayoría de sus funciones reguladoras deben realizarlas una sola proteína: HBx. Como se ha explicado anteriormente, la activación de la maquinaria de señalización celular permite a HBx inducir distintos genes implicados en la respuesta inmune. Sin embargo, parece paradójico que HBx sea capaz de inducir factores proinflamatorios, como el TNF- α , la sintasa inducible del óxido nítrico, la IL-6 o la IL-8, en lugar de citocinas antiinflamatorias como la IL-10. El TNF- α es una citocina multifuncional que desempeña un papel clave en muchos procesos inflamatorios⁷⁷. En el hígado, media la regeneración hepática y está implicado en el desarrollo de hepatitis crónica, cirrosis o hepatocarcinoma⁷⁸. Esta citocina es capaz de iniciar múltiples cascadas de señalización en los hepatocitos que conducen tanto a la proliferación celular como a la muerte celular por apoptosis⁷⁸. El destino final de una célula estimulada con TNF- α depende del equilibrio entre estas dos rutas de señalización. Del mismo modo, el óxido nítrico, cuya síntesis también es inducida por HBx⁷⁹, tiene un efecto dual sobre la célula infectada. Por una parte, inhibe la replicación viral, al igual que el TNF- α , y por otra parte media, junto con la IL-6, la proliferación hepática inducida por el TNF- α ^{80,81}.

Pero, ¿por qué un virus induciría la síntesis de citocinas proinflamatorias que pueden llevar a su propia destrucción? Como se ha comentado, la proteína HBx es capaz

de modular diferentes cascadas de señalización celular que también son inducidas por las citocinas. De esta forma, HBx podría estar alterando el equilibrio entre las señales de proliferación y apoptosis inducidas por las citocinas, impidiendo la muerte de la célula y favoreciendo su división (fig. 3). HBx es capaz de interferir con la apoptosis de distintas maneras: *a*) HBx induce NF-κB, lo que previene la apoptosis inducida por TNF- α ^{82,83}; *b*) HBx disminuye la expresión de Bid, inhibe las caspasas 3 y 8 por asociación directa y previene la liberación de citocromo c de la mitocondria, todos ellos pasos necesarios para la apoptosis⁸⁴⁻⁸⁶. Además, HBx interfiere con la apoptosis inducida por TGFβ y Fas activando las rutas de PI3K/Akt y SEK/JNK, respectivamente^{36,87}; *c*) HBx se une a p53 y previene la transcripción mediada por p53⁸⁸, y *d*) la activación de distintos factores de transcripción, como NF-κB o NF-AT, facilita la síntesis de TNF- α , IL-6 o óxido nítrico, que inducen la proliferación hepática^{65,79,89,90}.

La proteína HBx también podría utilizar la inducción de citocinas para evadir la vigilancia del sistema inmune, ya que el TNF- α y el óxido nítrico inhiben la replicación viral. Algunos virus (como poxvirus, adenovirus o herpesvirus) han desarrollado la habilidad de inhibir la presentación antigenica como mecanismo de supervivencia⁹¹. De esta forma, al inducir la expresión de TNF- α y de la sintasa inducible del óxido nítrico, HBx modularía negativamente la expresión de antígenos virales y evitaría que los hepatocitos infectados fueran reconocidos por las células del sistema inmune. Además, HBx induce otro miembro de la familia del TNF- α : FasL (el ligando de Fas), que induce apoptosis cuando se une a Fas en la célula diana⁶⁴. La expresión de FasL provoca la eliminación del CTL por apoptosis, lo que favorece la supervivencia de la célula infectada.

A parte de la posible utilización de la red de citocinas por el virus para sus propios fines, existe otro punto de vista muy interesante donde el hepatocito sería una parte activa en la lucha contra la infección. La célula infectada se aprovecharía de la gran variedad de efectos de la proteína HBx para inducir la producción de mediadores inflamatorios y activar la respuesta inmune. De esta forma, el hepatocito sería la primera barrera de defensa contra la infección viral.

