



FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**MODELO DE ANÁLISIS *IN VIVO* DE PATOLOGÍAS  
ASOCIADAS A VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO  
ONCOGÉNICOS**

TESIS DOCTORAL

**ÁGUEDA M<sup>a</sup> BUITRAGO PÉREZ**

MADRID, 2011





FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

# **MODELO DE ANÁLISIS *IN VIVO* DE PATOLOGÍAS ASOCIADAS A VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO ONCOGÉNICOS**

Memoria presentada por **ÁGUEDA M<sup>a</sup> BUITRAGO PÉREZ** para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en la Unidad de Oncología Molecular del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) de Madrid, bajo la dirección de los Doctores Jesús M<sup>a</sup> Paramio González y Ramón García Escudero

V<sup>o</sup> B<sup>o</sup> Codirector de Tesis

V<sup>o</sup> B<sup>o</sup> Codirector de Tesis

Dr. Jesús M<sup>a</sup> Paramio González

Dr. Ramón García Escudero

**MADRID 2011**



*“Wenn du ein glückliches Leben willst, verbinde es mit einem Ziel”*

*“Cuando quieras ser feliz en la vida, únela a una meta”*

*Albert Einstein*



**A mis padres**

**A mis hermanos y hermana**



# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. El Virus del Papiloma Humano (VPH).....	1
1.2. La epidermis y epitelios mucosos: dianas del VPH.....	2
1.3. El ciclo de vida del VPH .....	4
1.4. La familia <i>Papillomaviridae</i> .....	5
1.5. VPH mucosos y Cáncer.....	6
1.5.1. Cáncer de cérvix.....	7
1.5.2. Cáncer de cabeza y cuello.....	7
1.6. VPH cutáneo y cáncer de piel no melanoma .....	8
1.6.1. Epidermodisplasia verruciforme.....	9
1.6.2. Receptores de trasplante de órganos y VPH .....	9
1.6.3. VPH cutáneo en la población inmunocompetente .....	10
1.7. Oncogenes de VPH.....	10
1.8. Modelos experimentales de infección por VPH .....	14
1.8.1. Modelos de ratones transgénicos .....	14
1.8.1.1. Ratones transgénicos que expresan genes de VPH 16.....	14
1.8.1.2. Ratones transgénicos que expresan genes de VPH-EV .....	15
1.8.1.3. Modelos animales deficientes en la familia del retinoblastoma.....	15
1.8.2. Cultivos organotípicos de piel humana .....	16
1.8.2.1. Cultivos organotípicos que expresan genes de VPH mucosos .....	16
1.8.2.2. Cultivos organotípicos que expresan genes de VPH cutáneos .....	17
1.9. Terapias anti-VPH .....	18
1.9.1. Test de Papanicolau y vacunas preventivas anti-HPV .....	19

1.9.2.	Futuras terapias .....	20
1.9.3.	Testado de VPH y marcadores moleculares de displasia cervical y carcinomas.....	20
2.	OBJETIVOS.....	23
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
3.1.	Clonajes .....	29
3.1.1.	Clonaje de epítipo Flag y genes E7 en el plásmido pcDNA3.1(-) .....	30
3.1.2.	Generación de mutantes de E7 .....	32
3.1.3.	Clonajes en pGEX-2T .....	33
3.1.4.	Clonajes en el vector retroviral pLZR-IRES-EGFP.....	33
3.1.5.	Oligonucleótidos utilizados durante los clonajes .....	35
3.2.	Ensayos de unión proteína-proteína .....	35
3.2.1.	Purificación de fusiones E7-GST .....	35
3.2.2.	Ensayo de unión a pRb .....	37
3.2.3.	Obtención del aptámero A2 .....	38
3.3.	Cotransfecciones en Saos2 .....	39
3.3.1.	Mantenimiento de la línea.....	40
3.3.2.	Cotransfecciones con vectores de expresión eucariota en Saos2 .....	40
3.3.3.	Tratamientos con Inhibidor del proteasoma .....	41
3.3.4.	Tratamientos con Aptámero .....	41
3.4.	Infecciones retrovirales .....	42
3.4.1.	Producción de sobrenadantes.....	42
3.4.2.	Infección de queratinocitos primarios humanos.....	43
3.5.	Formación de equivalentes dermo-epidérmicos .....	44
3.5.1.	Preparación de matriz de fibrina y queratinocitos .....	45
3.5.2.	Trasplante del equivalente dermo-epidérmico .....	45
3.6.	Recolección de muestras .....	47
3.7.	Análisis histológico e inmunohistoquímico.....	47

3.7.1.	Anticuerpos inmunohistoquímica e inmunofluorescencia .....	48
3.8.	<i>Western blot</i> .....	49
3.8.1.	Anticuerpos <i>western blot</i> .....	50
3.9.	Análisis de expresión de genes y micro ARN mediante qRT-PCR.....	51
3.9.1.	Extracción ARN .....	51
3.9.2.	Retrotranscripción .....	51
3.9.3.	Cuantificación por qRT-PCR.....	51
3.9.4.	Cebadores utilizados en qRT-PCR.....	52
4.	RESULTADOS .....	53
4.1.	Interacción molecular entre E7 y los supresores tumorales pRb y p107.....	55
4.1.1.	E7 de VPH 5 cutáneo reduce los niveles del supresor tumoral pRb .....	56
4.1.2.	E7 de VPH 5 cutáneo reduce los niveles de p107.....	58
4.2.	5E7 se une a pRb .....	60
4.3.	El dominio LxCxE de E7 es necesario para la degradación de pRb y p107....	60
4.4.	Alteraciones en piel humana por la expresión de E7 de VPH.....	62
4.4.1.	Expresión estable de genes E7 en los trasplantes.....	62
4.4.2.	Análisis macroscópico de los trasplantes mediante dermatoscopia .....	63
4.4.3.	Análisis histológico de los trasplantes.....	64
4.4.4.	E7 altera la diferenciación epitelial en los trasplantes.....	68
4.4.5.	Aumento de proliferación en trasplantes que expresan E7 .....	70
4.4.6.	Expresión de ciclina A y p21 en trasplantes que expresan E7.....	72
4.4.7.	Apoptosis en los trasplantes infectados con E7.....	75
4.4.8.	Expresión de MCM7 y p16 <sup>INK4a</sup> , marcadores indirectos de VPH-AR, en los trasplantes de E7.....	77
4.4.9.	Expresión génica en los trasplantes de biomarcadores de carcinomas asociados a VPH-AR extraídos de estudios de expresión génica global.....	79
4.4.10.	Desregulación de microARNs implicados en cáncer de cérvix.....	80
4.5.	El aptámero A2 impide la degradación de pRb .....	82

5.	DISCUSIÓN .....	85
5.1.	E7 de VPH 5 y la familia del retinoblastoma .....	87
5.2.	Fenotipo de trasplantes con expresión de E7 de VPH 16.....	89
5.3.	Fenotipo de trasplantes con expresión de E7 de VPH 5.....	90
5.4.	Trasplantes de 16E7 como modelo preclínico de terapias anti-VPH-AR.....	92
6.	CONCLUSIONES.....	95
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	99
8.	ANEXO .....	117





## SUMMARY

Human papillomaviruses (HPVs) are DNA viruses of the *Papillomaviridae* family that infect stratified epithelia, and are responsible of benign and cancerous lesions in different anatomical locations. A few HPV types, considered as “high-risk” types (such as HPV 16 and 18), are the causative agents of virtually all cervical cancers, and some oropharyngeal carcinomas. Importantly, cervical cancer (CC) is the 3<sup>er</sup> most frequent cancer in women worldwide. Moreover, cutaneous HPV types belonging to the beta genus (such as HPV 5 and 8), are associated to squamous cell carcinoma (SCC) that frequently appeared in the skin of patients of the inherited skin disease *Epidermodysplasia verruciformis*, an also in organ transplant recipients. Analysis models for HPV-infection and HPV-associated pathology are difficult to obtain as the virus life cycle depends on a proper epithelial differentiation. Nevertheless, compelling evidences have shown that the E7 early gene from HPV 16 binds and induces protein instability of the pocket family of proteins pRb, p107 and p130, thus contributing essentially to HPV-oncogenesis. The major aims of this project are to characterize the capability of the E7 gene of HPV 5 to induce instability of pocket proteins, and to determine whether human primary keratinocytes transduced with the E7 genes from HPV 5 or HPV 16 (5E7 and 16E7), and transplanted into immunodeficient mice as reconstituted skin, could be used as models of HPV-pathobiology.

The results that we have obtained demonstrate that 5E7 is able to bind pRb *in vitro*. Moreover, 5E7 reduce the protein levels of pRb and p107 similarly to 16E7, and in a manner that is dependant on an intact LxCxE pocket binding motif. On the other hand, transplants with 5E7 or 16E7 genes demonstrated stable transgene expression during the analysis period (3 to 6 months). Histological examination of 16E7 epidermis showed similarities with pretumoral intrapithelial neoplasia of the cervix (acanthosis, suprabasal mitosis, papillomatosis, hyperkeratosis or nuclear atypia) which were not present in 5E7 skin. Moreover, transplants expressing 16E7 display disrupted differentiation. Suprabasal proliferation and cell cycle reentry was frequently observed in 16E7 transplants but focally in 5E7 samples. Molecular analysis of surrogate biomarkers of high-risk HPV-infected tumors demonstrated that expression of the E7 protein in reconstituted human skin transplanted into immunodeficient mice is a good *in vivo* model of HPV pretumoral and tumoral lesions. Moreover, this model could be used to analyze preclinical new antitumor therapies.



## ABREVIATURAS

5E7: Proteína E7 de VPH 5

16E7: Proteína E7 de VPH 16

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATCC: del inglés, *American Type Culture Collection*, colección americana de cultivos tipo

BrdU: Bromodesoxiuridina

BSA: Del inglés, *bovine serum albumine*. Seroalbúmina bovina

CC: cáncer de cervix

CCE: Carcinoma de célula escamosa

CCECC: Carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello

CDKs: del inglés, *Cyclin-dependent kinases*, quinasas dependientes de ciclinas

CPNM. Cáncer de piel no melanoma

DAB: 3,3'-Diaminobencidina

DAPI: del inglés, *4',6-diamidino-2-phenylindole*. 4,6 diamidino-2-fenil-indol

DMBA: 7,12-dimetilbenzo (a) antraceno

DMEM: del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. Medio Esencial Dulbecco Modificado

DMSO: dimetil sulfóxido

dNTP: del inglés, *deoxyribonucleotide triphosphate*. Desoxiribonucleotido trifosfato

DTT: Ditiotreitól

EDTA: del inglés, *ethylenediaminetetraacetic acid*. Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: del inglés, *Epidermal Growth Factor*, Factor de crecimiento epidérmico

eGFP: del inglés, *enhanced Green Fluorescent Protein*. Proteína verde fluorescente mejorada.

EV: Epidermodisplasia verruciforme

FDA: del inglés, *Food and Drug Administration*, Agencia de Alimentos y Medicamentos

FITC: del inglés, *fluorescein isothiocyanate*. Isotiocianato de fluoresceína

GST: glutation S-transferasa

GTPasa: del inglés, *Guanosine triphosphatase*. guanosina trifosfatasa

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

IRES: del inglés, *Internal Ribosome Entry Site*, sitio de unión interna del ribosoma

K: del inglés, *keratin*. Queratina

Kb: Kilobases

KDa: Kilodaltons

LCR: del inglés, *Large control region*. Región de control larga

LTR: del inglés, Long Terminal Repeat, región terminal repetida larga

NIC: neoplasia intraepitelial cervical

pb: pares de bases

PBS: del inglés, *phosphate buffered saline*. Tampón fosfato salino

PCNA: del inglés, *Proliferating Cell Nuclear Antigen*, antígeno nuclear de proliferación celular

PCR: del inglés, *polymerase chain reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa

PMSF: del inglés, *phenylmethylsulfonyl fluoride*. Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

pRb: Proteína del retinoblastoma

QPH: queratinocitos primarios humanos

qRT-PCR: del inglés, *quantitative real-time PCR*. PCR cuantitativa en tiempo real

RTO: receptor de trasplante de órganos

SAP: del inglés, *shrimp alkaline phosphatase*. Fosfatasa alcalina de gamba.

SDS: del inglés, *sodium dodecyl sulfate*. Dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: del inglés, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*.  
Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

TBE: del inglés, *tris-borate EDTA*. Tris-borato EDTA

Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano

TPA: del inglés, *12-O-Tetradecanoil-Phorbol-13-Acetate*, 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato

UV: radiación ultravioleta

VPH: Virus del papiloma humano

VPH-AR: Virus del papiloma humano de alto riesgo

VPH-ER: Virus del papiloma humano de bajo riesgo

VPH-EV: Virus del papiloma humano asociado a epidermodisplasia verruciforme

WT: del inglés, *wild type*. Forma nativa

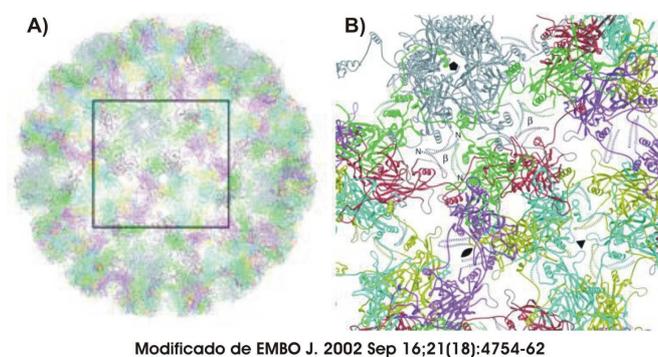


## 1. INTRODUCCIÓN



### 1.1. El Virus del Papiloma Humano (VPH)

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece a la familia Papillomaviridae, constituida por virus ADN de doble cadena, sin envuelta lipídica, con cápsida icosaédrica de aproximadamente 55nm formada principalmente por 72 capsómeros constituidos por la proteína L1 y polipéptidos formados por la proteína L2 (Figura 1) (64). El ADN de estos virus es de 8 kb y su genoma se divide en una región codificante para proteínas tempranas (4Kb) (E1-E7) y para proteínas estructurales (L1 y L2) de expresión tardía (3Kb), además posee una región de control larga (LCR) no codificante (1kb) (Figura 3) (46, 136). El LCR contiene el origen de replicación y múltiples sitios de unión a factores de transcripción (proteína E2 viral y factores de transcripción de la célula huésped) importantes para regular la transcripción a partir de los promotores tempranos y tardíos del virus. (211). Las proteínas E1 y E2 actúan como factores que reconocen el origen de replicación, regulando así la replicación episomal del virus (39, 71, 133). E1 tiene actividad helicasa y GTPasa (90), mientras que la proteína E2 es el principal regulador de la transcripción de los genes virales al unirse al LCR (188, 211). E4 se expresa sólo en células terminalmente diferenciadas como proteína de fusión con cinco aminoácidos del extremo amino de la proteína E1 y parece estar relacionada con la alteración del citoesqueleto (54). La proteína E5 no se expresa en todos los VPH (está ausente en muchos cutáneos como VPH 5) (48), codifica para una proteína de membrana y parece estar relacionado con la oncogénesis (117). Durante el ciclo viral, las proteínas E6 y E7 facilitan el mantenimiento de los episomas y estimulan a las células que empiezan a diferenciarse a reentrar en la fase S del ciclo celular (38, 66).

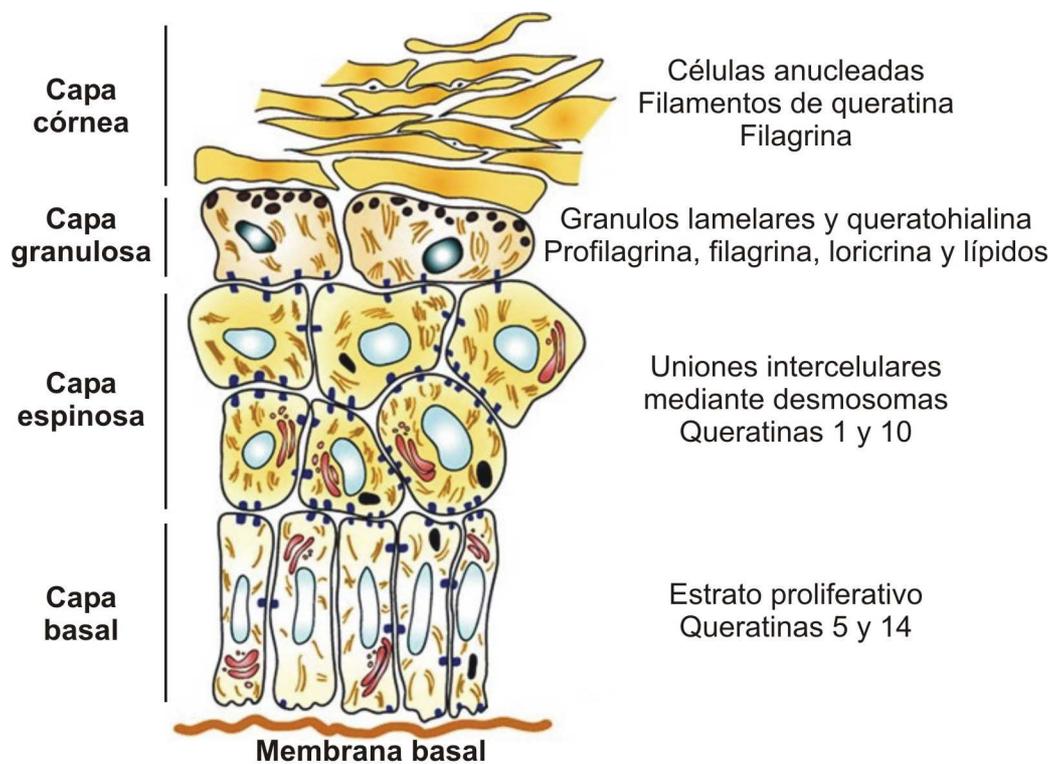


**Figura 1.** Estructura tridimensional de la cápsida del virus del papiloma humano. **A:** Estructura tridimensional de la cápsida de VPH 16. **B:** Imagen realizada in silico de la unión de los capsómeros que forman la cápsida de VPH 16

## 1.2. La epidermis y epitelios mucosos: dianas del VPH

Los tejidos epiteliales recubren el organismo tanto externamente (la piel, principal órgano compuesto por células epiteliales), como internamente (estómago e intestino, pulmones, útero, etc.), además de formar glándulas exocrinas y endocrinas mediante procesos de invaginación. En general, los tejidos epiteliales de recubrimiento tienen una función protectora frente a las agresiones del entorno, actuando en muchos casos como una barrera física. Estos epitelios están constituidos principalmente por queratinocitos, que son las células diana del VPH. Los epitelios estratificados presentan una estructura en capas altamente organizada y compartimentalizada que se encuentra en continuo proceso de renovación, lo que supone un mecanismo de defensa para evitar que, a pesar de estar continuamente expuestos a agresiones externas, los daños que éstas puedan inducir en las células epiteliales no afecten al mantenimiento del tejido. En los epitelios estratificados queratinizados se aprecian cuatro capas o estratos (basal, espinoso, granuloso y córneo) y los queratinocitos que los componen se encuentran en distintos estadios de diferenciación (Figura 2). Existen diversos mecanismos moleculares relacionados con este proceso de diferenciación del tejido (73). La **capa basal** está formada por una única capa de células cúbicas, que tienen capacidad proliferativa y son las que dan lugar a todas las células del tejido. Ésta capa es la más interna, estando separada del tejido subyacente por la lámina basal, a la que los queratinocitos se unen por medio de hemidesmosomas. La red de filamentos de queratina que forman el citoesqueleto en estas células está formado por K5 y K14 en proporción 1:1 (140). La **capa espinosa**, está formada por queratinocitos procedentes de la capa basal que ya no se dividen y que han comenzado el proceso de diferenciación dejando de sintetizar las queratinas propias de la capa basal y expresándose queratinas características de diferenciación como son K1 y K10 (58). Los queratinocitos de esta capa, cuya forma es poliédrica, están conectados entre sí mediante gran cantidad de desmosomas, lo cual contribuye a la integridad del tejido y a la función de barrera. Esta capa recibe su nombre por la apariencia que le otorgan los desmosomas bajo microscopía óptica. La **capa granulosa**, formada por queratinocitos en forma de rombo, se caracteriza por la presencia en el citoplasma de numerosos gránulos de queratohialina (compuestos principalmente por filagrina) y gránulos lamelares (que

liberan lípidos que contribuyen a la función de barrera) (79). Otras proteínas estructurales como la loricrina o la involucrina también se expresan en esta capa. Una enzima dependiente de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , la transglutaminasa, une químicamente estas proteínas a otras de la membrana plasmática, organizando la envuelta celular cornificada característica de la última capa. La **capa córnea** es la más externa y máxima responsable de la función protectora. Está formada por células muertas que adquieren forma aplanada que pierden el núcleo y otros orgánulos, quedando suspendidas en una matriz lipídica. Las capas más internas conservan algunos desmosomas, pero las más externas carecen de ellos, de manera que quedan sueltas y se desprenden, en el denominado proceso de descamación.



