



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Inhibición de la vía del TGF β por efecto del oncogén E6 del HPV16 y la UVB en la
epidermis del modelo murino K14E6**

Tesis que presenta

M. en C. Marco Antonio Popoca Cuaya

Para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

En la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Tutor

Dr. Patricio Gariglio V.

México, D.F.

Mayo 2015

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Oncología Molecular del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la tutoría del Dr. Patricio Gariglio Vidal y esta investigación fue posible gracias al apoyo otorgado por el CONACYT durante el programa de Doctorado.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Patricio Gariglio Vidal por brindarme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo así como de aprender de cada una de sus observaciones, sugerencias y especialmente por la paciencia que tuvo en todo momento durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. José de la Luz Díaz Chávez por brindarme su apoyo, ánimo y colaboración desde el inicio hasta el final de esta investigación.

Al Dr. Javier Hernández Sánchez por las valiosas aportaciones durante el desarrollo de este trabajo y el tiempo dedicado para mejorar el presente trabajo.

Al Dr. Jaime García Mena, por el tiempo y disposición dedicados en la evaluación y revisión del presente trabajo.

A la Dra. Emma S. Calderón Aranda, por sus observaciones, sugerencias, comentarios y el valioso apoyo brindado en la irradiación de los ratones con UVB.

A los laboratorios 24 y 25 del Departamento de Genética y Biología Molecular por el apoyo brindado, sugerencias y orientación así como todas las facilidades otorgadas por Biól. Enrique García, Dr. Rodolfo Ocadiz, y de la Biol. Elizabeth Álvarez.

A mis amigos y compañeros del laboratorio; Janini, Jesús, Jorge, Yasmin, Monserrath, Victor, Nicolas, Saira, Alejandra, Juanito y los que en este momento se escapan de mi memoria por la amistad generada que espero perdure a través del tiempo.

Al UPEAL por todas las facilidades brindadas en el cuidado y reproducción de los ratones transgénicos K14E6 y FVB/n, especialmente a Ricardo Gaxiola, Víctor García, Rafael Leyva y María Teresa Hernández por el apoyo técnico y administrativo.

A la Biblioteca General, especialmente a la Lic. Lupita Ciprés Oliva por el apoyo en la búsqueda de información no disponible en el Cinvestav así como en la proporción de material importante en este trabajo.

A la Sra. Gabriela Mora, por todo el apoyo administrativo, paciencia e información durante el posgrado.

A mis amigos y compañeros María de los Ángeles Romero, Minerva Mata, Sihomara García, Manuel Alberto Castillo y Arnulfo Bautista Santos por compartir el mismo sueño y por la hermandad que nos une y sobre todo por los momentos breves que hemos compartido; pues a pesar de ser pequeños hacen que la vida valga la pena y de una manera muy especial a Arnulfo; amigo y compañero del dolor, alcohol, alegrías y perseverancia.

Este camino no ha sido nada fácil, durante mi travesía hubo momentos donde quise abandonar este viaje y justo en ese instante sentí tu mano y aliento para continuar, camine dejando huellas, algunas borradas por el viento y otras grabadas con la fuerza del hierro, que se quedaran en la memoria y en el porvenir de todas aquellas personas y amigos que por alguna circunstancias el destino nos ha encontrado y también separado...

Agradezco y bendigo a Dios Todopoderoso

A la memoria de

Mis abuelos Pedro, Lina y María Encarnación.

A la presencia de

Mis padres por el apoyo incondicional en cada momento de mi vida y por enseñarme y compartirme sus vivencias.

Mis hermanos por creer en mí, por compartir muchos sueños, esperanzas, por la confianza y el apoyo brindado.

Mis sobrinos por ser la alegría que me motiva y la fortaleza que encuentro en cada una de sus sonrisas.

ABREVIATURAS

BrdU	Bromodeoxiuridina	nm	nanómetro
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina	NaOH	Hidroxido de Sodio
cDNA	DNA complementario	PAI-I	Inhibidor activador del plasminógeno
Co-Smads	Smads comunes	pb	pares de bases
DEPC	Dietilpirocarbonato	PBS	Bufer salina de fosfatos
DNA	Ácido Desoxiribonucleico	PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
dNTP's	Deoxinucleotidos tri-fosfatos	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
E6AP	Proteína asociada a E6	PDZ's	Dominio de proteínas con aminoácidos ETQV
EMT	Transición epitelial a mesénquima	pRb	Proteína del retinoblastoma fosforilada
G1	Fase G1 del ciclo celular	RNA	Ácido Ribonucleico
HCl	Ácido clorhídrico	R-Smads	Smads activadas por el receptor I
HCN	Buffer de Hepes, Cloruro de Calcio y Cloruro de Sodio	S	Fase S del ciclo celular
hDlg	Homólogo humano del disco grande de <i>Drosophila</i>	SARA	Anclaje de Smads activadas por el receptor I
HPRT	Hipoxantina fosforribosil transferasa	SBC's	Sunburns cells
HPV	Virus del papiloma humano	TAE	Buffer de tris-ácido
IQH	Inmunohistoquímica	TBS	Buffer de tris –salino.
I-Smads	Smads inhibitorias	TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
K14	Citoqueratina 14	TTL	Linker terminador de la traducción
KCl	Cloruro de Calcio	TβRI	Receptor tipo I de TGFβ
LTBP	proteína latente de unión a TGFβ	TβRII	Receptor tipo I de TGFβ
MEC	Matriz extracelular	UVA	Luz ultravioleta A
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio	UVB	Luz ultravioleta B
mJ	miliJoules	UVC	Luz ultravioleta C
mM	miliMolar	μL	microlitro
mRNA	RNA mensajero		

RESUMEN

Los papilomavirus humanos de alto riesgo, son los agentes causales del cáncer cervical y en el desarrollo del cáncer de piel no-melanoma. El HPV16 tiene dos oncogenes de expresión temprana; E6 y E7 los cuales codifican oncoproteínas que participan en la transformación de la célula huésped. E6 es conocida por su capacidad para inactivar a p53 e inducir su degradación. Interesantemente, en ratones transgénicos del oncogén E6 de HPV16 (K14E6) se ha reportado que induce hiperplasia epitelial y retardo en la diferenciación en la epidermis de la piel independientemente de la inactivación de p53. El factor de crecimiento transformante β (TGF β) es un importante regulador del crecimiento y diferenciación celular así como de la apoptosis, y esta vía frecuentemente afectada durante la tumorigenesis. La exposición a la UVB es un factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer de piel. La luz ultravioleta B (UVB) comprende una longitud de onda entre 290-320 nm de la UV, ocasiona diferentes respuestas en la célula, incluyendo daño al DNA, perturbación de vías de señalización y apoptosis los cuales son críticos para la homeostasis del epitelio cutáneo. En el presente estudio, investigamos si el oncogén E6 solo o en combinación con la UVB afecta algunos componentes de la vía del TGF β en la epidermis de los ratones K14E6. Utilizamos ratones K14E6 y no transgénicos de 8 días de edad irradiados y no irradiados con una sola dosis de UVB (500 mJ/cm²). Realizamos una cinética a los 10 min, 2h, 4h 8h y 24 h después de la exposición a la UVB y analizamos la expresión de p53, PCNA, los ligandos 1 y 2 de TGF β , los receptores T β RI y T β RII y fosfo-smad2 utilizando inmunohistoquímica y western blot. La expresión del mRNA de los genes blanco de TGF β se analizó por PCR cuantitativo en tiempo real. Encontramos que E6 y la UVB regulan negativamente la vía del TGF β en la epidermis del ratón K14E6 debido a la disminución de la expresión del T β RI en comparación con el ratón no transgénico (NT). La disminución del receptor tipo II (T β RII) por la presencia de E6 y la UVB, afecta la activación de Smad2 y la expresión de los genes blanco como p15, un importante regulador del ciclo celular. En resumen, la vía del TGF β en las células de la epidermis del modelo murino K14E6 es inhibida por E6 y la UVB.

SUMMARY

High-risk human papillomaviruses (HR-HPVs) are the causative agents of cervical cancer and they are also associated with a subset of head and neck squamous cell carcinomas. In addition, HPVs have also been postulated in the development of non-melanoma skin cancers (NMSC). The HPV16 have two early proteins, E6 and E7 oncogenes which encode oncoproteins that cause transformation of the host cell. E6 oncoprotein is best known for its ability to inactivate the tumor suppressor p53, through ubiquitin-mediated degradation of p53 protein. Interestingly, in transgenic mice for HPV16 E6 (K14E6), it was reported that E6 alone induced epithelial hyperplasia and delay in differentiation in skin epidermis independently of p53 inactivation. Transforming growth factor β (TGF β) is an important regulator of cell growth/differentiation and apoptosis and this pathway is often lost during tumorigenesis. Ultraviolet radiation B (UVB) is the middle-range of UV with wavelengths between 290-320 nm. UVB exposure activates diverse cellular responses in cells including DNA damage, gene mutations, perturbation of signal transduction pathways and apoptosis that are critical for cutaneous homeostasis. In the current study, we investigated whether the E6 oncogene alone or in combination with UVB dysregulate some components of the TGF β pathway in the epidermis of K14E6 mice. We used eight-day-old K14E6 and nontransgenic mice irradiated and unirradiated with a single dose of UVB (500mJ/cm²). We analyzed a kinetics at 10 min, 2h, 4h, 8h and 24h after UVB exposure and we evaluated p53 expression, PCNA, ligands of TGF β 1 and 2, receptors T β RI and T β RII and phospho-Smad2 using immunohistochemistry and Western blot, the expression of mRNA of target genes of TGF β was analyzed by RT-qPCR,. We found that the E6 oncogene and UVB irradiation impair the TGF β pathway in epidermis of K14E6 mice by downregulation of the expression of T β RI in comparison with NT mice, independently of UVB treatment. TGF β type II receptor (T β RII) was downregulated by E6 and UVB and this loss of T β RII prevents downstream activation of Smad2 and target genes as p15, an important regulator of cell cycle progression. In summary, the TGF β signaling in cells of the epidermis is downregulated in our mouse model by both the E6 oncoprotein and the UVB irradiation.

INDICE

RESUMEN	
AGRADECIMIENTOS	ii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	v
SUMMARY	vi
INTRODUCCIÓN	1
El Virus del papiloma humano	1
Oncoproteína E6 de HPV16	2
Modelo murino K14E6	4
El factor de crecimiento transformante β (TGF β)	6
El papel de TGF β en la carcinogénesis	10
Luz Ultravioleta B (UVB)	14
Alteraciones de la vía TGF β por la luz UVB	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	21
MATERIALES Y METODOS	16
Ratones transgénicos e irradiación con UVB	
Exposición de ratones FVB/n y K14-E6	22
Inclusión de tejido en parafina y cortes histológicos	22
Inmunohistoquímica	23
Separación de la epidermis	23

Extracción de RNA total	24
Síntesis de cDNA	25
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	25
RT-PCR en tiempo real	26
Western blot	27
Análisis Estadístico	
RESULTADOS	
Proliferación celular en la epidermis después de la irradiación con UVB en ratones NT y K14E6.	29
E6 evita la activación de p53 inducida por la UVB en la epidermis de los ratones transgénicos K14E6	31
Los ligandos de TGF β 1 y TGF β 2 son afectados en la epidermis de los ratones K14E6 después de la irradiación con UVB.	32
T β RII es el receptor más afectado después de la UVB en la epidermis de los ratones K14E6.	34
Inhibición de la fosforilación de Smad2 en la epidermis de los ratones transgénicos K14E6 después de la irradiación con UVB	36
Expresión de los genes blanco de la vía del TGF β después de la irradiación con UVB en la presencia de la oncoproteína E6	38
DISCUSION	41
CONCLUSIONES	50
PERSPECTIVAS	51
REFERENCIAS	52
ANEXO	64

INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (HPV)

Los papilomavirus humanos (HPVs) son pequeños virus de DNA que específicamente infectan a las células epiteliales cutáneas o de mucosas ocasionando lesiones proliferativas como papilomas o verrugas en la piel, en los genitales y en el tracto respiratorio superior. El genoma viral puede permanecer como un episoma estable o bien se integra al genoma de la célula huésped y se replica con el DNA durante la fase S del ciclo celular, de esta manera el ciclo de vida de los papilomavirus se encuentra altamente ligada al programa de diferenciación del epitelio infectado (Münger K, et al 2004). Se han reportado y caracterizado más de 100 tipos diferentes de HPV basados en secuencias homologas pero solo un número limitado de HPV está asociado con el desarrollo de cáncer.

Trece tipos de HPV de alto riesgo (alpha-HPV) juegan un papel crítico en el desarrollo de cáncer cervical y también se le ha asociado a otros tipo de cáncer anogenital así como un subconjunto de carcinoma de cabeza y cuello (Liang *et al* 2012; Patel *et al* 2010). Los beta-HPVs se han ligado al desarrollo de epidermodisplasia verruciforme (EV), la cual es una dermatosis poco común que provoca lesiones similares a las verrugas planas y a la pitiriasis versicolor, los defectos se atribuyen a una deficiencia en la inmunidad celular en la que existe una mayor susceptibilidad genética a la infección por determinados subtipos del virus del papiloma humano (HPV-EV), como los subtipos 5 y 8, y con menor frecuencia otros como el 9, 10 y el 12, (Underbrink *et al* 2008, Patel *et al* 2010;). Además se ha establecido una relación entre la infección de los beta-HPVs y el desarrollo de cáncer de piel no-melanoma (NMSC) en personas inmunocompetentes e inmunocomprometidas según datos epidemiológicos y asociados a factores de riesgo como la inmunosupresión local inducida por la luz ultravioleta (UV) (Massimi *et al* 2008). Hay una fuerte evidencia de la asociación potencial entre la infección de los HPV cutáneos y el carcinoma de células basales (BCC) (Preston *et al* 1992; Gallagher *et al* 1995; Iannaccone *et al* 2013). Interesantemente, el virus de alto riesgo HPV16, el cual es el más prevalente en el cáncer

cervical, se ha sugerido como un factor de riesgo para el desarrollo de NMSC en la población inmunocompetente (Iftner et al 2003; Reuschenbach et al 2011).

El grupo de virus denominados como “de alto riesgo” pueden estimular el crecimiento e inducir transformación maligna en el epitelio cervical promoviendo el desarrollo de cáncer, además la expresión del genoma viral se ha identificado en biopsias de cáncer anogenital y/o cervical. Algunos ejemplos de HPV de alto riesgo son: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58 y 69 (Riley et al, 2003).

HPV16 es el virus que más prevalece en la población y es el responsable de aproximadamente el 50% del cáncer cervical (Akgül et al 2006). El genoma de HPV16 codifica para al menos 6 genes tempranos diferentes y 2 genes de expresión tardía (Akgül et al 2006). En lesiones cervicales causadas por HPV16, la proliferación excesiva de células suprabasales epiteliales se atribuye a la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 codificados en la región temprana del genoma. El estudio tanto de E6 como de E7 ha revelado que estas son proteínas multifuncionales caracterizadas por unirse e inactivar a los supresores de tumores p53 y pRb respectivamente, los cuales regulan los procesos de división, diferenciación y/o muerte celular, lo que contribuye a la inmortalización o transformación celular. Sin embargo, los HPV de alto riesgo son necesarios pero no suficientes para el desarrollo de tumores ya que se requieren de otros eventos moleculares; (Arbeit JM et al 1994 y Schaeffer et al 2004). (Figura 1)

Oncoproteína E6 de HPV16

La oncoproteína E6 es un pequeño polipéptido de aproximadamente 150 aminoácidos y contiene dos motivos de dedos de zinc, cuya integridad es esencial para su función (Talis A.L. et al 1998). Estudios *in vitro* han demostrado que E6 se asocia con p53 y con una proteína asociada a E6 (E6AP), formando un complejo ternario que promueve la ubiquitinación y degradación de p53 por la vía del proteasoma (Scheffner M. et al 1993, Ciechanover A, 1998 y Huibregtse JM et al 2003). p53 es una proteína supresora de tumores que es activada por estrés celular lo cual permite el arresto del ciclo celular o la apoptosis evitando cualquier aberración genómica (Camus S et al, 2007). La inactivación

de p53 por E6 permite la acumulación de mutaciones genómicas en los queratinocitos infectados contribuyendo a la progresión de tumores benignos a carcinomas (Mantovani F. et al, 2001) (figura 2).

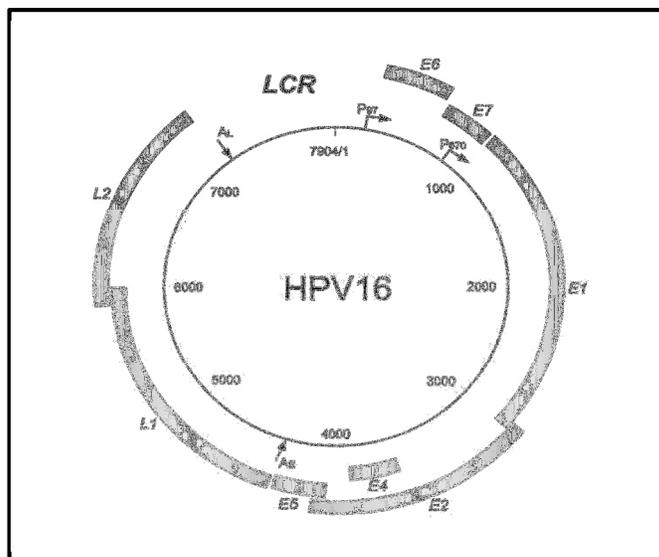


Figura 1. Genoma del virus del HPV16.

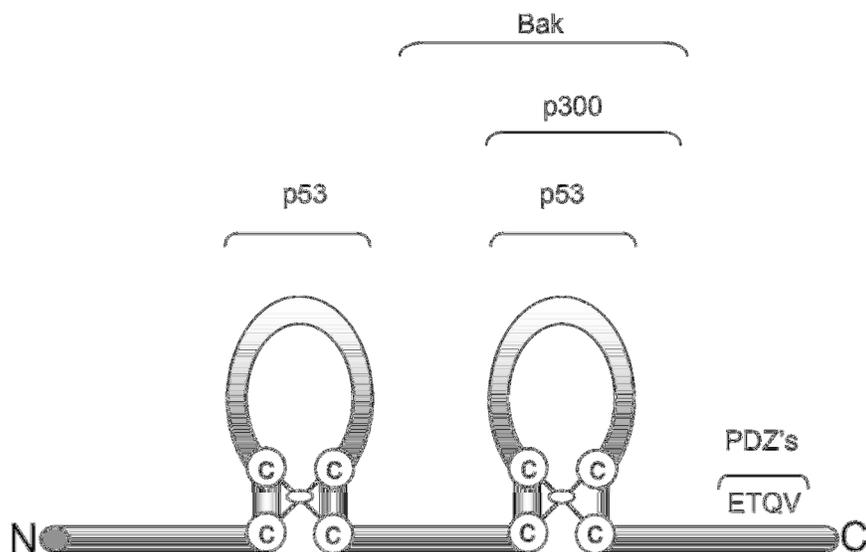


Figura 2. E6 de HPV16. Regiones involucradas en la interacción con proteínas celulares.

La inactivación de p53 por E6, no es la única función de esta última ya que diversos estudios han demostrado que proteínas mutantes de E6 que no pueden inducir la degradación de p53 son capaces de immortalizar células epiteliales mamarias y queratinocitos (zur Hausen 2000). E6 también participa como una proteína antiapoptótica ya que promueve inactivación de Bak y Bax (Thomas et al, 1998 y Jackson S et al, 2000). La inducción de Bak ocurre por UVB de manera independiente de p53. E6 promueve la degradación proteolítica de Bak cuando es inducida por la UVB, de manera que esto representa un mecanismo para inhibir la apoptosis y por consiguiente favorecer la proliferación celular (Mantovani F. 2001).

Otras proteínas celulares blanco de E6 son las proteínas con dominio PDZ's: la proteína supresora de tumores hDlg (El homólogo humano del disco grande de *Drosophila*) y Scribble (Nguyen ML et al 2003 y Simonson S.J. et al 2005). También se ha demostrado que interactúa con la Paxilina, E6TP1, con la proteína ERc55, el factor transcripcional c-myc. E6 es capaz de inhibir la actividad intrínseca de p300/CBP, en elementos de respuesta del promotor p53 y NF- κ B para activar la transcripción (Kumar et al 2002, Riley et al 2003 y Doorbar J. 2006). Distintos estudios han demostrado que E6 de HPV16 puede activar la transcripción de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT), la cual es mediada por myc y por elementos cis-Sp1. La telomerasa, generalmente no es activa en células normales adultas lo cual resulta en una pérdida gradual de la telomerasa a través de la división celular, y su activación por E6 es suficiente para inducir immortalización en cultivos primarios de células.

Modelo murino K14E6

La región del genoma de HPV16 que comprende los nucleótidos de 79-883 correspondiente al ORF de E6 y E7, fue insertada entre la secuencia del promotor y la secuencia de poliadenilación del promotor de la citoqueratina humana 14 (K14), para

dirigir la expresión de E6 hacia las células de la capa basal de la epidermis. Además se insertó un linker de terminación de la traducción (TTL) en el gen de E7 para evitar su expresión (Figura 3). La generación de ratones transgénicos ha permitido caracterizar el papel de E6, en el proceso de la carcinogénesis de la piel: E6 participa en la promoción, un paso involucrado en la formación de tumores benignos y la progresión, la cual se observa como la conversión maligna de tumores benignos a cáncer. (Simonson S.J. et al 2005).

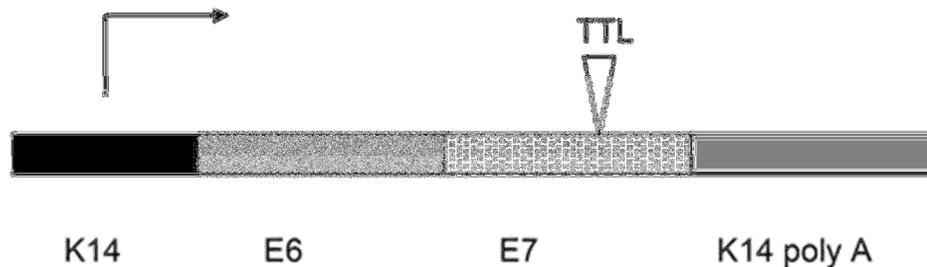


Figura 3. Construcción que expresa el oncogén E6 de HPV16, dirigida por la citoqueratina 14 (K14)

Una observación importante en los ratones K14E6 demostró que E6 indujo un engrosamiento en la epidermis, además hubo una expansión en el número de capas positivas para la citoqueratina 14, ya que normalmente el estrato basal de la epidermis expresa esta proteína. En este mismo estudio, se demostró que hubo un incremento en la proliferación celular y síntesis suprabasal de DNA analizadas por la detección de PCNA y la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), respectivamente, en la epidermis de manera independiente de la inactivación de p53, ya que cuando se comparó al ratón knockout para p53 y el ratón no transgénico no mostraron este fenotipo. Con esto se demostró que E6 tiene otras actividades que pueden inducir hiperproliferación, hiperplasia epitelial y retardo en el proceso de diferenciación en la epidermis de manera independiente de p53 (Song et al 1999) . Además se observó que estos ratones, en un periodo de 15 meses desarrollaron carcinoma epidermoide espontáneamente entre el 10 y 14% de la población, como se muestra a continuación.