HBx y fibrosis hepática

La infección crónica por el VHB es una de las principales causas de la cirrosis hepática, en la que las células estrelladas desempeñan un papel fundamental^{2,92}. Las células de Ito son capaces de proliferar y producir colágeno en respuesta a varias citocinas y factores de crecimiento, como el TNF- α , la IL-6, el TGF β o el PDGF⁷⁸. Aunque el papel de HBx en la fibrosis hepática está muy lejos de ser conocido, la inducción de TGF β , TNF- α o IL-6 inducidos por el transactivador viral podría activar las células estrelladas y facilitar la acumulación de matriz extracelular. En este sentido, se ha propuesto que la capacidad de HBx de unirse a Smad4 y amplificar la señalización inducida por TGF β constituye un posible mecanismo de inducción de fibrosis por el virus³⁸. Además, la contribución de HBx al mantenimiento de un estado inflamatorio crónico puede favorecer el desarrollo de la fibrosis.

HBx y hepatocarcinoma

Se estima que aparecen 350.000 nuevos casos de carcinoma hepatocelular cada año en el mundo, especialmente en China y el sudeste asiático, donde la infección por el VHB es casi endémica². La cirrosis es la principal causa de este tumor, especialmente si se ha desarrollado a partir de una infección crónica por el VHB. Así pues, la infección por este virus resulta el principal factor de riesgo para el desarrollo de hepatocarcinoma.

Los mecanismos responsables de la transformación maligna en la infección crónica por el VHB no han sido del todo definidos, y se piensa que intervienen en el proceso tanto factores virales como celulares¹. Por una parte, el daño hepático crónico producido por la respuesta inmune contra el virus es una condición premaligna, ya que produce un ciclo sin fin de necrosis, inflamación y regeneración, que se caracteriza por el incremento en la tasa de replicación del ADN celular, la producción de mutágenos endógenos y la interferencia con las funciones de reparación y destoxicificación⁹³. Si se mantienen estas condiciones durante suficiente tiempo, se favorecen los múltiples cambios genéticos y cromosómicos necesarios para el desarrollo del hepatocarcinoma^{94,95}.

Por otra parte, el virus desempeña un papel fundamental en el desarrollo del carcinoma hepatocelular. Al contrario que el WHV, que frecuentemente se inserta delante del gen *c-myc*⁹⁶, el VHB no muestra ningún sitio preferente

de integración en el genoma celular⁷. Sin embargo, si existen sitios de integración preferentes en el genoma viral, que favorecen que el gen *X* sea la secuencia viral más frecuentemente integrada^{97,98}. Tras la integración, la mayoría de las proteínas virales dejan de sintetizarse y el virus deja de replicarse. Sin embargo, HBx puede encontrarse en los hepatocitos de pacientes con hepatocarcinoma, e incluso se han detectado transcritos de HBx en pacientes negativos para el AgHBs^{15,98}. La eliminación por el sistema inmune de las células con replicación viral y la proliferación de las células que contienen el ADN integrado del VHB facilitan la expansión clonal de células que expresan HBx⁷.

Aunque se piensa que el gen *X* no es un oncogén, el desarrollo de distintos modelos animales ha demostrado que HBx desempeña un papel central en el desarrollo del hepatocarcinoma. El gen *X* está presente en los virus de hepatitis B de mamíferos, pero no en los de aves, que no desarrollan hepatocarcinoma como los de mamífero⁷. Recientemente se ha descrito una proteína similar a HBx en los virus de hepatitis de las aves, aunque su potencial prooncogénico aún está por demostrar¹⁰⁰. Por otra parte, ciertas cepas de ratones transgénicos portadores del gen *X* desarrollan hepatocarcinoma espontáneamente^{101,102}. Y en otras HBx sinergiza con *c-myc* o carcinógenos químicos para inducir la formación del tumor^{103,104}. Además, al inyectar transfectantes estables del VHB en ratones desnudos, las células son capaces de colonizar distintos órganos y desarrollar tumores¹⁰⁵.

Además de la capacidad de activar distintas cascadas de señalización celular y de inducir la transcripción de algunos protooncogenes descrita anteriormente, existen otras actividades de HBx que contribuyen su potencial procarcinogénico (fig. 4). Primero, HBx se une a *p53*, inhibiendo su unión a ADN^{106,107}, su actividad transcripcional y su interacción con el factor de transcripción ERCC3, que participa en la reparación del ADN. Segundo, HBx facilita la acumulación de mutaciones en el ADN a dos niveles: induce la síntesis de agentes que pueden dañar el ADN, como el óxido nítrico⁷⁹, e interfiere con la reparación del ADN al unirse directamente con DDB-1¹⁰⁸. Tercero, como se ha descrito anteriormente, HBx interfiere con las señales apoptóticas y así favorece la selección positiva de las células que expresan este transactivador viral⁷. Además, se ha señalado un efecto proangiogénico de HBx, al ser capaz de inducir el factor de crecimiento del endotelio vascular¹⁰⁹. Aunque también se ha descrito que HBx induce la progresión del ciclo celular, activando CDK2 y CDC2 y acelerando el tránsito a través de los puntos de control G₀/G₁ y G₂/M^{110,111}, parece ser que esta capacidad depende de las concentraciones celulares de *p53*. En presencia de títulos altos de *p53*¹¹², HBx inhibiría la división celular, mientras que si la expresión de *p53* es muy baja o nula HBx tendría el efecto opuesto, y favorecería la progresión del ciclo celular.