Modificado de J Cell Biol. 2008 Jan 28;180(2):273-84. Epub 2008 Jan 21

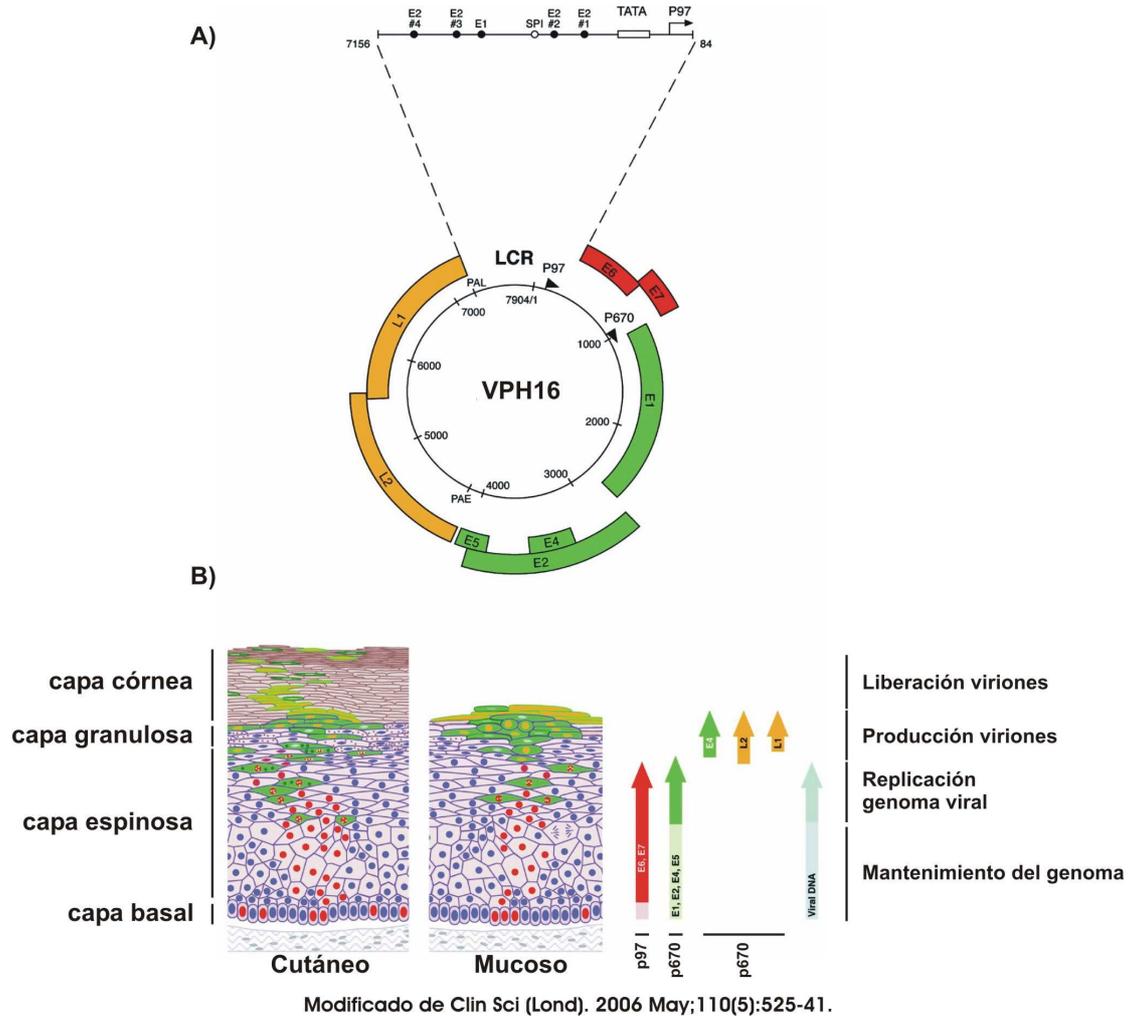
**Figura 2. Diferenciación epidérmica.** A partir de los queratinocitos de la capa basa, que es la que tiene capacidad proliferativa, se van diferenciando las células para formar la capa espinosa, granulosa y cornea.

En condiciones normales, un queratinocito de la capa basal con capacidad proliferativa, recibe señales que hacen que inicie el proceso de migración hacia capas superiores. En este proceso, pierde su capacidad proliferativa y va diferenciándose

progresivamente, expresando cada vez mayor cantidad de diferentes tipos de queratinas hasta convertirse en un queratinocito córneo que finalmente se desprende (73). En los epitelios estratificados no queratinizados (situado en superficies internas y húmedas del cuerpo) se distinguen sólo tres capas, no existiendo un estrato córneo (65). También en este caso, las células con capacidad proliferativa se encuentran en la capa basal, y según van migrando hacia los estratos superiores van perdiendo esta capacidad y se van diferenciando (152).

### **1.3. El ciclo de vida del VPH**

El ciclo del VPH es dependiente de los procesos de diferenciación del epitelio estratificado que infecta. El virus llega a los queratinocitos de la capa basal a través de pequeñas heridas y su genoma se estabiliza en forma episomal (Figura 3). La infección por VPH requiere de la presencia de receptores secundarios para una infección eficiente, y la integrina  $\alpha 6$  parece estar involucrada (62, 129). En el caso de VPH 16 se ha visto que la internalización en la célula se produce por procesos de endocitosis mediante recubrimiento con clatrina (43), pero otros tipos de VPH utilizan caveolina (19). Cada célula infectada tiene unas 50 copias del genoma del virus y su replicación está sincronizada con la replicación del ADN celular (181). Durante la diferenciación del queratinocito infectado, se produce la síntesis de las proteínas de la cápsida. A su vez, gracias a la proteína E7 viral, estas células permanecen en fase S permitiendo la replicación del ADN. Posteriormente se produce la encapsidación del virus (70) y al no ser virus líticos, su liberación se tiene que producir durante el proceso de descamación normal de los queratinocitos terminalmente diferenciados (28). La proteína E4 de ciertos VPHs se asocia con filamentos intermedios de queratina, afectando a la estabilidad de la red de queratinas, facilitando la liberación de las partículas virales (54). La producción de los viriones se restringe a capas suprabasales, mientras que las células infectadas de la zona basal, al continuar proliferando, permiten que la infección persista durante años.



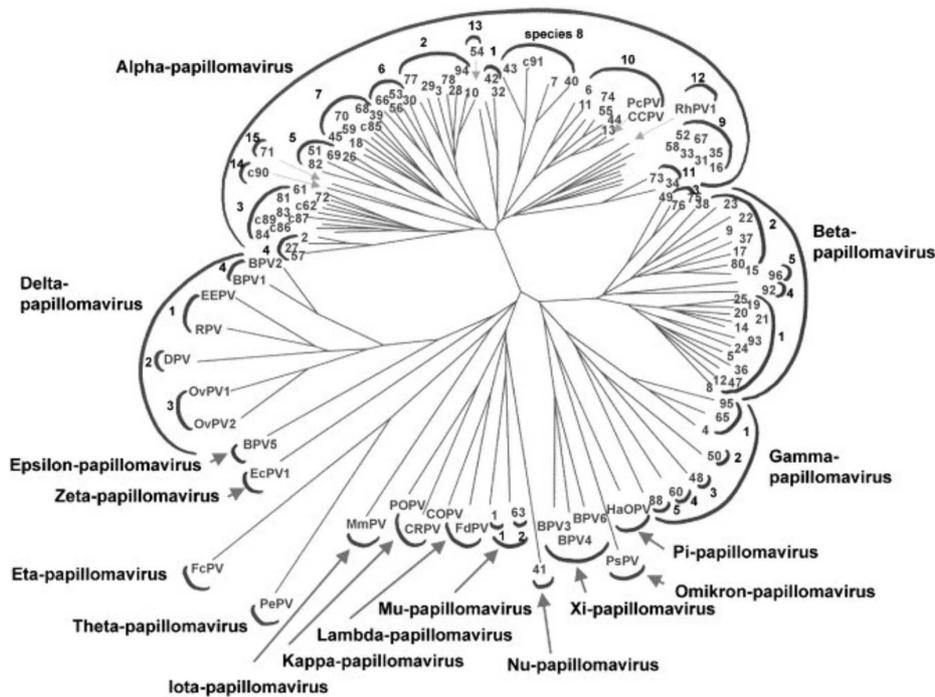
**Figura 3: Ciclo de infección de VPH.** A: El genoma de VPH está compuesto por una región que codifica las proteínas tempranas no estructurales (E1-E7), otra región que codifica las proteínas tardías que forman la cápsida (L1 y L2) y una región de control larga (LCR) que regula la replicación y la expresión génica viral. B: El ciclo del virus del papiloma humano es dependiente del proceso de diferenciación de los epitelios estratificados que infecta a través de pequeñas heridas por las que entra en contacto con las células de la zona basal. Durante la diferenciación del queratinocito, se produce la síntesis de las proteínas de la cápsida, dando lugar a la producción de viriones que se liberan durante el proceso de descamación del queratinocito terminalmente diferenciado.

#### 1.4. La familia Papillomaviridae

La clasificación molecular de los miembros de la familia Papillomaviridae se realiza mediante homología de secuencia del gen de la proteína tardía L1, considerándose del mismo género aquellos que comparten un 60% de homología. En la actualidad se han descrito alrededor de 100 tipos distintos de papillomavirus que infectan humanos (los VPH) que están englobados en cinco géneros: alfa, beta, gamma, mu y nu (Figura 4). Estos VPH son agentes etiológicos de lesiones benignas en la piel y

epitelios mucosos como verrugas y condilomas, pero algunos tipos infectan lesiones con propensión a transformación maligna, dando lugar a carcinomas de células escamosas (CCE) y adenocarcinomas en cavidad oral, faringe, zona anogenital y piel.

El género beta ( $\beta$ ) engloba a muchos de los VPH de tropismo cutáneo que provocan lesiones en humanos. Se les llama también VPH-EV por estar relacionados con la enfermedad hereditaria epidermodisplasia verruciforme (EV). El género alfa ( $\alpha$ ) engloba en mayor parte a VPH mucosos y cutáneos no EV (48).



Virology. 2004 Jun 20;324(1):17-27

Figura 4: Familia *Papillomaviridae*.

### 1.5. VPH mucosos y Cáncer

Los VPH de tropismo mucoso se pueden clasificar a su vez en virus de alto riesgo (VPH-AR) o de bajo riesgo, según su asociación a lesiones malignas o benignas respectivamente (214). La infección con VPH-AR está asociada a cáncer anogenital (91), siendo principalmente importante en el desarrollo de cáncer de cérvix (CC) (159), aunque también están relacionados con carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello (CCECC) (116). En epitelios mucosos, el ADN del virus puede encontrarse en la célula que infecta en forma episomal o integrado en el genoma de la célula (169, 206).

La integración de parte de la secuencia del genoma de VPH en los cromosomas de la célula infectada es un evento frecuente en procesos de malignización (189). Aunque no parece que haya “puntos calientes” (212), esta integración si tiene normalmente como diana “sitios frágiles” (174). Se suele integrar sólo una parte del genoma viral, delecionándose buena parte del mismo, pero conservando las secuencias que codifican las oncoproteínas virales E6 y E7 (8, 169). La expresión de E6 y E7, principales oncogenes virales, aumenta al no tener integrada la secuencia que codifica la proteína viral E2 que reprime su expresión. Debido a la integración el virus, el ARN mensajero de E6 y E7 se une a parte de las secuencias de la célula huésped, haciéndolo más estable e incrementando así su expresión (94, 95).

### **1.5.1. Cáncer de cérvix**

El cáncer de cervix es el 3<sup>er</sup> tipo de cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial, tiene una tasa de supervivencia del 50%, y es especialmente importante en países en vías de desarrollo (68). La infección con VPH-AR es necesaria para el desarrollo de CC invasivo (193). Aunque la infección no es suficiente para el desarrollo tumoral, el ADN viral está presente en un 85% de CC invasivos (45). El virus se transmite por contacto sexual (108) y existen algunos factores que favorecen la progresión tumoral, como son el tabaco y alcohol, o las hormonas esteroideas (135). Los virus de alto riesgo que aparecen con más frecuencia son VPH 16 y VPH 18 (71%) (159). Estudios recientes apuntan a que el VPH 45 también es uno de los tipos más frecuentes en este tipo de lesiones (45). La edad de aparición de la mayoría de los carcinomas invasivos está entre los 47 y los 50 años.

### **1.5.2. Cáncer de cabeza y cuello**

El cáncer de cabeza y cuello es el 6<sup>o</sup> tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial, con un porcentaje de supervivencia de los pacientes de 40-50% (116). Aparece en la cavidad oral, faringe (hipofaringe y orofaringe) y laringe. Los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de este tipo de tumores son el consumo de tabaco y alcohol, que podrían tener un efecto sinérgico. Distintos estudios epidemiológicos han demostrado que una proporción significativa de CCECC está asociada a la infección por VPH-AR. Así, la frecuencia de tumores con infección varía entre 20-30%

dependiendo del estudio, siendo la zona orofaríngea la de mayor incidencia (30-50%) (40, 76, 109). Además, los tumores infectados presentan un comportamiento clínico distinto, con mejor pronóstico y respuesta más efectiva al tratamiento (63). Dentro de la cavidad orofaríngea, la infección es especialmente frecuente en carcinomas de amígdalas, superando el 50% (81, 139). El VPH 16 es el subtipo más frecuente y también lo es en lesiones de cuello de útero, por lo que se cree que la transmisión al epitelio oral puede estar relacionada con determinadas prácticas sexuales (40).

Los pacientes con la enfermedad de Anemia de Fanconi son especialmente sensibles al desarrollo de carcinomas escamosos, principalmente CCECC. Esta enfermedad hereditaria multigénica y poco frecuente se caracteriza por poseer alta inestabilidad cromosómica y tener alterada la ruta de Fanconi implicada en la reparación del daño producido en el ADN (134, 197). Podría haber una aceleración en la inestabilidad cromosómica de células de estos pacientes inducida por la proteína E7 de VPH-AR al tener afectada la vía de reparación de ADN (176). Existen discrepancias respecto a la incidencia de infección con VPH en estos pacientes, aunque son pocos los estudios epidemiológicos realizados (146) (186).

#### **1.6. VPH cutáneo y cáncer de piel no melanoma**

El cáncer de piel no melanoma (CPNM) es el cáncer más frecuente de la población caucásica, representando aproximadamente el 30% del total de los cánceres en dicha población (52). El CCE de piel es el 2º tipo más frecuente de CPNM (123). El mayor factor de riesgo es la exposición a la luz solar (7, 27), aunque la infección con diversos tipos de VPH cutáneos también está asociada al desarrollo de CCE (22, 182). Existen menos evidencias sobre la implicación molecular de virus cutáneos en tumorigénesis en comparación con los mucosos y cánceres anogenitales. Aún así, se ha visto que hay grupos de pacientes que tienen una alta susceptibilidad a la aparición de CCE en zonas expuestas al sol y se relacionan con la infección del virus: pacientes EV, la población inmunodeficiente y la población caucásica que recibe altas dosis de radiación solar. Los VPH cutáneos son responsables de la formación de verrugas comunes que, debido a la exposición a radiación solar, pueden malignizar en algunos casos. La transmisión del virus en la piel se produce por contacto, a través de heridas,

llegando a las células de la capa basal. A diferencia de los mucosos, el genoma de estos VPH cutáneos permanece en forma episomal incluso en los tumores más avanzados.

### **1.6.1. Epidermodisplasia verruciforme**

Dentro de los VPH de tropismo cutáneo, se encuentran los de la familia EV (VPH-EV, en supergrupo  $\beta$ , VPH 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17 y del 19 al 25), que fueron descritos originalmente como asociados a lesiones papilomatosas y malignas de los enfermos EV (92, 122, 143). Es una enfermedad hereditaria autosómica rara que afecta a los genes EVER1/TMC6 y EVER2/TMC8 (144, 156). Aparece en la infancia y cursa con una alta sensibilidad a la luz solar, desarrollando lesiones en la piel a los 10 años de edad. Uno de cada tres pacientes presenta carcinomas en la piel en zonas expuestas al sol entre los 30-50 años y estos CCE son positivos para la infección con VPH en un 90% de los casos (150). La mayoría de VPH-EV están presentes en lesiones benignas, pero algunos de ellos, especialmente los tipos VPH 5 y 8, aparecen con gran frecuencia en carcinomas primarios y metastáticos de pacientes EV (67, 100, 145, 149, 203).