Genotipo	Carcinoma de piel	% de carcinoma en piel
K14E6	26/180	14.4
FVB/N	0/150	0.0

Cuadro 1. Desarrollo espontáneo de cáncer de piel en ratones K14E6 comparado con ratones NT en un periodo de observación de 15 meses.

El factor de crecimiento transformante β (TGF β): Supresor de tumores

El TGF β pertenece a una superfamilia de proteínas integrada por más de 35 citocinas que incluye a las activinas, inhibinas, proteína morfogénica de hueso (BMP), hormona anti-mülleriana y al factor de crecimiento transformante β propiamente dicho, que regulan una gran cantidad de actividades biológicas (Poniatowski, et al 2015). TGF β es secretada por diversos tipos celulares y su papel es multifuncional dependiendo del contexto celular y del ambiente, debido a que regula una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación, morfogénesis, adhesión, migración, producción de matriz extracelular y modulación del sistema inmune (Figura 4). (Schuster N 2002 y Kim I Y, et al 2005).

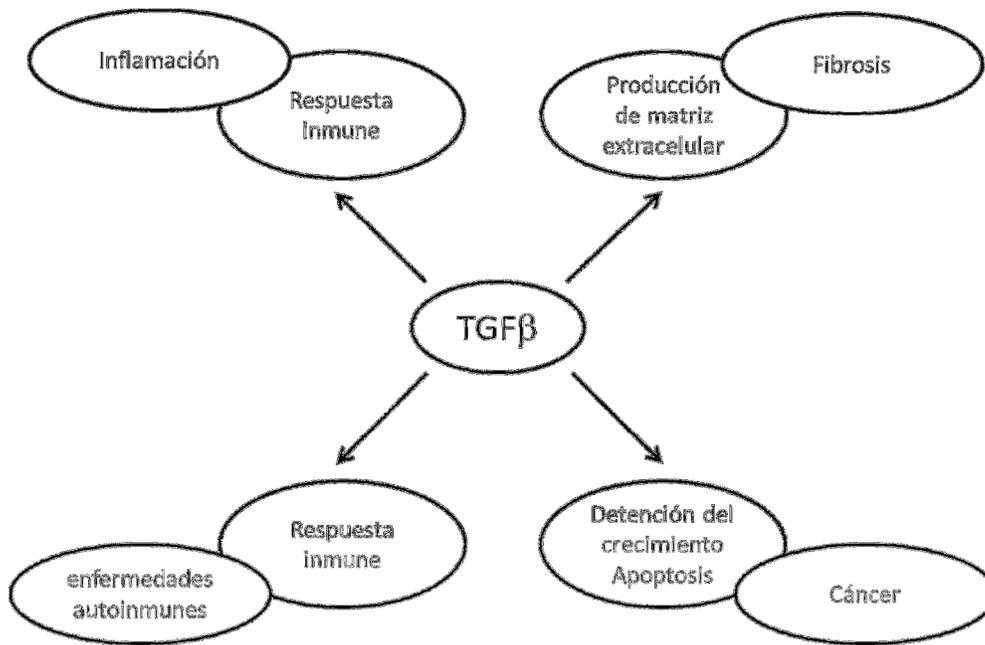


Figura 4. Función pleiotrópica del TGFβ

El TGFβ es secretado de las células como una proteína de alto peso molecular, la cual está compuesta de tres proteínas: el dímero maduro, la proteína de latencia asociada (LAP) y la proteína latente de unión a TGFβ (LTPB). El TGFβ es activado por la disociación de LAP del TGFβ maduro. El TGFβ inhibe la proliferación de la mayoría de las células epiteliales, endoteliales y linfoides, esta regulación negativa de la proliferación por TGFβ constituye una importante vía supresora de tumores (Massagué J 2000 y Bierie B et al, 2006).

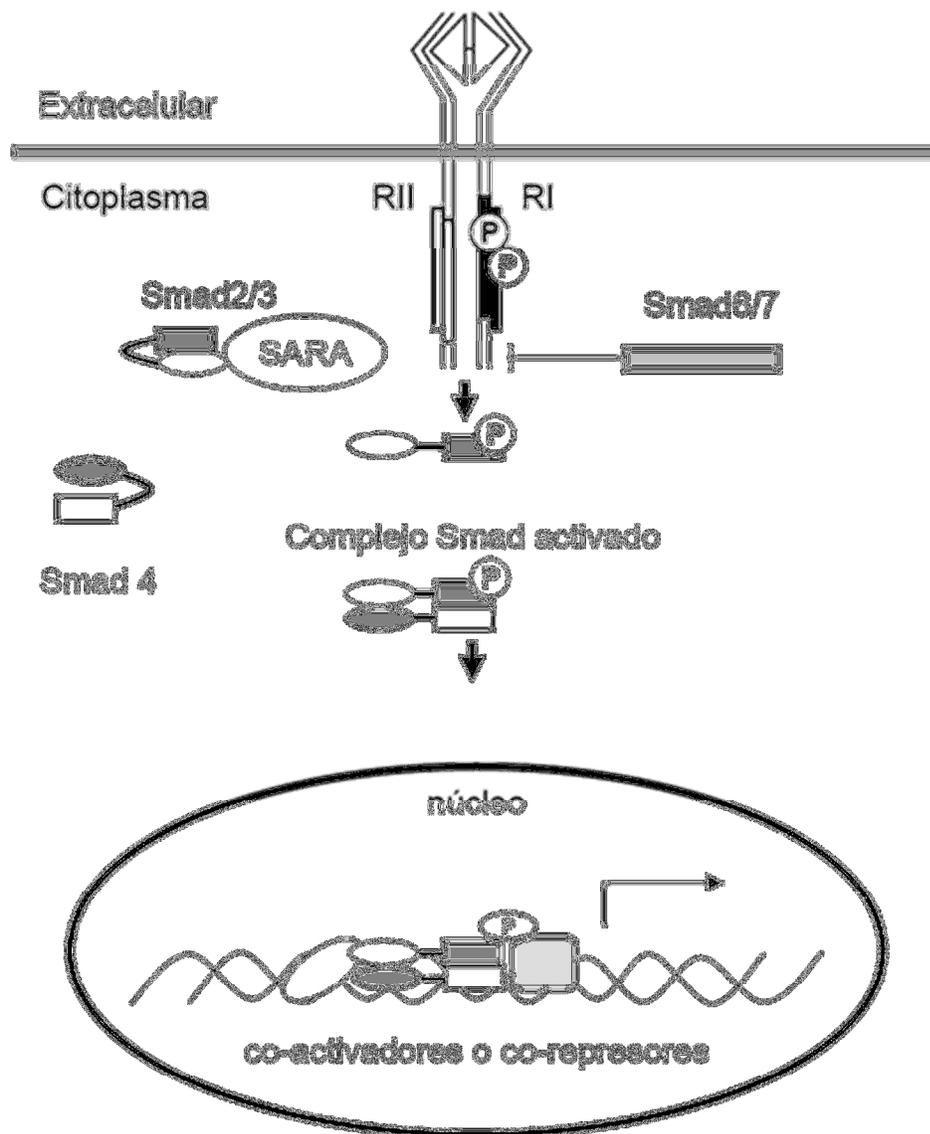


Figura 5. Vía de señalización del TGFβ.

En mamíferos existen tres isoformas de los ligandos, TGFβ1, β2 y β3, que son codificadas por genes separados, pero la señalización ocurre a través del mismo modo. Se han descrito al menos tres clases diferentes de receptores de la familia del TGFβ, (TβRI, TβRII y

T β RIII). El T β RIII es el más abundante de los tres y actúa uniendo TGF β y transfiriendo la citosina a los receptores de tipo I y II. La vía canónica de señalización es la siguiente: TGF β interactúa con el ectodominio de T β RII lo que permite la interacción con T β RI generando un complejo ligando-receptor formado por un dímero de ligando, dos T β RI y dos T β RII. El T β RII es una cinasa que se activa cuando se ha unido el ligando, esta constitutivamente activa y fosforila el dominio GS del receptor T β RI. T β RI fosforila a las Smads a través de su dominio catalítico (Akhurst et al 2001) (Figura 5).

Las Smads forman parte de una familia de proteínas, las cuales son mediadoras importantes en la señalización del TGF β ya que actúan como factores de transcripción. Generalmente están localizadas en el citoplasma, en el estado basal de la vía. Smad2 y Smad3 se encuentran unidas a SARA (Anclaje de Smads activadas por el receptor), la cual presenta a Smad2 y Smad3 (R-Smads) al T β RI activado. T β RI fosforila directamente la región carboxilo terminal de Smad2 y Smad3, lo cual resulta en un decremento en la afinidad de SARA y en la heterodimerización de las R-Smads con Smad4, la cual no es fosforilada (co-Smad). La asociación de las R-Smads con Co-Smad permite la translocación al núcleo, vía las nucleoporinas dentro del complejo del poro nuclear, donde estos complejos de Smads interaccionan con otros factores transcripcionales y activan la transcripción de genes específicos.

La presencia de cofactores transcripcionales particulares en el núcleo asociados al complejo de Smads permite la transcripción o represión de los promotores de los genes blanco regulados por la vía del TGF β , lo cual depende del contexto celular, como por ejemplo Fast, el factor de transcripción E3, Jun, Fos, etc. Muchos cofactores facilitan la interacción de las Smads a diferentes co-activadores los cuales reclutan a las histona-acetil-transferasas o co-represores que reclutan a las histona-deacetilasas para reprimir la transcripción (Ver figura 6).

Por otro lado Smad 6 y Smad 7 (I-Smads) no son fosforiladas por los receptores. Su función es inhibitoria; Smad7 se unen al receptor tipo I, compitiendo con las R-Smad evitando así la fosforilación y por consiguiente su activación. TGF β induce la expresión de Smad7

de tal manera que induce una retroalimentación negativa en la vía de señalización (Oft et al 1998).

El papel de TGF β en la carcinogénesis

El arresto de la proliferación celular por TGF β está asociado con el incremento de la expresión y actividad de varios inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (Cdk), se sabe que inhibe la actividad de los complejos ciclina D-Cdk4/6 y ciclina E/Cdk2. El incremento de la expresión y actividad de p15INK4b, p21Waf/Cip y p27 Kip1 resulta en un decremento de la actividad de las Cdk en la fase G1 del ciclo celular, lo cual mantiene a la proteína retinoblastoma (pRb) en su estado activo hipofosforilado. La hipofosforilación de pRb secuestra al factor E2F necesario para la progresión en la fase S del ciclo celular, deteniendo al ciclo celular en la fase G1. Por otro lado, el protooncogén c-myc es un potente regulador de la proliferación celular en eucariontes superiores, puede activar o reprimir la transcripción, dependiendo de los factores asociados, la expresión de c-myc es reducida en células epiteliales en respuesta a TGF β , se sabe que la vida media del mRNA y de la proteína c-myc es corta, por lo que la inhibición constituye un evento crítico para la inhibición de la proliferación celular. Otro evento importante es la represión transcripcional de la fosfatasa Cdc25A debido a que esta promueve la progresión del ciclo celular a través de la defosforilación y por lo tanto la activación de las Cdk. Cdc25A activa a la ciclina E(A)-Cdk2 durante la transición de la fase G1/S y también parece estar involucrada en la activación de Cdk1 en la transición de G2/M. (Busino L et al 2004) (Figura 6)

La transición epitelio-mesénquima (EMT) ocurre cuando las células epiteliales pierden sus características, incluyendo la disolución de uniones celulares (tight junctions, uniones adherentes y desmosomas) y la polaridad apical-basolateral y adquieren un fenotipo mesenquimal caracterizado por la reorganización de actina así como la migración e invasión celular. La EMT es regulada espacial y temporalmente en el desarrollo normal de los mamíferos, es esencial para numerosos procesos de desarrollo incluyendo la

formación de mesodermo y la formación del tubo neural, la EMT también se presenta en situaciones patológicas como el cáncer y la fibrosis. En cáncer las células tumorales epiteliales llegan a ser más invasivas después de sufrir EMT debido a que su acceso al sistema circulatorio a través de intravasación lo que resulta en la diseminación de las células cancerígena (Figura 7).

La pérdida de marcadores epiteliales como la E-cadherina, β -catenina, Fibronectina, y Vimentina, se considera que es un evento fundamental en la EMT. Muchos factores de transcripción pueden reprimir la E-cadherina directa o indirectamente. Otro evento importante es la adquisición del fenotipo mesenquimal además de la pérdida de adhesión celular, aumento en movilidad e invasividad, resistencia a apoptosis, y cambios morfológicos. Estos eventos son regulados principalmente por tres familias de factores de transcripción; las familias de las Snail, ZEB y bHLH, su expresión es inducida en respuesta a TGF β directamente por las Smads (El caso de las proteínas Snail) o indirectamente a través de la activación de otros factores de transcripción. Una vez activados, estos factores de transcripción a su vez reprimen la transcripción de marcadores epiteliales y se activa la expresión de genes mesenquimales.

De todos los mecanismos empleados por las células tumorales para evadir al sistema inmune, la producción o activación, TGF β es considerado como uno de los más potentes (Thomas et al 2005). En primer lugar, la pérdida de la respuesta a este factor favorece la producción de factores de crecimiento y la diferenciación de un fenotipo invasivo durante los primeros estados de la tumorigenesis. Diversos estudios han demostrado que TGF β directamente inhibe a las células del sistema inmune debido a que suprime la proliferación y diferenciación de linfocitos incluyendo células T citotóxicas, células NK y macrófagos, así como su activación lo cual a su vez inhibe la presentación de antígenos en las células presentadoras de antígenos (Park et al 2009). Las células tumorales producen grandes cantidades de TGF β , el cual es activado en el microambiente tumoral, de esta manera evita la vigilancia inmune durante la transformación, favoreciendo el desarrollo tumoral y de metástasis.

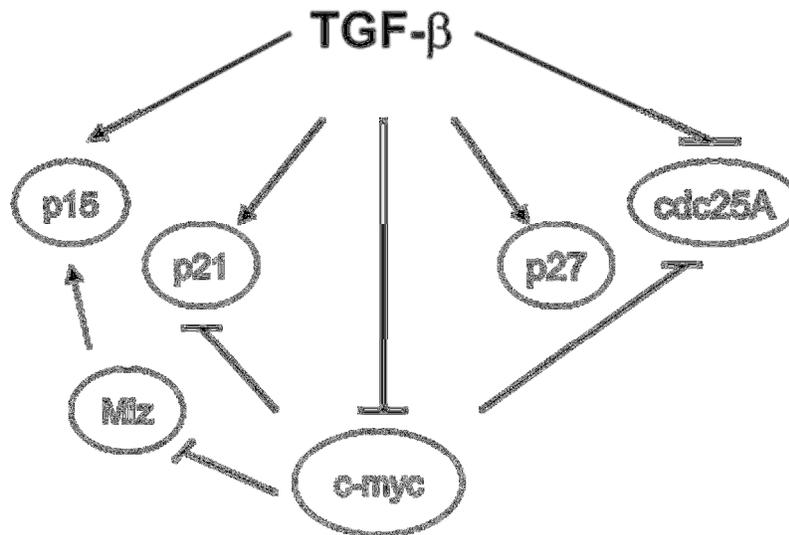


Figura 6. Función supresora inhibidora del ciclo celular de TGFβ.

En estados iniciales de la tumorigénesis, un gran número de células pierde su respuesta a TGFβ en términos de inhibición del crecimiento y/o activación de apoptosis (Schuster et al 2002). El TGFβ estimula la promoción del tumor particularmente en células en las cuales la señalización a través de las Smads permanece funcional. Se ha demostrado que el TGFβ regula la iniciación de un carcinoma mediante un amplio espectro de interacciones, como por ejemplo la inmunosupresión, y la síntesis de matriz extracelular lo cual proporciona un apropiado microambiente para la progresión y metástasis (Chin D. et al 2004 y Hang et al 2005). La secreción de elevadas cantidades de TGFβ, aumenta la activación de las proteasas.

En muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de piel, la pérdida o resistencia a la vía TGFβ/Smad generalmente ocurre como consecuencia de mutaciones, deleciones o pérdida de la heterocigocidad alélica en alguno de los componentes de la vía de señalización, como por ejemplo: TβRII, Smad2 o Smad4. Lo anterior ha sido demostrado

en varias investigaciones y correlaciona con el desarrollo del cáncer. Además se ha reportado represión transcripcional y metilación de la región promotora del DNA de TGF β RII. La represión transcripcional de TGF β RII puede ser responsable del desarrollo de muchos tumores asociados a la resistencia al TGF β (Glick A. 1993).

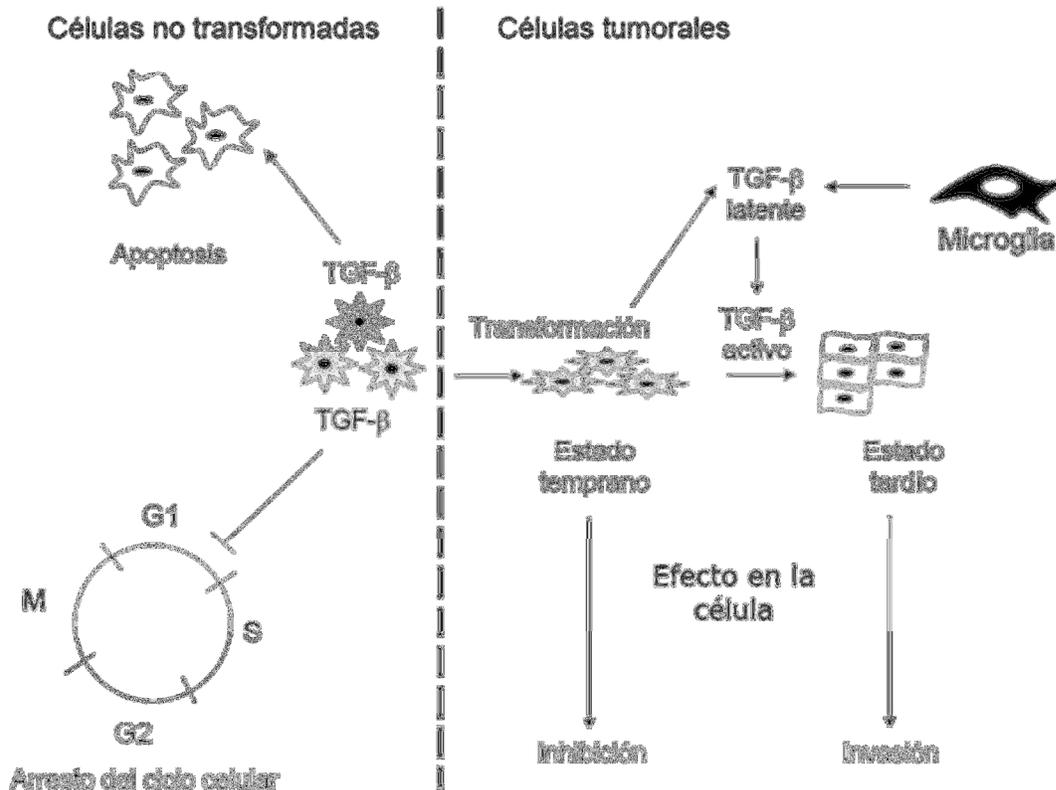


Figura 7. Función supresora de tumores del TGF β .

En tumores en etapas tardías, el TGF β no sólo pierde su función supresora de tumores sino que la sobreexpresión de TGF β es un factor oncogénico, induciendo proliferación, invasión, transición epitelial a mesenquima, (EMT), propagación de células endoteliales, en ciertos casos metástasis y angiogénesis (Park et al 1994). TGF β estimula la producción

del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el cual es el principal estímulo en la promoción de la angiogénesis y del inhibidor del activador del plasminogeno (PAI-I) ambos participan en la remodelación vascular, promoviendo la neovascularización. (Kaminska B et al 2005). En humanos, la sobre-expresión del TGF β 1 ha sido asociada con cáncer de mama, colon, gástrico, hepatocelular, pulmonar y pancreático Copland J. et al 2003).

Esta vía tiene por lo tanto dos funciones en el cáncer: supresor de tumores en etapas tempranas del desarrollo tumoral y activador de la progresión de cáncer en estadios tardíos (Derynck R et al 2001).

Luz Ultravioleta B (UVB)

La luz solar está compuesta de un espectro continuo de irradiaciones electromagnéticas y se puede dividir en tres regiones de acuerdo a la longitud de onda, ultravioleta (45%), visible (5%) e infrarrojo (50%). La luz ultravioleta está dividida en tres categorías UVA (315–400 nm), UVB (280-315 nm) y UVC (100-280 nm) (Dare et al, 2006). La capa de ozono eficientemente absorbe la luz ultravioleta arriba de 310 nm por lo que consume el 95% de la luz UVB. Debido al daño de la capa de ozono una gran cantidad de UVB alcanza la superficie de la tierra (Laethem et al, 2005).

La principal función de la epidermis es proteger al organismo de la deshidratación, del daño producido por agentes mutagénicos y de la radiación de la luz UVB. La UVB es absorbida por la piel estimulando la inducción de mutaciones somáticas a través de la formación de dímeros de timina y otros fotoproductos (Jackson et al 2000). Otros efectos de la UVB en la piel son la producción de quemaduras y es considerado como el principal agente etiológico promotor e iniciador del cáncer de piel (melanoma y no melanoma) (De Fabo et al 2004).

La radiación UVB activa múltiples receptores de factores de crecimiento y citocinas en la superficie celular, los cuales a su vez inician cascadas de señalización intracelular, como por ejemplo la activación del gen supresor de tumores p53. Este gen es considerado el guardián del genoma y es uno de los genes frecuentemente mutados por luz UV en cáncer de piel de humano y de ratón (Dong et al 2005).

La luz UVB y las radiaciones ionizantes inducen elevados niveles de la proteína p53 que a su vez activa la transcripción de genes tales como p21 Waf1/Cip1, involucrado en el arresto del ciclo celular en la zona de transición G1/S (pRb hipofosforilado). La proteína p21Waf1/Cip1 se une e inactiva a las cinasas dependientes de ciclinas requeridas para la progresión del ciclo celular. El arresto del ciclo celular permite la reparación del DNA, de tal manera que p53 juega un papel en la prevención del desarrollo de cáncer de piel inducida por la radiación UVB. Sin embargo, p53 también puede causar apoptosis de células con excesivo daño no reparado, a través de la regulación positiva del gen bax y regulación negativa del gen bcl-2 (Ouhtit A. et al 2001 y Bruins W et al 2004).