En general, estos datos apoyan fuertemente la teoría de que 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^{15,99} indicaría



Fig. 4. HBx favorece la aparición y progresión del hepatocarcinoma. HBx induce la expresión de factores de crecimiento hepático, lo que facilita la progresión del ciclo celular, y factores angiogénicos, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Además, HBx interfiere con la reparación del ADN, con p53 y con los procesos de apoptosis. Por último, HBx es capaz de inducir diferentes procesos asociados con la invasión tumoral y la metástasis, como la migración celular, la reorganización del citosqueleto, la rotura de uniones intercelulares y la disminución del receptor de fibronectina $\alpha 5\beta 1$. TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; NO: óxido nítrico.

que podría desempeñar una función no sólo en el establecimiento del hepatocarcinoma, sino también en los estadios posteriores que dan lugar a la metástasis. En este sentido, nosotros hemos descrito recientemente que HBx es capaz de inducir diferentes procesos asociados con la metástasis, incluyendo la migración celular, la reorganización del citosqueleto, la rotura de uniones intercelulares y la disminución del receptor de fibronectina $\alpha 5\beta 1^{113-115}$. Además, HBx aumenta la capacidad invasiva de las células tumorales mediante la inducción de la expresión de MT1-MMP y ciclooxygenasa 2¹¹⁶.

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.
- Malik AH, Lee WM. Chronic hepatitis B virus infection: treatment strategies for the next millennium. *Ann Intern Med* 2000;132:723-31.
- Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985;317:489-95.
- Kekulé A, Lauer U, Meyer M, Caselmann W, Hofschneider P, Koshy R. The pre S2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature* 1990; 343:457-60.
- Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B virus. *Annu Rev Biochem* 1987;56:651-93.
- Feitelson 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.
- Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982;29:403-15.
- Takada S, Kido H, Fukutomi A, Mori T, Koike K. Interaction of hepatitis B virus X protein with a serine protease, tryptase TL2 as an inhibitor. *Oncogene* 1994;9:341-8.
- Urban S, Hildt E, Eckerskorn C, Sirma H, Kekulé A, Hofschneider PH. Isolation and molecular characterization of hepatitis B virus-X protein from a baculovirus expression system. *Hepatology* 1997;26:1045-53.
- Scheck N, Bartenschlager R, Kuhn C, Schaller H. Phosphorylation and rapid turnover of hepatitis B virus X-protein expressed in HepG2 cells from a recombinant vaccinia virus. *Oncogene* 1991;6:1735-44.
- Takada S, Koike K. Three sites of the hepatitis B virus X protein cooperatively interact with cellular proteins. *Virology* 1994; 205:503-10.
- Kumar V, Jayasuryan N, Kumar R. A truncated mutant (residues 58-140) of the hepatitis B virus X protein retains transactivation function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5647-52.
- Murakami S, Cheong J, Kaneko S. Human hepatitis virus X gene encodes a regulatory domain that represses transactivation of X protein. *J Biol Chem* 1994;269:15118-23.
- Su Q, Schröder CH, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1998;27:1109-20.
- Sirma H, Weil R, Rosmorduc O, Urban S, Israël A, Kremsdorff D, et al. Cytosol is the prime compartment of hepatitis B virus X protein where it colocalizes with the proteasome. *Oncogene* 1998;16:2051-63.
- Dandri M, Petersen J, Stockert RJ, Harris TM, Rogler CE. Metabolic labeling of woodchuck hepatitis B virus X protein in naturally infected hepatocytes reveals a bimodal half-life and association with the nuclear framework. *J Virol* 1998; 72:9359-64.
- Rahmani Z, Huh KW, Lasher R, Siddiqui A. 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-κB via oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2001;21:7721-30.
- Takada S, Shirakata Y, Kaneniwa N, Koike K. 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.
- López-Cabrera M, Letovsky J, Hu KQ, Siddiqui A. Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: transactivation and repression by CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 5069-73.