### **1.6.2. Receptores de trasplante de órganos y VPH**

Los pacientes receptores de trasplantes de órganos (RTO) desarrollan frecuentemente lesiones tanto benignas (papilomas), como premalignas (queratosis actínica) y malignas (CCE) en la piel. Muchas de estas lesiones están infectadas con VPH cutáneos, principalmente VPH-EV (12, 21, 25, 84, 194). La frecuencia de aparición de tumores CCE en piel en pacientes RTO es hasta 100 veces mayor que la de la población normal (44, 177). Las zonas más frecuentes en las que aparecen las lesiones son áreas expuestas al sol, como la cara y el antebrazo (14, 61). Algunos estudios indican que puede depender del tipo de droga que se utiliza para inmunosuprimir a los pacientes transplantados y ciertos determinantes genéticos (177). Uno de los mayores problemas para el tratamiento de estos pacientes radica en el número de tumores que puede llegar a padecer cada paciente, oscilando entre 10-100 CCE, en un corto período de tiempo (20), lo que hace complicada la cirugía para la extirpación de los tumores. Aunque se creía que los tipos de VPH más frecuentes en este tipo de lesiones eran VPH 5 y VPH 8, estudios recientes de biopsias de lesiones de RTO no

muestran un tipo dominante claro. De hecho, lo más frecuente es encontrar infecciones múltiples con diversos tipos de VPH cutáneos (17, 85).

### **1.6.3. VPH cutáneo en la población inmunocompetente**

El acúmulo de mutaciones producido por la exposición al sol excesiva (fuente de radiación UV) es, sin lugar a dudas, el mayor factor de riesgo para la formación de CPNM, queratosis actínica y lesiones precancerosas en general (41, 72, 190). En lesiones precancerosas como la queratosis actínica, se detecta ADN de VPH cutáneos en un 85% de los casos (149), lo que sugiere una función sinérgica entre la infección y la radiación solar en etapas tempranas de la tumorigénesis. Además, el porcentaje de pacientes caucásicos con CCE y con anticuerpos frente a los tipos EV más importantes en carcinogénesis es superior (60%) al de la población sana (50%), y significativo estadísticamente (47, 85, 100, 200). Estudios recientes indican que estas diferencias varían según la localización geográfica y no parece haber un tipo predominante de VPH en este tipo de tumores. Por tanto, la infección con VPH-EV estaría creando un entorno que favorece la progresión tumoral (22)

La tasa de incidencia de CPNM en la población caucásica y su asociación con VPH-EV, así como la exacerbada predisposición a la aparición de tumores cutáneos (especialmente CCE) en pacientes EV y RTO hacen necesario el estudio de los mecanismos moleculares de carcinogénesis cutánea relacionada con VPH, así como la búsqueda de terapias anti-VPH cutáneos.

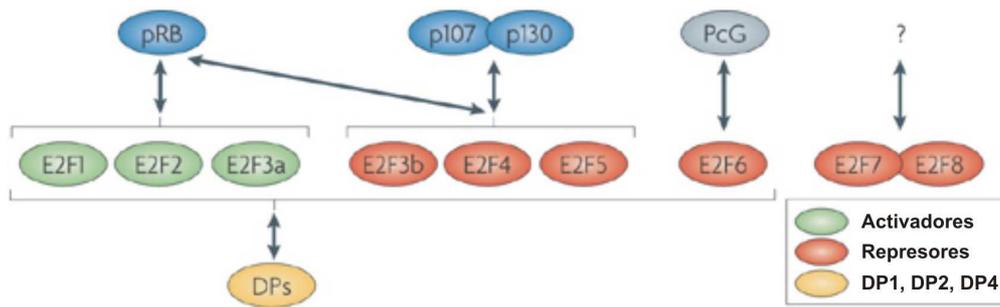
### **1.7. Oncogenes de VPH**

Las proteínas virales con mayor potencial oncogénico de VPH-AR, son las proteínas tempranas E6 y E7 (128). La expresión continuada de ambas es necesaria para la transformación y mantenimiento de las células tumorales (8, 78, 137). E6 y E7 controlan, al menos en parte, el ambiente de la célula que infecta para favorecer la replicación del genoma viral. Esto conlleva una inhibición de la diferenciación celular y fomento de la proliferación (215). Los oncogenes E6 y E7 interfieren con proteínas clave del ciclo celular, apoptosis ó reparación de daño del ADN, como son p53 y pRb.

El supresor de tumores p53 es un regulador clave de la apoptosis. En condiciones normales p53 se activa y estabiliza mediante acetilación y fosforilación como respuesta a estrés celular o daño en el ADN (por ejemplo, por irradiación con luz UV-B) (192), lo que da lugar a la inducción de la expresión de dianas de p53 que median la parada del ciclo celular y la subsiguiente reparación de daño genotóxico. Si el daño no puede ser reparado, p53 induce la muerte celular programada. La proteína E6 de VPH-AR dirige a p53 hacia su degradación vía proteasoma (166), impidiendo la parada de ciclo o apoptosis. La inhibición de la apoptosis mediada por E6 se produce también por vías independientes de p53, ya que E6 de VPH 18 es además capaz de inhibir la inducción de BAK, impidiendo la activación de apoptosis vía mitocondrial (183). Al mismo tiempo, E6 de VPH-AR promueve la actividad telomerasa induciendo hTERT a nivel transcripcional (104, 107, 187). Por tanto, la combinación de la inhibición de la apoptosis y la activación de la telomerasa, favorecen una progresión del ciclo celular y un aumento de la inestabilidad cromosómica.

En el caso de VPH cutáneos, aunque E6 no induce degradación de p53, sí inhibe la apoptosis inducida tras daño con luz UV-B incluso en presencia de p53. Aunque los mecanismos moleculares que expliquen este fenotipo no están completamente dilucidados, existen evidencias que apoyan el papel de E6 de VPH cutáneos asociados a CCE en la interferencia con rutas de inducción de apoptosis dependientes e independientes de p53 (179). Tras irradiación con UV-B, E6 de VPH cutáneos inhibe la transcripción de genes proapoptóticos dependientes de p53 como son Fas, PUMA $\beta$ , Apaf-1, y PIG3 (75). Por otro lado, E6 interfiere con reguladores de la integridad de la mitocondria ante estímulos proapoptóticos, como BAK (93, 118). Se ha visto incluso, que algunos E6 y E7 de distintos VPH pueden inducir la expresión de la forma dominante negativa  $\Delta$ Np73, que incluso en presencia de p53 funcional, impide la inducción de genes proapoptóticos (1).

Por otro lado, la oncoproteína E7 de VPH-AR interacciona con proteínas de la familia del retinoblastoma a través de la secuencia conservada LxCxE del dominio CR2 (114). Esta familia del retinoblastoma está constituida por tres proteínas relacionadas (pRb, p107, y p130), que se unen a factores de transcripción de la familia E2F (Figura 5).



Modificado de Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Sep;9(9):713-24.

**Figura 5: Familia del retinoblastoma e interacción con E2F.** En azul se representa las proteínas de la familia del retinoblastoma, en verde los factores E2F activadores y en rojo los E2F represores.

Durante la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, pRb, p107 y p130 son fosforilados y por tanto inactivados. Esto induce la liberación de los factores E2F, permitiendo la expresión de numerosos genes implicados en replicación del ADN y en el control de diversas actividades que permiten la progresión del ciclo celular (49, 96, 126, 185). Además, la mera sobreexpresión de ciertos miembros de esta familia en células quiescentes induce la entrada en la fase S del ciclo celular (121). La proteína pRb puede reprimir la transcripción mediada por E2F mediante dos mecanismos: por un lado i) es capaz de bloquear el dominio de transactivación mediante la unión a E2F; por otro, ii) pRb puede actuar como correpresor transcripcional, ya que los complejos pRb/E2F pueden unir y bloquear los promotores regulados por E2F (82). La proteína E7 de VPHs-AR induce la degradación de pRb (24, 77), p107 (77) y p130 (77, 209). De esta forma, tras la unión a E7 y la degradación de pRb (p107 y/o p130), los factores E2F se liberarían, induciendo así la progresión del ciclo celular. A su vez, tras la expresión de E7 de VPH-AR, se estabiliza p53 y se incrementa los niveles del inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas p21. A pesar de que p21 es una diana transcripcional de p53 (59, 60), el aumento de p21 que se produce por E7 de VPH-AR, no es una mera consecuencia del aumento de p53 (99). La proteína p21 es regulador directo de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (83) y se une al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) impidiendo así la replicación el ADN mediada por este (210). Sin embargo, a pesar de la inducción de p21 mediada por E7 de VPH-AR, este no

es funcional. p21 tiene impedida la unión a PCNA y la capacidad de inactivar CDKs al unirse E7 por su extremo carboxilo terminal al dominio de unión de PCNA (74, 86), permitiéndose la progresión del ciclo celular en células que expresan E7 de VPH-AR (74, 97).

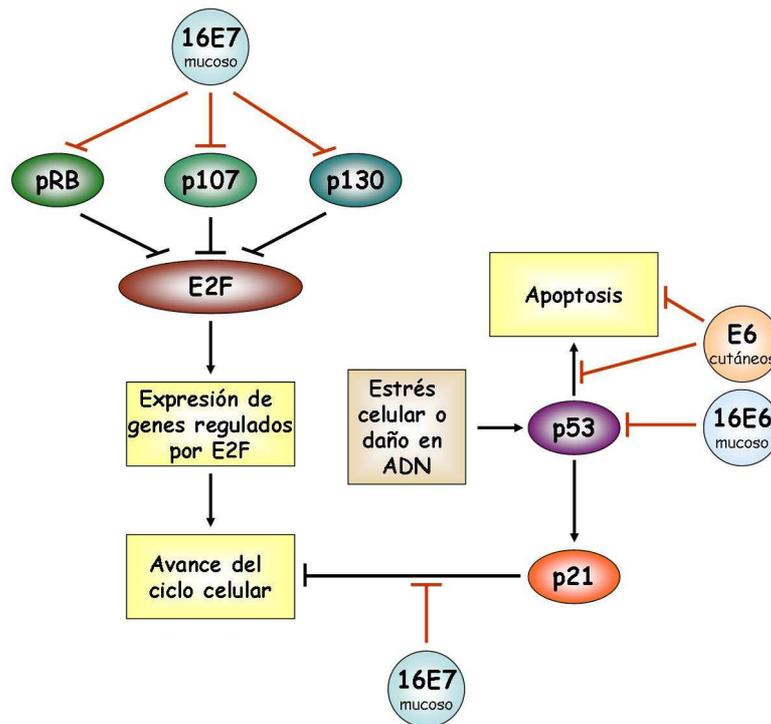


Figura 6. Interacción de las oncoproteínas virales con reguladores del ciclo.

Además de las interacciones de E7 con proteínas del ciclo celular (Figura 6), E7 tiene otras dianas implicadas en metabolismo o inestabilidad cromosómica favoreciendo así la progresión tumoral. La proteína E7 de VPH 16 es capaz de alterar el funcionamiento de la piruvato kinasa M2 (127), haciendo que estas células deriven su metabolismo principalmente a procesos glicolíticos en vez de fosforilación oxidativa (128). Este tipo de metabolismo es muy frecuente en muchos tipos de tumores (69). A parte de la activación de TERT y degradación de p53 mediada por E6 de VPH-AR, E7 de VPH-AR puede mantener una pequeña actividad telomérica en ausencia de E6 (178), induce duplicación de centrosomas (56) provocando múltiples centriolos inmaduros (55). Todo esto provoca una alta inestabilidad genómica en la célula, lo que

explicaría el desvalance cromosómico que hay en muchas de las patologías provocadas por VPH-AR (213).

### **1.8. Modelos experimentales de infección por VPH**

Son muchos los esfuerzos, especialmente en los últimos años, para desarrollar modelos de infección por VPH que ayuden a entender los mecanismos moleculares por los que el virus induce la tumorigénesis. Además, si dichos modelos reproducen fidedignamente las enfermedades asociadas a VPH, permitirían el ensayo de terapias preclínicas.

#### **1.8.1. Modelos de ratones transgénicos**

Diversas líneas de ratones transgénicos han permitido el estudio de las interacciones de las proteínas virales en el contexto de un organismo vivo.

##### **1.8.1.1. Ratones transgénicos que expresan genes de VPH 16**

Hace unos años se demostró que ratones transgénicos con los genes de VPH 16 bajo el control del promotor K14, que se expresa en la capa basal de epitelios estratificados, son susceptibles a progresión maligna, dando lugar a carcinomas e incluso metástasis, lo que evidenció la capacidad tumorigénica de VPH 16 (36). Los ratones K14-16E7 (87) presentan hiperqueratosis, hiperplasia, expansión de células con capacidad proliferativa y de células que expresan la queratina de diferenciación temprana, K10. El fenotipo en estos ratones se presenta en diversos epitelios como son la piel, el paladar, esófago, estómago anterior y en el cuello del útero. Los ratones k14-16E6 tienen hiperproliferación e hiperplasia, y desarrollan tumores en la piel en los animales adultos (175). Los tumores desarrollados son más malignos que los de los animales K14-16E7, lo que sugiere que E7 interviene en etapas tempranas de la carcinogénesis de piel, mientras que E6 participa más tarde, promoviendo la malignización.

A partir de estos ratones transgénicos, se han generado modelos de CC mediante tratamiento con estrógenos (158) y de CCECC mediante tratamiento con el carcinógeno químico 4-Nitroquinolina-N-Óxido asociado al tabaco (180). Estos

modelos han permitido establecer que el oncogén principal en la carcinogénesis de cérvix y de cabeza y cuello es E7 (más que E6) (158, 180), y también determinar que el fenotipo provocado por la expresión de E7 no sólo depende de la inhibición de pRb, aunque sí en su mayor parte (9-11, 180).

#### 1.8.1.2. Ratones transgénicos que expresan genes de VPH-EV

Además de la generación de animales que expresan alguna o varias proteínas virales de VPH-AR, se han creado líneas de ratones que expresan las proteínas de VPH cutáneos para analizar la relación de VPH cutáneos con cáncer de piel. Schaper y colaboradores (165), desarrollaron animales transgénicos que expresan las proteínas tempranas de VPH 8 (familia EV), en capa basal bajo el promotor de K14. La gran mayoría de los ratones desarrollan tumores benignos caracterizados por papilomatosis, acantosis, hiperqueratosis y varios grados de displasia. Algunos de los animales desarrollan carcinomas escamosos. Estos resultados son una de las primeras evidencias del potencial tumorigénico de VPH-EV. Por otro lado, se obtuvo un modelo que expresa las proteínas tempranas E6 y E7 de VPH 38 (VPH-EV) bajo el promotor de K10 en células de diferenciación temprana (53). Estos ratones presentan proliferación celular aumentada, hiperplasia y displasia en la epidermis. Aunque en estos animales no se desarrollan tumores espontáneos, sí aparecieron tumores tras procesos de carcinogénesis química con DMBA/TPA lo que demuestra que las proteínas E6 y E7 de VPH-EV provocan alteraciones en la piel que favorecen el desarrollo tumoral.

Los ratones transgénicos que expresan oncogenes de VPH han demostrado ser muy útiles para el estudio de la progresión neoplásica en los epitelios escamosos, y la implicación de las principales proteínas virales en carcinogénesis.

#### 1.8.1.3. Modelos animales deficientes en la familia del retinoblastoma

La piel de los animales deficientes en pRb en epidermis se caracteriza por una hiperplasia moderada, con aumento de proliferación, y alteraciones en la diferenciación e hiperqueratosis (161). A pesar de que pRb es un supresor tumoral, estos animales no desarrollan tumores espontáneos. Cuando se someten a carcinogénesis química (DMBA/TPA) en la piel, presentan un número menor de

tumores que ratones control, pero más malignos (161). La aparición de menos tumores está asociada a incremento de apoptosis, que genera una presión selectiva hacia la pérdida prematura de p53, responsable de la malignización de los tumores. Este resultado es coincidente con el hecho de que los tumores de piel de ratones K14-16E6 sean más malignos que los de K14-16E7, ya que 16E6 es capaz de inhibir p53 (175). Cuando pRb se inactiva en piel en un fondo deficiente para p107, los animales mueren poco después de nacer (112). Sin embargo, cuando la piel es trasplantada en ratones inmunodeficientes, se desarrollan carcinomas espontáneos altamente diferenciados. Este resultado ha llevado a nuestro grupo a proponer que p107 es un supresor tumoral en ausencia de pRb (112).

Estos ratones deficientes en proteínas del retinoblastoma y otros permiten establecer que la pérdida de pRb sólo, ó de pRb y p130 (111), ó de p107 y p130 (163) no es suficiente para inducción de tumores. Sin embargo, la pérdida simultánea de pRb y p107 es necesaria y suficiente para el desarrollo de carcinomas de célula escamosa en la piel. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos con animales k14-16E7, donde se ha demostrado que la carcinogénesis en piel inducida por 16E7 no sólo depende de la inactivación de pRb.

## **1.8.2. Cultivos organotípicos de piel humana**

Dado que la diana celular de VPH es el queratinocito humano, se han utilizado queratinocitos primarios humanos (QPH) transducidos con genes de VPH, con los cuales se regenera piel humana, que permite ser cultivada *in vitro* durante un período de 14-15 días.

### **1.8.2.1. Cultivos organotípicos que expresan genes de VPH mucosos**

Blanton y colaboradores elaboraron cultivos organotípicos con queratinocitos humanos transducidos con genes de VPH 16 (18). Estos cultivos demostraron que E6/E7 ó E7 recapitulan algunas características observadas en lesiones pretumorales tanto de epitelios queratinizados (queratinocitos de prepucio) como no queratinizados (queratinocitos de cuello de útero). Cabe destacar la hiperplasia y la presencia de células en proliferación en capas suprabasales. Resultados similares se han obtenido

con cultivos organotípicos de genes de VPH 18 (184). Cuando se expresa únicamente la proteína E7 de VPH 16 ó 18 se observa reentrada en fase S en células suprabasales que se están diferenciando y expresión de p53 en capas suprabasales, que sin embargo no induce parada del ciclo celular (18, 184). Además, en estudios donde se analizaron E7 de distintos VPH mucosos (tanto AR como BR), sólo la proteína E7 de VPH-AR fue capaz de inducir un fenotipo parecido al de lesiones VPH (184). Por otro lado, se ha comprobado que una versión mutada de E7 de VPH 18, incapaz de unir a pRb, no induce el fenotipo descrito de la proteína silvestre. Finalmente, Wang y colaboradores (195) han desarrollado recientemente un modelo de cultivo organotípico con VPH 18 que permite la amplificación y expresión del genoma completo. El método permite recapitular el ciclo del virus y la producción de viriones. Con este modelo se demostró que hay una prolongación de la fase G2 en células de la zona media y superior del estrato espinoso.