La pérdida del tipo silvestre de p53 elimina el control en la tumorigénesis, permitiendo a las células con daño en el DNA proseguir a través del ciclo celular, con lo que se propaga la inestabilidad genómica y/o daño en las células.

Diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la UVB induce la formación de “sunburns” cells (SBCs), las cuales exhiben el núcleo picnótico característico de la apoptosis. Este mecanismo asegura la eliminación de células dañadas por la exposición a la luz UVB, que potencialmente pueden llegar a ser tumorigénicas (Ouhtit et al, 2000 y Dare et al 2006). Las dos principales vías de apoptosis que participan por efecto de la luz UVB en queratinocitos son: una vía extrínseca mediada por receptores de muerte y una vía intrínseca mitocondrial, las cuales no necesariamente son excluyentes y pueden actuar como un mecanismo de amplificación de las vías apoptóticas (Daher A 2006).

Alteraciones de la vía del TGF β por la luz UVB

Se ha observado un incremento gradual de la expresión de TGF β 1 y TGF β 3, mientras que la forma predominante en piel humana TGF β 2, mostró una reducción de aproximadamente un 70% en su expresión en biopsias de piel de humano, después de ser irradiadas con luz UVB (Quan et al 2002).

La expresión de Smad7 es inducible por la misma vía del TGF β y esta antagoniza la expresión de genes mediados por esta vía, evitando la asociación de Co-Smads y R-Smads o la fosforilación de las R-Smads. Interesantemente, se ha observado que la inducción de Smad7 ocurre en respuesta a la luz UV (He et al, 2002). Se ha demostrado también que la luz UVB promueve la activación del factor de transcripción AP-1 y que el promotor de Smad7 posee el sitio de unión a AP1. En fibroblastos de piel humano AP1 interacciona con el promotor de Smad7, de tal manera que la irradiación UV a su vez incrementa los niveles de mRNA y proteína de Smad7, de esta manera la proteína Smad7 interacciona con el receptor tipo I evitando la asociación y activación de Smad3 con Smad4 (Quan, et al 2005).

En otro estudio *in vivo*, Quan et al (2005) demostraron que la luz UV redujo los niveles de mRNA y de proteína del T β RII en fibroblastos de piel humana pero hubo una recuperación del nivel del receptor II a las 24 horas. En este estudio se observó que la luz UV inhibe la transcripción de T β RII, con lo cual la vía de señalización corriente abajo se bloquea impidiendo la síntesis de procolágeno I, uno de los genes blanco regulado positivamente por la vía del TGF β (Quant et al 2004).

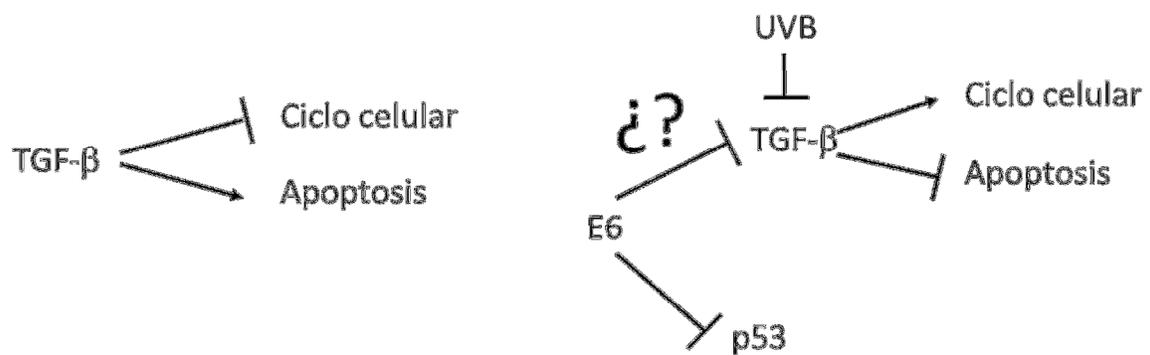
La radiación ultravioleta en particular el rango comprendido entre 290-320nm (UVB), representa al 5% de la irradiación solar y está involucrado en la supresión del sistema inmune de la piel (Halliday et al 2012) y es el principal factor de riesgo para el desarrollo de NMSC. Esto es relevante para el cáncer de piel debido a que la UVB actúa como un potente carcinógeno capaz de inducir iniciación, promoción y progresión de las células tumorales (Pfeifer et al 2012) La colocalización de las células de carcinoma de piel (SCC) y

la infección por HPV en sitios crónicamente expuestos a la luz solar sugiere que la UVB y el HPV pueden cooperar en el desarrollo de lesiones de piel (Mouret et al 2012). El efecto de la oncoproteína E6 y la UVB en la inducción de lesiones en la piel no se ha reportado. El objetivo de este estudio fue investigar los efectos de la luz UVB y el oncogen E6 de HPV16 en la vía del TGF β en la epidermis de ratones transgénicos K14E6. En este trabajo reportamos que la expresión del T β RII es inhibido por la UVB y el oncogen E6, mientras que el T β RI es inhibido solo por la oncoproteína E6. La inhibición de los receptores afecta la fosforilación de Smad2 así como la expresión de genes blanco regulados por TGF β . En resumen, sugerimos que la infección por HPV16 en la epidermis y la exposición a la luz UVB puede cooperar en la carcinogénesis de la piel al menos en parte por la inhibición de la vía del TGF β .

JUSTIFICACIÓN

Los ratones transgénicos para E6 del HPV16 (K14-E6) desarrollan hiperplasia epitelial y presentan un retardo en la diferenciación, eventos importantes en cáncer. Sin embargo, este fenotipo no es debido a la inactivación de p53, y otras vías supresoras de tumor podrían ser inhibidas por E6.

Además es de interés determinar si la luz UVB y E6 pueden cooperar en la alteración de componentes de esta vía de señalización empleando un modelo murino.



HIPÓTESIS

La oncoproteína E6 de HPV16 sola o en cooperación con luz UVB puede alterar la expresión y función de componentes de la vía de TGF β independientemente de la inactivación de p53 en un modelo murino.

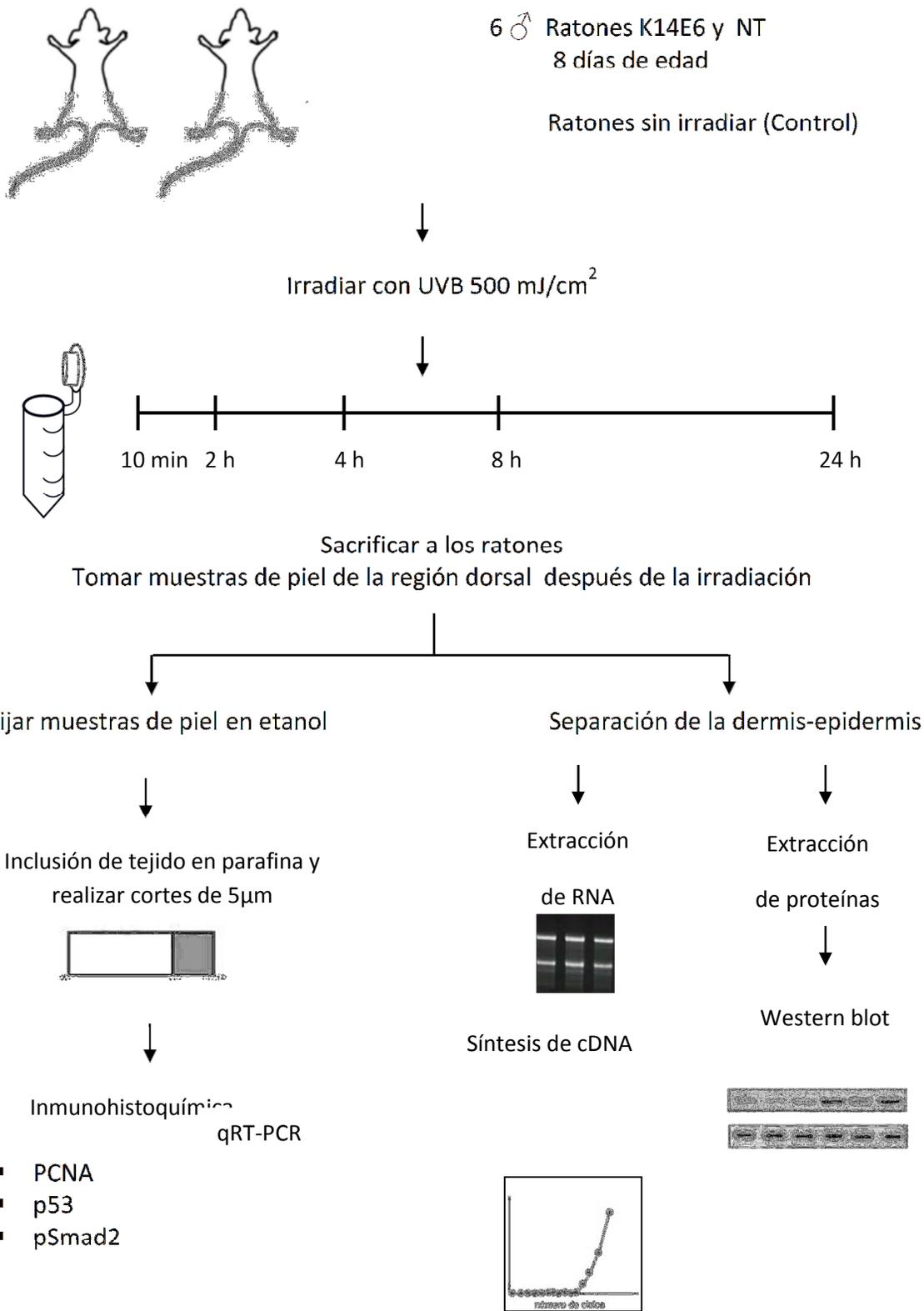
OBJETIVO GENERAL

Estudiar posibles alteraciones de la vía de señalización del TGF β por E6 y luz UVB en la epidermis del modelo murino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la separación de la dermis-epidermis para la extracción de RNA total.
2. Determinar la expresión de p53 como un control de la respuesta a la luz UVB en la epidermis de ratones NT y K14E6.
3. Analizar la proliferación celular en la epidermis de ratones FBV/n (NT) y K14E6 irradiados y sin irradiar con luz UVB.
4. Comparar la expresión proteica de las isoformas 1 y 2 de TGF β en la epidermis de los ratones NT y K14E6 irradiados y sin irradiar con luz UVB.
5. Analizar la expresión proteica los receptores T β RI y T β RII en la epidermis de ratones transgénicos NT y K14E6 irradiados y sin irradiar con luz UVB
6. Determinar la activación de la vía del TGF β , mediante la expresión de Smad2 fosforilada en la epidermis, en los ratones NT y K14E6
7. Analizar la activación o represión transcripcional de genes blanco (p15, c-myc y Cdc25A) de la vía del TGF β , en ratones NT y K14E6 irradiados y sin irradiar con UVB

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Material y métodos

Ratones transgénicos e irradiación con UVB

Los ratones K14E6 han sido previamente descritos y caracterizados (Song *et al* 1999). Todos los ratones (NT y K14E6) fueron tratados de acuerdo a las normas establecidas por la American Association of Laboratory Animal Care (AALAC). Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo al protocolo aprobado por la Unidad de producción y experimentación de animales de laboratorio (UPEAL-CINVESTAV-IPN, México; NOM-062-ZOO-1999). Los ratones fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial y agua. Ratones macho de 8 días de edad K14E6 y no transgénicos (NT; FVB/N) se expusieron a una sola dosis de luz ultravioleta B (UVB) de 500 mJ/cm² debido a que esta dosis corresponde a la dosis dosis de eritema media en ratones, se utilizó una fuente de UV con un pico de longitud de onda de 310 nm. Después del tratamiento los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical en diferentes tiempos post-irradiación UVB (10 min, 2 h, 4 h 8 h y 24 h). Un grupo de ratones no irradiados fueron utilizados como control.

Inclusión de tejido en parafina y cortes histológicos.

Las muestras de tejido fijadas en etanol absoluto se deshidrataron para ser incluidas en parafina, para eliminar la solución de etanol se reemplazó por xilol y finalmente los tejidos se impregnaron en parafina a 60^o C. Posteriormente, se prepararon los bloques de parafina utilizando moldes precalentados en una placa aproximadamente a 60^o C, antes de que la parafina se solidificara se orientó el tejido de la piel dentro de cada molde con la ayuda de unas pinzas para que los cortes se realizaran de manera transversal, por último con la ayuda de un micrótopo, se realizaron cortes de 5 µm, estos se montaron en portaobjetos electrocargados.

Inmunohistoquímica (IHQ)

Los cortes de 5 μm de los tejidos se desparafinaron durante 30 minutos, incubándose en un horno aproximadamente a 60°C, después se rehidrataron en xilol por 10 min. (2 veces) etanol al 100% por 5 min (2 veces) y lavadas con buffer PBSIX-Tween 20 0.1%. Se realizó recuperación de los antígenos inducida por calor durante 20 min. en una solución de citratos (ácido cítrico y citrato de sodio). Para eliminar a la peroxidasa endógena se bloqueó en una solución con H₂O₂ al 3% en metanol absoluto durante 30 min. Posteriormente, se hicieron lavados con PBS Tween20 al 0.1%. Para eliminar el fondo inespecífico se incubó el tejido con una solución de albumina al 10 % diluida en PBS durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente, en seguida se lavó con PBS Tween 20 0.1%. Finalmente, se incorporó el anticuerpo primario incubándose toda la noche a 4°C en cámara húmeda (PCNA 1:100, p53 1:100 de Santa Cruz Biotechnology y PSMAD2 1:100 de Merck Millipore).

Al día siguiente se hicieron lavados con PBS Tween 20 0.1%, para acoplar el anticuerpo secundario durante una hora en cámara húmeda a temperatura ambiente, se lavó de nuevo con PBS Tween 20 0.1% para incorporar el conjugado por 30 min, se reveló la reacción con de acuerdo con las sugerencias del fabricante del kit se detuvo la reacción con lavados de PBS Tween 20 y agua bidestilada, y por último las muestras se contrastaron con hematoxilina y las laminillas se sellaron con permount y se analizaron en un microscopio óptico en aumentos de 20X y 40X. las fotografías se tomaron en un microscopio Zeiss y Leica a un aumento de 40X.

Separación de la epidermis

La piel dorsal de cada ratón fue retirada inmediatamente después del sacrificio y se cortó en 3 piezas. Una de las piezas se fijó en formaldehído al 4 % para incluirla en parafina. Las otras dos piezas fueron tratadas con el método de calor para separar la epidermis de la dermis. Esto consistió en lavar la piel con PBS en vortex y posteriormente sumergir la piel en un baño de agua bidestilada a 58°C durante 55 segundos, finalmente con la ayuda de

un bisturí se procedió a realizar una separación mecánica en un baño de hielo a 4^oC. (El-Abaseri et al 2006) Una vez separada la epidermis, las muestras se lavaron con PBS IX y se almacenaron para extraer RNA total y proteínas a -70^oC.

Extracción de RNA total

La obtención de RNA total se realizó a partir de las muestras de epidermis de ratones NT y K14E6. Para esto se trituró la epidermis de cada muestra en nitrógeno líquido utilizando un mortero de porcelana hasta pulverizarlo y almacenado en 1 mL de TRizol a -70^oC. Posteriormente se prosiguió con la extracción de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen), descrito a continuación.

A cada tubo se le agregó 200 µL de cloroformo por cada mililitro de TRizol, se agitó vigorosamente durante 15 segundos manualmente y después con vortex hasta obtener un color rosa uniforme, se incubó durante 15 minutos a 4^oC (se agitó con vortex cada 5 min. y al final 30 seg.), posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4^oC. Se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo, incorporando 500 µL de isopropanol por cada mililitro de TRizol, que se utilizó al principio, después se dejó incubar por 20 min a temperatura ambiente y nuevamente se centrifugó a 13,000 rpm por 20 min. a 4^oC. Como resultado se obtuvo una pastilla (RNA total), el sobrenadante se decantó y la pastilla se lavó con 300 µL de etanol al 80% con agua pretratada con DEPC (Dietilpirocarbonato) por cada mililitro de TRizol, se agitó con vortex para resuspender la pastilla y se centrifugó a 7,500 rpm por 10 min a 4^oC. Finalmente se dejó secar el RNA y se resuspendió en 30 µL de agua pretratada con DEPC, finalmente las muestras se almacenaron a -70^oC.

Para visualizar el RNA obtenido se realizó una electroforesis en un gel de agarosa (BIO-RAD Laboratories, USA) al 2% en buffer TAE que fue teñido con bromuro de etidio, se utilizó como buffer de carga el colorante "Orange G" y se visualizaron en un transiluminador de luz UV, la imágenes se obtuvieron con una cámara GeneCam (SynGene, USA).

Síntesis de cDNA

Se cuantificó el RNA total extraído de la epidermis de ratones NT y K14E6 y se tomó un volumen equivalente a 1 µg. A cada muestra se le agregó 1 µl de oligonucleótido de timina (oligo dT, 0.5 µg /µl) y agua tratada con DEPC al 0.1%, hasta que se obtuvo un volumen final de 12 µl, posteriormente se incubó a 70°C durante 10 min. Inmediatamente después las muestras se colocaron en hielo durante un minuto, después se le agregó a cada muestra 4 µl de buffer 5X (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM y MgCl₂ 15 mM), 2 µl de ditioneitol (DTT, 0.1 mM), 1 µl de deoxinucleótidos tri-fosfatados: dATP, dGTP, dCTP y dTTP (dNTP's, 0.2 mM); 1 µl de inhibidor de enzimas que degradan el ARN (RNase Cloned, 10 U/µl), se incubó a 42°C durante 2 min y finalmente se incubó con 1 µl (200U/µl) de la enzima transcriptasa reversa "SuperScript™ II Rnase H " a 42°C durante 1 hora y finalmente se incubó a 70°C durante 15 min. El cDNA se almacenó a -20°C.

NOTA: los reactivos que se utilizaron pertenecen a la casa comercial Invitrogen, Life Technologies, USA. La metodología es la recomendada por el fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se prepararon tubos, con 17.05 µl de agua ultrapura, 1.25 µl de Cloruro de Magnesio (MgCl₂, 2 mM), 1 µl de oligo sentido y 1µ de oligo antisentido(100 µg/ul), 2.5 µl de Buffer 10X (tris-HCl 200mM y KCl 500 mM), y 0.2 µl de la enzima Taq DNA polimerasa (5U/µl), con un volumen de reacción final de 25 µl .

Para visualizar los productos del RT-PCR correspondientes a la expresión de cada gen, se realizaron electroforesis en geles de agarosa (BIO-RAD, Laboratories, USA) al 2% en TAE, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz UV. En cada corrida se incluyó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen, life Technologies, USA) y los geles se analizaron tomando en cuenta el producto esperado de cada gen, utilizando una cámara digital (GeneCam SynGene, USA).

RT-PCR en tiempo real

El ensayo de PCR en tiempo real se llevó a cabo empleando el kit QuantiTect (QIAGEN USA) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Se empleó el cDNA de las muestras de los ratones NT y K14E6, así como los primers utilizados en el PCR punto final, las cuales fueron diseñadas utilizando el software Primer Express (Cuadro 2). Todas las mezclas de PCR se realizaron con 12.5 µl de master mix SYBR, 10.5 ml de agua y 1µl de cDNA. Las reacciones se realizaron en un termociclador Applied Biosystems 7500. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: 10 minutos de la pre-incubación a 95 ° C seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C y un minuto a 60 ° C. Para la cuantificación del mRNA en las muestras de epidermis a partir del cDNA se empleó el método de cuantificación relativa utilizando los valores del ciclo umbral (Ct) que se define como la fracción del número de ciclo en el que la fluorescencia generada por el SYBR Green sobrepasa la línea umbral. Los valores Ct obtenidos con los primers específicos de los blancos de la vía del TGFβ se compararon con el valor de Ct obtenido para el control GADPH. Estos datos fueron cuantificados utilizando la ecuación que reporto Livak y Schmittgen en el 2001: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Con los valores se procedió a graficar los promedios y la desviación estándar (DE), el contenido relativo de mRNA y se realizaron pruebas de ANOVA donde se consideró un valor P menos de 0.05 para ser considerado estadísticamente significativo. Cada muestra fue analizada por triplicado.

Las secuencias de los oligonucleotidos utilizados en las reacciones de RT-PCR fueron las siguientes:

Cuadro 2. Secuencia de oligos

Oligos	Secuencias	
Cdc25A	Sentido	5'-AGTGGCTGGTGTAGGAGTCACA-3'
	Antisentido	5'-ATGCCCCCCTCTTCCA-3'
c-myc	Sentido	5'-TGCATTGACCCCTCAGTGGT-3'
	Antisentido	5'- TCCGAGGAAGGAGAGAAGGC -3'
p15	Sentido	5'-TCTGCAGCTGGATCTGGTCC-3'
	Antisentido	5'-TCCTGAAAGGTAGAGGGCCC-3'
GAPDH	Sentido	5'- CATCTCCTCCCGTTCTGCC-3'
	Antisentido	5' -GTGGTG-CAGGATGCATTGC-3'

Western blot

Para la extracción de proteínas de las muestras de epidermis, estas se trituraron en un mortero estéril en nitrógeno líquido hasta quedar reducido a polvo, finalmente se homogeneizaron en un buffer de radioinmunoprecipitación (RIPA). Las proteínas fueron almacenadas a -70°C . Una vez cuantificadas las muestras de proteínas, estas se hirvieron durante 5 minutos empleando buffer de muestra con la finalidad de desnaturalizar a las proteínas. Después de enfriar las muestras se centrifugaron por unos segundos, posteriormente estas se corrieron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a diferentes porcentajes (TGF β 1 y2 al 15%, T β RI, T β RII pSmad2 al 12%), en un carril se cargó marcador de peso molecular, los geles se corrieron a 200 volts para esto se utilizó buffer de corrida, por aproximadamente una hora. Cuando las proteínas se separaron de acuerdo al peso molecular, el gel se transfirió en una membrana de nitrocelulosa, para ello se colocó el gel junto con la membrana y papel filtro en cámara húmeda a 4°C en buffer de transferencia, durante toda la noche o por 30 minutos según la proteína a identificar, para corroborar la transferencia de proteínas se utilizó rojo de Ponceau posteriormente se lavó la

membrana con agua bidestilada y continuando con el protocolo se bloqueó con leche al 5% o albumina al 5% en PBS durante una hora en agitación. Posteriormente la membrana se lavó con TBS-Tween 20% finalmente se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche (p53 1:100, TGFβ1 1:200, TGFβ2 1:100, TβRII 1:200, TβRI 1:100 1:150 Smad2 de Santa Cruz Biotechnology y PSMAD2 1:100 de Merck Millipore). Aproximadamente después de 24 horas de incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween 20% y se incubó durante una hora con el anticuerpo secundario y nuevamente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween 20%. Posteriormente se le colocó a la membrana 1 mL de sustrato de quimioluminiscente (ECL) y finalmente se reveló en un cuarto oscuro, una vez fijada la película. Para re-utilizar la membrana con otro anticuerpo se procedió a desnudarla colocándola en agua bidestilada por 5 min, NaOH 0.2 M por 5 min, 2 lavados con agua bidestilada durante 5 min y por último con PBS, volver a bloquear con leche o albumina e incubar con el anticuerpo. Después de tener las placas con la señal de la proteína a identificar se realizó densitometría de cada una de las placas normalizando con actina (control de carga) utilizando el programa Image J.