22. Dikstein R, Faktor O, Ben-Levy R, Shaul Y. Functional organization of the hepatitis B virus enhancer. *Mol Cell Biol* 1990; 10:3682-9.
23. Faktor O, Shaul Y. The identification of hepatitis B virus X gene responsive elements reveals functional similarity of X and HTLV-I tax. *Oncogene* 1990;5:867-72.
24. Nakatake H, Chisaka O, Yamamoto S, Matsubara K, Koshy R. Effect of X protein on transactivation of hepatitis B virus promoters and on viral replication. *Virology* 1993;195: 305-14.
25. Kekulé A, Lauer U, Weiss L, Luber B, Hofschneider P. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature* 1993;361:742-5.
26. Doria M, Klein N, Lucito R, Schneider RJ. 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.
27. Bouchard MJ, Wang LH, Schneider RJ. Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science* 2001;294:2376-8.
28. 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.
29. Klein NP, Bouchard MJ, Wang LH, Kobarg C, Schneider RJ. Src kinases involved in hepatitis B virus replication. *EMBO J* 1999;18:5019-27.
30. 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.
31. Benn J, Su F, Doria M, Schneider RJ. 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.
32. Natoli G, Avantaggiati M, Chirillo P, Puri P, Ianni A, Balsano C, et al. Ras- and Raf-dependent activation of c-jun transcriptional activity by hepatitis B virus transactivator pX. *Oncogene* 1994;9:2836-43.
33. Chirillo P, Falco M, Puri PL, Artini M, Balsano C, Levrero M, et al. Hepatitis B virus pX activates NF-κB dependent transcription through a Raf-independent pathway. *J Virol* 1996; 70: 641-6.
34. Lucito R, Schneider RJ. Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF-κB without a requirement for protein kinase C. *J Virol* 1992;1992:983-91.
35. Lee Y-H, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 1998;273:25510-5.
36. Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. 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.
37. Huang J, Kwong J, Sun E, Liang T. Proteosome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein. *J Virol* 1996;70:5582-91.
38. Lee DK, Park SH, Yi Y, Choi SG, Lee C, Parks WT, et al. The hepatitis B virus encoded oncoprotein pX amplifies TGF-beta family signaling through direct interaction with Smad4: potential mechanism of hepatitis B virus-induced liver fibrosis. *Genes Dev* 2001;15:455-66.
39. Lee YI, Lee S, Lee Y, Bong YS, Hyun SW, Yoo YD, et al. The human hepatitis B virus transactivator X gene product regulates Sp1 mediated transcription of an insulin-like growth factor II promoter 4. *Oncogene* 1998;16:2367-80.
40. Yoo YD, Ueda H, Park K, Flanders KC, Lee YI, Jay G, et al. Regulation of transforming growth factor-β1 expression by the hepatitis B virus (HBV) X transactivator. *J Clin Invest* 1996; 97:388-95.
41. Choi BH, Park GT, Rho 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.
42. 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.
43. Haviv I, Matza Y, Shaul Y. pX, the HBV-encoded coactivator, suppresses the phenotypes of TBP and TAF_{II}250 mutants. *Genes Dev* 1998;12:1217-26.
44. Lin Y, Tang H, Nomura T, Dorjsuren D, Hayashi N, Wei W, 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.