#### 1.8.2.2. Cultivos organotípicos que expresan genes de VPH cutáneos

Boxman y colaboradores (23) han comparado los efectos de la expresión de E6 y E7 de varios VPH-EV, así como de VPH 10 (cutáneo no EV) y VPH 16. Las alteraciones en procesos de diferenciación y proliferación que muestran las pieles artificiales con las proteínas de VPH 16 no se dan con las de VPH-EV ó VPH 10. Las proteínas E6 y E7 de VPH 5, VPH 12 y VPH 38 provocan desorganización de las capas que forman el epitelio y un ligero aumento de proliferación. En otro estudio se expresó las proteínas E6 y E7 (ó E7 sólo) de VPH 8, observándose aumento de proliferación y características de células con capacidad de migrar (4). Estos estudios y otros realizados con E6 y E7 de VPH-EV han mostrado alteración en los patrones de diferenciación, y aumento de proliferación que está restringida a las células de la capa basal. El uso de cultivos organotípicos ha permitido conocer qué genes virales son responsables de algunas alteraciones fenotípicas observadas en lesiones humanas asociadas a la infección, en un contexto tridimensional y con células humanas primarias. También ha permitido comprobar que los efectos producidos por VPH-AR son más importantes que los producidos por VPH-EV. Sin embargo, la principal limitación es que estos estudios están muy restringidos en el tiempo ya que el cultivo organotípico *in vitro* tiene una

corta duración (12-15 días), lo que dificulta el análisis de las consecuencias de la expresión de oncogenes virales a largo plazo, o el posible efecto terapéutico de nuevos tratamientos en un contexto *in vivo*.

### **1.9. Terapias anti-VPH**

Las verrugas cutáneas, dependiendo del tipo y localización, son más o menos fácilmente tratables. Existen diferentes medicaciones (como resina de podofilina, imiquimod, cantaridita, bleomicina, ácido salicílico, etc) así como procedimientos de extirpación como queratólisis, electrodesecación, criocirugía, curetaje, ó láser.

Las verrugas genitales (condilomas o condiloma acuminata) se tratan de manera muy similar, y al igual que pasa con las cutáneas, suelen remitir por sí solas. Sin embargo son altamente contagiosas, y pueden extenderse y reaparecer, convirtiéndose en una enfermedad recurrente que plantea problemas serios de extirpación repetida por cirugía.

La papilomatosis de laringe es una enfermedad recurrente que puede dar lugar a tumores. Sin tratamiento es potencialmente fatal por un crecimiento descontrolado, pudiendo obstruir las vías aéreas. Aparte de la cirugía tradicional o cirugía con láser, también se utiliza la terapia fotodinámica, e incluso quimioterapia. Tanto las verrugas genitales como la papilomatosis de laringe están provocadas por la infección, en la inmensa mayoría de los casos, de VPH 6 y 11.

El tratamiento más habitual para los cánceres anogenitales (CC, cáncer de pene, ano, vulva), para el CCECC y el CPNM consiste en cirugía, radioterapia y/o quimioterapia. Muchas lesiones o tumores de CPNM se eliminan a tiempo con cirugía. La respuesta al tratamiento, o la supervivencia depende del tipo de tumor, localización, tamaño, extensión a nódulos linfáticos o metástasis distal en el momento del diagnóstico. Los tumores de CCECC con infección por HPV tienen mejor pronóstico y mejor respuesta a tratamiento con radioterapia y quimioterapia.

Dado el papel que VPH tiene en el inicio y/o progresión de una proporción importante de estos tumores, es necesario diseñar terapias antitumorales dirigidas contra los oncogenes virales, contra posibles genes o microARN celulares que cooperen

en la carcinogénesis de VPH, o al restablecimiento de funciones/proteínas celulares antitumorales inhibidas por el virus (rutas p53 y/o pRb dependientes).

### **1.9.1. Test de Papanicolaou y vacunas preventivas anti-HPV**

La prueba de Papanicolaou (llamada así en honor de Georgios Papanicolaou, médico griego que fue pionero en citología y detección temprana de cáncer), también llamada citología de cérvix o citología vaginal, es un examen citológico en el que se toman muestras de células epiteliales en la zona de transición del cuello uterino, en busca de anormalidades celulares que orienten a (y no que diagnostiquen) la presencia de una posible neoplasia de cuello uterino. El Papanicolaou es una prueba de cribado que debe practicarse a todas las mujeres desde que inician su actividad sexual hasta los 65 años aproximadamente. La prueba de Papanicolaou es un examen barato, fácil y simple que cualquier médico puede realizar y que contribuye eficazmente al diagnóstico precoz del cáncer del cuello uterino. La muestra obtenida debe ser analizada por médicos especializados en anatomía patológica. El test de Papanicolaou se calcula que permite reducir la incidencia de CC en un 80% en países y regiones donde se utilizan generalmente.

En los últimos años se han desarrollado vacunas preventivas contra VPH y están integradas dentro del calendario de vacunación del 2011 de la Asociación Española de Pediatría. La vacunación se realiza a todas las niñas con edades comprendidas entre los 11 y 14 años, repartidas en 3 dosis (2). Las vacunas comercializadas contienen partículas virales atenuadas (VLPs) de la proteína L1 de cápsida de los VPH de tipo 16 y 18 (Cervarix-GlaxoSmithKline) y además la de los tipos 6 y 11 (Gardasil-Merck). VPH 6 y 11 son responsables de la mayoría de verrugas genitales y papilomatosis de laringe, lesiones muy frecuentes (153). El desarrollo de vacunas preventivas contra los VPH cutáneos sería mucho más difícil ya que: i) suelen producir infecciones múltiples; ii) establecer la vacunación antes de la infección es complicado dado que se puede contagiar a edades muy tempranas; iii) no existen tipos específicos de VPH-EV asociados a la mayoría de lesiones, lo que implica hacer vacunas multivalentes (más de 4-6 VPHs) para proteger a un porcentaje significativo de lesiones y tumores en piel.

### 1.9.2. Futuras terapias

A pesar de la efectividad de las vacunas contra VPH 16 y 18, sigue siendo necesario el desarrollo de nuevas terapias menos invasivas que la cirugía y más eficaces que las que hay actualmente para aquellas personas que ya estén infectadas

Se trata por tanto de vacunas profilácticas y no terapéuticas. Por ello, se están investigando inmunoterapias que puedan tener una función protectora y también terapéutica, en lesiones pretumorales tipo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (101). Por otro lado, se ha demostrado eficacia de terapias basadas en ARN de interferencia, péptidos, o aptámeros de ARN en células en cultivo o en ratones transgénicos (30, 80, 89, 141, 191). La eficiencia, toxicidad o efectos secundarios de la utilización de éstas posibles terapias deben ensayarse adecuadamente en modelos *in vivo* adecuados antes de ser ensayados clínicamente.

### 1.9.3. Testado de VPH y marcadores moleculares de displasia cervical y carcinomas

Aunque el test de Papanicolau es altamente efectivo, su especificidad es limitada en lesiones clínicamente importantes con anomalías citológicas de bajo grado. Hasta un 25% de los pacientes podría tener un resultado de falso negativo según dicho test. Por tanto, es necesario desarrollar nuevos métodos que predigan con mejor precisión la existencia de lesiones importantes a partir de tests no invasivos. Varios son los métodos que han sido descritos para detectar la presencia de VPH en carcinomas o displasias cervicales. Algunos están basados en hibridación directa, como hibridación *in situ* o como el test llamado *Hybrid Capture 2* (prueba digene HPV, Qiagen). Otros están basados en PCR, bien con cebadores específicos de subtipos de VPH, bien con cebadores degenerados que detectan múltiples VPH a la vez. Finalmente, existen métodos basados en diferentes tecnologías, como puede ser *Luminex xMap*, *Third Wave Invader HPV Assay*, *DNA Chip Gen\_Probe Aptima*, *Viral Load/Real Time PCR PreTect HPV-Proofer*, *CINtec* (IHC, p16INK4a) ó *ProExC* (TOP2A/MCM) (para una revisión ver referencia 50). El único aprobado por la FDA es *Hybrid Capture 2*, que cuando se combina con la citología, presenta una sensibilidad para detección de lesión cervical de alto grado y para cáncer del 100%. La sensibilidad

y especificidad así como la validación clínica de su utilidad, es diferente para cada uno de los otros tests. A destacar es el uso de CINtec, un test basado en la detección de la proteína p16INK4a mediante inmunohistoquímica. En numerosos estudios se ha demostrado que dicho test incrementa la precisión del diagnóstico de NIC de alto grado (16).

Finalmente, varios son los estudios que se han realizado sobre expresión génica global (29, 37, 125, 138, 154, 160, 164, 167, 173, 201, 202, 208) o expresión de ARN micro (115, 120, 124, 147, 198) mediante el uso de biochips (o microarrays) o PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Mediante estos análisis se han podido estudiar en más detalle los mecanismos moleculares de inducción tumoral a partir de VPH-AR, la desregulación de genes/rutas que tiene lugar durante el proceso tumoral, el perfil de expresión génica de CC y CCECC infectados con HPV-AR, y los perfiles asociados a parámetros clínicos con carácter predictivo. Estos estudios permiten, además, conocer posibles biomarcadores de la enfermedad asociada a VPH, con posible aplicación práctica en la clínica, y describir posibles diana para búsqueda de terapias antitumorales. Finalmente, la utilización de biochips (de ARN mensajero o micro ARN) en modelos de análisis de VPH (ratones transgénicos, cultivos tridimensional, u otros) posibilitaría, por un lado la validación de dichos modelos, y por otro ensayar y validar preclínicamente nuevas terapias anti-VPH



## 2. OBJETIVOS



1. Determinar si la proteína temprana E7 del VPH 5 de la familia EV (5E7) se une al supresor tumoral pRb
2. Determinar si 5E7 afecta a la estabilidad de las proteínas de la familia del retinoblastoma, y comprobar si el mecanismo de acción es similar al descrito para la proteína E7 de VPH 16 (16E7)
3. Comprobar si el motivo LxCxE de unión a la familia del retinoblastoma que conserva 5E7 es necesario para afectar a su estabilidad
4. Elaborar modelos *in vivo* de piel humana regenerada y transplantada sobre ratones inmunodeprimidos *nu/nu* que expresen los genes 5E7 y 16E7 mediante transducción retroviral
5. Analizar el fenotipo de los trasplantes obtenidos mediante análisis histológico con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica, para determinar el efecto de la expresión de E7 en la organización histológica de la epidermis, la diferenciación epitelial, la proliferación celular, y la apoptosis
6. Comparar el fenotipo de los trasplantes obtenidos con lesiones pretumorales o carcinomas humanos asociados a VPH mediante el uso de biomarcadores previamente descritos (bien mediante inmunohistoquímica, expresión génica o de micro ARNs) para validar los trasplantes como modelo de análisis y de ensayo preclínico de terapias anti-VPH
7. Análisis de moléculas con carácter terapéutico que puedan ser capaces de prevenir la interacción de E7 con sus dianas celulares



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS



### 3.1. Clonajes

Para la expresión de las proteínas E7 en células eucariotas se realizaron clonajes en el vector de expresión pcDNA 3.1(-) (Invitrogen) y en el vector retroviral pLZR-IRES-eGFP. El vector retroviral fue obtenido a partir del vector pLZRS (103, 205) modificado por el laboratorio del CIEMAT (113). Los genes E7 se clonaron en pGEX-2T (Amersham Biosciences), obteniéndose la fusión N-terminal con glutathion S-transferasa (GST) con el objetivo de hacer ensayos de unión proteína-proteína entre E7 y algunas de sus dianas celulares. Esta construcción permite la expresión de las proteínas E7 al expresarse en bacterias y su posterior purificación mediante unión de GST a columnas de glutathion.

Los tratamientos con endonucleasas de restricción utilizadas para el clonaje y chequeo de los clones obtenidos se llevaron a cabo con los tampones y condiciones recomendadas por la empresa fabricante (New England Biolabs). En algunos casos fue necesario tratar con Klenow (Roche) para la obtención de extremos romos a partir de extremos cohesivos mediante la incorporación de dNTPs (Invitrogen). Las purificaciones de los fragmentos de clonaje y los plásmidos cortados se realizaron mediante el kit de purificación *Illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band* (GE Healthcare). Los plásmidos cortados utilizados para el clonaje se trataron con la fosfatasa alcalina SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*, Roche) antes de proceder a la ligación para defosforilar los extremos 5' y evitar su autoligación. Las ligaciones se realizaron con la enzima Ligasa de ADN T4 (Invitrogen). Los plásmidos resultantes de las ligaciones se transformaron en bacterias químicamente competentes (Dominion MBL). Para el chequeo del clonaje de los insertos, el ADN plasmídico fue purificado con el kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). El adecuado clonaje de los fragmentos en las dianas elegidas de los plásmidos se analizó cortando con enzimas de restricción que dan un patrón de bandas diferencial. Los fragmentos se examinaron por electroforesis en geles de agarosa/TBE 0.5X y 1µg/ml bromuro de etidio, junto con los marcadores de 100-bp y 1-Kb (Invitrogen), visualizándose en transiluminador de luz ultravioleta Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio Rad). Una vez seleccionados los clones que daban un patrón de bandas correcto, se analizaron por secuenciación.

Las enzimas y kits indicados anteriormente fueron utilizados con los tampones y condiciones recomendadas por los fabricantes.

### **3.1.1. Clonaje de epítipo Flag y genes E7 en el plásmido pcDNA3.1(-)**

Para expresar los genes E7 en células eucarióticas transfectadas, se decidió clonarlos en el vector comercial pcDNA3.1(-). Dicho vector permite la expresión de genes insertados en el sitio de policlonaje a partir del promotor eucariótico de citomegalovirus (pCMV).

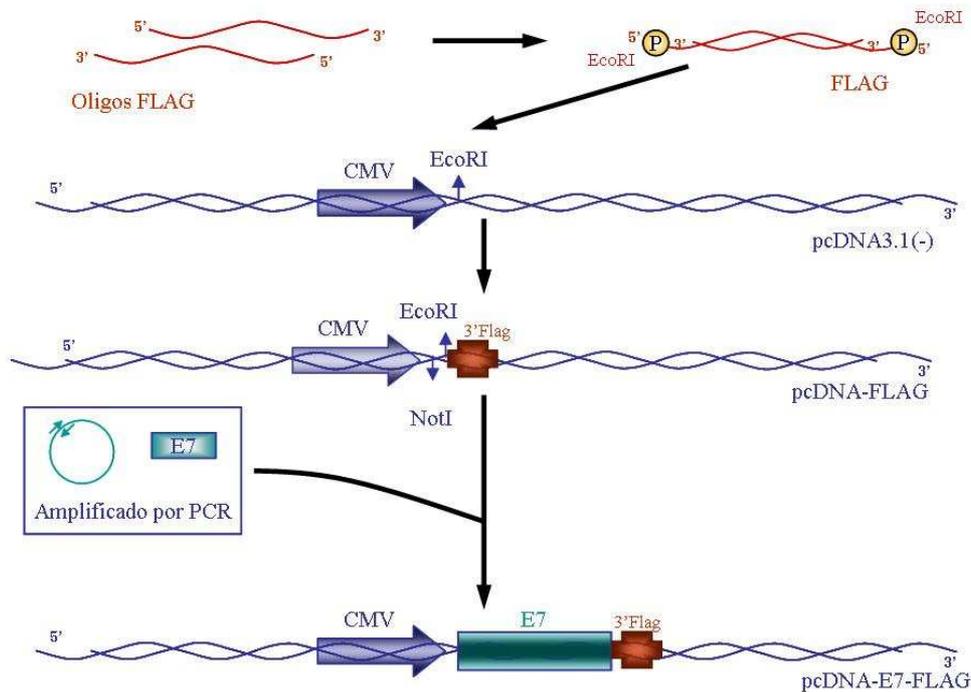
Dada la ausencia de anticuerpos comerciales para la inmunodetección de la proteína E7 de VPH 10 y de VPH 5, se hicieron fusiones entre la proteína viral (incluido de VPH 16) y el epítipo Flag. A la secuencia Flag se le añadió un codón de terminación y el clonaje se hizo para que el epítipo quedara en el extremo carboxilo terminal de las proteínas E7.

Para clonar Flag en pcDNA3.1(-), tras hibridar dos oligonucleótidos complementarios (Tabla 1) (con extremos cohesivos compatibles con EcoRI), se fosforilaron sus extremos con la polinucleótido quinasa de T4 (New England Biolabs) según las condiciones recomendadas por la casa comercial. Posteriormente fueron ligados con el plásmido previamente cortado con el enzima de restricción EcoRI. Dado el pequeño tamaño del inserto a clonar, se hicieron ligaciones con diluciones seriadas de los oligonucleótidos hibridados. A partir de la dilución óptima, considerando el número de colonias por cada placa, se seleccionaron los clones de aquella placa que teóricamente tendría el menor número de plásmidos con inserciones en tándem. Para asegurar que los plásmidos con inserto seleccionados sólo han incorporado una copia del inserto, se chequearon por PCR utilizando oligonucleótidos complementarios a secuencias del plásmido que amplifican el inserto (oligonucleótidos T7 y reverso de la Tabla 1). Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa/TBE 0.5X y 1µg/ml bromuro de etidio. Se eligieron tres clones y se secuenciaron.

Una vez generado el vector pcDNA-Flag, se realizó el clonaje de los genes E7 en dicho vector.

Mediante oligonucleótidos cebadores específicos (Tabla 1), se amplificaron los distintos E7 de VPH por PCR (2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,15 ng/μl oligo, 2 unidades Taq (Promega), 0,1 ng plásmido molde). Los plásmidos molde utilizados fueron pcDNA3-10E7, pBP-5E7 y pBP-16E7 cedidos por el Dr. A. Storey (Cancer Research UK, Londres, Reino Unido).