Análisis estadístico

La comparación de los valores de proliferación celular (células positivas a PCNA) en la epidermis de los ratones NT y K14E6 se realizó utilizando la prueba t de Student y la comparación de medias para cada gen blanco del TGFβ en cada punto de la cinética empleada en los ensayos de RT-qPCR se realizó la prueba de ANOVA utilizando los valores de cuantificación $2^{-\Delta Ct}$. En ambas pruebas estadísticas se utilizó el programa SPSS 13.0 software package (IBM USA).

Resultados

Proliferación celular en la epidermis después de la irradiación con UVB en ratones NT y K14E6.

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) está asociado a la fase S del ciclo celular por lo cual utilizamos a este marcador para evaluar la proliferación en los queratinocitos de la epidermis en ratones de 8 días de edad no transgénicos (NT) y transgénicos K14E6, en muestras de piel provenientes de cortes de 5 μm los cuales se obtuvieron 4 horas después de una sola irradiación con UVB (500mJ/cm²) comparados con ratones no irradiados (Control) empleando inmunohistoquímica (IHC). Como se observa en la figura 8, en ratones NT se observó una disminución significativa en la proliferación celular en el estrato basal a las 4 horas después de la irradiación con UVB, lo cual sugiere un arresto en el ciclo celular debido al daño provocado por la UVB, comparado a los ratones no irradiados. En la epidermis de los ratones K14E6 se observó hiperproliferación celular en el grupo control y no se observaron cambios después de las 4 h de la exposición con luz UVB, esto probablemente se debe a la presencia de la oncoproteína E6 la cual está presente en el núcleo y el citoplasma en la epidermis de los ratones K14E6 (figura 8) detectada por IHC.

El análisis semicuantitativo de PCNA en la epidermis de los ratones NT y K14E6 se realizó contando el número total de células en áreas específicas y las células positivas a PCNA a diferentes tiempos después del tratamiento con UVB, estos valores se graficaron, como puede ser apreciado en la figura 9, principalmente se puede observar una recuperación en la expresión de PCNA en las células de la epidermis a las 8 h post-UVB en ratones no transgénicos. En contraste, en los ratones K14E6 no se observó un arresto del ciclo celular. Las células positivas a PCNA fueron detectadas en el estrato basal y suprabasal de la epidermis de los ratones K14E6 y no hubo diferencias significativas entre en control y los ratones irradiados a diferentes tiempos. Tres laminillas fueron analizadas de cada muestra de tres ratones y las células positivas a PCNA en la epidermis fueron contadas en 10 campos de cada sección de la laminilla.

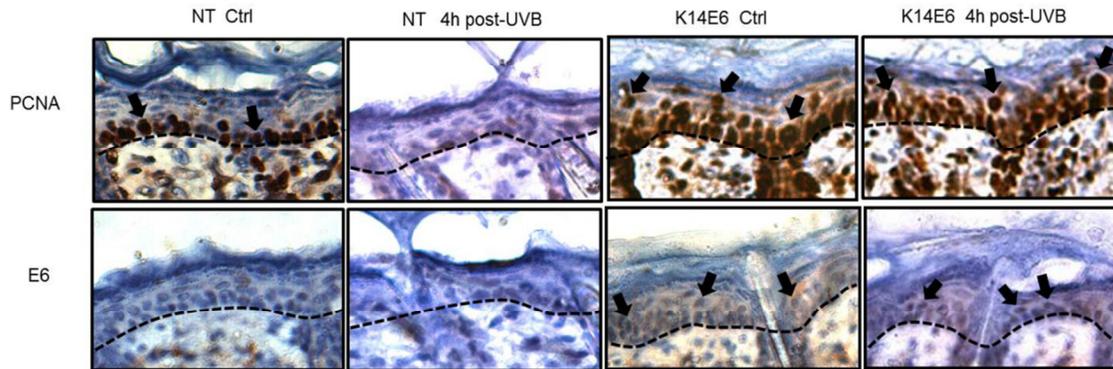


Figura 8. Sección histológica de la piel de ratones de 8 días de edad de ratones NT y K14E6, los cuales fueron irradiados con $500\text{mJ}/\text{cm}^2$ aproximadamente durante 5 minutos o ratones no irradiados (control). Las muestras de piel se analizaron por inmunohistoquímica para identificar a PCNA y la oncoproteína E6 y contrastadas con hematoxilina, la línea punteada representa la capa basal de la epidermis. La señal oscura en los núcleos muestra a las células positivas a PCNA (flechas negras). E6 se muestra como una señal oscura en el citoplasma y en el núcleo en células de la epidermis, únicamente en los ratones K14E6 la cual se muestra en flechas negras.

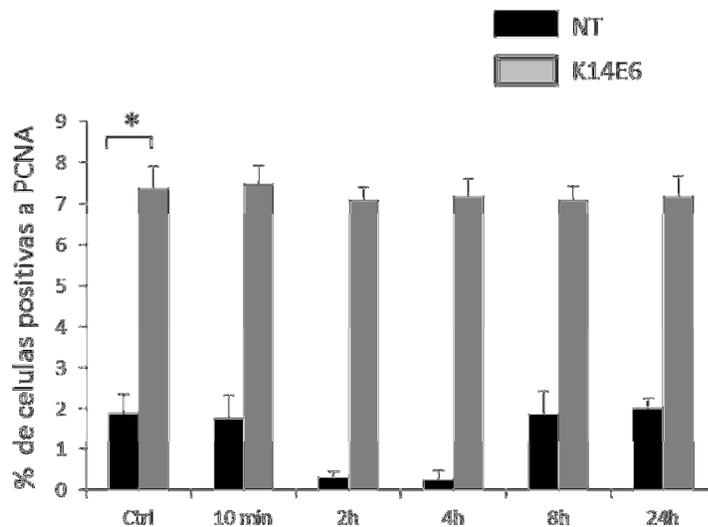


Figura 9. La grafica representa el promedio del porcentaje de células positivas a PCNA obtenidas de 10 campos (40X) en el microscopio por ratón. Al menos tres ratones fueron utilizados para calcular el porcentaje. La diferencia entre células positivas de los ratones K14E6 y NT fue estadísticamente significativa (*) determinada por la prueba t student.

E6 evita la activación de p53 inducida por la UVB en la epidermis de los ratones transgénicos K14E6

Después de analizar la proliferación celular, evaluamos la expresión proteica del supresor de tumor p53 en respuesta al tratamiento con UVB en la epidermis de ratones NT y K14E6 debido a la importancia que tiene la activación de p53 en células con daño al DNA. Como se muestra en la Figura 10 después de 4 h de irradiación con UVB, en la epidermis de ratones NT se detectó por inmunohistoquímica acumulación de p53 en el núcleo. En contraste, en los ratones K14E6 no se detectaron células positivas a p53 después de la irradiación con UVB. Adicionalmente, se realizaron experimentos empleando western blot y los resultados mostraron que p53 se detectó a los 10 minutos después de la irradiación con UVB en ratones NT; la estabilización de p53 continuo durante 2 h y 4 h post-UVB y regreso a los niveles normales a las 8 h o 24 h post-UVB (Figura 11). Esta acumulación de p53 probablemente induce arresto del ciclo celular o apoptosis en el ratón NT. En los ratones K14E6, no hubo inducción de p53 en ningún punto de la cinética después de la irradiación con UVB, presumiblemente debido a la degradación de p53 por efecto de E6. Utilizamos como control positivo de la expresión de p53 a las células C33A (línea derivada del cáncer cervical negativa al HPV).

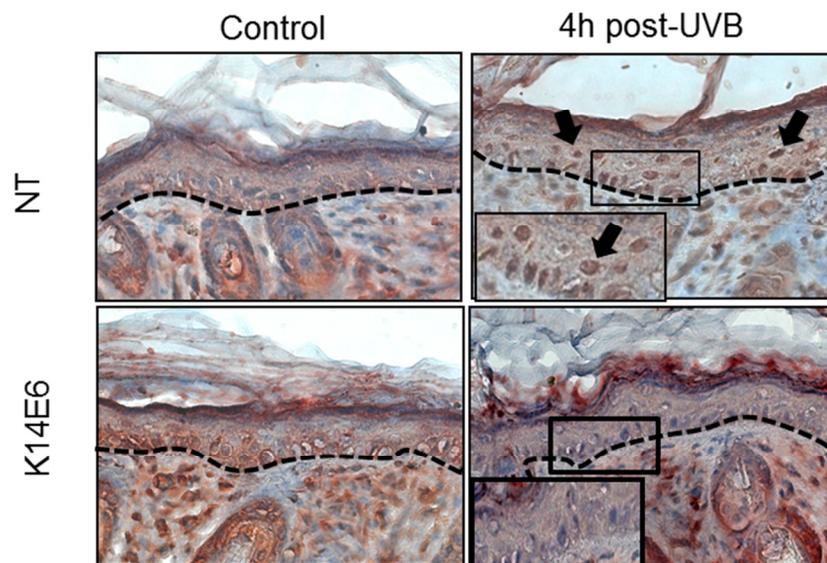


Figura 10. Inmunohistoquímica de p53 en secciones de piel de ratones NT y K14E6, las cuales fueron contrastadas con hematoxilina. La línea punteada representa la membrana basal de la epidermis. La señal oscura en el núcleo (flechas negras) muestra a las células positivas a p53 (ver el recuadro).

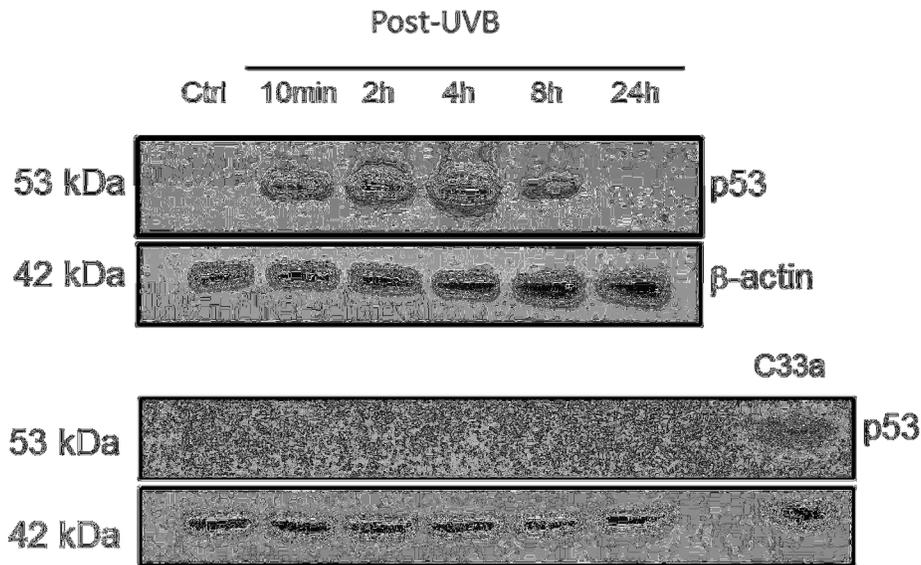


Figura 11. Inmunoblot para detectar a p53 en extractos de epidermis en ratones NT (panel superior) y K14E6 (panel inferior). El total de lisados de epidermis fueron obtenidos en diferentes tiempos después de la irradiación de UVB e identificados contra p53. La línea celular de cáncer cervical negativa a HPV16 C33A fue utilizada como control positivo para p53. Las membranas fueron tratadas e incubadas con el anticuerpo contra β -actina como control de carga. Estos experimentos fueron repetidos al menos 3 veces con resultados similares. En la figura se puede observar una placa representativa del revelado del Western blot.

Los ligandos de TGF β 1 y TGF β 2 son afectados en la epidermis de los ratones K14E6 después de la irradiación con UVB.

Para investigar la cooperación entre la oncoproteína E6 y la irradiación UVB en la vía supresora de tumor TGF β , realizamos ensayos de Western blot y comparamos la expresión de los niveles de proteína de las isoformas 1 y 2 de TGF β en la epidermis de ratones NT y K14E6 después de la irradiación con UVB. En la figura 12 se puede observar que la proteína de TGF β 1 fue sobre-expresada en ratones NT no irradiados pero su nivel se redujo entre las 2 y 4 horas después del tratamiento con UVB y su expresión fue

recuperada parcialmente a las 8 h. En ratones K14E6 no irradiados se detectó un alto nivel de TGF β 1, pero en este caso hubo una tendencia a reducir los niveles después de la exposición a la luz UVB sin que se observara un efecto de recuperación al menos hasta las 24 horas. Esta reducción sugiere que la oncoproteína E6 y la exposición a la luz UVB cooperan en inhibir la expresión proteica de TGF β 1 en la epidermis. En ratones no irradiados NT se detectaron bajos niveles de TGF β 2 en comparación con el ligando de TGF β 1 (Fig. 12); 4h después de la exposición a la radiación UVB hubo una inducción significativa de esta isoforma en la epidermis de ratones NT. En ratones K14E6 no irradiados un nivel similar de TGF β 1 y 2 fue observado; sin embargo la disminución de TGF β 2 ocurrió a las 4 horas post-UVB y después su nivel disminuyó gradualmente sin que se observara una recuperación. Estas observaciones se pueden apreciar en las densitometrías de los western blot de ambas isoformas (Figura 13), donde se observa una disminución significativa de su expresión después de la irradiación con UVB en la epidermis de los ratones K14E6 sin que se detectara una recuperación del TGF β 1 y 2 en ratones NT y K14E6.

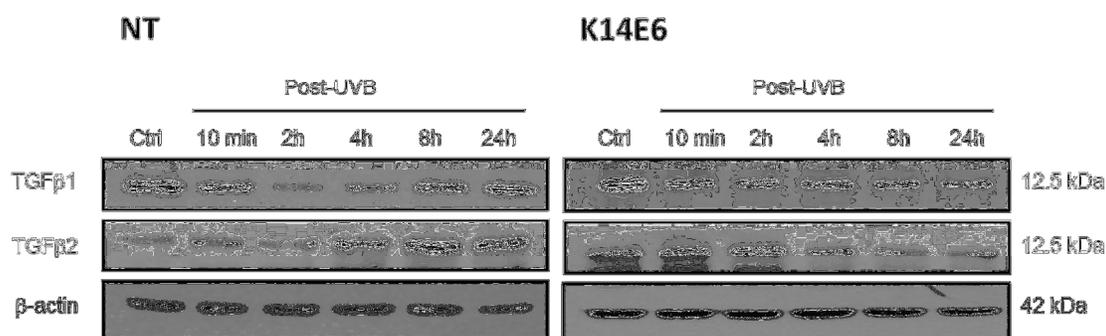


Figura 12. Western blot representativo de los ligandos de TGF β 1 y TGF β 2 en epidermis de ratones de 8 días de edad NT y transgénicos K14E6. Los lisados epidermales fueron separados por SDS-PAGE, transferidos y probados para TGF β 1 y TGF β 2. La β -actina se usó como control de carga. Tres experimentos independientes fueron realizados con resultados similares.

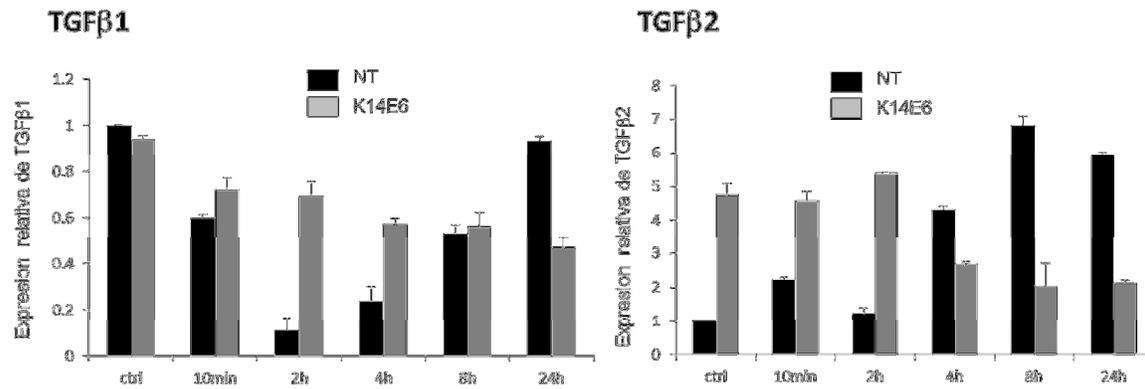


Figura 13. Densitometría de las bandas del Western Blot de TGFβ1 y TGFβ2. Las bandas de western blot fueron normalizadas con las bandas de β-actina y cuantificadas comparadas con el grupo control. Las gráficas se muestran como las medias de 3 experimentos separados y cada barra con el valor de la desviación estándar.

TβRII es el receptor más afectado después de la UVB en la epidermis de los ratones K14E6.

Para explorar una posible cooperación entre la oncoproteína E6 y la UVB en la vía del TGFβ a nivel de los receptores, analizamos la expresión de los receptores TβRI y TβRII en la epidermis de los ratones NT y K14E6. La expresión basal del TβRII observada en el western blot en ambos ratones NT y K14E6 sin irradiación, pero los niveles de este receptor en la epidermis de los ratones K14E6 fueron bajos con respecto al ratón NT (Comparar las bandas de los western blot de la figura 14). La disminución de la expresión de la proteína TβRII ocurrió rápidamente después de los 10 minutos del tratamiento con UVB en ratones NT, pero este efecto fue transitorio porque la expresión TβRII se detectó nuevamente a las 8 h. En contraste, en ratones K14E6 gradualmente disminuye su expresión en la epidermis de este receptor como consecuencia del tratamiento con la UVB sin que se observara una recuperación evidente (figura 14). Estos resultados nos proporcionan una fuerte evidencia de la cooperación entre el oncogén E6 y la UVB en la inhibición de la vía supresora del TGFβ a nivel del receptor TβRII. Por otro lado, la

expresión del T β RI fue inhibida en la epidermis de los ratones transgénicos K14E6 sin irradiar, comparado al grupo control NT no se observaron cambios importantes después de la exposición a la UVB en la expresión de los niveles de T β RI en ambos ratones NT y K14E6 como se puede observar en la densitometría de los western blot (figura 15), los niveles del T β RI permanecieron sin alteraciones en todos los puntos de la cinética. Esto sugiere que el T β RII es el principal receptor afectado en la vía de señalización del TGF β en la epidermis después de la irradiación con UVB.

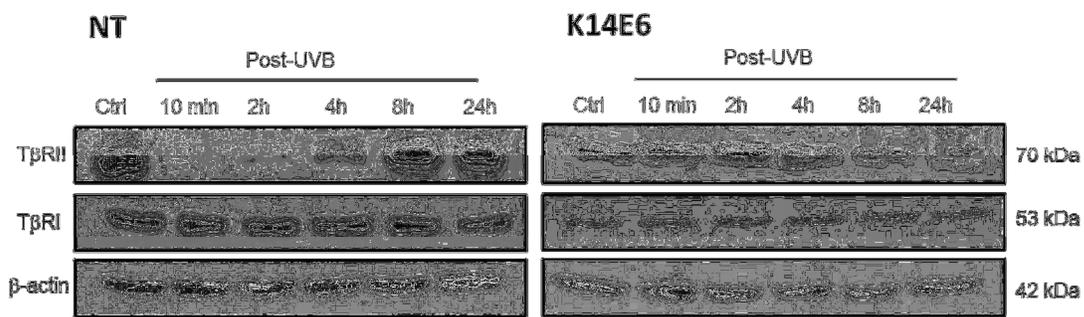


Figura 14. Análisis de western blot de los receptores T β RII y T β RI en lisados de epidermis de ratones de 8 días de edad NT y K14E6 no irradiados (control) e irradiados con UVB. Las muestras fueron separadas por SDS-PAGE, transferidas y reveladas contra T β RII y T β RI. La β -actina fue incluida como control de carga y fue revelada después de desnudar la membrana. Tres experimentos independientes fueron realizados con resultados similares.

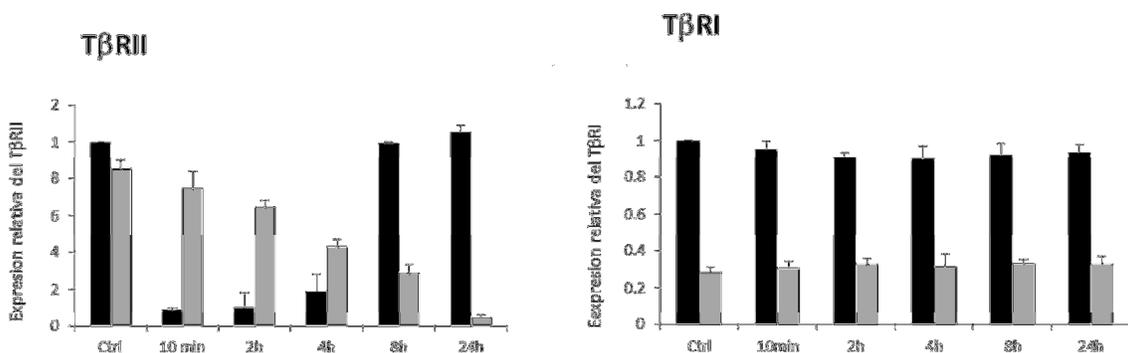


Figura 15. Densitometría de las bandas del Western Blot de los receptores T β RII y T β RI normalizadas con el control de carga (β -actina). Las gráficas representa la media de tres experimentos independientes, así como la desviación estándar.

Inhibición de la fosforilación de Smad2 en la epidermis de los ratones transgénicos K14E6 después de la irradiación con UVB

La fosforilación de Smad2 es un evento clave en la vía del TGF β debido a que refleja la activación de la vía supresora, por este motivo analizamos la fosforilación de Smad2 (pSmad2) en la epidermis de ratones NT y K14E6 utilizando IHC y western blot antes y después de la irradiación con UVB. En ratones NT no irradiados, detectamos un nivel basal de pSmad2 en los núcleos de la epidermis; 4 horas después de la irradiación con UVB la señal positiva de pSmad2 en los núcleos de las células de la epidermis disminuyeron (Figura 16). En contraste en la epidermis de los ratones K14E6 no irradiados el nivel de pSmad2 es inferior comparado con los ratones NT no irradiados (Figura 16); en el análisis después del tratamiento con UVB, en las inmunohistoquímicas observamos que la señal nuclear de pSmad2 disminuyo y solo se observó una mínima señal en las células de la epidermis (Figura 16 panel inferior).