45. Haviv I, Shamay M, Doitsh G, Shaul Y. Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol Cell Biol* 1998; 18:1562-9.
46. Qadri I, Conaway JW, Conaway RC, Schaack J, Siddiqui A. Hepatitis B virus transactivator protein, HBx, associates with the components of TFIID and stimulates the DNA helicase activity of TFIID. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10578-83.
47. 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.
48. Cheong J, Yi M, Lin Y, Murakami S. 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.
49. Dorjsuren D, Lin Y, Wei W, Yamashita T, Nomura T, Hayashi N, et al. RMP, a novel RNA polymerase II subunit 5-interacting protein, counteracts transactivation by hepatitis B virus X protein. *Mol Cell Biol* 1998;18:7546-55.
50. Reifenberg K, Wilts H, Lohler J, Nusser P, Hanano R, Guidotti LG, et al. The hepatitis B virus X protein transactivates viral core gene expression *in vivo*. *J Virol* 1999;73:10399-405.
51. Spandau DF, Lee CH. Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol* 1988;62:427-34.
52. Twu JS, Robinson WS. Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2046-50.
53. Levrero M, Balsano C, Natoli G, Avantaggiati ML, Elfassi E. Hepatitis B virus X protein transactivates the long terminal repeats of human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J Virol* 1990;64:3082-6.
54. Ferrari C, Pilli M, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Cavalli A, et al. Autopresentation of hepatitis B virus envelope antigens by T cells. *J Virol* 1992;66:2536-40.
55. Franco A, Paroli M, Testa U, Benvenuto R, Peschle C, Balsano F, et al. Transferrin receptor mediates up-take and presentation of hepatitis B envelope antigens by T cells. *J Exp Med* 1992;175:1195-205.
56. Gómez-Gonzalo M, Carretero M, Rullas J, Lara-Pezzi E, Aramburu J, Berkout B, et al. The hepatitis B virus X protein induces HIV-1 replication and transcription in synergy with T-cell activation signals: functional roles of NF-κB/NF-AT and SP1-binding sites in the HIV-1 long terminal repeat promoter. *J Biol Chem* 2001;276:35435-43.
57. Eskild A, Magnus P, Petersen G, Sohlberg C, Jensen F, Kittelsen P, et al. Hepatitis B antibodies in HIV-infected homosexual men are associated with more rapid progression to AIDS. *AIDS* 1992; 6:571-4.
58. Avantaggiati ML, Natoli G, Balsano C, Chirillo P, Artini M, Marzio ED, et al. The hepatitis B virus (HBV) pX transactivates the c-fos promoter through multiple cis-acting elements. *Oncogene* 1993;8:1567-74.
59. Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, Marzio ED, Will H, Perricaudet M, 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.
60. Menzo S, Clementi M, Alfani E, Bagnarelli P, Iacovacci S, Dandri AM, et al. Trans-activation of epidermal growth factor receptor gene by the hepatitis B virus-X gene product. *Virology* 1993;196:878-82.
61. Hsu DK, Dowling CA, Jeng KC, Chen JT, Yang RY, Liu FT. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1999;81:519-26.
62. Kim SO, Park JG, 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.
63. Feng SL, Guo Y, Factor VM, Thorgeirsson SS, Bell DW, Testa JR, et al. The Fn14 immediate-early response gene is induced during liver regeneration and highly expressed in both human and murine hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*