Los oligonucleótidos incluyen en sus extremos 5' sitios de reconocimiento de enzimas de restricción para permitir el clonaje de los productos de PCR. Además, los cebadores de la zona 3' de cada gen carecen del codón de terminación, para impedir la terminación de la traducción antes de la incorporación del epítipo Flag inmediatamente detrás. Así, VPH 10E7 se clonó NotI/EcoRI, y VPH 5E7 y 16E7 se clonaron en sitio EcoRI (Figura 7). En el caso de 5E7 se elimina la diana BamHI (que se encuentra dentro del gen) al cambiar "GGATCC" por "GGATCA", que es una mutación puntual silenciosa.



**Figura 7. Clonaje del epítipo Flag y los distintos E7 en pcDNA3.1 (-).** Se hibridaron oligos complementarios con la secuencia del epítipo y se clonaron en sitio EcoRI de pcDNA3.1(-) formándose pcDNA-Flag. Posteriormente se amplificó por PCR los distintos E7, y se clonó 10E7 en sitio NotI/EcoRI, y 5E7 y 16E7 en EcoRI de pcDNA-Flag.

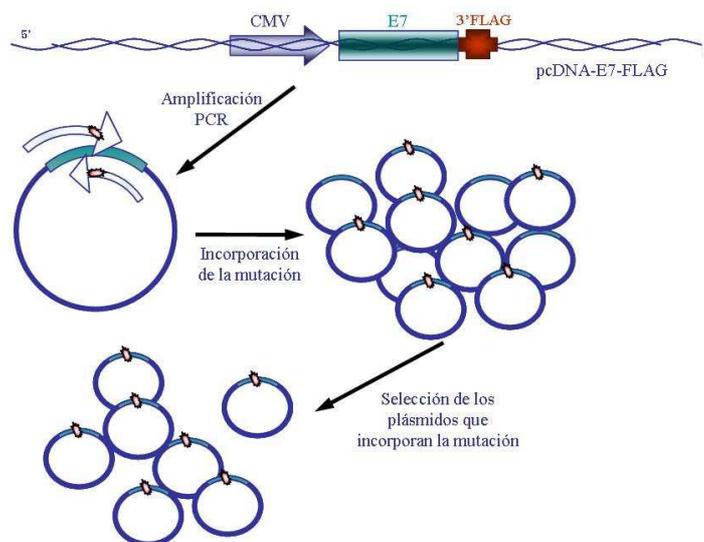
### 3.1.2. Generación de mutantes de E7

Se han obtenido los mutantes  $\Delta$ DLYC<sub>16E7</sub> y  $\Delta$ DLFC<sub>5E7</sub> de VPH 16 y VPH 5 respectivamente. Estos mutantes tienen deletado gran parte del motivo LxCxE de unión a proteínas pocket, como son pRb, p107 y p130 (Figura 8). El mutante  $\Delta$ DLYC<sub>16E7</sub> ha sido previamente descrito (151).

HPV10 (c)	MHGPHPTVKDIEL.SL	.....APED.I.	PVCNV	QL.....D....E.E.D.	31
HPV16 (m)	MHGDTPTLHEYML.DL	.....QPETT.D	LVCYE	QL.N.....D...SSEEE.DE	37
HPV5 (c)	MIGKEVTVQDIIL.EL	SEVQPEVLP.VD	LFC EE	ELPN.....EQ.ETEEEPD.	44
			LXCXE		

**Figura 8. Alineamiento de los genes E7 de VPH 10, 5 y 16 en la zona mutada.** Se muestra la secuencia del dominio CR2 de las proteínas E7 de VPH. La zona en naranja fue deletada en 16E7 ( $\Delta$ DLYC) y 5E7 ( $\Delta$ DLFC). c: VPH cutáneo y m: VPH mucoso.

Para la obtención de los mutante de los genes E7, se utilizó el kit *Quick Change Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene), basado en la amplificación por PCR sobre plásmidos pcDNA3.1 (-) que contienen las versiones silvestres de los genes E7 (unidas al epítipo Flag y descritos en el apartado 3.1.1), utilizando oligonucleótidos cebadores (Tabla 1) que incorporan las mutaciones especificadas (Figura 9). Las condiciones de amplificación de PCR, así como el diseño de los oligonucleótidos se realizó según las recomendaciones de la casa comercial. Tres clones de cada mutante fueron chequeados por secuenciación.



**Figura 9. Obtención de los mutantes.** Se incluyeron las mutaciones deseadas mediante la amplificación por PCR empleando oligos específicos que incorporaban la mutación.

### 3.1.3. Clonajes en pGEX-2T

Para realizar ensayos de unión entre E7 y otras proteínas, decidimos utilizar fusiones con glutatión-S-transferasa (GST). Para ello se clonaron los genes E7Flag a partir de los plásmidos pcDNA-E7-Flag generados anteriormente (apartado 3.1.1) en el vector de expresión pGEX-2T (Amersham Biosciences). VPH 5E7 y 16E7 se clonaron EcoRV/PmeI en el sitio SmaI de pGEX-2T (Figura 10). Dado que las ligaciones se hicieron con extremos romos, se chequeó la orientación adecuada del gen E7Flag. Además se seleccionaron solo los clones en los que GST y E7Flag estaban en la misma fase de lectura.

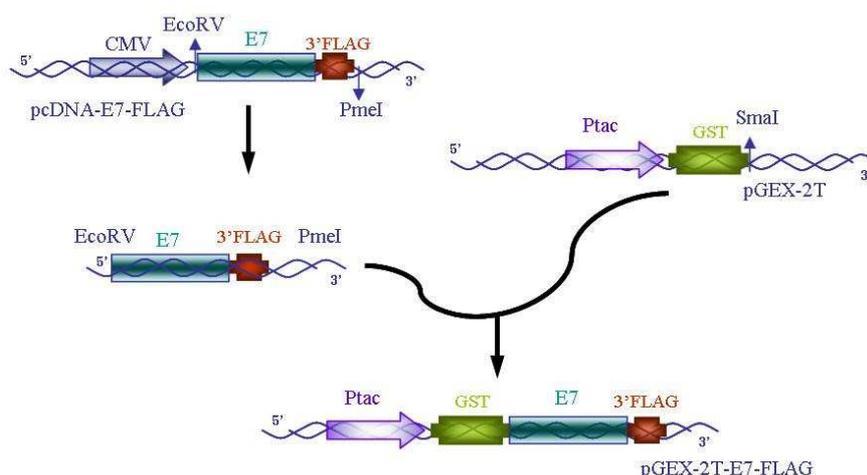


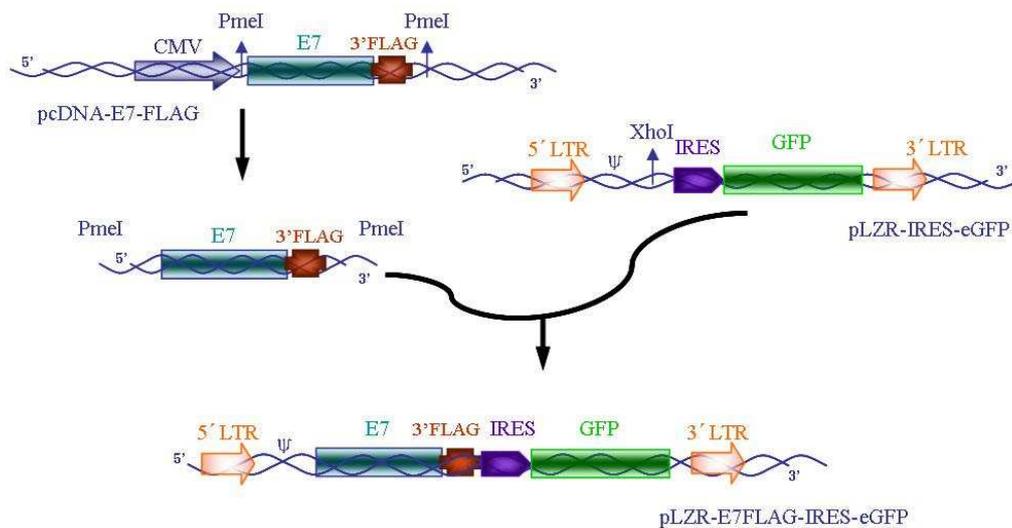
Figura 10. Clonaje de los E7s en pGEX-2T. Los genes E7Flag de VPH 5 y VPH 16 se clonaron a partir de los plásmidos pcDNA-E7-Flag extrayendo con EcoRV/PmeI en el sitio SmaI de pGEX-2T.

### 3.1.4. Clonajes en el vector retroviral pLZR-IRES-EGFP

Con el fin de hacer infecciones retrovirales en cultivos de queratinocitos primarios humanos (QPH), fueron clonados los genes E7Flag de VPH 5 y 16 en el vector retroviral pLZR-IRES-eGFP. La transducción de las células diana con retrovirus obtenidos a partir de dicho vector permite la expresión de los genes E7Flag a partir del mismo ARNm que el gen de la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP). De esta forma, la traducción de E7 se realiza a partir del extremo 5'-cap del ARNm maduro,

mientras que la traducción de eGFP se produce a partir de la secuencia IRES (*Internal Ribosome Entry Site*). Esto permite la monitorización de la expresión de E7 mediante la visualización de fluorescencia verde. La transcripción de los genes de E7Flag y eGFP se produce utilizando como promotor la secuencia LTR del virus de la leucemia murina de Molony, activo en QPHs.

Para realizar el clonaje, se extrajeron los fragmentos de E7Flag a partir de los plásmidos pcDNA-E7-Flag (descritos en apartado 3.1.1). En todos los casos, las fusiones E7Flag se cortaron con PmeI y fueron clonados en el vector pLZR-IRES-eGFP en el sitio XhoI tras haber sido tratado con la enzima Klenow (Roche) (Figura 11). Dado que las ligaciones se hicieron con extremos romos, se chequeó la orientación adecuada del gen E7Flag mediante secuenciación.



**Figura 11. Clonajes en el vector pLZR-IRES-EGFP.** Los genes E7Flag de VPH 5 y VPH 16 se clonaron a partir de los plásmidos pcDNA-E7-Flag extrayendo con PmeI en el sitio XhoI de pLZR

### 3.1.5. Oligonucleótidos utilizados durante los clonajes

Utilizado para:	Nombre	Secuencia
Clonaje Flag	Flag.Eco-f	AATTCGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAAC
pcDNA3.1(-)	Flag.Eco-r	AATTGTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCG
Clonaje E7s por PCR en pcDNA3.1(-)-Flag	VPH 10-f	GCGCGCGGCCGCAATGCACGGTCCGCATCCC
	VPH 10-r	GCGCGAATTCACGCAGCGAGGACACAC
	VPH 5-f	GCGCGAATTCATGATTGGTAAAGAGGTC
	VPH 5-r	GCGCGAATTCTGATCCGTCATGTTTGCAG
	VPH 16-f	GCGCGAATTCATGCATGGAGATACACCT
	VPH 16-r	GCGCGAATTCTGGTTTCTGAGAACAGAT
Oligonucleótidos mutantes	1.5f2	GCAGCCCGAAGTGCTACCAGTTGAAGAGGAATTACCAAACGAGC
	1.5r2	GCTCGTTTGGTAATTCCTCTTCAACTGGTAGCACTTCGGGCTGC
	1.16f2	GATTTGCAACCAGAGACAACCTTATGAGCAATTAATGACAGC
	1.16r2	GCTGTCATTTAATTGCTCATAAGTTGTCTCTGTTGCAAATC
Secuenciación pcDNA 3.1(-)	Reverse	GGCAAACAACAGATGGCTGG
	T7	ATACGACTCACTATAGGGAG
Secuenciación pGEX-2T	GEX-f	GGGCTGGCAAGCCAGTTTGGTG
	GEX-r	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
Secuenciación pLZR-ires-eGFP	Lzrgpf_f	ACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATC
	Lzrgpf_r	CGGCCTTATTCCAAGCGGCTT

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el clonaje y secuenciación de los plásmidos obtenidos

Los oligonucleótidos se obtuvieron de Isogen Life Science (Holanda).

## 3.2. Ensayos de unión proteína-proteína

### 3.2.1. Purificación de fusiones E7-GST

Para la purificación de las proteínas E7Flag fusionadas a GST, se transformaron las bacterias competentes BL21 (DE3) pLysS (Promega) con 10-100 ng de los plásmidos pGEX-5E7-Flag y pGEX-16E7-Flag (descritos en apartado 3.1.3). También se realizaron transformaciones con el vector pGEX-2T para purificar GST. Con cada una de las colonias seleccionadas (al menos 4 colonias por transformación) se puso un cultivo de 2 ml de LB y 150 µg/ml de ampicilina a 37°C en agitación, hasta que la densidad óptica a 600 nm esté entre 0,6 y 0,8 (D.O. 600 = 0,6-0,8). Se indujo con 0,1 mM de IPTG y se incubó el cultivo durante otras 2 horas. Se centrifugaron las bacterias a 4°C y se resuspendieron en PBS. Las bacterias se sonicaron (Bioruptor® UCD-200) en 3 ciclos de 30 segundos con intervalos de reposo en hielo. El lisado de bacterias se centrifugó durante 5 minutos a 4°C y al sobrenadante se le añadió glutatión-sefarosa (Amersham Biosciences) preparada al 50% en PBS según las recomendaciones de la casa comercial.

Se mantuvo en agitación suave a temperatura ambiente durante 5 minutos y se realizaron 3 lavados con PBS. Para liberar las proteínas fusionadas a GST del glutatión-seferosa, se añadió tampón de elución (50 mM TrisHCl y 10 mM Glutatión reducido, pH=8). Una vez eluidas las proteínas E7-GST, se chequearon los extractos mediante electroforesis en gel SDS-PAGE 4-12% (Invitrogen) y tinción del gel con Azul de Coomassie.

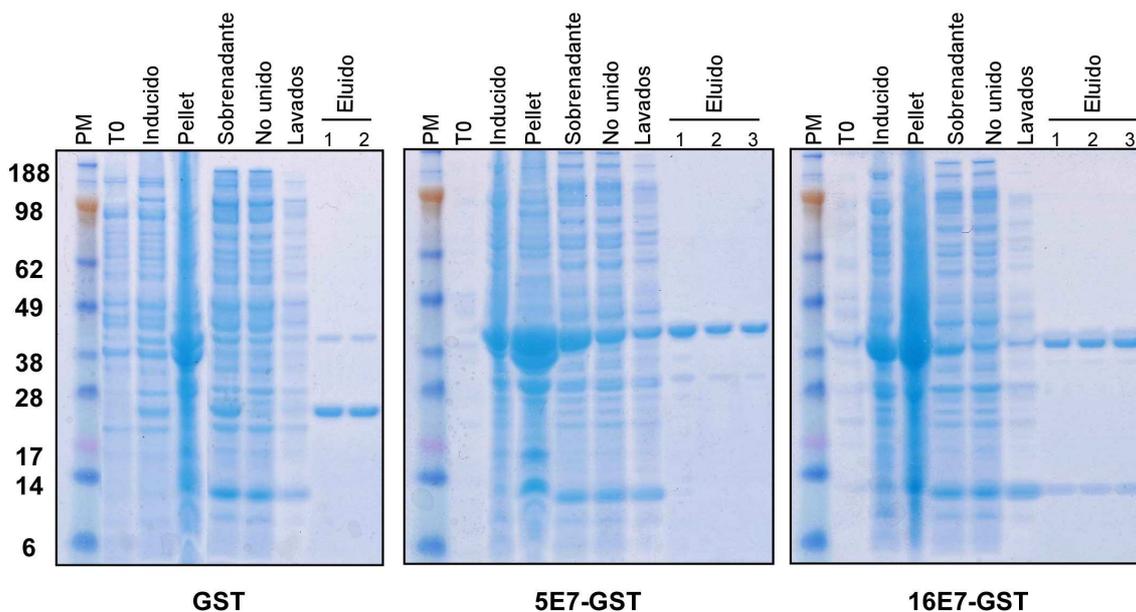
Con los clones seleccionados como óptimos para la obtención de las proteínas, se procedió a la purificación de proteínas fusionadas con GST a gran escala.

De cada clon se preparó un cultivo de 50 ml en LB con 150 µg/ml de ampicilina que se incubó durante la noche a 37° C, posteriormente se diluyó para obtener una densidad óptica de 0,4 a 600 nm (D.O. 600nm = 0,4) y se dejó incubando una hora más a 37° C. Tras ese tiempo, se indujo la producción de las proteínas con IPTG 1 mM y se mantuvo a 37° C en agitación. 4 horas después de la inducción del cultivo, cuando la densidad óptica a 600 nm alcanzó 0,6 (D.O. 600 = 0,6), se centrifugaron las bacterias a 6.000 G durante 15 minutos a 4° C. El precipitado se resuspendió en tampón de lisis (1X PBS, 10 mM EDTA, 1 mg/ml Lisozima, 1 mM PMSF y 20 µg/ml Benzamidina) y se incubó a 4° C durante 20 minutos. Se añadió DTT hasta una concentración de 5 mM y Tritón X-100 al 1%. Se mantuvo 10 minutos a 4° C y luego se sonicó tres veces a intervalos de 30 segundos, manteniendo las muestras en hielo. Las muestras sonicadas se centrifugaron a 8.000 G durante 15 minutos para separar el sobrenadante donde se encontraban las proteínas GST, y los precipitados. A partir del sobrenadante se purificaron las proteínas utilizando el equipo Profinia™ (Bio-Rad) con las columnas, tampones y programa *GST and Desalting* que permitió purificar las proteínas que están fusionadas a GST en tampón PBS (Tabla 2).

Proteína	GST	5 E7	16 E7
mg totales	11,7	3,9	5,9

**Tabla 2. Rendimiento de purificación de las proteínas**

Se tomaron alícuotas de las muestra en distintos puntos de la extracción para corroborar que la proteína de interés estaba principalmente en el sobrenadante y que la extracción se había realizado correctamente. Estas muestras se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE 4-12% (Invitrogen) y tinción del gel con Coomassie (Figura 12).



**Figura 12. Purificaciones con GST.** Análisis de las purificaciones de las proteínas fusionadas a GST mediante electroforesis SDS-PAGE 4-12% y teñidas con Azul de Coomassie

### 3.2.2. Ensayo de unión a pRb

Para comprobar si las proteínas E7 de VPH 5 y VPH 16 se unen al supresor tumoral pRb, se utilizó extracto total de proteínas de la línea celular HaCaT que expresan normalmente la proteína pRb en Tampón de Lisis (20 mM Tris HCl pH=7,5, 0,6 mM EDTA, 70 mM NaCl, 0.1% NP-40 e inhibidores de proteasas (Roche)).

Las proteínas E7-GST y GST purificadas se unieron a glutatión (Amersham Biosciences) según el protocolo establecido por la casa comercial.