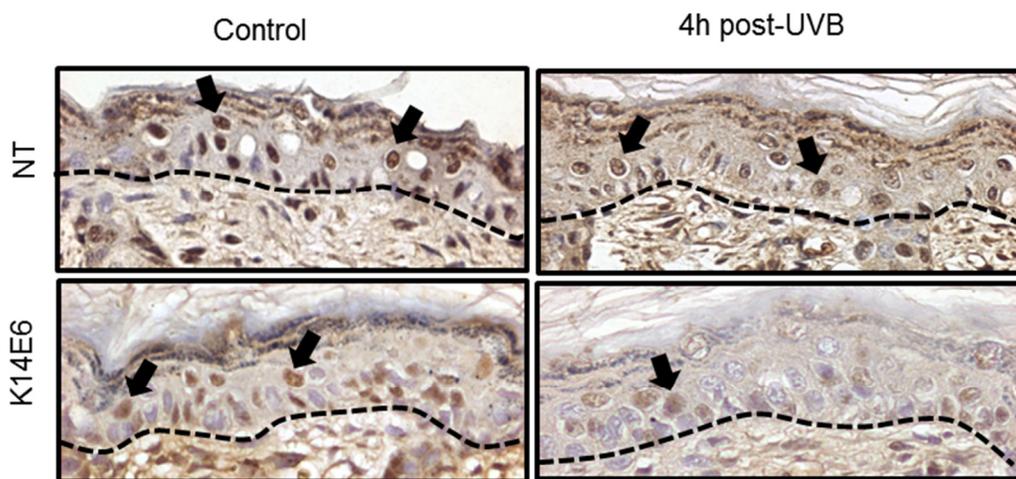


Figura 16. Análisis inmunohistoquímico de la fosforilación de Smad2 en cortes histológicos de ratones de 8 días de edad NT y K14E6, sin irradiar y a las 4 horas post-UVB. La señal café de fosfo-Smad2 (flechas negras) se observó en los núcleos de las células de la epidermis, las cuales fueron contrastadas con hematoxilina. La línea punteada indica la membrana basal que separa la epidermis de la dermis.

Posteriormente, confirmamos estos resultados por Western blot; en extractos epidermales de ratones NT; pSmad2 disminuyó a las 2 horas y la señal casi fue indetectable a las 4 horas después del tratamiento con UVB (Figura 17), este efecto fue transitorio y solo una ligera recuperación del nivel de pSmad2 se detectó nuevamente a las 8 horas post-UVB (Figura 17). En los ratones K14E6, los niveles de pSmad2 fueron bajos con respecto a los ratones NT; después de la exposición a la luz UVB los niveles de pSmad2 en la epidermis de los ratones K14E6 disminuyeron gradualmente e interesantemente el nivel normal de pSmad2 no se recuperó al menos antes de las 24 horas (Figura 18). Estos resultados sugieren una cooperación entre la oncoproteína E6 de HPV16 y la radiación UVB en la inhibición de la fosforilación de Smad2 y por lo tanto, el bloqueo de la vía del TGF β .

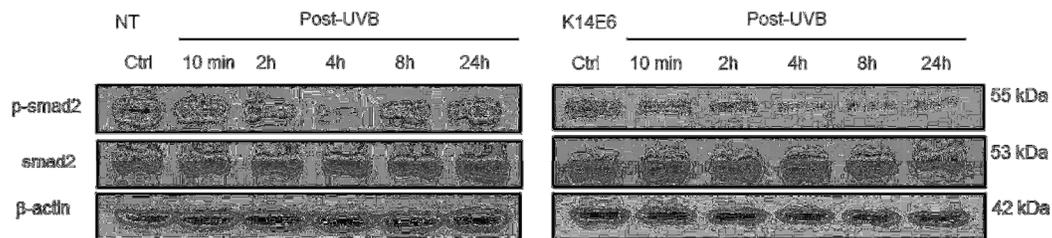


Figura 17. Análisis de Western blot de Smad2. Lisados de proteínas, obtenidos a diferentes tiempos después de la irradiación con UVB de la epidermis de ratones NT y K14E6, estos fueron revelados utilizando un anticuerpo anti-fosfo-Smad2, Smad2 total y anti β -actina la cual fue utilizada como control de carga, se muestra un western blot representativo.

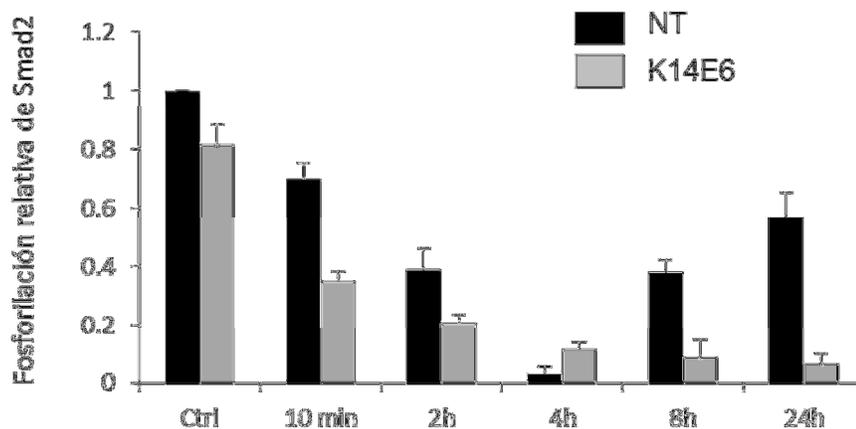


Figura 18. Densitometría del western blot de los resultados de la cinética de pSmad2 en la epidermis de ratones NT y K14E6. Las gráficas representan la media de tres experimentos independientes, así como la desviación estándar.

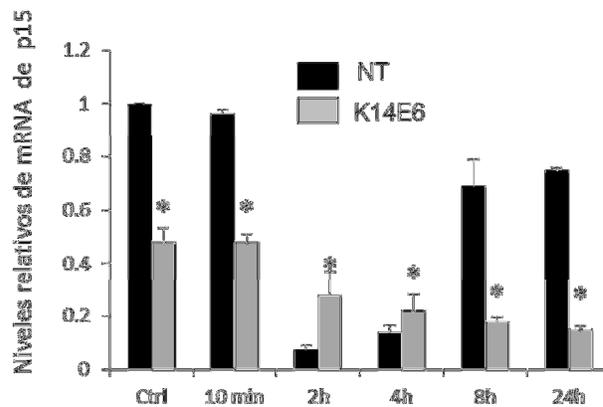
Expresión de los genes blanco de la vía del TGF β después de la irradiación con UVB en la presencia de la oncoproteína E6.

La inhibición de la vía TGF β /Smad en la epidermis de los ratones K14E6 después de la irradiación con UVB sugiere que la expresión de los genes blanco podría estar modificada. Para corroborar esta posibilidad, los niveles de los mRNA de los genes blanco de TGF β : p15, c-myc y Cdc25A fueron analizados por PCR cuantitativo en tiempo-real. Los niveles de mRNA de cada gen fueron normalizados al mRNA de GAPDH. En ratones sin irradiar NT el gen supresor de tumor p15 es transcripcionalmente activo (Figura 19A); el nivel de mRNA de p15 disminuyó a las 2 horas y 4 horas post-UVB comparado a los niveles del mRNA del control, pero se observó una recuperación de la expresión de p15 a las 8 horas post-UVB. Es evidente que en los ratones transgénicos la E6 promueve la inhibición del mRNA de p15 en la epidermis en la ausencia de la irradiación de la luz UVB comparado con la epidermis de los ratones NT. En este modelo, la irradiación UVB provocó una pérdida gradual en el nivel del transcrito de p15 sin una recuperación, en contraste a p15, la expresión de los mRNAs de los oncogenes de c-myc y Cdc25A su expresión fue menor en la epidermis de

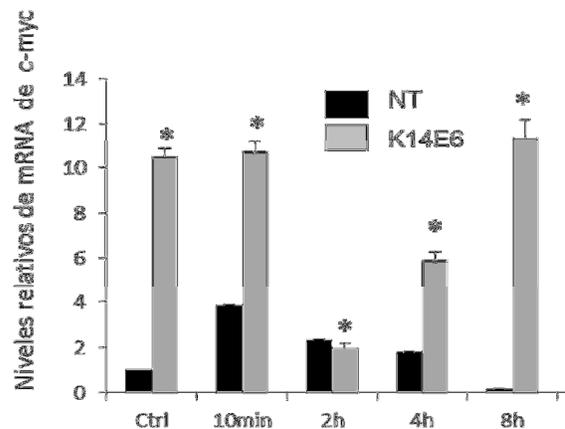
ratones NT comparados a los ratones transgénicos bajo condiciones normales (control). En ratones NT los niveles del mRNA de c-myc y de Cdc25A incremento ligeramente a los 10 min después de la irradiación pero regresaron a sus niveles basales a las 8 horas post-UVB (Figura 17B y C).

En contraste, en los ratones K14E6 c-myc y Cdc25A fueron sobre-expresados en la epidermis sin tratamiento con luz UVB. Después del tratamiento con luz UVB, la expresión de c-myc y de Cdc25A disminuyeron a las 2 horas pero el nivel de los mRNA de ambos genes fue parcialmente aumentado a las 4 horas y totalmente recuperadas a las 8 horas post-UVB. Nuevamente estos resultados sugieren que el la vía de señalización del supresor de tumor TGF β en la epidermis de la piel es fuertemente afectada por el oncogén E6 de HPV16 y la luz UVB.

A



B



C

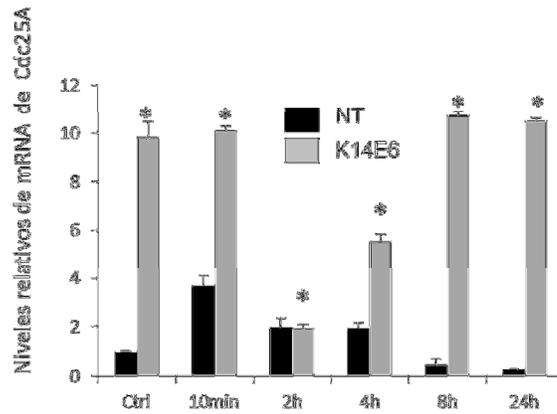


Figura 19. Expresión relativa de mRNA en la epidermis de ratones NT y K14E6 después de la irradiación con UVB. Un total de 3 ratones se evaluaron por cada condición, los niveles de mRNA de p15, c-myc, Cdc25A fueron cuantificados utilizando RT-qPCR. Los niveles de expresión de los mRNA se normalizaron con el gen endógeno GAPDH en ambos ratones NT y K14E6. Los resultados se muestran como el número de veces del nivel del mRNA. Los niveles de los mRNA de los mRNA oncogénicos fueron sobreexpresados en ratones NT y K14E6 sin tratamiento con UVB, mientras que el nivel del mRNA del gen supresor de tumor p15 fue bajo en la epidermis de los ratones K14E6 comparado a los ratones NT. El asterisco indica que los valores $p < 0.05$ comparado al grupo de ratones NT no irradiados mediante la prueba estadística de ANOVA.

Discusión

En el presente trabajo, reportamos que la oncoproteína E6 del HPV16 regula negativamente la vía supresora de tumor TGF β en células de la epidermis en el ratón transgénico K14E6 y que la UVB coopera con E6 en la inhibición de esta vía supresora de tumores. Estos resultados pueden contribuir a dilucidar los primeros cambios que ocurren en la carcinogénesis de piel en un modelo murino.

Diferentes estudios han demostrado que la UVB participa como iniciador y en la promoción de tumores de piel, por ejemplo: Cáncer de la piel no-melanoma (NMSC), un padecimiento diagnosticado principalmente en la población caucásica, debido a la exposición continua a la radiación solar (Chen *et al.*, 2013). Se ha sugerido que el Virus del Papiloma Humano (HPV) puede tener un papel en el desarrollo del NMSC, en personas que presentan una rara enfermedad conocida como epidermodisplasia verruciforme (EV). En pacientes con EV se ha detectado HPVs en lesiones de piel premalignas y NMSC tanto en individuos inmunosuprimidos e inmunocompetentes. En estudios en pacientes con NMSC se ha detectado DNA de ambos tipos de HPV cutáneos y mucosos (Iftner *et al.*, 2003). Interesantemente, en un estudio se reportó que la infección con el virus de alto riesgo HPV16 puede representar un importante factor de riesgo para el desarrollo del NMSC en la población inmunosuprimida (Reuschenbach *et al.*, 2011). De hecho, en NMSC se ha reportado la asociación entre la UVB y el HPV particularmente en sitios del cuerpo expuestos a la luz solar (Molho-Pessach *et al.*, 2007). Esta cooperación probablemente juega un papel importante en la inmortalización durante los primeros estados de la carcinogénesis de piel (Mouret *et al.*, 2007 y Molho-Pessach *et al.* 2007). Debido a que se ha reportado la ausencia del HPV en algunos NMSC se ha sugerido que la presencia del HPV puede ser más importante en la iniciación del tumor y no en el mantenimiento del fenotipo maligno (Molho-Pessach *et al.*, 2007). En este trabajo, utilizamos al ratón transgénico K14E6 donde previamente, el papel de E6 ha sido estudiado en un modelo de cáncer de piel (Simonson *et al.*, 2005). Analizamos los efectos tempranos de la luz UVB

sobre la vía supresora de tumor TGF β en la epidermis del modelo K14E6, debido a que es un importante regulador del ciclo celular así como de la diferenciación celular

Estudiamos los cambios hasta las 24 h después de la exposición a la UVB en la vía del TGF β en la epidermis del modelo murino K14E6 tratados con una sola dosis de UVB (500 mJ/cm²) comparados con los ratones no transgénicos (NT) a los 8 días de edad. En primer lugar, observamos que la respuesta en la epidermis a la irradiación de UVB en ratones NT promueve defensa celular y esta respuesta se evidencia por la inducción del supresor de tumor p53, el cual a su vez induce arresto del ciclo celular o apoptosis que permiten reparar al DNA dañado o si este no puede ser reparado inducir apoptosis. En contraste, en la epidermis de los ratones K14E6, no hubo promoción del arresto del ciclo celular inducido por la irradiación UVB, por lo que, la proliferación celular es mantenida. Debido a que el incremento en la proliferación celular se ha identificado como un indicador clave de la susceptibilidad a la carcinogénesis (Mouret *et al.*, 2007; Simonson *et al.*, 2005), es posible que la ausencia del arresto del ciclo celular en los ratones K14E6 tratados con UVB podría representar un paso temprano en la carcinogénesis de la piel.

En un trabajo previo, se reportó hiperproliferación y retardo en la diferenciación celular en la epidermis del ratón K14E6 como eventos independientes de la inactivación de p53 por efecto de la oncoproteína E6 de HPV16, lo cual sugiere que otras vías supresoras de tumor son afectadas por la presencia de E6 (Song *et al.*, 1999). Por otro lado, se reportó que E6 juega un papel clave en la carcinogénesis debido a su función para promover proliferación celular y supervivencia del virus en los queratinocitos (Mantovani *et al.*, 2003; Lagunas-Martínez *et al.*, 2010). Además, Shai *et al.* (2008) demostraron que E6 es el oncogene más potente en el modelo murino, el cual contribuye en gran parte a la promoción y a la progresión de la carcinogénesis de piel. En un estudio realizado en nuestro grupo, Mendoza-Villanueva *et al.*, (2008) compararon el perfil de expresión genética en piel y cérvix en ratones hembras K14E6 jóvenes y observaron diferentes procesos celulares afectados, tales como el ciclo celular, inhibición de la expresión de genes proapoptóticos e incremento de la expresión de genes anti-apoptóticos

principalmente en piel. Estos resultados son consistentes con el potencial oncogénico de la oncoproteína E6 de HPV16 en la piel (Shai *et al.*, 2008).

En mamíferos, el ligando TGF β tiene 3 isoformas (1, 2 y 3), las cuales son potentes inhibidores del crecimiento, estas tienen función autocrina y paracrina en la epidermis y de esta manera juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis epidermal (Dell'oste *et al.*, 2008). La función del TGF β 1 es regular el crecimiento y diferenciación de células en la capa del estrato basal. La disminución de TGF β 1 se ha asociado con un aumento en la proliferación celular de la piel y la disminución en la diferenciación celular (Cho *et al.*, 2004). Por otro lado, el incremento de TGF β 2 puede inducir apoptosis en epitelios (Glick *et al.*, 1993). Después del tratamiento con UVB, evaluamos la expresión de las isoformas 1 y 2 en ratones NT y K14E6.

En ratones NT el nivel de TGF β 1 en la epidermis disminuyó después del tratamiento con la exposición a UVB pero este efecto fue transitorio, mientras que la isoforma 2 incremento su expresión en respuesta a la UVB. En contraste observamos que las isoformas 1 y 2 disminuyeron por efecto de la UVB en la epidermis de los ratones K14E6, sin una recuperación en su expresión en comparación con los grupos no tratados. Estos resultados sugieren que en la presencia del oncogen E6 en la epidermis y la UVB reprimen la expresión proteica de las isoformas estudiadas de TGF β . Similarmente Ness *et al.* (2000) reportaron que la oncoproteína E6 de HPV16 por si sola puede disminuir la expresión proteica de ligando TGF β 2 en queratinocitos primarios humanos; esta disminución confiera una ventaja selectiva de crecimiento en células con bajo nivel de p53 que probablemente contribuye a la progresión maligna (Ness *et al.*, 2000). También se ha reportado que la disminución de la expresión del TGF β 2 en Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN) puede contribuir al fenotipo maligno (El-Sherif *et al.*, 2000). Tomando en cuenta que la baja expresión de TGF β 1 y TGF β 2 se ha asociado con la hiperproliferación celular y un riesgo en el incremento de la progresión maligna en el modelo murino (Gold *et al.*, 2000), es posible que el bajo nivel de ambas isoformas observada después del

tratamiento con UVB en la epidermis de los ratones K14E6, puede representar un paso temprano en la carcinogénesis del ratón.

La función citostática de TGF β es frecuentemente inhibida o bloqueada en la carcinogénesis como resultado de mutaciones o de la inhibición del receptor T β RII. Algunas mutaciones han sido detectadas en diferentes líneas celulares derivadas de cáncer y la pérdida de la función de este receptor es considerado como un evento clave para la progresión del cáncer en estados tardíos (Drabsch *et al.*, 2012). En HNSCC el gen que codifica al T β RII es frecuentemente deletado (Lu *et al.*, 2006), estas observaciones correlacionan con la progresión maligna en nuestro modelo murino. Importantemente, la irradiación UV en piel de humano *in vivo* y en fibroblastos cultivados provenientes de piel de humano puede inhibir la vía de señalización del TGF β debido a la desregulación de la expresión del T β RII (Quan *et al.*, 2004). De acuerdo con nuestros resultados, encontramos que en ratones NT, la expresión del T β RII rápidamente fue inhibida en la epidermis, 10 minutos después de la irradiación con UVB; en este caso se observó una recuperación hasta 8 horas post-irradiación. También observamos que la oncoproteína E6 por si sola inhibe la expresión del T β RII en la epidermis del ratón transgénico y el tratamiento con UVB resultó en una disminución del T β RII a las 4 y 8 horas sin una recuperación significativa por lo menos hasta las 24 horas post-irradiación con UVB.

Nuestros resultados confirman un reporte previo donde los oncogenes E6 y E7 de HPV16 regulan negativamente la actividad del promotor del T β RI y T β RII en un modelo *in vitro* (Hypes., *et al.*, 2009). Además, previamente observamos una disminución en el mRNA del T β RII en ratones K14E6 utilizando microarreglos y este efecto fue también evidente en el cérvix del ratón K14E7 (Mendoza-Villanueva *et al.*, 2008; Diaz-Chavez *et al.*, 2008). Por otro lado, en este estudio encontramos una disminución en la expresión del T β RI en la epidermis de ratones K14E6 comparado con el ratón NT pero este nivel no cambio en ambos ratones después de la irradiación con UVB. Consistente con nuestros resultados, Mi y colaboradores en el 2000 reportaron que en queratinocitos humanos transfectados con HPV16 se adquirió resistencia al efecto supresor del TGF β durante la progresión en un

modelo *in vitro* lo cual puede mediar en parte la transformación celular y esto se debió a la pérdida de la expresión receptor T β RI (Mi *et al.*, 2000). Hypes y colaboradores (2009) también encontraron una disminución en la actividad del promotor del T β RI y esta fue atribuida a la expresión de las oncogenes E6 y E7 en etapas tardías de la transformación en queratinocitos humanos (Hypes *et al.*, 2009). Estos resultados indican una vez más que E6 juega un importante papel en la inhibición de la función supresora de tumores del TGF β en la epidermis del ratón K14E6.

En la vía canónica de señalización del TGF β , una vez que los receptores T β RI y T β RII han sido activados por el ligando inducen la fosforilación de la proteína Smad2 la cual forma un complejo heterodimerico con Smad4, de esta manera translocan al núcleo para activar o reprimir genes y así mantener la función supresora de tumor (Massagué *et al.*, 2008). Poco se conoce acerca de la alteración de la vía del TGF β durante los primeros estadios de la carcinogénesis en piel; la fosforilación de Smad2 (pSmad2) es un evento crítico como mediador del TGF β . La presencia de pSmad2 en la epidermis puede ser utilizada como un indicador de la actividad de la vía del TGF β (Massagué *et al.*, 2008). En este trabajo, observamos que en respuesta a la UVB los niveles de p-Smad2 en la epidermis de ratones NT disminuyeron a las 2h y no se detectó después de las 4 horas, alcanzando niveles normales entre las 8 y 24 horas post-irradiación. En contraste, observamos bajos niveles de pSmad2 en la epidermis de los ratones K14E6 en comparación a los ratones NT sin el tratamiento con UVB, es decir la oncoproteína E6 por si sola inhibe la fosforilación de Smad2, los niveles de p-smad2, disminuyeron drásticamente, después del tratamiento con UVB. Este hallazgo sugiere que E6 y la UVB cooperan para inhibir la actividad supresora de tumor del TGF β en la epidermis de ratones transgénicos K14E6.