- 2000;156:1253-61.
64. Shin EC, Shin JS, Park JH, Kim H, Kim SJ. 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.
65. Lee Y, Park US, Choi I, Yoon SK, Park YM, Lee YI. Human interleukin 6 gene is activated by hepatitis B virus-X protein in human hepatoma cells. *Clin Cancer Res* 1998;4:1711-7.
66. 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.
67. 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.
68. Lee M, Choi Y, Shin E, Kang H, Kim Y, Jeong S, 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.
69. 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.
70. Wang HD, 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.
71. Chen HS, Kaneko S, Girones R, Anderson RW, Hornbuckle WE, Tennant BC, et al. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection of woodchucks. *J Virol* 1993;67:1218-26.
72. Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection *in vivo*. *J Virol* 1994; 68:2026-30.
73. Chisari F, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995;13:29-60.
74. Guidotti LG, Ando K, Hobbs MV, Ishikawa T, Runkel RD, Schreiber RD, et al. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3764-8.
75. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B Virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996;4:25-36.
76. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adoptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19:65-91.
77. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Annu Rev Immunol* 1992;10:411-52.
78. Simpson KJ, Lukacs NW, Colletti L, Strieter RM, Kunkel SL. Cytokines and the liver. *J Hepatol* 1997;27:1120-32.
79. Majano PL, García-Monzón C, López-Cabrera M, Lara-Pezzi E, Fernández-Ruiz E, García-Iglesias C, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. *J Clin Invest* 1998;101:1343-52.
80. Guidotti LG, McClary H, Loudis JM, Chisari FV. Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Exp Med* 2001;191:1247-52.
81. Rai RM, Lee FY, Rosen A, Yang SQ, Lin HZ, Koteish A, et al. Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13829-34.
82. Su F, Theodosis CN, Schneider RJ. Role of NF-κB and Myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 2001;75:215-25.
83. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-κB. *Nature* 1995;376:167-70.
84. Diao J, Garces R, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:189-205.
85. Chen GG, Lai PB, Chan PK, Chak EC, Yip JH, Ho RL, et al. Decreased expression of Bid in human hepatocellular carcinoma is related to hepatitis B virus X protein. *Arv* 2001;37: 1695-702.
86. Gottlob K, Fulco M, Levrero M, Graessmann A. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem* 1998;273:33347-53.
87. Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, et al. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem* 2001;276:8328-40.
88. Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Forrester K, Yeh H, Stürzbecher HW, et al. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res* 1995;55:6012-6.
89. Lara-Pezzi E, Majano PL, Gómez-Gonzalo M, García-Monzón C, Moreno-Otero R, Levrero M, et al. Hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor-α gene expression in hepatocytes. *Hepatology* 1998;28:1013-21.
90. Diehl AM. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol Rev* 2000;174:160-71.
91. Alcami A, Koszinowski UH. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today* 2000; 21:447-55.
92. Davis BH, Kresina TF. Hepatic fibrogenesis. *Clin Lab Med* 1996;16:361-87.
93. Nakamoto Y, Guidotti LG, Kuhlen CV, Fowler P, Chisari FV. Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Med* 1998;188:341-50.
94. Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Sell S, et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989; 59:1145-56.
95. Dunsford HA, Sell S, Chisari FV. Hepatocarcinogenesis due to chronic liver cell injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Cancer Res* 1990;50:3400-7.
96. Hsu TY, Moroy T, Etienne J, Louise A, Trepo C, Tiollais P, et al. Activation of c-myc by woodchuck hepatitis virus insertion in hepatocellular carcinoma. *Cell* 1988;55:627-35.
97. Dejean A, Sonigo P, Wain-Hobson S, Tiollais P. Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-base-pair direct repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:5350-4.
98. Matsubara T, Tokina T. Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for carcinogenesis. *Mol Biol Med* 1990; 7:243-60.
99. Paterlini P, Poussin K, Kew M, Franco D, Brechot C. 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.
100. Chang SF, Netter HJ, Hildt E, Schuster R, Schaefer S, Hsu YC, et al. Duck hepatitis B virus expresses a regulatory HBx-like protein from a hidden open reading frame. *J Virol* 2001; 75:161-70.
101. Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991;351:317-20.
102. Yu DY, Moon HB, Son JK, Jeong S, Yu SL, Yoon H, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis B virus X-protein. *J Hepatol* 1999; 31:123-32.
103. Terradillos O, Billet O, Renard CA, Levy R, Molina T, Briand P, et al. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene* 1997;14:395-404.
104. Slagle BL, Lee TH, Medina D, Finegold MJ, Butel JS. Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene. *Mol Carcinog* 1996;15:261-9.
105. Höhne M, Schaefer S, Seifer M, Feitelson MA, Paul D, Gerlich WH. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *EMBO J* 1990;9:1137-45.
106. Truant R, Antunovic J, Greenblatt J, Prives C, Cromlish JA. 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.
107. Wang XW, Forrester K, Yeh H, Feitelson MA, Gu JR, Harris CC. 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.
108. Becker SA, Lee TH, Butel JS, Slagle BL. Hepatitis B virus X Protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol* 1998; 72:266-72.
109. Lee SW, Lee YM, Bae SK, Murakami S, Yun Y, Kim KW. Human hepatitis B virus X protein is a possible mediator of hypoxia-induced angiogenesis in hepatocarcinogenesis.

- Biochem Biophys Res Commun 2000;268:456-61.
110. Koike K, Moriya K, Yotsuyanagi H, Lino S, Kurokawa K. Induction of cell cycle progression by hepatitis B virus HBx gene expression in quiescent mouse fibroblasts. *J Clin Invest* 1994;94:44-9.
111. Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11215-9.
112. Ahn JY, Jung EY, Kwun HJ, Lee CW, Sung YC, Jang KL. 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.
113. Lara-Pezzi E, Serrador JM, Montoya MC, Zamora D, Yáñez-Mó M, Carretero M, 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.
114. Lara-Pezzi E, Roche S, Andrisani OM, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M. The hepatitis B virus HBx protein induces adherens junction disruption in a src-dependent manner. *Oncogene* 2001;20:3323-31.
115. Lara-Pezzi E, Majano PL, Yáñez-Mó M, Gómez-Gonzalo M, Carretero M, Moreno-Otero R, 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.
116. Lara-Pezzi E, Gómez-Gaviro MV, Gálvez BG, Mira E, Iñiguez MA, Fresno M, et al. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing MT1-MMP and COX-2 expression. *J Clin Invest* 2002;110:1831-8.