Un total de 20  $\mu$ g de proteínas GST (unidas glutatión) se incubaron con 400  $\mu$ g de proteínas procedente del lisado de HaCaT a 4<sup>o</sup> C y en agitación durante una hora. Trascurrido este tiempo se dejó que las proteínas unidas precipitaran por gravedad y

posteriormente una pequeña centrifugación de 5 segundos a 4° C. El sobrenadante fue retirado y al precipitado se le añadió Tampón de unión (20 mM Tris HCl pH 7,5, 0,6 mM EDTA, 70 mM NaCl, 0.01% NP-40 e inhibidores de proteasas (Roche)). El proceso de precipitación y resuspensión se repitió 4 veces.

Finalmente se analizaron las muestras mediante separación en SDS-PAGE 10% y *western blot* incubando con los anticuerpos para la detección de GST y pRb (ver apartado 3.8.1).

### **3.2.3. Obtención del aptámero A2**

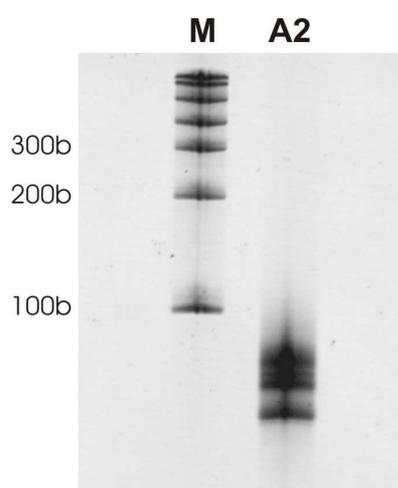
La amplificación del aptámero A2 se realizó *in vitro* durante 3 horas a 37° C a partir de 1µg de ADN molde del aptámero (TGATAATACGACTCACTATAGGGAATG GATCCACATACTACGAAT-N<sub>30</sub>-TTCAGTGCAGACTTGACGAAGCTT) cedido por la Dra. N. Stonehouse (University of Leeds, Reino Unido) que fue transcrito a ARN (40 mM Tris-HCl pH=7,9, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 2 mM espermidina, 0,2 mM ATP y 0,2 mM GTP (Amersham Biosciences), 0,2mM 2'-fluoro-UTP y 2'-fluoro-CTP (TriLink Biotechnologies), 2 unidades de pirofosfatasa inorgánica de levadura (YIP, Sigma Aldrich) y 20 unidades de ARN polimerasa de T7 (Fermentas)). Tras la reacción de amplificación, se eliminó el ADN del molde mediante tratamiento durante 30 minutos a 37° C con 2 unidades de ADNasa I libre de ARNasa (Promega).

El exceso de nucleótidos de la reacción se retiró mediante columnas *NucAway spin colum* (Ambion).

El aptámero de ARN amplificado tuvo que ser purificado para eliminar las enzimas de la reacción. Para esto se realizó una purificación con Fenol:Cloroformo y una posterior precipitación con etanol. Brevemente, se añadió a la reacción el mismo volumen de fenol, se mezcló y se centrifugó a 14.000 G durante 3 minutos a 4° C, separándose así en dos fases. Se tomó la fase acuosa, que es en la que está disuelto el aptámero de ARN, y se descartó la fase orgánica. Esto se repite al menos dos veces. Se añade el mismo volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma), se mezcla y se centrifuga durante unos segundos a 14.000 G a 4° C tomando la fase acuosa y descartando siempre la fase orgánica, este paso se repitió al menos dos veces. A la

fase acuosa se le añadió 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M pH=5,2 y 2,5 veces el volumen de etanol 100%. Se mezcló, se dejó durante una hora a  $-80^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se centrifugó a 14.000 G durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado obtenido se lavó con etanol 70% previamente enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y centrifugando durante 3 minutos a 14.000 G a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después de haber dejado secando el precipitado, se resuspendió en agua libre de ARNasa.

Para comprobar la eficiencia del proceso y la calidad del aptámero se midió su concentración con espectrofotómetro ND-1000 V3.3 (*NanoDrop Technologies*) y se utilizó una alícuota del aptámero y el marcador *Ribo Ruler Low Range RNA ladder* (Fermentas) para resolverlos mediante electroforesis en gel de Bis-Acrilamida 12% (Severn Biotech Ltd). La visualización del ARN se hizo en transiluminador de luz ultravioleta tras incubar con *SYBR® Safe DNA gel stain* (Invitrogen) durante 10 minutos a temperatura ambiente (Figura 13)



**Figura 13. Análisis de la calidad del aptámero.** Análisis por electroforesis Bis-Acrilamida 12% permite ver el aptámero y los subproductos. La banda superior corresponde al aptámero (72b), el resto de bandas son productos inacabados de la amplificación

En este proceso, todos los reactivos utilizados, así como las pipetas y la zona de trabajo estaban libres de ARNasas para evitar la degradación del aptámero de ARN.

### **3.3. Cotransfecciones en Saos2**

Se ha utilizado la línea celular Saos2 (osteosarcoma humano), obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection). Esta línea celular expresa una proteína no funcional del retinoblastoma humano (pRb) debido a una delección. Esto le confiere un

bajo peso molecular (171) convirtiendo a esta línea en una herramienta idónea para este estudio, ya que es permite analizar exclusivamente el comportamiento de la proteína transfectante.

### **3.3.1. Mantenimiento de la línea**

Las células Saos2 se siembran en monocapa en Medio Completo (DMEM-Glutamax (GIBCO), 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBi) (BioWhitaker) y 1% de antibiótico-antimicótico (GIBCO)). Se incuban a 37° C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada dos ó tres días en función de la actividad metabólica celular. Las células se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaron un 90% de confluencia, momento en que se levantaron de la placa con tripsina-EDTA (Sigma).

Para su preservación, las células se congelan en nitrógeno líquido. El medio de congelación está compuesto por SFB y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10% (v/v).

### **3.3.2. Cotransfecciones con vectores de expresión eucariota en Saos2**

Las cotransfecciones realizadas en Saos2 se hicieron cuando las células estaban en estado de preconfluencia en placas de 10 cm. Para transfectar con FuGENE HD (Roche), se prepararon distintas mezclas de plásmido según el ensayo, de manera que hubiera 14,3 µg de ADN plasmídico por cada transfección, a una concentración final de 0,2 µg/µl disuelto en DMEM sin complementar:

- 2,6 µg pcDNA-mycRb cedido por Dr. S. Mitnacht (Cancer Research UK, Reino Unido) o pCMV-HA-p107 cedido por el Dr. L. Zhu (Albert Einstein College of Medicine, EEUU)
- 0,65 µg de pcDNA-eGFP cedido por el Dr. A. Storey (Cancer Research UK, Reino Unido)
- 7,8 µg de pcDNA-E7-Flag, pcDNA-E7-Flag mutantes o bien el vector pcDNA-Flag (carece de E7) como control (descritos en apartados 3.1.1 y 3.1.2)
- 3,25 µg de pcDNA-Flag (para completar los µg necesarios para la transfección)

Se añadieron 4  $\mu$ l de FuGENE HD por cada  $\mu$ g de ADN, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, para finalmente incorporar la mezcla correspondiente de plásmidos al medio de cada placa. Las transfecciones se dejaron incubando durante 48 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.3.3. Tratamientos con Inhibidor del proteasoma

Los tratamientos con el inhibidor de proteasoma MG132 (BIOMOL) fueron llevados a cabo a las 40 horas de la transfección. El inhibidor de proteasoma (diluido en DMSO) se añadió al Medio Completo hasta obtener las concentraciones finales de cada ensayo (10, 20 y 40  $\mu$ M) en el volumen final. Para demostrar que el vehículo no tiene ningún efecto a las dosis utilizadas, se añadió el mismo volumen de DMSO a placas control.

### 3.3.4. Tratamientos con Aptámero

Los tratamientos con aptámero A2 consisten en una segunda transfección con el aptámero A2 (en apartado 3.2.3) utilizando Oligofectamina (Invitrogen) tras 24 horas de haber realizado la cotransfección con pcDNA-mycRb, pcDNA-eGFP y los vectores de los distintos E7.

Para transfectar con oligofectamina es necesario que las células estén sin suero, por tanto, se retira el medio a las células transfectadas a las 24 horas, se lavan con PBS para eliminar los posibles restos de suero y se sustituye por medio DMEM sin complementar.

La preparación de la mezcla de transfección consiste en la formación del complejo Oligofectamina-Aptámero para lo que primero se realizan las mezclas:

- Aptámero (concentración final 200 nM) y DMEM hasta 437,5  $\mu$ l
- 7,5  $\mu$ l de Oligofectamina y 30  $\mu$ l de DMEM incubando 10 minutos

Posteriormente se unen las dos mezclas y se deja incubando nuevamente 20 minutos para que se forme el complejo. Luego se añade al medio de las células y tras 4

horas de incubación a 37°C en atmósfera humidificada y 5% CO<sub>2</sub>, se añade DMEM suplementado con 30% SFBi.

Se dejaron incubando durante 24 horas más a 37° C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.4. Infecciones retrovirales**

Las infecciones retrovirales se han realizado en QPH obtenidos de biopsias sanas de prepucio de niños.

Para la obtención de retrovirus recombinantes se utilizó la línea productora 293T obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection).

Estas células son una línea celular humana embrionaria de riñón inmortalizada y optimizada para ser transfectadas transitoriamente y dar a niveles altos de expresión de proteínas, lo que las hace idóneas para ser utilizadas como células empaquetadoras. Esta línea celular se mantiene en Medio Completo en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Por otro lado se utilizaron QPH que se sembraron con Medio de Siembra (DMEM-Glutamax y HAM'S F12 (GIBCO) en proporción 3:1, suplementado con 10% suero HyClone FetalClone II (Termo Scientific), 1% de antibiótico-antimicótico (GIBCO), insulina 5 µg/ml (Sigma), 24 µg/ml de adenina (Sigma), 0,4 µg/ml de dihidrocortisona (Sigma), 1,3 ng/ml de tirosina-triyodada (Sigma), 8 ng/ml de toxina colérica (Sigma)). A los QPH se les cambió el medio tras como mínimo 8 horas después de ser sembradas por el Medio de Crecimiento (Medio de Siembra y 10 ng/ml de EGF) (130). A estas células se les cambia el Medio de Crecimiento cada dos o tres días, dependiendo de la actividad metabólica celular.

#### **3.4.1. Producción de sobrenadantes**

La línea celular 293T se sembró en monocapa en Medio Completo y se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaron un 90% de confluencia, momento en que se levantaron con tripsina-EDTA y se resembraron en placas de 10 cm.

Para la obtención de retrovirus recombinantes se cotransfectó esta línea empaquetadora con plásmidos que expresan el gen *env* de la envuelta anfotrópica (tropismo por células humanas), así como el gen *gag* (proteínas de la cápsida del virus recombinante) y el gen *pol* (retrotranscriptasa viral). La línea celular 293T se cotransfectó en preconfluencia con FuGENE HD (Roche). La concentración final de plásmidos era 0,2 µg/µl disueltos en DMEM sin complementar:

- 3,75 µg de pNGVL3-4070 que codifica para la envuelta anfotrópica 4070 cedido por el Dr. F. Serrano (CNB, Madrid)
- 3,75 µg de pNGVL3-MLV-gag-pol que contiene los genes gag y pol cedido por el Dr. F. Serrano (CNB, Madrid)
- 3,75 µg de pLZR-IRES-eGFP (como control), pLZR-5E7Flag-IRES-eGFP ó bien pLZR-16E7Flag-IRES-eGFP (descritos en apartado 3.1.4)

Se mezclaron 3 µl de FuGENE HD por cada 1 µg de ADN, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente fue añadido al medio de cada una de las placas. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. 36 horas tras la transfección, el medio fue sustituido por Medio de Crecimiento. A este medio se liberan las partículas virales que se van produciendo y es a lo que se llama sobrenadante retroviral. Este sobrenadante retroviral se emplea para la infección de (QPHs) por lo que se utilizó el Medio de Crecimiento para su producción, ya que es específico para las células a infectar. 48 horas tras la cotransfección se recogió el sobrenadante retroviral, en su lugar se añadió Medio Completo para el mantenimiento de la línea celular 293T. A las 56 horas se sustituyó nuevamente el medio por Medio de Crecimiento para producir, tras 72 horas de la cotransfección, un segundo sobrenadante retroviral que sirvió para reinfectar los QPHs.

### **3.4.2. Infección de queratinocitos primarios humanos**

Los QPH son células que necesitan ser sembradas en cocultivo con fibroblastos murinos 3T3-2J irradiados letalmente (50 Gy) (157). La línea celular 3T3-2J fue cedida por el Dr. J. Garlick (The State University of New York, USA).

Primero se sembraron las células 3T3-2J irradiadas en el Medio de Siembra (130, 157). Al día siguiente se sembraron los QPH a muy baja densidad para favorecer la eficiencia de infección (aproximadamente 100.000 queratinocitos por frasco de 75 cm<sup>2</sup>) en Medio de Siembra. Después de al menos 8 horas de ser sembrados, se les sustituyó el medio por Medio de Crecimiento. 48 horas después de haber sido sembrados (observando colonias de 4-8 células), se realizó la primera infección retroviral retirando el medio a las células y sustituyéndolo por 9 ml del primer sobrenadante retroviral (ver apartado 3.4.1) al que previamente se le añade 8 µg/ml de polibreno. Las células se mantuvieron durante 8 horas con este sobrenadante retroviral, que luego se sustituyó por Medio de Crecimiento. Al día siguiente se hizo la reinfección en las mismas condiciones, pero esta vez con el segundo sobrenadante retroviral obtenido. Nuevamente, se mantuvieron las células durante 8 horas para permitir la reinfección. Transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y se suplió por Medio de Crecimiento. La transducción celular se produce en aquellas células en división, y la eficacia de infección fue chequeada cualitativamente con microscopio de fluorescencia invertido y cuantitativamente por citometría de flujo (Becman Coulter Epics XL), analizando el porcentaje de células eGFP positivas con el programa CXP Analysis 2.1 (Beckman Coulter).

Antes de levantar los QPH infectados, se retiran los fibroblastos letalmente irradiados mediante incubación con PBS-EDTA 1 mM durante aproximadamente 5 minutos. Una vez retirados los fibroblastos, se levantaron los QPH mediante incubación con Tripsina-EDTA. De estos queratinocitos transducidos se utilizó una alícuota para sembrar en los equivalentes dermo-epidérmicos, otra alícuota para los análisis por citometría y otra alícuota para la extracción de proteínas y ARN.

### **3.5. Formación de equivalentes dermo-epidérmicos**

Para generar el equivalente dermo-epidérmico fueron embebidos los fibroblastos, procedentes del mismo donante sano del que se obtuvieron los queratinocitos, en una matriz de fibrina (componente dérmico). Sobre esta matriz dérmica, se sembraron los queratinocitos (componente epidérmico) infectados (descrito en apartado 3.4.2) (51).

### 3.5.1. Preparación de matriz de fibrina y queratinocitos

Para la elaboración de la matriz de fibrina es necesario crioprecipitado de plasma sanguíneo de cerdo que se obtiene tras tres ciclos de congelación y descongelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , centrifugado, filtrado y resuspendido en NaCl estéril. Este crioprecipitado de cerdo fue cedido por la Dra. M. del Río (CIEMAT-CIBERER, Madrid). El crioprecipitado contiene fibrinógeno, factores de coagulación y otras proteínas. La matriz de fibrina se obtiene tras incubación con trombina, que convierte el fibrinógeno en fibrina. La matriz de fibrina para dos geles se formó con 1,5 ml crioprecipitado al que se añadieron 5 ml de Medio de Siembra con suero activado y fibroblastos (125.000 fibroblastos/gel) y 7,5 IU de trombina (sigma) previamente disuelta en 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  25 nM estéril. Se pusieron 3,5 ml de esta matriz en cada pocillo de placas de 6 pocillos. Una vez formado el gel se añadieron 3 ml de Medio de Siembra, lo que facilita el intercambio de  $\text{CaCl}_2$  del gel al medio. A las 24 horas de la preparación del gel, se retiró el medio, se añadió PBS que se incubó durante 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se retiró el PBS para sustituirlo por Medio de Siembra durante otros 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Con esto se consigue eliminar gran parte del  $\text{CaCl}_2$  y evitar así una diferenciación prematura de los queratinocitos que se sembraron posteriormente. Entre 100.000 y 250.000 QPH transducidos (ver apartado 3.4.2) fueron utilizados. Tras al menos 8 horas de haber sembrado los QPH transducidos en el gel, se sustituyó el medio por Medio de Crecimiento favoreciendo así la proliferación de los queratinocitos. El medio se cambió cada dos o tres días, dependiendo del metabolismo celular.

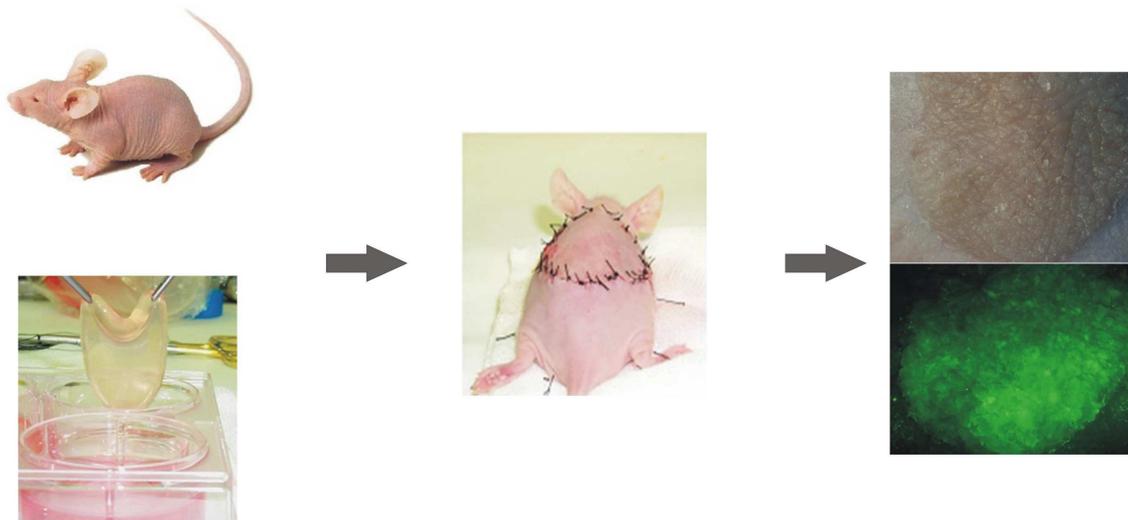
Cuando los queratinocitos estuvieron confluentes en los geles, éstos fueron trasplantados.