Tomando en cuenta nuestros resultados, se sugiere que la expresión de los genes blancos de la vía del TGF β pueden ser modificada a nivel transcripcional en el modelo murino K14E6 y adicionalmente son afectados por la irradiación UVB. Entonces comparamos el nivel del mRNA de los genes blanco (p15, c-myc y Cdc25A) utilizando RT-qPCR en la epidermis de ratones NT y K14E6 con y sin el tratamiento con UVB. Es bien conocido que

en condiciones normales la función supresora de tumor del TGF β , inhibe a c-myc y p15 es activado transcripcionalmente. c-myc ha sido identificado como un proto-oncogen ya que tiene la habilidad para promover la progresión del ciclo celular y varios estudios reportan un incremento de este transcrito en tumores de piel en modelos de rata y ratón (Waikel *et al.*, 1999). La sobre-expresión del factor de transcripción c-myc en la epidermis induce proliferación celular, inhibe la diferenciación y disminuye la sensibilidad de los queratinocitos a inducir apoptosis después del tratamiento con UVB, además del mRNA de c-myc como gen blanco de la vía del TGF β (Waikel *et al.*, 1999), se encuentra el gen de Cdc25A que es transcripcionalmente reprimido en respuesta al TGF β , el cual es un factor crítico para la progresión del ciclo celular (Galaktionov *et al.*, 1996). La proteína Cdc25A es una fosfatasa que se encarga de defosforilar y de este modo activa a la ciclina dependiente de cinasa 2 (Cdk2). Esta cinasa es importante para la actividad de los complejos ciclina A/Cdk2 y de la ciclina E/Cdk2, los cuales juegan un papel crítico en la transición G1-S de la progresión del ciclo celular (Boutros *et al.*, 2007). La sobre-expresión del oncogén Cdc25A se ha asociado con una evasión de los puntos de control y con inestabilidad genética (Aressy *et al.*, 2008) y se ha visto sobre-expresado en varias enfermedades malignas incluyendo el cáncer de piel (Boutros *et al.*, 2007).

En ausencia de luz UVB, observamos que en la epidermis de los ratones K14E6 hay una sobreexpresión de c-myc y de Cdc25A, esta activación puede ser explicada por el daño en algunos componentes de la vía del TGF β , como anteriormente reportamos en este trabajo; baja expresión de los receptores T β RI y T β RII, así como el bajo nivel de fosforilación de Smad2 detectados en el ratón K14E6 comparados con los ratones NT. Esta observación soporta fuertemente la idea que la actividad funcional supresora de tumor del TGF β es bloqueada por la oncoproteína E6 de HPV16.

En contraste, el tratamiento con UVB inhibió la expresión del mRNA c-myc y Cdc25A en los ratones K14E6, pero solo por pocas horas, ya que la expresión de los transcritos de c-myc y Cdc25A se recuperaron a las 8 horas después de la irradiación con UVB. Se ha reportado que los niveles del mRNA de c-myc disminuyen después de la irradiación con

UVB en queratinocitos humanos e interesantemente esto correlaciona con la inducción de apoptosis. Recientemente, se reportó que la UVB induce degradación del mRNA de c-myc en células de roedor y humano, esto puede ser parte de la respuesta celular global producida por el daño inducido por la UVB y como parte de un mecanismo para mantener la estabilidad genómica (Britton *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha demostrado la funcionalidad de la respuesta de los microRNAs inducida por la luz UVB?, se ha identificado a miR-16 el cual disminuye al transcrito de Cdc25A y este participa en la regulación del ciclo celular. Interesantemente, los guardianes del genoma (p53, p63 y p73) regulan diversos miRNAs supresores de tumor (como es el caso de miR-34/miR-145/let-7, los cuales son capaces de disminuir los niveles de mRNA de c-myc (Boominathan *et al.*, 2010); por ejemplo, p53 reprime a c-myc a través de la inducción del supresor de tumor miR-145 (Sachdeva *et al.*, 2009). En ratones NT, después de un ligero incremento de los mRNAs de c-myc y Cdc25A (a los 10 minutos post-irradiación con UVB) el nivel de estos transcritos gradualmente disminuyó y no se observó ningún efecto de recuperación. De acuerdo a nuestros resultados, es posible que en ratones NT la vía del TGF β es transitoriamente inactivada por efecto de la UVB (Gambichler *et al.*, 2007), ocasionando una rápida activación en la expresión de c-myc y Cdc25A. La recuperación de la vía del TGF β en los ratones NT puede disminuir y a su vez la expresión de ambos oncogenes.

Otro gen blanco regulado por la vía del TGF β es el inhibidor de la ciclina dependiente de cinasa p15. En líneas celulares epiteliales este gen es rápidamente expresado en respuesta al TGF β y bajo condiciones normales de crecimiento, este supresor de tumor contribuye de manera importante al funcionamiento citostático del TGF β . Nuestros resultados, evidenciaron que la inhibición del nivel de expresión del mRNA de p15 en los ratones K14E6 y el efecto de la irradiación UVB en la epidermis, evitan la recuperación y gradualmente el transcrito de p15 pierde su expresión, sin que haya un efecto de recuperación.

En conclusión, la señalización del TGF β en células de la epidermis es afectada en nuestro modelo por la oncoproteína E6 como por irradiación UVB (Figura 20), los resultados de

este estudio sugieren que los queratinocitos de la epidermis infectados con HPV16 y la repetida exposición a la luz UVB podría contribuir a la carcinogénesis de la piel en el modelo murino K14E6.

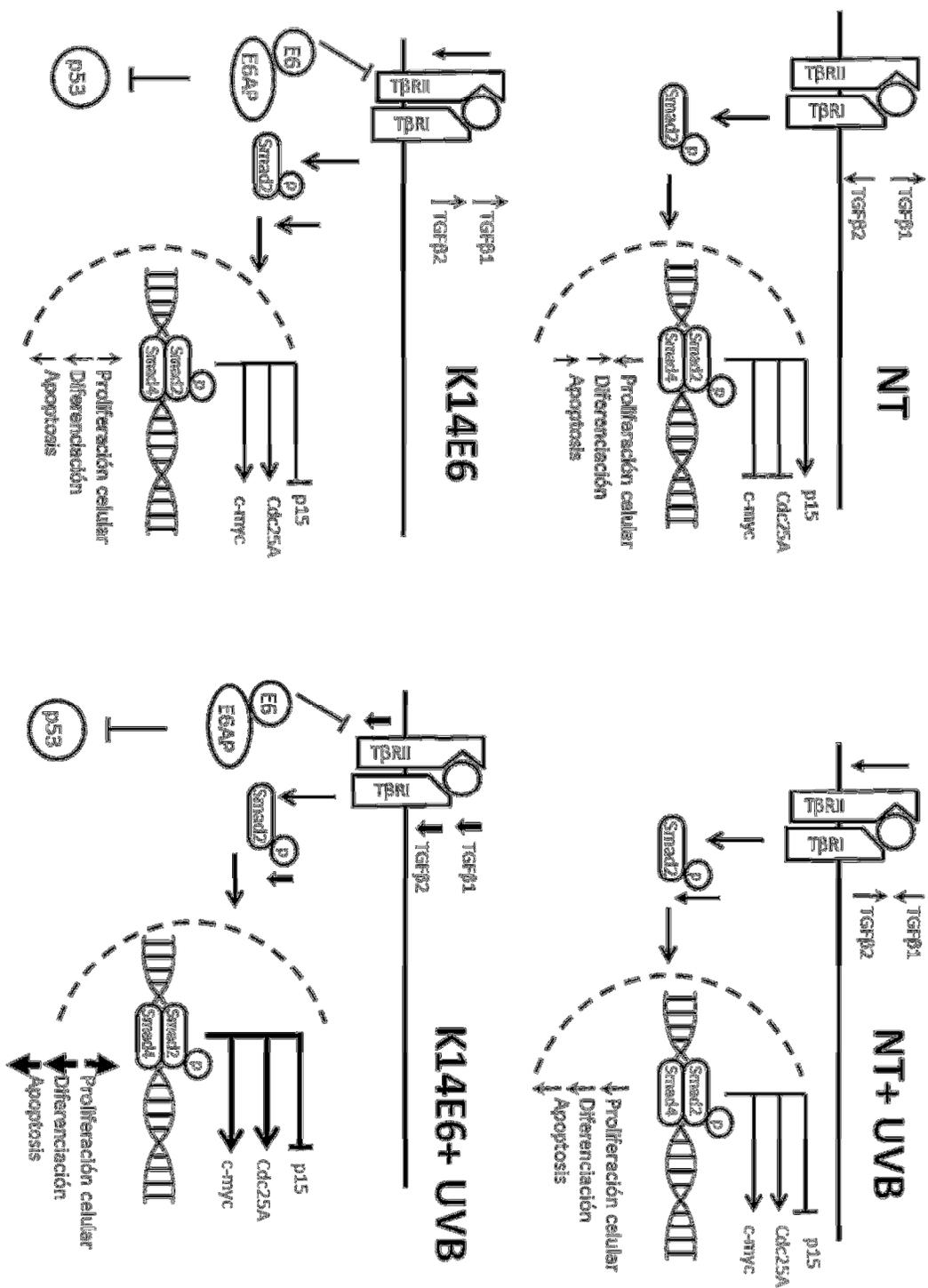


Figura 20. Participación de E6 del HPV16 y la UVB en la inhibición de la vía del TGFβ

Conclusiones

La proliferación celular en la epidermis de ratones NT disminuye con el tratamiento de UVB, mientras que en los ratones K14E6, este proceso no se ve afectado significativamente.

En la epidermis de los ratones NT se indujo la activación de p53 en respuesta a la UVB mientras que en los ratones K14E6 no se detectó la expresión de p53.

La UVB inhibe la expresión de TGF β 1 en la epidermis de ratones NT, con un efecto de recuperación y a su vez es un estímulo para la expresión de la isoforma 2.

La UVB y la oncoproteína E6 cooperan en la inhibición de la expresión de ambas isoformas de TGF β .

La UVB disminuye la expresión del T β RII a los 10 minutos, mientras que el T β RI no disminuye la expresión con el mismo tratamiento.

El oncogén E6 disminuye la expresión del T β RII y T β RI y coopera con la UVB en la disminución del receptor T β RII.

La UVB inhibió la fosforilación de Smad2 con un efecto de recuperación y coopera con E6 en la inhibición de la fosforilación de Smad2.

La UVB disminuye los niveles de mRNA de p15 en los ratones NT con un efecto de recuperación.

El oncogén E6 por sí solo disminuye la expresión del mRNA de p15 y con la irradiación UVB se observó una inhibición sin recuperación.

El tratamiento con UVB promueve la inhibición de c-myc y Cdc25A.

E6 promueve la sobreexpresión de c-myc y Cdc25A en la epidermis y la UVB induce una inhibición pero un efecto de recuperación de los mRNA.

Perspectivas

Diseñar un protocolo para estudiar el papel de la UVB en repetidas exposiciones por un periodo prolongado.

Identificar el tipo de lesiones en la piel como resultado de una exposición crónica así como la alteración de otras vías supresoras de tumor

Analizar el mirNoma en la epidermis del ratón K14E6 comparado con el NT con y sin irradiación con UVB.

Identificar posibles marcadores moleculares en el inicio de la carcinogénesis del ratón K14E6.

Referencias

Chen AC, Halliday GM, Damian DL. (2013) Non-melanoma skin cancer: carcinogenesis and chemoprevention. *Pathology*. 45(3):331-41.

Iftner A, Klug SJ, Garbe C, Blum A, Stancu A, Wilczynski SP, Iftner T. (2003) The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer Res*. 63(21):7515-9.

Reuschenbach M, Tran T, Faulstich F, Hartschuh W, Vinokurova S, Kloor M, Krautkrämer E, Zeier M, von Knebel Doeberitz M, Sommerer C. (2011) High-risk human papillomavirus in non-melanoma skin lesions from renal allograft recipients and immunocompetent patients. *Br J Cancer*. 104(8):1334-41.

Molho-Pessach V, Lotem M. (2007) Viral carcinogenesis in skin cancer. *Curr Probl Dermatol*. 35:39-51.

Mouret S, Favier A, Beani JC, Leccia MT. (2007) Differential p53-mediated responses to solar-simulated radiation in human papillomavirus type 16-infected keratinocytes. *Exp Dermatol*. 16(6):476-84.

Simonson SJ, Difilippantonio MJ, Lambert PF. (2005) Two distinct activities contribute to human papillomavirus 16 E6's oncogenic potential. *Cancer Res*. 65(18):8266-73.

Song S, Pitot HC, Lambert PF. (1999) The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol*. 73(7):5887-93.

Mantovani F, Banks L. (2003) Regulation of the discs large tumor suppressor by a phosphorylation dependent interaction with the beta-TrCP ubiquitin ligase receptor. *J Biol Chem*. 278(43):42477-86.

Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V, Gariglio P. (2010) Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1805(1):6-16.

Shai A, Pitot HC, Lambert PF. (2008) p53 loss synergizes with estrogen and papillomaviral oncogenes to induce cervical and breast cancers. *Cancer Res*. 68(8):2622-31.

Mendoza-Villanueva D, Diaz-Chavez J, Uribe-Figueroa L, Rangel-Escareño C, Hidalgo-Miranda A, March-Mifsut S, Jimenez-Sanchez G, Lambert P, Gariglio P. (2008) Gene expression profile of cervical and skin tissues from human papillomavirus type 16 E6 transgenic mice. *BMC Cancer*. 8:347.

Dell'oste V, Azzimonti B, Mondini M, De Andrea M, Borgogna C, Mesturini R, Accardi R, Tommasino M, Landolfo S, Dianzani U, Gariglio M. (2008) Altered expression of UVB-induced cytokines in human papillomavirus-immortalized epithelial cells. *J Gen Virol*. 89:2461-6.

Cho HR, Hong SB, Kim YI, Lee JW, Kim NI. (2004) Differential expression of TGF-beta isoforms during differentiation of HaCaT human keratinocyte cells: implication for the separate role in epidermal differentiation. *J Korean Med Sci*. 19(6):853-8.

Nees M, Geoghegan JM, Munson P, Prabhu V, Liu Y, Androphy E, Woodworth CD. (2000) Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes. *Cancer Res*. 60(15):4289-98.

El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins D. (2000) Decreased synthesis and expression of TGF-beta1, beta2, and beta3 in epithelium of HPV 16-positive cervical precancer: a study by microdissection, quantitative RT-PCR, and immunocytochemistry. *J Pathol*. 192(4):494-501.

Gold LI, Jussila T, Fusenig NE, Stenbäck F. (2000) TGF-beta isoforms are differentially expressed in increasing malignant grades of HaCaT keratinocytes, suggesting separate roles in skin carcinogenesis. *J Pathol.* 190(5):579-88.

Drabsch Y, ten Dijke P. (2012) TGF- β signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 31(3-4):553-68.

Lu SL, Herrington H, Reh D, Weber S, Bornstein S, Wang D, Li AG, Tang CF, Siddiqui Y, Nord J, Andersen P, Corless CL, Wang XJ. (2006) Loss of transforming growth factor-beta type II receptor promotes metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma. *Genes Dev.* 20(10):1331-42.

Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. (2004) Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-beta type II receptor/Smad signaling. *Am J Pathol.* 165(3):741-51.

Hypes MK, Pirisi L, Creek KE. (2009) Mechanisms of decreased expression of transforming growth factor-beta receptor type I at late stages of HPV16-mediated transformation. *Cancer Lett.* 282(2):177-86.

Diaz-Chavez J, Hernandez-Pando R, Lambert PF, Gariglio P. (2008) Down-regulation of transforming growth factor-beta type II receptor (TGF-betaRII) protein and mRNA expression in cervical cancer. *Mol Cancer.* 7:3.

Mi Y, Borger DR, Fernandes PR, Pirisi L, Creek KE. (2000) Loss of transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor type I mediates TGF-beta resistance in human papillomavirus type 16-transformed human keratinocytes at late stages of in vitro progression. *Virology.* 270(2):408-16.

Massagué J. (2008) TGF-beta in Cancer. *Cell*. 134(2):215-30.

Waikel RL, Wang XJ, Roop DR. (1999) Targeted expression of c-myc in the epidermis alters normal proliferation, differentiation and UV-B induced apoptosis. *Oncogene*. 18(34):4870-8.

Galaktionov K, Chen X, Beach D. (1996) Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*. 382(6591):511-7.

Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. (2007) CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?. *Nat Rev Cancer*. 7(7):495-507.

Aressy B, Ducommun B. (2008) Cell cycle control by the CDC25 phosphatases. *Anticancer Agents Med Chem*. 8(8):818-24.

Britton S, Salles B, Calsou P. (2008) c-MYC protein is degraded in response to UV irradiation. *Cell Cycle*. 7(1):63-70.

Pothof J, Verkaik NS, Hoeijmakers JH, van Gent DC. (2009) MicroRNA responses and stress granule formation modulate the DNA damage response. *Cell Cycle*. 8(21):3462-8.

Boominathan L. (2010) The guardians of the genome (p53, TA-p73, and TA-p63) are regulators of tumor suppressor miRNAs network. *Cancer Metastasis Rev*. 29(4):613-39.

Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V, Kumar S, Elble R, Watabe K and Mo Y.Y. (2009) p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *PNAS*. 106:3207-3212.

Gambichler T, Skrygan M, Tomi NS, Breuksch S, Altmeyer P, Kreuter A. 2007. Significant downregulation of transforming growth factor-beta signal transducers in human skin following ultraviolet-A1 irradiation. *Br J Dermatol.* 156(5):951-6.

Münger K, A Balswin, K M Edwards, H Hayakawa, C L Nguyen, M Owens, M Grace and KW Huh. 2004) Mechanism of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J. Virol.* 78:11451-11460.

Liang C, Marsit CJ, McClean MD, Nelson HH, Christensen BC, Haddad RI, Clark JR, Wein RO, Grillone GA, Houseman EA, Halec G, Waterboer T, Pawlita M, Krane JF, Kelsey KT. (2012) Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1;72(19):5004-13.

Patel T, Morrison LK, Rady P, Tyring S. (2010) Epidermodysplasia verruciformis and susceptibility to HPV. *29(3-4):199-206.*

Underbrink MP1, Howie HL, Bedard KM, Koop JI, Galloway DA. (2008) E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. *J Virol.* 82(21):10408-17.

Massimi P, Thomas M, Bouvard V, Ruberto I, Campo MS, Tommasino M, Banks L. (2008) Comparative transforming potential of different human papillomaviruses associated with non-melanoma skin cancer. *Virology.* 371(2):374-9.

Preston DS, Stern RS. (1992) Nonmelanoma cancers of the skin. *N Engl J Med.* 3;327(23):1649-62.

Gallagher RP1, Hill GB, Bajdik CD, Coldman AJ, Fincham S, McLean DI, Threlfall WJ. (1995) Sunlight exposure, pigmentation factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. II. Squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol.* 131(2):164-9.

Iannacone MR1, Gheit T, Waterboer T, Giuliano AR, Messina JL, Fenske NA, Cherpelis BS, Sondak VK, Roetzheim RG, Ferrer-Gil S, Michael KM, McKay-Chopin S, Pawlita M, Tommasino M, Rollison DE. (2013) Case-control study of cutaneous human papillomavirus infection in Basal cell carcinoma of the skin. *J Invest Dermatol.* 133(6):1512-20.

Riley RR, Duensing S, Brake T, Münger K, Lambert PF and Arbeit JM. (2003) Dissection of Human Papillomavirus E6 and E7 Function in Transgenic Mouse Models of cervical Carcinogenesis. *Cancer Res.* 63:4862-4871.

Akgül B1, Cooke JC, Storey A. (2006) HPV-associated skin disease. *J Pathol.* 208(2):165-75.

Arbeit JM, Münger K, Howley PM and Hanahan D. (1994) progressive Squamous epithelial Neoplasia in K14-Human Papillomavirus Type 16 Transgenic Mice. *J. Virol.* 68:4358-4368.

Schaeffer AJ, Nguyen M, Liem Amy, Lee D, Montagna C, Lambert P.F, Ried T and Difilippantonio MJ. (2004) E6 and E7 oncoproteins Induce Distinct Patterns of Chromosomal Aneuploidy in Skin Tumors from Transgenic Mice. *Cancer Res* 64: 538-546.

Talis A.L, J.M. Huibregtse and P.M. Howley. (1998) The Role of E6AP in the Regulation of p53 Protein levels in Human Papillomavirus (HPV)- positive and HPV-negative Cells. *J.B.C.* 11:6439-6445.

Scheffner M. J.M. Huibregtse, R.D. Vierstra and P.M. Howley. (1993) The HPV-16 and E6-AP Complex Functions as a Ubiquitin-Protein Ligase in the Ubiquitination of p53. *Cell.* 75:495-505.

Ciechanover A. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *The EMBO J.*17:7151-7160.

Huibregtse JM, M Scheffner and PM Howley. (1993) localization of the E6-AP regions That Direct Human Papillomavirus E6 Binding, Association with p53, and ubiquitination of Associated Proteins. *Mol. and Cell. Biol.* 13;8:4918-4927.

Camus S, S menéndez, CF Cheok, LF stevenson, S Lain and DP Lane. (2007) Ubiquitin-independent degradation of p53 mediated by high-risk human papillomavirus protein 16. *Oncogene.* 1-12.

zur Hausen HZ (2000) Papillomaviruses Causing: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *Jour. Nat. Can. Inst.* 92:690-698.

Thomas M and Banks L. (1998) Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene.* 17:2943-2954

Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L and Storey A. (2000) Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes and Development,* 14:3065-3073.

Mantovani F. and Banks L. (2001) The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene,* 20:7874-7887.

Nguyen ML, Nguyen MM, Lee D, Griep AE, and Lambert PF. (2003) The PDZ Ligand Domain of the Human Papillomavirus Type 16 E6 Proteins Is Required for E6? Induction of Epithelial Hyperplasia In Vivo. *J. Virol.* 77: 6957-6964.

Kumar A, Zhao Y, Meng G, Zeng M, Srinivasan S, Delmolino LM, Gao Q, Dimri, Weber GF, Wazer DE, Band H and Band V. (2002) Human Papillomavirus Oncoprotein E6 Inactivates the Transcriptional Coactivator Human ADA3. *Mol. Cell Biol.* 22:5801-5812.

Doorbar J. (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110:525-541.

Lambert PF, Pan H, Pitot HC, Liem A, Jackson M, and Griep AE. (1993) Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes in the skin of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5583-5587.

Griep AE, Herber R, Jeon S, Lohse JK, Dubielzig RR, and Lambert PF. (1993) Tumorigenicity by Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 in Transgenic Mice Correlates with Alterations in Epithelial Cell Growth and Differentiation. *J. Virol*, 67:1373-1384.

Poniatowski ŁA1, Wojdasiewicz P2, Gasik R3, Szukiewicz D1. (2015) Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm.* 2015:137823.

Schuster N, Kriegstein K. (2002) Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res.* 307(1):1-14.

Kim IY, MM Kim and SJ Kim. 2005. Transforming Growth Factor- β : Biology and Clinical Relevance. *J. Biochem. and Mol. Biol.* 38;1:1-8.

Massagué J. (2000) How cells read TGF- β signals. *Mol. Cell Biol.* 1: 169-178.

Bierie B and Moses HL. (2006) TGF β : the molecular Jekyll and Hyde of Cancer. *Nature Rev.* 6:506-520.

Akhurst RJ and Derynck R (2001) TGF- β signaling in cancer- a double-edged sword. *TRENDS in Cell Biol.* 11: S44-S51.

Oft M, Heider KH and Beug H.(1998) TGF β signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr. Biol.* 8:1243-1252.

Busino L, Chiesa, G. G.F Draetta and M Donzelli. 2004. Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene.* 23:2050-2056.

Thomas DA, Massagué J. (2005) TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell.* 8(5):369-80.

Park HY, Wakefield LM, Mamura M. (2009) Regulation of tumor immune surveillance and tumor immune subversion by TGF-beta. *Immune Netw.* 9(4):122-6.

Chin D, GM Boyle, PG. Parson and WB Coman. (2004) What is transforming growth factor-beta (TGF- β)?. *The British Association of plastic Surgeons.* 57: 215- 221.

Hang G, Lu SL, Li AG, He W, Corless, Kulesz-Martin M and Wang X. (2005) Distinct mechanism of TGF-b1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. *The Journal of Clinical Invest.* 115:1714-1723.

Glick AB, Kulkarni AB, Tennenbaum T, Hennings H, Flanders KC, O'Reilly M, Sporn MB, Karlsson S, Yuspa SH. (1993) Loss of expression of transforming growth factor beta in skin and skin tumors is associated with hyperproliferation and a high risk for malignant conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;90(13):6076-80.

Park K, Kim SJ, Bang YJ, Park JG, Kim NK, Roberts AB, Sporn MB. (1993) Genetic changes in the transforming growth factor beta (TGF-beta) type II receptor gene in human gastric

cancer cells: correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF-beta. Proc Natl Acad Sci U S A. 13;91(19):8772-6.

Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M. (2005) TGF-beta signalling and its role in tumour pathogenesis. Acta Biochim 52(2):329-37.

Copland JA, Luxon BA, Ajani L, Maity T, Campagnaro E, Guo H, LeGrand SN, Tamboli P, Wood CG. (2003) Genomic profiling identifies alterations in TGFbeta signaling through loss of TGFbeta receptor expression in human renal cell carcinogenesis and progression. Oncogene. 11;22(39):8053-62.

Derynck R, R J. Akhurst and A Balmain. 2001. TGF- β signalling in tumor suppression and cancer progression. Nature genetics.29:117-129.

Dare A. and Vaid FH. (2006) Effect of light intensity and wavelengths on photodegradation reactions of rivoflavin in aqueous solution. J. Photobiol B. 2;82:21-27.

Laethem AV, Claerhout S, Garmyn M and Agostinis P. (2005) The sunburn cell: Regulation of death and survival of the keratinocyte. Int. Jour. Biochem. And Cell Biol. 37:1547-1553.

De Fabo EC, FP Noonan, T Fears and G Merlino. (2004) Ultraviolet B but not A Radiation Initiates Melanoma. Cancer Res. 64:6372-6376.

Dong W, Kloz U, Accardi R, Caldeira S, Tong WM, Wang ZQ, Jansen L, Dürst M, Sylla BS, Gissmann L, Tommasino M. (2005) Skin hyperproliferation and susceptibility to chemical carcinogenesis in transgenic mice expressing E6 and E7 of human papillomavirus type 38. J Virol. 79(23):14899-908.

Ouhtit A. (2001) A model for UV-Induction of Skin Cancer, J Biomed Biotechnol, 1:5-6.

Bruins W, E. Zwart, LD Attardi, T. Iwakuma, E.M. Hoogervorst, R.B. Beems, B. Miranda, C.T.M van Oostrom, J. Van den Berg, G.J. van den Aardweg, G. Lozano, H. Van Steeg, T. Jacks and A. De Vries. (2004) Increased Sensivity to UV Radiation in Mice with a p53 Point Mutation at Ser389. *Mol. Cell. Biol.* 24: 8884-8894.

Ouhtit A, Muller H.K, Davis DW, Ullrich SE, McConkey D and Ananthaswamy HN. (2000) Temporal Events in Skin Injury and the Early Adaptative reesponses in Ultraviolet-Irradiated Mouse Skin. *Am. Jour. Pathol.* 156:201-207.

Daher A, Simbulan-Rosenthal CM and Rosenthal DS. (2006) Apoptosis induced by ultraviolet B in HPV-immortalized human keratinocytes requires caspase-9 and is death receptor independent. *Exp. Dermatol.* 15:23-34.

Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. (2002) Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor beta/smad pathway in human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* 119(2):499-506.

He W, Li AG, Wang D, Han S, Zheng B, Goumans MJ, Ten Dijke P, Wang XJ. (2002) Overexpression of Smad7 results in severe pathological alterations in multiple epithelial tissues. *EMBO J.* 3;21(11):2580-90.

Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. (2002) Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor beta/smad pathway in human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* 119(2):499-506.

Halliday GM, Damian DL, Rana S, Byrne SN. (2012) The suppressive effects of ultraviolet radiation on immunity in the skin and internal organs: implications for autoimmunity. *J Dermatol Sci.* 66(3):176-82.

Pfeifer GP, Besaratinia A. (2012) UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem Photobiol Sci.* 11(1):90-7.

Mouret S, Favier A, Beani JC, Leccia MT. (2007) Differential p53-mediated responses to solar-simulated radiation in human papillomavirus type 16-infected keratinocytes. *Exp Dermatol.* 16(6):476-84.

El-Abaseri TB, Putta S, Hansen LA. Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the epidermal growth factor receptor. *Carcinogenesis* 2006;27(2):225-31.

The HPV16 E6 oncoprotein and UVB irradiation inhibit the tumor suppressor TGF β pathway in the epidermis of the K14E6 transgenic mouse

Marco Popoca-Cuaya¹, Jose Diaz-Chavez², Jesus Hernandez-Monge¹, Elizabeth Alvarez-Rios¹, Paul F.Lambert³ and Patricio Gariglio^{1*}.

1 Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Mexico City 07360, Mexico.

2 Unit of Biomedical Research in Cancer, UNAM/Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Mexico City 14080, Mexico.

3 McArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, Madison, WI 53706, USA.

*Address correspondence to Patricio Gariglio, vidal@cinvestav.mx.

Present address: Department of Genetics and Molecular Biology. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV). Av. Instituto Politécnico Nacional 2508. Colonia San Pedro Zacatenco, CP 07360.

Abstract

High-risk human papillomaviruses (HR-HPVs) are the causative agents of cervical cancer and they are also associated with a subset of head and neck squamous cell carcinomas. In addition, HPVs have also been postulated in the development of non-melanoma skin cancers (NMSC). In these cancers, the oncogene E6 is best known for its ability to inactivate the tumor suppressor p53 protein. Interestingly, in transgenic mice for HPV16 E6 (K14E6), it was reported that E6 alone induced epithelial hyperplasia and delay in differentiation in skin epidermis independently of p53 inactivation. Transforming growth factor β (TGF β) is an important regulator of cell growth/differentiation and apoptosis and this pathway is often lost during tumorigenesis. Ultraviolet radiation B (UVB) exposure activates diverse cellular responses, including DNA damage and apoptosis. In the current study, we investigated whether the E6 oncogene alone or in combination with UVB dysregulate some components of the TGF β pathway in the epidermis of K14E6 mice. We used eight-day-old K14E6 and nontransgenic mice irradiated and unirradiated with a single dose of UVB. We found that the E6 oncogene and UVB irradiation impair the TGF β pathway in epidermis of K14E6 mice by downregulation of the TGF β type II receptor (T β RII). This loss of T β RII prevents downstream activation of Smad2 and target genes as p15, an important regulator of cell cycle progression. In summary, the TGF β signaling in cells of the epidermis is downregulated in our mouse model by both the E6 oncoprotein and the UVB irradiation.

Key words E6 oncoprotein, UVB, TGF β , HPV16, Transgenic mice

Introduction

Human papillomaviruses (HPVs) are strictly epitheliotropic small DNA-containing viruses that infect keratinocytes at a wide range of body sites (1). Although more than 100 different HPVs have been characterized based on sequence homologies, only a limited number were shown to be associated with cancer development. Thirteen so-called high-risk types of the alpha genus HPVs (alpha-HPV) play a critical role in the development of cervical cancer and have been implicated in other anogenital cancers and a subset of head and neck carcinomas (2, 3). In addition, cutaneous beta-HPVs have been linked to development of epidermodysplasia verruciformis (EV) (3,4). Furthermore, a causative relationship between beta-HPVs infection and the development of non-melanoma skin cancer (NMSC) in both immunocompetent and immunocompromised people is suggested by epidemiologic data and associated risk factors such as UV-mediated local immunosuppression (5). There is also a strong evidence for the potential association between cutaneous HPV infection and basal cell carcinoma (BCC) (6, 7, 8).

Interestingly, the high-risk HPV16, which is the most prevalent in cervical cancer, was also suggested as a risk factor for NMSC in the non-immunosuppressed population (9, 10). HPV16 E6 and E7 oncogenes are the principal factors responsible for initiation and progression of cancer (11, 12). The HPV16 E6 oncogene is one of the earliest viral genes expressed after HPV infection; it is well known that E6 has the ability to degrade p53 and to interact with a number of different proteins that contribute to the promotion of HPV oncogenicity (11, 13). The *in vivo* properties of the E6 oncoprotein from HPV16 have been evaluated through the generation and characterization of a HPV16 transgenic mouse strain (K14E6) that contains the E6 oncogene linked to the human keratin 14 promoter (hK14) targeting its expression to the basal layer of the stratified epithelium (14, 15). Interestingly, in the epidermis of these mice it was observed that E6 alone induced epithelial hyperplasia and delay in differentiation independently of p53 inactivation (16). Even

though data linking HPV16 with human skin cancer are limited (9, 10, 17-19; for review see 20) the K14E6 transgenic mice spontaneously develop malignant skin tumors, and with increased incidence when treated with chemical carcinogens (21). Moreover, in this model E6 was shown to be a potent oncogene in the skin inducing both promotion and progression (16, 22). This effect could be partially due to E6-induced inactivation of both p53 and TGF β pathways (23, 24).

Transforming growth factor β (TGF β) also regulates biological processes such as cell growth, differentiation, apoptosis, extracellular matrix formation, inflammatory/immune response and angiogenesis (25). TGF β is a potent growth inhibitor in epithelial tissues because it promotes cell cycle arrest and induces apoptosis acting as a tumor suppressor (25, 26). TGF β ligands signal through receptors that are members of the serine/threonine receptor kinase superfamily. TGF β signaling is initiated when TGF β binds the TGF β receptor type II (T β RII) and induces its serine/threonine kinase activity. The binding of TGF β to T β RII promotes the recruitment of TGF β receptor type I (T β RI) which is activated via transphosphorylation by T β RII on multiple serine residues. Activated T β RI phosphorylates and activates Smad2 and Smad3 transcription factors. Phosphorylated Smad2 and/or Smad3 then bind their common partner Smad4 to form a heteromeric complex, which then translocates to and accumulates in the nucleus, where it acts as a transcription factor (25, 27). In cancer, tumor cells tend to escape from the TGF β antiproliferative effect by either acquiring mutations in the components of the TGF β signal transduction pathway or by epigenetic alterations in the expression of pathway components (28). TGF β not only loses its anti-tumoral function but can also become an oncogenic factor inducing epithelial-mesenchymal transition, proliferation, angiogenesis, invasion, metastasis and immune suppression (29, 30).

Ultraviolet radiation, in particular the mid-wavelength range 290-320nm (UVB), that represents 5% of the solar radiation, is involved in the suppression of the skin immune system and is the

major risk factor for the development of NMSC, especially the Basal cell carcinoma (31, 32). This is relevant to human skin cancer because UVB radiation acts as a potent carcinogen capable to induce tumor cell initiation, promotion and progression of the tumor cell (33). The preferential colocalization of skin squamous cell carcinoma (SCC) and HPVs infection to chronically sun-exposed body sites suggests that UVB and HPV may cooperate in the development of skin lesions (34). Recently, it was reported that HPV18 E6 and E7 oncogenes and UVB irradiation upregulate proinflammatory cytokines such as interleukin-6 and 8 in BBC supporting the etiological role of HPV infection in skin cancer (35). Interestingly, it has been reported that HPV16-infected keratinocytes are resistant to UVB-induced oxidative stress and cell death (34, 36); however, the combined effect of E6 oncoprotein and UVB on induction of skin lesions is unclear yet.

The aim of this study was to investigate the early effects of UVB and the HPV16 E6 oncoprotein on the TGF β pathway in skin epidermis of K14E6 mouse. We found that the expression of the T β RII is inhibited by both UVB and E6, while T β RI is inhibited only by the E6 oncoprotein. These effects lead to downstream alterations in both the phosphorylation of Smad2 and the expression of target genes regulated by TGF β .

Materials and Methods

K14E6 transgenic mice and UVB irradiation. The K14E6 transgenic mouse has been previously described and characterized (15). All mice were housed and treated according to the American Association of Laboratory Animal Care (AALAC) regulations. All procedures were performed as reported (37). Eight-day-old K14E6 and nontransgenic (NT; FVB/N) mice were exposed to a single dose of 500mJ/cm² of ultraviolet light using a UVB source with a peak wavelength of 310 nm. Mice

were euthanized by cervical dislocation at different time points after UVB exposure. Unirradiated mice were used as controls.

A detailed description of all Materials and Methods can be found in Supplementary Material.

Results

Cell proliferation in epidermis of non-irradiated and UVB-irradiated K14E6 transgenic mice.

Since PCNA is associated with the S phase of the cell cycle, we assessed cell proliferation in mice skin samples by immunohistochemical detection of this nuclear antigen. For this, we analyzed epidermis from eight-day-old K14E6 and NT mice at 4h after a single dose (500mJ/cm²) of UVB irradiation. In NT mice there was a significant decrease in cell proliferation in the *stratum basale* at 4h post-UVB as compared with the NT mice without irradiation (Fig. 1A upper panel). On the contrary, we observed hyperproliferation in the epidermis from K14E6 mice without irradiation (control) and no changes were observed 4h after UVB treatment (Fig. 1A upper panel). In the same sections we identified the E6 oncoprotein as a faint brown nuclear and cytoplasmic signal by immunohistochemical stain; this signal was detected in the basal and suprabasal layers of the skin epithelium only in K14E6 mice (Fig. 1A lower panel). Semiquantitative analysis of PCNA in the epidermis of both NT and K14E6 mice was performed by counting the total number of cells in specific areas, and those PCNA-positive cells at different times after UVB irradiation. As indicated in Figure 1B, a recovery in the expression of PCNA in cells of the epidermis was observed in NT mice at 8h post-UVB. In contrast, the UVB effect was abrogated by the E6 oncoprotein in irradiated K14E6 mice PCNA-positive cells were detected in the basal and suprabasal layers of the K14E6 mice epidermis with or without UV radiation, and no significant difference was found

between control and irradiated mice. Three slides were obtained from each sample from three mice and PCNA-positive cells were counted in 10 fields for each slide section.

E6 prevents UVB-induced activation of p53 in epidermis of K14E6 mice. Under our experimental conditions we evaluated the expression of the tumor suppressor p53 protein following UVB irradiation in the epidermis of NT and K14E6 mice because p53 activation is a hallmark of the DNA damage response. As shown in Fig. 2A, after 4h of UVB irradiation, the epidermis of NT mice accumulated nuclear p53. In contrast, no p53-positive cells were observed by immunohistochemistry in K14E6 mice epidermis after UVB-irradiation. Further analysis with Western blotting indicated that p53 was detected 10 min after UVB irradiation in NT mice; the stabilization of p53 continued during 2h and 4h post-UVB and returned to normal levels in 8h or 24h post-UVB (Fig. 2B). This accumulation of p53 probably induces either cell growth arrest or apoptosis in NT mice. In K14E6 mice, however, there was no induction of p53 at any time point analyzed after UVB irradiation, presumably because E6 led to efficient degradation of the p53 protein. We detected a high level of p53 in C33A cells (HPV-negative cervical cancer cell line) used as a positive control for this tumor suppressor protein (Fig. 2B).

TGF β 1 and β 2 ligands are downregulated in K14E6 mice epidermis after UVB exposure. We compared in epidermis derived from NT and K14E6 transgenic mice the protein levels of TGF β 1 and TGF β 2 isoforms, after UVB irradiation by Western blot. In Figure 3A it can be observed that the TGF β 1 protein was highly expressed in unirradiated NT mice, but its level was reduced from 2 to 4h after UVB exposure and partially recovered at 8h. In unirradiated K14E6 mice there was also a high level of TGF β 1, but in this case there was a tendency towards reduced levels of this ligand after UVB exposure without a recovery (Fig. 3B). This reduction suggests that the E6 oncoprotein and UVB exposure cooperate to inhibit TGF β 1 protein expression in epidermis. On the other hand,

unirradiated NT mice showed very low levels of TGF β 2 in comparison with TGF β 1 ligand (Fig. 3A); 4h after exposure to UVB radiation there was a significant induction of this isoform in epidermis of NT mice (Fig. 3A). In unirradiated K14E6 mice a similar level of TGF β 1 and 2 was observed; however, TGF β 2 downregulation occurred at 4h post-UVB irradiation and thereafter its level gradually decreased without a recovery (Fig. 3B). These observations can be better appreciated in the densitometric analyses of TGF β 1 and 2 protein levels (Figs. 3C and 3D), providing evidence that both isoform ligands were reduced after UVB irradiation in epidermis of the K14E6 mice and that no recovery of TGF β 1 and 2 proteins was detected in these mice.

T β RII is the main TGF β signaling pathway receptor affected after UVB in the K14E6 mice epidermis. We determined the T β RI and II expression in NT and K14E6 mice epidermis by Western blot. Basal expression of T β RII was observed in both unirradiated NT and K14E6 mice, but the level of this receptor was lower in the epidermis of the transgenic mice (compare Figs. 4A and 4B). In addition, downregulation of T β RII protein expression occurred rapidly after 10 min of UVB irradiation in NT mice, but this effect was transitory because T β RII expression was detected again at 8h. In contrast, in K14E6 mice a gradual disappearance of this receptor after UVB treatment was observed with no evidence of recovery (Fig. 4B). These results provide strong evidence of the cooperation between the E6 oncoprotein and UVB in the TGF β pathway inhibition at the level of T β RII. On the other hand, T β RI expression was inhibited in unirradiated K14E6 epidermis compared to NT control; however following irradiation, the levels of T β RI in both NT and K14E6 mice remained unaltered at any point of the kinetics (Figs. 4C and 4D). This suggests that T β RII is the main receptor affected in the TGF β signaling pathway after UVB in the K14E6 mice epidermis.

Smad2 phosphorylation is inhibited in epidermis of K14E6 mice after UVB irradiation.

Phosphorylation of Smad2 reflects the activation of the TGF β tumor suppressor pathway. We

examined Smad2 phosphorylation (pSmad2) in NT and K14E6 mice epidermis using immunohistochemistry and Western blot before and after UVB irradiation. In unirradiated NT mice, we detected high basal levels of pSmad2 in the nucleus of skin epidermis; 4h after UVB irradiation pSmad2 positive staining was reduced in cells of the epidermis (Fig. S1A; upper panel). In contrast, in the epidermis of unirradiated K14E6 mice the level of pSmad2 was lower compared with unirradiated NT mice (Fig. S1A); following UVB treatment, immunohistochemical analysis showed that the signal of pSmad2 decreased and minimal nuclear signal was observed in epidermal cells (Fig. S1A; lower panel). We confirmed these results by Western blot; in epidermal extracts from NT mice pSmad2 was reduced at 2h and almost undetectable 4h after UVB (Fig. S1B). This effect was transitory since a slight recovery of the pSmad2 level was detected again at 8h post-UVB (Fig. S1B). In K14E6 mice, pSmad2 basal levels were lower than in NT mice; after UVB light exposure the level of pSmad2 in K14E6 mice is gradually reduced, and interestingly, the normal level of pSmad2 was not recovered, at least not before 24h as shown in the densitometric analysis of Figure S1C, suggesting cooperation of the E6 oncoprotein and UVB irradiation in the inhibition of Smad2 phosphorylation and thus in the inhibition of the TGF β pathway.

The expression of TGF β pathway target genes after UVB irradiation is altered by the presence of the E6 oncoprotein. The downregulation of TGF β /Smad pathway in K14E6 mice after UVB irradiation suggested that the expression of target genes could be modified. To test this possibility, p15, c-myc and Cdc25A mRNA levels were measured by real-time quantitative PCR. In NT mice the p15 tumor suppressor mRNA decreased at 2h and 4h post-UVB as compared to control mice, but a recovery of its expression was observed at 8h post UVB (Fig. S2A). It is evident that in transgenic mice the E6 oncoprotein promoted the downregulation of p15 mRNA in the epidermis in the absence of UVB irradiation, as compared with NT mice epidermis; in this model, the UVB irradiation provoked a gradual loss in the level of the p15 transcript without a recovery (Fig. S2A).

In contrast to p15, the mRNA expression of c-myc and Cdc25A oncogenes was lower in the epidermis of NT mice as compared to transgenic mice under normal basal conditions (control); in NT the level of c-myc and Cdc25A mRNA increased slightly 2-4h after UVB irradiation but returned to their basal levels at 8h post UVB (Figs. S2B and S2C). In contrast, in K14E6 mice these genes were highly upregulated by the E6 oncoprotein alone (Figs. S2B and S2C). Following UVB treatment, the expression of c-myc and Cdc25A decreased at 2h but the mRNA level of both genes was partially upregulated at 4h and fully recovered at 8h post-UVB. Again, these results suggest that the tumor suppressor TGF β pathway in skin epidermis is highly affected by both E6 and UVB.

Discussion

In the present study, we found that in mice epidermis the UVB irradiation cooperates with HPV16 E6 oncoprotein in the inhibition of the TGF β signaling pathway. These results could shed light on the mechanism involved in the early steps of K14E6 induced skin carcinogenesis. It is well established that UVB induces skin tumors; for example NMSC is dependent on cumulative sun exposure (33, 39). In fact, in NMSC it has been reported the cooperation between UVB and HPV in particular body sites exposed to sunlight (40). This cooperation likely plays a role in the early immortalization stage of carcinogenesis (36, 40). To study the effects of UVB on the TGF β pathway and E6 from HPV16, we used the K14E6 transgenic mice because it has been useful in dissecting the functions of E6 (21); in particular, we analyzed the early effects of UVB on the TGF β pathway in this model.

We observed that the response to UVB in NT mice epidermis promotes cellular defense processes leading to p53 induction; this in turn induces cell-cycle arrest or apoptosis to allow repair or elimination of the damaged cells, respectively. In contrast, K14E6 mice epidermis did not promote cell-cycle arrest induced by UVB irradiation, but instead we found that cell proliferation is

maintained. Since increased proliferation is a key indicator of carcinogenesis susceptibility (36, 41), it is possible that the lack of cell-cycle arrest in the K14E6 mice could represent an early step in skin carcinogenesis. Previously, the hyperproliferation and related delay in differentiation in the epidermis of K14E6 mice were reported as a p53-independent activity of E6 (15). On the other hand, it was reported that E6 plays a key role in carcinogenesis because it is crucial for the proliferation and survival of HPV-infected keratinocytes (42-44).