### 3.5.2. Trasplante del equivalente dermo-epidérmico

Los geles descritos en el apartado anterior fueron trasplantados en ratones inmunodeficientes nu/nu (Janvier) de 6 semanas de edad como ha sido descrito previamente (13). Los trasplantes se realizaron en las condiciones de esterilidad requeridas para una cirugía de este tipo en animales de experimentación. El protocolo de anestesia es disociativo, seguro, eficaz y reversible, inducido por una combinación

de sedantes administrados por vía intraperitoneal: medetomidina (0,8 mg/gr de peso; Domtor®, Pfizer) y ketamina (0,1 mg/gr de peso; Ketolar®, Pfizer). Se realizó una escisión circular en el lomo a los ratones de tamaño similar al equivalente cutáneo que se iba a trasplantar. Mientras se realiza el trasplante se desvitaliza la piel extraída del ratón mediante tres ciclos de congelación y descongelación. Esta piel desvitalizada se colocó mediante puntos de sutura por encima del equivalente cutáneo sirviendo de protección para la zona del trasplante. Para revertir el efecto anestésico se inyecta atipamezol (2 µg/gr de peso; Antisedan®, Pfizer). La piel desvitalizada se desprende por sí sola a lo largo del proceso de toma del trasplante, quedando en la zona el equivalente de piel trasplantado una piel que está constituida por células humanas (Figura 14).

Las células del trasplante que fueron transducidas se pueden detectar fácilmente mediante su observación a la lupa con un filtro (luz azul  $\lambda$  490 nm) para la detección de eGFP.



**Figura 14. Esquema realización de los trasplantes de equivalentes dérmicos en ratones desnudos.** Una vez que los QPH transducidos han crecido hasta confluencia sobre la matriz de fibrina y fibroblastos, se retira de los pocillos y se procede a su trasplante en el dorso del ratón. Se sustituye la piel del ratón por el gel constituido con células humanas. La piel desvitalizada del ratón se utiliza para cubrir el gel. Durante el proceso de toma del trasplante, la piel desvitalizada del ratón se desprende, quedando perfectamente integrada la piel humanizada en el ratón. Con la localización de eGFP permite indentificar la piel regenerada a partir de las células humanas transducidas.

### 3.6. Recolección de muestras

Los ratones fueron sacrificados a los tres y seis meses tras el trasplante. Una hora antes de sacrificar los animales por inhalación de CO<sub>2</sub>, se inyectaron intraperitonealmente 10 µl por gramo de peso de una solución de BrdU (10mg/ml en NaCl al 0,9%) (161). Las muestras recogidas para análisis histológico se fijaron durante 24h en formol 4% o paraformaldehído 4%, para ser posteriormente embebidas en parafina. De zonas adyacentes a la piel tomada para histología se tomaron también muestras en nitrógeno líquido y RNAlater (Invitrogen) para la obtención de proteínas y ARN respectivamente.

### 3.7. Análisis histológico e inmunohistoquímico

Las muestras histológicas fijadas en formol o paraformaldehído fueron embebidas en parafina. Los cortes histológicos (5 µm de grosor) se realizaron con microtomo, se desparafinaron y se tiñeron con hematoxilina/eosina para realizar el análisis histológico, o se procesaron para inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. En general, los cortes se incubaron primeramente con suero de caballo al 10% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente para impedir uniones inespecíficas y posteriormente con los anticuerpos primarios diluidos en PBS con BSA al 1% durante toda la noche a 4° C. Los anticuerpos secundarios diluidos en PBS con BSA al 1% se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Entre las distintas incubaciones se realizaron dos lavados con PBS y uno con PBS-Tween 0,05%. Este protocolo se modificó para inmunohistoquímica, añadiendo un tratamiento previo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar la peroxidasa endógena. En el caso de detección de incorporación de BrdU, se hizo un tratamiento, tras la desparafinación, con HCl 2N durante una hora con el fin de favorecer la desnaturalización del ADN y poder detectar la BrdU incorporada al mismo. Las muestras fijadas en formol y utilizadas para inmunofluorescencia fueron incubadas con NH<sub>4</sub>Cl 100 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente para el bloqueo de la autofluorescencia debida a los restos de formol. Con algunos anticuerpos fue necesario el desenmascaramiento de epítomos antigénicos en los cortes fijados en formol. Antes de la incubación con suero de caballo, se pusieron los cortes en tampón citrato 10 mM

pH=6,0 y se calentaron en el microondas: 900 W hasta hervir, 10 minutos a 150 W y 20 minutos dejando enfriar. Para la detección del anticuerpo secundario por inmunohistoquímica se utilizó el sistema avidina/estreptavidina-peroxidasa (ABC Kit, Vectastain) según las indicaciones de la casa comercial. La reacción se visualizó con diaminobencidina como sustrato cromógeno y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peroxidase Substrate Kit DAB, Vector Laboratories). Las preparaciones se contratiñeron con hematoxilina y se montaron con Eukitt. La visualización se llevó a cabo en microscopio óptico convencional. En el caso de las inmunofluorescencias, se emplearon anticuerpos secundarios unidos a diferentes fluorocromos y se montaron con Moviol (Hoescht). En aquellas muestras donde se quiso identificar los núcleos, se les añadió DAPI (10µg/µl) (Roche). La visualización se realizó en un microscopio (Zeiss Axioplan2 imaging) equipado con fuente de epifluorescencia y filtros adecuados. Las imágenes fueron capturadas por una cámara digital (AxioCam MRm) y visualizadas por el programa AxioVision 4. El procesamiento de las imágenes se realizó mediante los programas Corel DRAW 11 y Adobe Photoshop CS2.

### 3.7.1. Anticuerpos inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Los anticuerpos utilizados y sus concentraciones se describen a continuación:

ANTICUERPOS PRIMARIOS				
Especificidad	Origen	Casa Comercial	Dilución	Desenmascaramiento
BrdU (BMC 9318)	Monoclonal ratón	Roche 1170376	1:50	No necesario
BrdU [BU1/75 (ICR1)]	Monoclonal rata	Abcam	1:50	No necesario
Caspasa 3 activa (Asp175)	Policlonal conejo	Cell Signaling	1:1.000	No necesario
Ciclina A (Ab-7)	Policlonal conejo	Thermo Scientific	1:500	Necesario
eGFP	Policlonal conejo	Invitrogen	1:200	No necesario
Involucrina (SY5)	Monoclonal ratón	Sigma	1:500	No necesario
K 1	Policlonal conejo	Sigma	1:500	Necesario
K 5 (AF138)	Policlonal conejo	Covance	1:500	Necesario
K 10 (DE-K10)	Monoclonal ratón	DakoCytomation	1:250	No necesario
MCM7/CDC47 (47DC141)	Monoclonal ratón	Thermo Scientific	1:50	Necesario
p16 (F-12)	Monoclonal ratón	Santa Cruz	1:200	No necesario
p21 (SXM30)	Monoclonal ratón	DB Pharmingen	1:20	No necesario
PCNA (PC10)	Monoclonal ratón	Thermo Scientific	1:250	Necesario

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados para inmunodetección de marcadores en muestras histológicas

ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
Especificidad	Conjugado	Dilución	Casa Comercial
Conejo	Biotina	1:1.000	Jackson Immunoresearch
Conejo	Texas-Red	1:500	Jackson Immunoresearch
Rata	AMCA	1:50	Jackson Immunoresearch
Ratón	Biotina	1:1.000	Jackson Immunoresearch
Ratón	FITC	1:50	Jackson Immunoresearch

Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados para inmunodetección de marcadores en muestras histológicas

### 3.8. Western blot

Para la obtención de proteínas, las células se levantaron de la placa de cultivo bien rascando con raspador o bien mediante tripsinización. Posteriormente se lavaron varias veces con PBS y se centrifugaron a 2.000 G durante 10 minutos para retirar el PBS. La lisis de estas células se hizo utilizando el tampón RIPA (Trizma-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 0,1% SDS, 1% Triton X-100 y 0,5% DOC) suplementado con inhibidores de proteasas (Roche) y tras incubar durante 15 minutos en hielo, se centrifugaron los extractos a 14.000 G durante 3 minutos a 4° C. El sobrenadante, donde estaban las proteínas solubilizadas, se recogió y se midió su concentración mediante el análisis colorimétrico de Bradford (BioRad). Las proteínas obtenidas en los extractos se separaron en geles de SDS-PAGE 4-12% (Invitrogen). Se utilizaron entre 20-40 µg de proteína de cada muestra, que se mezclaron con tampón de carga y agente reductor (Invitrogen). La electroforesis se hizo en el tampón de electrodos MOPS o MES según el peso molecular de las proteínas (Invitrogen). El gel se transfiere a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen) en cámara húmeda Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) con tampón de transferencia estándar (Trizma-Base 25 mM, glicina 190 mM y metanol 10%). Tras varios lavados con PBS, se incuba la membrana con una solución de bloqueo a base de leche desnatada 5% en PBS-Tween20 1% durante al menos 30 minutos para bloquear las uniones inespecíficas. Tras ello, se incuba con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en leche desnatada 2,5% en PBS-Tween20 1% dirigidos frente a las proteínas de interés. Para detectar la unión del

anticuerpo primario se usan anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa, Visualizándose la unión de los anticuerpos mediante el kit de detección de luminiscencia basado en una reacción específica de peroxidasa (*Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate*, Pierce) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para incubar una misma membrana con sucesivos anticuerpos primarios, se eliminaron cada vez los anticuerpos unidos sumergiendo la membrana en tampón de *stripping* (62,5mM Tris-HCl pH 6,7, 2%SDS, 100mM  $\beta$ -mercaptoetanol) durante 30 minutos a 50° C y lavando al menos tres veces con PBS antes de empezar una nueva inmunodetección.

### 3.8.1. Anticuerpos *western blot*

Los anticuerpos primarios y secundarios empleados en la detección de proteínas por *western blot* fueron los siguientes:

ANTICUERPOS PRIMARIOS			
Especificidad	Origen	Casa Comercial	Dilución
Actina (I-19)	Policlonal cabra	Santa Cruz	1:2.000
Bax (P-19)	Policlonal conejo	Santa Cruz	1:200
Ciclina A (Ab-7)	Policlonal conejo	Thermo Scientific	1:100
Flag	Policlonal conejo	Sigma	1:500
eGFP (B-2)	Monoclonal ratón	Santa Cruz	1:200
HA (16B12)	Monoclonal ratón	Covance	1:500
VPH 16 E7 (NM2)	Monoclonal ratón	Santa Cruz	1:500
p107 (C-18)	Policlonal conejo	Santa Cruz	1:500
p53 (FL-393)	Policlonal conejo	Santa Cruz	1:500
pRb (G3-245)	Monoclonal ratón	DB Pharmingen	1:500
$\alpha$ -Tubulina (B-5-1-2)	Monoclonal ratón	Sigma	1:2.500

Tabla 5. Anticuerpos primarios para la inmunodetección de proteínas mediante *western blot*

ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
Especificidad	Conjugado	Casa Comercial	Dilución
Cabra	Peroxidasa	Santa Cruz	1:10000
Conejo	Peroxidasa	Amersham Biosciences	1:5000
Ratón	Peroxidasa	Jackson Immunoresearch	1:5000

Tabla 6. Anticuerpos secundarios para la inmunodetección de proteínas mediante *western blot*.

### 3.9. Análisis de expresión de genes y micro ARN mediante qRT-PCR

#### 3.9.1. Extracción ARN

La extracción de ARN total con la fracción de microARN se extrajo de las células y del tejido procedente de los equivalentes dermo-epidérmicos (conservados en nitrógeno líquido o *RNAlater*) utilizando el kit *miRNAeasy Mini Kit* (Qiagen) que permite la separación de moléculas de ARN mayores de 18 nucleótidos. Para el procesamiento de la piel se tuvo que romper y homogenizar el tejido previamente con el homogenizador Biometa (Retsch) a una frecuencia de 40/s durante 4 minutos. Durante el proceso de extracción, se realiza una incubación con ADNasa (Qiagen) según las recomendaciones del kit para eliminar el ADN genómico. La concentración del ARN obtenido se midió mediante espectrofotómetro ND-1000 V3.3 (*NanoDrop Technologies*) y su integridad se comprobó mediante el sistema Bioanalyzer (Agilent; Servicio de Genómica de la UCM), aceptándose como criterio de calidad un valor a partir de 1.4 de la relación 28S/18S o un valor a partir de 8 del *RNA integrity number* (RIN) como medida del grado de degradación de la muestra (168).

#### 3.9.2. Retrotranscripción

La transcripción reversa del ARNm para la obtención de ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de 1 µg de ARN total en el caso del ARN procedente de las células y de 400 ng en el caso del ARN procedente del tejido. Para ello se empleó el kit de retrotranscripción *Omniscript® Reverse Transcription kit* (Qiagen) usando los cebadores oligo-dT que son específicos para el ARNm. Sin embargo para la transcripción reversa de micro ARN se utilizó el kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* (Applied biosystems) utilizándose 10ng de muestra por reacción y los cebadores son específicos para cada micro ARN.

#### 3.9.3. Cuantificación por qRT-PCR

La amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real del ARNm se realizó con cebadores específicos según el estudio (ver apartado 3.9.4), SYBR Green (Applied Biosystems) y 1 µl del ADN complementario (ADNc) obtenido tras retrotranscripción. Se utilizó la *7500 Fast Real-Time PCR System* para realizar las PCRs y se cuantificó

mediante el cálculo relativo del incremento del *cycle threshold* (Ct) entre las muestras problema y el control (TBP y GUSB).

La amplificación por PCR cuantitativa de microARN se realizó con cebadores específicos suministrados en cada ensayo individual, el kit *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (Applied biosystems) y 0,7 µl del ADN complementario obtenido tras la retrotranscripción. Se utilizó la *7500 Fast Real-Time PCR System* para realizar las PCRs, que se cuantificaron mediante el cálculo relativo del incremento del *cycle threshold* (Ct) entre las muestras problema y el control (U6B)

### 3.9.4. Cebadores utilizados en qRT-PCR

Gen:	Nombre cebador	Secuencia cebador
eGFP	qF-eGFP	GGAGCGCACGATCTTCTTCA
	qR-eGFP	AGGGTTTCGCCCTCGAA
5 E7	qF-5E7	TTGTCCACGCCACAGAAT
	qR-5E7	AGCCGTCATGTTTGAGTIT
16 E7	qF-16E7	GCTGGACAAGCAGAACCG
	qR-16E7	GCACAACCGAAGCGTAGA
pRb	hRb1_f	TCTTCATGCAGAGACTGAAAACA
	hRb1_r	AGGTATTGGTGACAAGGTAGGG
p107	hRb1_f	TTGGCGAATCAGGACCATA
	hRb1_r	TGAGCCTGGCTGTGTTAAT
E2F1	hE2F1f	TCCAAGAACCACATCCAGTG
	hE2F1r	CTGGGTCAACCCCTCAAG
TBP	qTBPf	AGTGAAGAACAGTCCAGACTG
	qTBPr	CCAGGAAATAACTCTGGCTCAT
GUSB	qF-hGUSB	CCTGTGACCTTTGTGAGCAA
	qR-hGUSB	AACAGATCACATCCACATACGG
Ciclina B2	qF-hCCNB2	GAAGATTGGGAGAACCCTCA
	qR-hCCNB2	TGTGGGTTTATGGACTGCAA
p21	qF-hp21	CCTCATCCCCTGTCTCCTTT
	qR-hp21	GTACCACCCAGCGGACAAGT
CENPF	qF-hCENPF	GAGTCAAACCAACAGC
	qR-hCENPF	TCCGCTGAGCAACTTGA
MELK	qF-hMELK	CAGGTGTCATTAGCCCTGAGA
	qR-hMELK	CAAACACTTTGGCTCCCTTT
RFC4	qF-hRFC4	TGTGTCAGGAAGTCGCTCAG
	qR-hRFC4	GGGTGGTTTTCGACTCCTTC

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de ARNm mediante qRT-PCR.

Los oligonucleótidos se obtuvieron de Metabion Internacional AG (Alemania).

#### 4. RESULTADOS

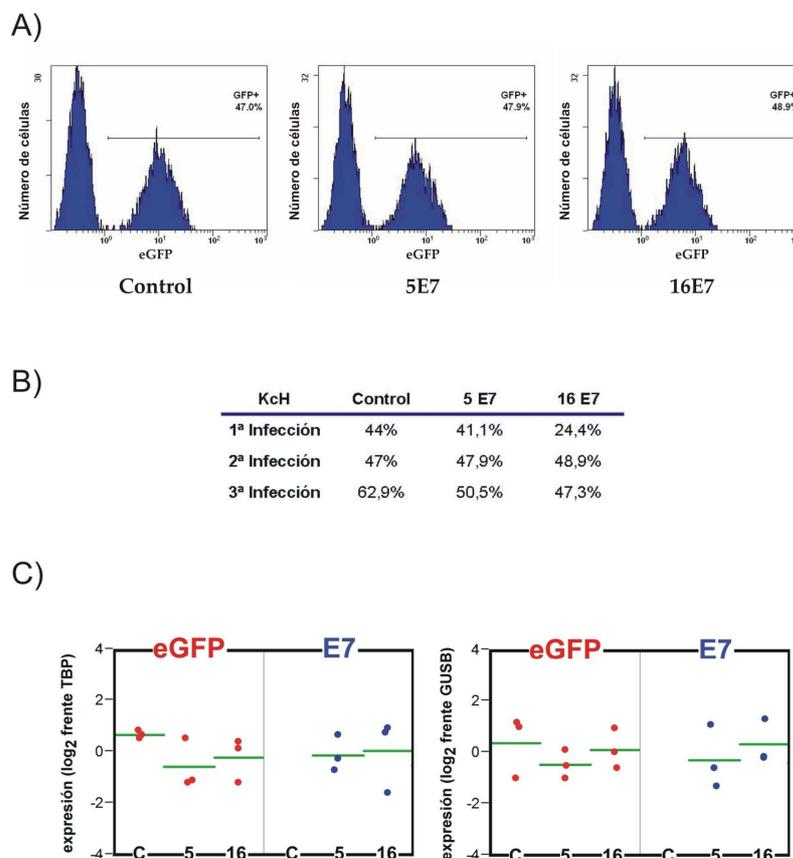


#### 4.1. Interacción molecular entre E7 y los supresores tumorales pRb y p107

Las proteínas de la familia del retinoblastoma son importantes en la regulación de la proliferación celular. Ya que la proteína E7 de VPH-AR inhibe su función como mecanismo de tumorigénesis, se planteó analizar si la proteína E7 de VPH 5 (5E7) podría tener las mismas actividades en el contexto de cáncer de piel. El mayor interés de este estudio radica en los efectos de la proteína E7 en las células diana del virus, los queratinocitos humanos. El problema de realizar directamente los estudios sobre estas células es que, si existieran interacciones entre E7 y alguna de las proteínas de la familia del retinoblastoma, su efecto se podría ver enmascarado por posibles compensaciones funcionales. Dada la complejidad del sistema de estudio, se decidió hacer aproximaciones previas mediante cotransfecciones en la línea celular Saos2. Esta línea, al carecer de una proteína pRb funcional (171), se convierte en una herramienta muy útil para analizar el efecto de E7 sobre el pRb exógeno asegurándose que las posibles variaciones sean debidas única y exclusivamente a la presencia de E7.