We analyzed the expression of TGF β 1 and TGF β 2 ligands in the epidermis from NT and K14E6 mice, observing that in NT mice there was a decrease of TGF β 1 post-irradiation and a recovery, whereas the isoform 2 level increased in response to UVB without a decrease at least for 24 hours. These findings are consistent with Glick *et al*, 1993, reporting that TGF β 1 loss correlates with basal cell hyperproliferation, and that elevated levels of TGF β 2 can induce apoptosis, as we observed in NT mice (45). A decrease of TGF β 1 has been also previously associated with skin proliferation and a decrease in cellular differentiation (46). In contrast, for K14E6 we observed a decrease of TGF β 1 and 2 without a recovery after UVB treatment in epidermis, suggesting that in the presence of E6, UVB repressed at the protein level the expression of both TGF β isoforms and the TGF β pathway activity. Similarly Nees *et al* (2000) reported that HPV16 E6 decreased TGF β 2 protein in keratinocytes, which confers a selective growth advantage on cells with low p53 levels that probably contributes to malignant progression (47). It has also been reported that decreased epithelial expression of TGF β 2 in HPV16-positive CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia) may contribute to a malignant phenotype (48). Taking into account that lower expression of TGF β 1 and TGF β 2 is associated with hyperproliferation and an increased risk of malignant progression in murine skin (49).

The normal cytostatic function of TGF β is frequently inhibited or blocked in carcinogenesis as result of mutations or downregulated T β RII receptor (50, 51). Importantly, UV irradiation of

human skin in vivo and cultured human skin fibroblasts inhibits TGF β signaling by downregulating T β RII expression (52). A previous work indicates that E6 and E7 from HPV16 decreased the promoter activity of T β RI and T β RII in an in vitro model (53). In addition, we previously observed a decrease of T β RII mRNA in skin from K14E6 mice by microarray analysis (44, 54). In agreement with these reports, we found that in NT mice the expression of T β RII was quickly inhibited in the epidermis, 10 minutes after UVB irradiation; in this case the recovery was observed until 8 h post-UVB. We observed that the E6 oncoprotein alone impairs the expression of T β RII in epidermis, and the treatment with UVB resulted in further decrease at 4 and 8 h without a significant recovery for at least 24 h post-UVB. We also found diminished expression of T β RI in the epidermis of K14E6 mice compared with NT mice, but this level was unchanged after UVB irradiation, indicating cooperation between E6 and UVB to reduce the T β RII level and an inhibition of T β RI by E6 alone. Consistent with our results, Mi *et al* (2000) reported that human keratinocytes acquired TGF β resistance during *in vitro* progression of HPV16-mediated transformation as a result of loss of TGF β receptor type I expression (55). Hypes *et al* (2009) also found that the decrease in promoter activity of T β RI was attributed to the expression of the HPV16 E6 and E7 oncogenes, at late stages of transformation in human keratinocytes (53). These results indicate that E6 plays an important role in TGF β pathway decreasing the expression of both receptors in the epidermis of the K14E6 mice.

The presence of phospho-Smad 2 in the nucleus can be used as an indicator of fully active TGF β pathway (26). Densitometry analyses of total Smad2 protein and phosphorylated Smad2 levels in epidermis were compared in NT and K14E6 mice after UVB irradiation (Fig. S1 C). The levels of nuclear phospho-Smad2 in NT mice epidermis decreased at 2h and were not detectable after 4h reaching normal levels between 8h and 24h post-treatment. In contrast, we observed low pSmad2 levels in the epidermis of K14E6 in comparison to NT mice without UVB treatment; this reduced

pSmad2 level was markedly lower after UVB treatment. This is the first report suggesting that E6 from HPV16 and UVB reduce the pSmad2 level, probably as result of low levels of T β RII receptor, and suggests again cooperation between E6 oncoprotein and UVB to inhibit the tumor suppressor activity of TGF β signaling in K14E6 mice.

As it is known, in the normal tumor suppressive TGF β pathway, c-myc and Cdc25A are downregulated and p15 is upregulated. The c-myc proto oncogene has the ability to promote cell cycle progression and is upregulated in UVB induced skin tumors in both mouse and rat models (56); in addition, c-myc increases transcription of the potential Cdc25A oncogene (57). High expression of the Cdc25A gene has been reported in various human malignancies including skin cancer (58).

In the absence of UVB irradiation we observed in K14E6 mice epidermis a strong activation of c-myc and Cdc25A mRNA expression that could be partially explained by the mentioned defects in the TGF β pathway. In contrast, the UVB treatment inhibited both c-myc and Cdc25A expression in K14E6 mice but only for a few hours; then c-myc and Cdc25A mRNA levels were recovered by 8 h after UVB. Levels of c-myc mRNA were reported to be decreased in cultured normal human keratinocytes in response to UVB irradiation, and this was found to correlate with induction of both p53 and apoptosis (59). More recently, it was found that UVB induces a rapid degradation of c-myc mRNA in rodent and human cells; this could be part of the global cell response to UV damage and safeguard mechanisms maintaining high apoptosis levels and genome stability (60, 61). The rapid recovery of c-myc and Cdc25A expression after UVB irradiation could be an effect of E6, representing an early step towards skin carcinogenesis in K14E6 mice by decreasing apoptosis. In NT mice, after an initial slight increase of c-myc and Cdc25A mRNAs post UVB, the level of these transcripts gradually decreased and no recovery was detected; it is possible that in NT mice the TGF β pathway is transiently inactivated by UVB (62), causing a minor but fast activation of c-myc

and Cdc25A expression. The recovery of the TGF β pathway in NT mice will decrease in turn the expression of both oncogenes.

The cell-cycle dependent kinase inhibitor p15^{INK4B} is normally upregulated by TGF β to induce cell cycle arrest in G1 (63) and this contributes to the antiproliferative effect of TGF β . The upregulation of p15 mRNA expression observed in NT mice is inhibited after UVB but this effect is transient; in contrast, in K14E6 mice cooperation of E6 oncoprotein and UVB in the inhibition of TGF β pathway results in downregulation of the p15 target gene without recovery.

In conclusion, the TGF β signaling in cells of the epidermis is downregulated in our mouse model by both the E6 oncoprotein and the UVB irradiation; it would be interesting to demonstrate if HPV16-E6-expressing keratinocytes in epidermis and the repeated exposure to UVB could contribute to induce skin carcinogenesis in our mouse model.

Acknowledgments

The authors thanks to Enrique García Villa, Rodolfo Ocádiz Delgado and Lauro Macias Gonzales for technical assistance and the contribution of Emma Calderón Aranda for advice during mice irradiation. This work was supported by the Institute of Science and Technology of Mexico City (ICyTDF) grant ICyT326/11 (P.G.) and Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) , grant 168896 (J.D.C.). Marco Popoca Cuaya was recipient of doctoral fellowships from CONACyT (191490).

Author contributions

MP performed most of the experiments and prepared the first draft the manuscript; JD participated in the design of the research study, performed the RT-qPCR experiments and revised the manuscript; JH performed the statistical analysis and revised the manuscript; EA performed

the monitoring of mice and revised the manuscript ; PL provided transgenic mice and manuscript review; and PG designed the research study and revised the manuscript.

Conflict of interests

The authors have no conflicting interests to declare

References

1. De Villiers EM, Gunst K, Stein H, *et al.* Esophageal squamous cell cancer in patients with head and neck cancer: Prevalence of human papillomavirus DNA sequences. *Int J Cancer* 2004;109(2):253-8.
2. Liang C, Marsit CJ, McClean MD, *et al.* Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2012; 72(19): 5004–5013.
3. Patel T, Morrison LK, Rady P, *et al.* Epidermodysplasia verruciformis and susceptibility to HPV. *Dis markers* 2010.29(3-4):199-206.
4. Underbrink MP, Howie HL, Bedard KM, *et al.* E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. *J Virol.* 2008; 82(21):10408-17.
5. Massimi P, Thomas M, Bouvard V, *et al.* Comparative transforming potential of different human papillomaviruses associated with non-melanoma skin cancer. *Virology* 2008; 371(2):374-9.
6. Preston DS1, Stern RS. Nonmelanoma cancers of the skin. *N Engl J Med.* 1992 3:327(23):1649-62.
7. Gallagher RP1, Hill GB, Bajdik CD, *et al.* Sunlight exposure, pigmentation factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. II. Squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol.* 1995;131(2):164-9.
8. Iannacone MR1, Gheit T, Waterboer T, *et al.* Case-control study of cutaneous human papillomavirus infection in Basal cell carcinoma of the skin. *J Invest Dermatol.* 2013;133(6):1512-20.
9. Reuschenbach M, Tran T, Faulstich F, *et al.* High-risk human papillomavirus in non-melanoma skin lesions from renal allograft recipients and immunocompetent patients. *Br J Cancer* 2011; 104(8):1334-41.
10. Iftner A, Klug SJ, Garbe C, *et al.* The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer Res* 2003; 63(21):7515-9.
11. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* 2009; 384(2):260-5.
12. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res* 2009; 143(2):195-208.

13. Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes PJ. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol* 2008; 153(3):397-408.
14. Herber R, Liem A, Pitot H, *et al.* Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J Virol* 1996; 70(3):1873-81.
15. Song S, Pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol* 1999; 73(7):5887-93.
16. Song S, Liem A, Miller JA, *et al.* Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. *Virology* 2000; 267(2):141-50.
17. Cairey-Remonnay S, Humbey O, Mouglin C, *et al.* TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in cutaneous squamous cell carcinoma and benign epithelial lesions of renal transplant recipients and immunocompetent individuals: lack of correlation with human papillomavirus status. *J Invest Dermatol* 2002; 118(6):1026-31.
18. Gustafsson AC, Ren ZP, Asplund A, *et al.* The role of p53 codon 72 and human papilloma virus status of cutaneous squamous cell carcinoma in the Swedish population. *Acta Derm Venereol* 2004; 84(6):439-44.
19. Meyer T, Arndt R, Christophers E, *et al.* Frequency and spectrum of HPV types detected in cutaneous squamous-cell carcinomas depend on the HPV detection system: a comparison of four PCR assays. *Dermatology* 2000;201(3):204-11.
20. Wang J, Aldabagh B, Yu J, *et al.* Role of human papillomavirus in cutaneous squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *J Am Acad Dermatol* 2014;70(4):621-9.
21. Simonson SJ, Difilippantonio MJ, Lambert PF. Two distinct activities contribute to human papillomavirus 16 E6's oncogenic potential. *Cancer Res* 2005; 65(18):8266-73.
22. Shai A, Pitot HC, Lambert PF. p53 loss synergizes with estrogen and papillomaviral oncogenes to induce cervical and breast cancers. *Cancer Res* 2008. 68(8):2622-31.
23. Ho JS, Ma W, Mao DY *et al.* p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 2005;25(17):7423-31.
24. Kalo E, Buganim Y, Shapira KE, *et al.* Mutant p53 attenuates the SMAD-dependent transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) signaling pathway by repressing the expression of TGF-beta receptor type II. *Mol Cell Biol* 2007;27(23):8228-42.
25. Tian M, Neil JR, Schiemann WP. Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer. *Cell Signal* 2011; 23(6):951-62.
26. Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008; 134(2):215-30.

27. Bierie B, Moses HL. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21(1):49-59.
28. Butz H, Rácz K, Hunyady L, *et al.* Crosstalk between TGF- β signaling and the microRNA machinery. *Trends Pharmacol Sci.* 2012; 33(7):382-93.
29. Seoane J. The TGFbeta pathway as a therapeutic target in cancer. *Clin Transl Oncol.* 2008; 10(1):14-9.
30. Heldin CH, Vanlandewijck M, Moustakas A. Regulation of EMT by TGF β in cancer. *FEBS Lett.* 2012;586(14):1959-70.
31. Halliday GM, Damian DL, Rana S, *et al.* The suppressive effects of ultraviolet radiation on immunity in the skin and internal organs: implications for autoimmunity. *J Dermatol Sci* 2012;66(3):176-82.
32. Dessinioti C, Antoniou C, Katsambas A, *et al.* Basal cell carcinoma: what's new under the sun. *Photochem Photobiol* 2010;86(3):481-91.
33. Pfeifer GP, Besaratinia A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem Photobiol Sci* 2012;11(1):90-7.
34. Mouret S, Sauvaigo S, Peinnequin A, *et al.* E6* oncoprotein expression of human papillomavirus type-16 determines different ultraviolet sensitivity related to glutathione and glutathione peroxidase antioxidant defence. *Exp Dermatol* 2005;14(6):401-10.
35. Hsiao YP1, Yang JH, Wu WJ, *et al.* E6 and E7 of human papillomavirus type 18 and UVB irradiation corporately regulate interleukin-6 and interleukin-8 expressions in basal cell carcinoma. *Exp Dermatol.* 2013;22(10):672-4.
36. Mouret S, Favier A, Beani JC, *et al.* Differential p53-mediated responses to solar-simulated radiation in human papillomavirus type 16-infected keratinocytes. *Exp Dermatol* 2007;16(6):476-84.
37. Cortés-Malagón EM, Bonilla-Delgado J, Díaz-Chávez J *et al.* Gene expression profile regulated by the HPV16 E7 oncoprotein and estradiol in cervical tissue. *Virology* 2013;447(1-2):155-65.
38. El-Abaseri TB, Putta S, Hansen LA. Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the epidermal growth factor receptor. *Carcinogenesis* 2006;27(2):225-31.
39. Chen AC, Halliday GM, Damian DL. Non-melanoma skin cancer: carcinogenesis and chemoprevention. *Pathology* 2013; 45(3):331-41.

40. Molho-Pessach V, Lotem M. Viral carcinogenesis in skin cancer. *Curr Probl Dermatol* 2007;35:39-51.
41. Denning MF. Protein kinase C/mitogen-activated protein kinase signaling in keratinocyte differentiation control. *J Invest Dermatol* 2010;130(8):1968-70.
42. Mantovani F, Banks L. Regulation of the discs large tumor suppressor by a phosphorylation-dependent interaction with the beta-TrCP ubiquitin ligase receptor. *J Biol Chem*. 2003;278(43):42477-86.
43. Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V, Gariglio P. Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010;1805(1):6-16.
44. Mendoza-Villanueva D, Diaz-Chavez J, Uribe-Figueroa L *et al*. Gene expression profile of cervical and skin tissues from human papillomavirus type 16 E6 transgenic mice. *BMC Cancer* 2008;8:347.
45. Glick AB1, Kulkarni AB, Tennenbaum T, *et al*. Loss of expression of transforming growth factor beta in skin and skin tumors is associated with hyperproliferation and a high risk for malignant conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;1;90(13):6076-80.
46. Cho HR, Hong SB, Kim YI *et al*. Differential expression of TGF-beta isoforms during differentiation of HaCaT human keratinocyte cells: implication for the separate role in epidermal differentiation. *J Korean Med Sci* 2004;19(6):853-8.
47. Nees M, Geoghegan JM, Munson P *et al*. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes. *Cancer Res* 2000;60(15):4289-98.
48. El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ *et al*. Decreased synthesis and expression of TGF-beta1, beta2, and beta3 in epithelium of HPV 16-positive cervical precancer: a study by microdissection, quantitative RT-PCR, and immunocytochemistry. *J Pathol* 2000; 192(4):494-501.
49. Gold LI, Jussila T, Fusenig NE *et al*. TGF-beta isoforms are differentially expressed in increasing malignant grades of HaCaT keratinocytes, suggesting separate roles in skin carcinogenesis. *J Pathol* 2000;190(5):579-88.
50. Drabsch Y, ten Dijke P. TGF- β signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2012. 31(3-4):553-68.

51. Lu SL, Herrington H, Reh D *et al.* Loss of transforming growth factor-beta type II receptor promotes metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma. *Genes Dev* 2006;20(10):1331-42.
52. Quan T, He T, Kang S *et al.* Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-beta type II receptor/Smad signaling. *Am J Pathol* 2004;165(3):741-51.
53. Hypes MK, Pirisi L, Creek KE. Mechanisms of decreased expression of transforming growth factor-beta receptor type I at late stages of HPV16-mediated transformation. *Cancer Lett* 2009. 282(2):177-86.
54. Diaz-Chavez J, Hernandez-Pando R, Lambert PF *et al.* Down-regulation of transforming growth factor-beta type II receptor (TGF-betaRII) protein and mRNA expression in cervical cancer. *Mol Cancer* 2008;7:3.
55. Mi Y, Borger DR, Fernandes PR *et al.* Loss of transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor type I mediates TGF-beta resistance in human papillomavirus type 16-transformed human keratinocytes at late stages of in vitro progression. *Virology* 2000;270(2):408-16.
56. Waikel RL, Wang XJ, Roop DR. Targeted expression of c-Myc in the epidermis alters normal proliferation, differentiation and UV-B induced apoptosis. *Oncogene* 1999;18(34):4870-8.
57. Galaktionov K, Chen X, Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 1996;382(6591):511-7.
58. Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* 2007;7(7):495-507.
59. Garmyn M, Yaar M, Holbrook N *et al.* Immediate and delayed molecular response of human keratinocytes to solar-simulated irradiation. *Lab Invest* 1991; 65(4):471-8.
60. Britton S, Salles B, Calsou P. c-MYC protein is degraded in response to UV irradiation. *Cell Cycle*. 2008;7(1):63-70.
61. Pothof J, Verkaik NS, Hoeijmakers JH *et al.* MicroRNA responses and stress granule formation modulate the DNA damage response. *Cell Cycle* 2009;8(21):3462-8.
62. Gambichler T, Skrygan M, Tomi NS *et al.* Significant downregulation of transforming growth factor-beta signal transducers in human skin following ultraviolet-A1 irradiation. *Br J Dermatol* 2007;156(5):951-6.

63. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994;15;371(6494):257-61.

Figure Legends

Figure 1. PCNA expression in skin from NT and K14E6 mice after UVB irradiation. (A) Histological cross-sections of skin from 8-day-old NT and K14E6 transgenic mice were irradiated with 500mJ/cm² during 5 minutes or unirradiated (Control). Samples of skin were subjected to immunohistochemistry for PCNA and E6 oncoprotein at the same sections and counterstained with hematoxylin (See Material and Methods), the black dotted line represents the basement membrane that separates the epidermis from the dermis. The brown staining in the nucleus indicates PCNA-positive cells (black arrows); E6 shows a faint brown nuclear and cytoplasmic signal in the epidermis of K14E6 mice (black arrows). (B) The graph represents the average percentage of PCNA-positive cells obtained from 10 microscopic fields (40X) per mouse. At least three mice were used to calculate the percentage. Differences between the PCNA-positive cells in the K14E6 transgenic mice versus the NT mice were statistically significant (*) as determined by Student's t-test.

Figure 2. E6 prevents p53 accumulation in irradiated skin epidermis from K14E6 mice. (A) Unirradiated and UVB-irradiated epidermis cross-sections from 8-day-old mice were done as in Figure 1. Indicated sections from NT and K14E6 transgenic mice were immunostained for p53 and counterstained with hematoxylin. The black dotted line represents the basement membrane that separates the epidermis from the dermis. The brown staining in the nucleus (black arrows) shows p53-positive cells; see inset. (B) Immunoblot for the p53 expression in NT (upper panel) and K14E6 (lower panel) mice skin; total cell lysates were obtained at the indicated times after UVB irradiation and blotted with p53 specific antibody and appropriate secondary antibody (see Material and Methods). HPV16-negative cervical cancer cell line C33A was used as positive control

for p53. Blots were stripped and reprobbed with anti- β -actin as loading control. These experiments were repeated at least three times with similar results. A representative gel is shown.

Figure 3. TGF β 1 and β 2 expression is diminished in K14E6 transgenic mice epidermis after UVB irradiation. A representative Western blot analysis of TGF β 1 and TGF β 2 in 8-day-old NT (A) and K14E6 transgenic mice (B) is shown. Irradiation conditions were as indicated in Figure 1. Epidermis lysates were separated by SDS-PAGE, transferred and probed for TGF β 1 and TGF β 2 after stripping as indicated in Materials and Methods. β -actin blot is included as a loading control. Three independent experiments were performed and showed similar results. Western blot bands were normalized to β -actin bands and quantified (C and D) by comparing with those of control mice. Data are shown as the means of three separate experiments; bars, \pm S.D.

Figure 4. Expression of T β RI and T β RII in epidermis from K14E6 mice is downregulated after UVB irradiation. Western blot analysis of T β RII and T β RI in 8-days-old NT (A) and K14E6 mice (B). NT and transgenic mice UVB irradiation was done as in previous figures. Epidermis lysates were separated by SDS-PAGE, transferred and probed using specific antibodies for T β RII and T β RI. β -actin blot is included as a control and was obtained after stripping as indicated in Materials and Methods. Three independent experiments were performed with similar results. The graphs show the densitometry results of the T β RII bands (C) and T β RI bands (D) normalized for the loading control (β -actin). Data represent mean of triplicate samples \pm S.D.

Figure S1. The E6 oncoprotein and UVB cooperate to diminish pSmad2 protein. (A) Immunohistochemical analysis of pSmad2 in unirradiated and irradiated skin cross-sections from 8 day-old NT and K14E6 mice was performed 4h post-UVB as indicated in Materials and Methods.

Brown nuclei (black arrows) shows phospho-Smad2; the skin sections were counterstained with hematoxylin. The black dotted line represents the basement membrane that separates the epidermis from the underlying dermis. (B) Protein lysates, obtained at different times after UVB irradiation from the epidermis of NT and K14E6 mice, were immunoblotted with anti-phospho-Smad2 antibodies, as well as with anti-Smad2; anti β -actin was used as loading control. A representative Western blot is shown. (C) The graphs show the densitometry results of the kinetics for pSmad2 bands in both NT and K14E6 epidermis. Data represent mean of triplicate samples \pm S.D.

Figure S2. Kinetics of TGF β target genes expression in epidermis from NT and K14E6 mice after UVB irradiation. Relative mRNA expression in epidermis of NT and K14E6 mice after UVB irradiation. In a total of 3 mice for each condition the mRNA level of p15, c-myc, Cdc25A (A, B, C respectively) was evaluated using RT-qPCR. The mRNA expression level was normalized to the endogenous GAPDH control gene in both NT and K14E6 mice. The results are shown as fold change relative to non-irradiated NT mice, as described in Material and Methods. Note that oncogenic Cdc25A and c-myc mRNA levels were higher in K14E6 than in NT mice, whereas tumor suppressor p15 was downregulated in K14E6 compared to NT mice. Asterisks indicate $p < 0.05$ compared to control unirradiated NT mice.