Posteriormente, se realizaron infecciones retrovirales en queratinocitos primarios humanos para lo que se utilizó vector retroviral pLZR-IRES-eGFP en el que se clonaron las proteínas 5E7 y E7 de VPH 16 mucoso (16E7) (Ver apartado 3.4). La infección de QPHs permite la generación de un ARNm policistrónico, traducándose por un lado la proteína E7 clonada y por otro lado, a partir del IRES, la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP). Se realizaron un total de tres infecciones distintas con cada uno de los vectores retrovirales: vector vacío o control, y vectores con 5E7 ó 16E7. La coexpresión de eGFP y las proteínas E7 nos ha permitido determinar el porcentaje de células transducidas en cada infección al detectar las células eGFP positivas mediante citometría de flujo (Figura 15A). En cada histograma se ven dos picos, el área de pico de la izquierda comprende las células que no emiten fluorescencia verde y por tanto no están eficazmente transducidas, mientras que el área de pico de la derecha engloba aquellas células que emiten fluorescencia verde, por lo que expresarían la proteína eGFP y son las que han sido eficazmente transducidas. En la Figura 15B se muestran los resultados obtenidos de todos los análisis mediante FACS de la expresión de eGFP. Se realizaron análisis mediante qRT-PCR del ARNm tanto de eGFP como de

los distintos E7 del estudio. En la Figura 15C, se demuestra que tanto eGFP como los genes E7 se están expresando en las células primarias.



**Figura 15. Análisis de transducción de E7 en QPHs.** A: ejemplo de uno de los análisis realizados por citometría de flujo en el que se representa el número de células frente a la fluorescencia de eGFP. El área del pico izquierdo corresponde a células sin fluorescencia y el de la derecha células que emiten fluorescencia. B: La tabla resume el porcentaje de células eGFP positivas según las cuantificaciones por citometría para cada grupo de infecciones. y con una eficiencia adecuada para el estudio. C: Análisis por PCR cuantitativa de la expresión de los distintos E7 y eGFP. Se muestran los valores normalizados frente a los genes TBP ó GUSB, usados como control de expresión invariable.

Estos datos obtenidos por PCR cuantitativa del ARNm de eGFP han sido utilizados para la normalización de los resultados obtenidos en QPHs que se mostrarán en los siguientes apartados.

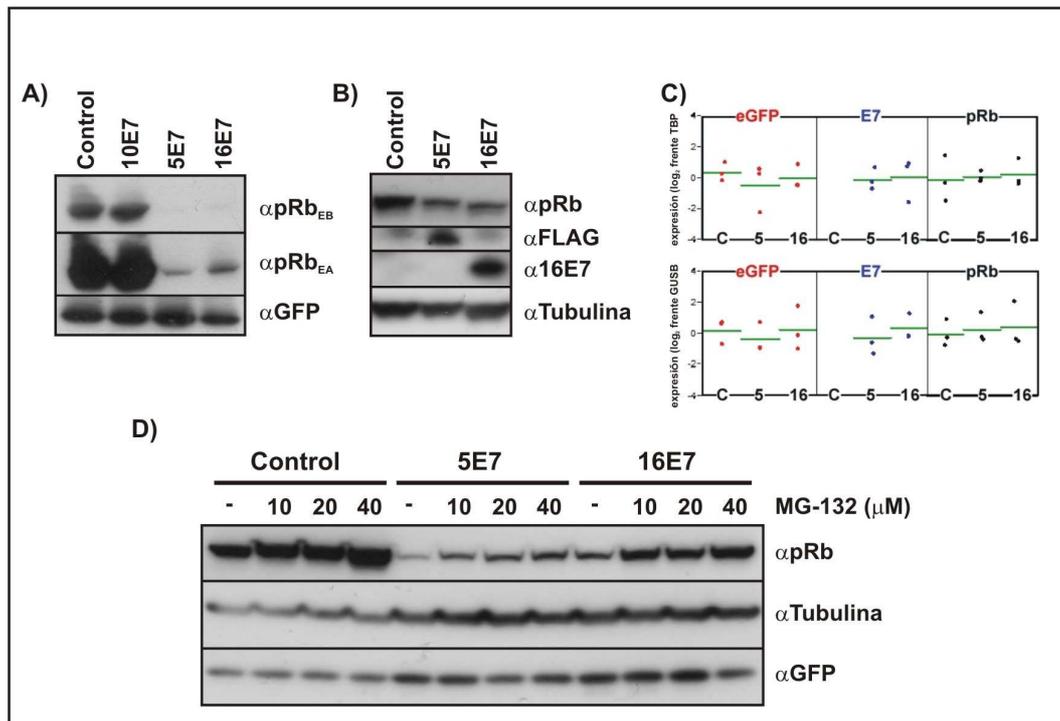
#### 4.1.1. E7 de VPH 5 cutáneo reduce los niveles del supresor tumoral pRb

Los primeros análisis se han realizado en la línea celular Saos2 con vectores de expresión de la proteína pRb humana y la proteína 5E7. Esta línea no expresa una proteína pRb funcional (171), permitiendo analizar el efecto de E7 sobre pRb exógeno

al ser cotransfectados. La proteína 16E7 induce la degradación, y por tanto, reduce los niveles de pRb, por lo que se usó como control positivo (77). Como control negativo, se usó la proteína E7 de VPH 10, incapaz de degradar pRb (31) seguramente porque carece del motivo LxCxE de unión a la familia del retinoblastoma. El análisis de las proteínas extraídas de estas células mediante *western blot* con anticuerpos específicos, muestran una dramática reducción de los niveles de expresión de pRb en aquellas células transfectadas con 5E7 (Figura 16A). Este resultado demuestra que la proteína E7 de VPH 5 cutáneo reduce los niveles del supresor tumoral, de manera similar a lo observado con E7 de VPH 16. Un resultado similar se obtuvo mediante transducción retroviral en QPHs (Figura 16B). La expresión de las proteínas E7 se visualizó en QPHs mediante un anticuerpo anti-Flag. Aunque ambos E7 contienen el epítipo Flag (apartado 3.1.1), solo pudimos detectar 5E7. Un anticuerpo específico anti-16E7 se utilizó como alternativa.

Esta reducción de los niveles de pRb no se debe a una reducción en la expresión y/o estabilidad del ARNm del gen de pRb, ya que en los queratinocitos transducidos no existe disminución según análisis por qRT-PCR en 5E7 y 16E7 frente al control (Figura 16 C).

Para dilucidar si 5E7 podría estar reduciendo los niveles de pRb mediante mecanismos de degradación dependientes del proteasoma, tal y como se ha descrito para 16E7 (77, 196), células Saos2 se trataron con el inhibidor del proteasoma MG132 durante 4 horas tras 40 horas de transfección. Los extractos celulares obtenidos se analizaron mediante *western blot* con anticuerpos específicos. Como se puede ver en la Figura 16 D, existe una recuperación parcial de los niveles de pRb en presencia de MG132 en el caso de las células que expresan 5E7, mucho mayor en el caso de las células que expresan 16E7. El resultado demuestra que MG132 no inhibe totalmente la reducción en los niveles de pRb inducida por 5E7, lo que sugiere que no actúa de forma preferente por la vía del proteasoma.



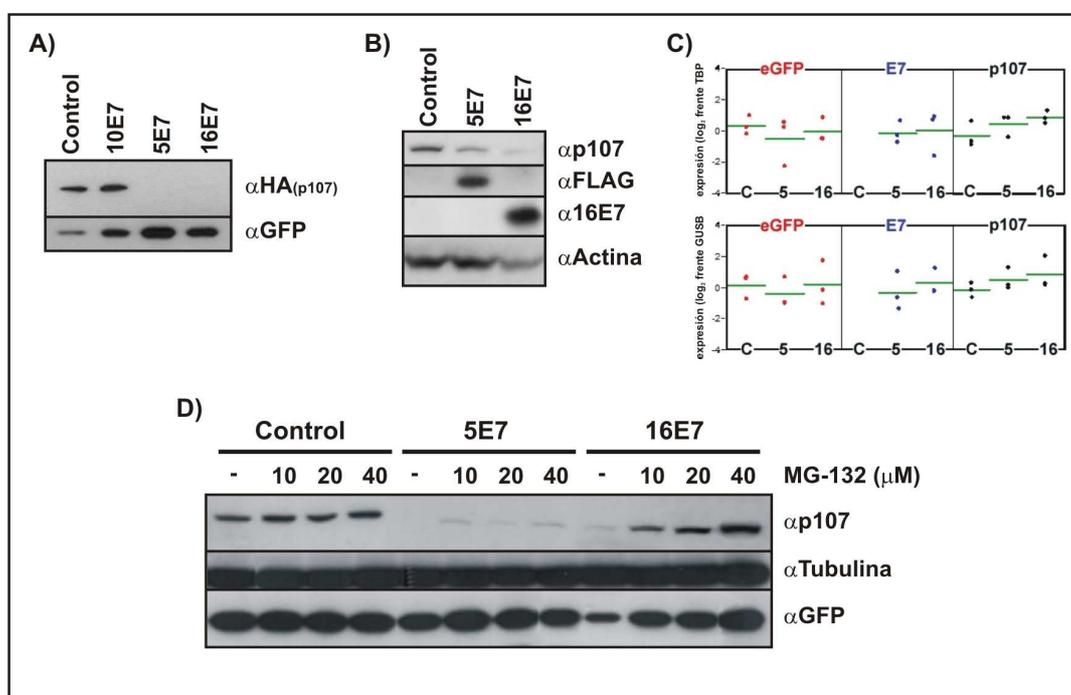
**Figura 16. Los niveles de pRb se ven afectados en presencia de E7 de VPH 5.** **A:** *western blot* de transfecciones en Saos2 con vectores de expresión de pRb y E7. Como control de la transfección se utilizó el vector de expresión de eGFP. (EB: Exposición baja; EA: Exposición alta). **B:** *western blot* de QPHs transducidos con E7 de VPH 5 o VPH 16. **C:** Análisis por PCR cuantitativa de los genes eGFP, E7 y pRb en las infecciones retrovirales. Los valores se normalizaron con los genes TBP o GUSB, usados como control de expresión, y se corrigieron según el porcentaje de infección obtenido por citometría de flujo. **D:** *western blot* de transfecciones en Saos2 tratadas con MG132. Como control de la transfección se utilizó eGFP.

#### 4.1.2. E7 de VPH 5 cutáneo reduce los niveles de p107

Para el análisis de los niveles de p107, se cotransfectó la línea celular Saos2 con un vector de expresión que contiene el gen de p107 humano fusionado al epítipo HA, ya que esta línea celular sí expresa p107. Esta fusión de p107 al epítipo HA permite su detección mediante *western blot* con anticuerpos específicos anti-HA. Estaríamos por tanto detectando la proteína p107HA coexpresada con la proteína E7 sólo en células que hayan sido realmente cotransfectadas. Tal y como se observa en la Figura 17A, la expresión de 5E7 disminuye la expresión de p107HA hasta niveles similares a los obtenidos en presencia del oncogén 16E7. Además, en QPHs también se reducen los niveles de p107 en aquellas células transducidas con las proteínas E7 de VPH 16 y VPH 5 (Figura 17B). De manera similar a pRb, esta reducción de los niveles de p107 no se debe a una reducción en la expresión y/o estabilidad del ARNm del gen de p107, ya

que en los queratinocitos transducidos no existe disminución según análisis por qRT-PCR en 5E7 y 16E7 frente al control (Figura 17).

Se realizaron ensayos con el inhibidor del proteasoma MG132 en células cotransfectadas con p107HA y los dos E7. Tras el tratamiento con el inhibidor, se observó que apenas existe una recuperación de los niveles de p107 en presencia de MG132 en el caso de las células que expresan 5E7. Sin embargo, sí que se recuperan los niveles de p107 en el caso de las células que expresan 16E7 (Figura 17D). Este resultado demuestra que MG132 no inhibe la reducción en los niveles de p107 tras expresión con 5E7, lo que sugiere que no actúa mediante degradación vía proteasoma.



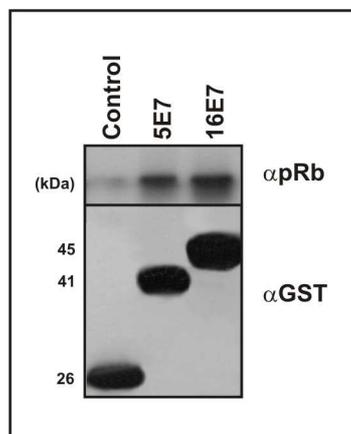
**Figura 17. E7 afecta los niveles de p107.** **A:** *western blot* de transfecciones en Saos2 con plásmidos de expresión de p107HA y E7. Como control de la transfección se utilizó eGFP. **B:** *western blot* de QPHs transducidos con E7 de VPH 5 o VPH 16. **C:** Análisis por PCR cuantitativa de los genes eGFP, E7 y p107 en las infecciones retrovirales. Los valores se normalizaron con los genes TBP o GUSB, usados como control de expresión, y se corrigieron según el porcentaje de infección obtenido por citometría de flujo. **D:** *western blot* de transfecciones en Saos2 tratadas con MG132. Como control de la transfección se utilizó eGFP.

Aunque los mismos ensayos en células Saos2 y QPHs se han realizado con p130, el tercer miembro de la familia del retinoblatoma, no hemos podido observar cambios en los niveles de expresión, ni en presencia de 5E7 ni de 16E7. Dado que ha

sido descrito que 16E7 induce la degradación de p130, nuevos abordajes experimentales nos deberán permitir analizar la posible degradación de p130 por 5E7.

#### 4.2. 5E7 se une a pRb

En el caso de la proteína E7 de VPH-AR, como VPH 16, se sabe que es necesaria la unión de la proteína viral al supresor tumoral para que éste se pueda degradar. Para comprobar que existe unión entre la proteína E7 de VPH 5 cutáneo y pRb, se realizaron ensayos de coprecipitación con los vectores resultantes de los clonajes realizados en el vector pGEX-2T (apartado 3.1.3). Transformaciones en bacterias con estos vectores permitieron expresar altos niveles de las proteínas E7Flag fusionadas a GST (apartado 3.2.1). Estas proteínas purificadas y fusionadas a GST se incubaron con un extracto de proteínas procedente de la línea celular HaCaT (que expresa pRb). Tras la incubación y varios lavados (ver apartado 3.2.2), sólo aquellas proteínas de HaCaT que estén unidas a las proteínas E7 virales unidas a GST podrán ser visualizadas al analizarlas por *western blot*. El resultado muestra que 5E7 se une a pRb, aunque seguramente con menor afinidad que 16E7 (Figura 18), tal y como ha sido previamente descrito (57, 204).

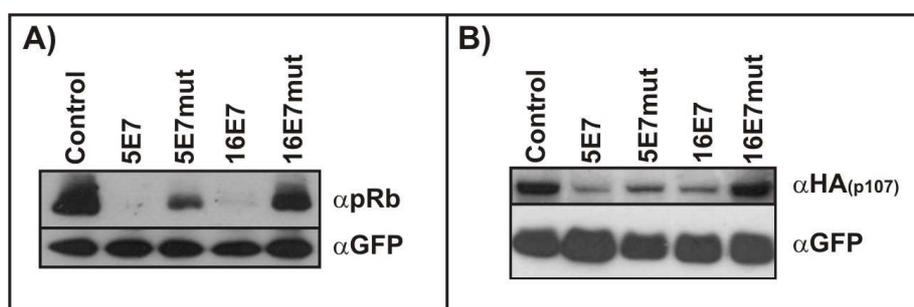


**Figura 18. Unión de pRb a las proteínas GST-5E7 y GST-16E7.** Análisis mediante *western blot* de las proteínas coprecipitadas con Glutación-Sefarosa. Se observa unión entre pRb y las proteínas GST-5E7 y GST-16E7.

#### 4.3. El dominio LxCxE de E7 es necesario para la degradación de pRb y p107

Las proteínas E7 de VPH mucosos de alto riesgo, como VPH 16, poseen el motivo LxCxE de unión a proteínas de la familia pocket. La unión de E7 a estas

proteínas es necesaria para su desestabilización. Muchos VPH de tropismo cutáneo que están relacionados con el desarrollo de lesiones malignas poseen también este dominio, como 5E7. Para analizar si la reducción de los niveles de pRb y p107 en presencia de 5E7 puede estar relacionada con este dominio de la proteína viral de VPH 5, se construyó el mutante de delección  $\Delta$ DLFC\_5E7. La mutación de 5E7 se eligió en base a los resultados obtenidos y publicados con el mutante de 16E7 ( $\Delta$ DLYC) (34, 151), siendo los residuos mutados los equivalentes según el alineamiento de las proteínas E7 (apartado 3.1.2). Una vez generado el mutante, se realizaron transfecciones en la línea celular Saos2 con los vectores de expresión de pRb ó p107HA y con vectores de expresión de los E7 mutantes. El análisis mediante *western blot* de los extractos de proteínas de las células transfectadas muestra que la reducción de los niveles de pRb y p107 observada con la coexpresión de las proteínas E7 silvestres, se ve atenuada con los mutantes  $\Delta$ DLYC\_16E7 y  $\Delta$ DLFC\_5E7 (Figura 19). Aunque en el caso de  $\Delta$ DLFC\_5E7 y p107 exógeno los niveles no se recuperan totalmente, sí son mayores que con la proteína silvestre (Figura 19B).



**Figura 19. Mutantes de delección de E7 no reducen los niveles de pRb y p107.** A: *western blot* de transfecciones en Saos2 con los genes E7 mutantes en el dominio LxCxE y con el vector de expresión de pRb (A) o p107HA (B). En ambos casos se usó eGFP como control de la transfección.

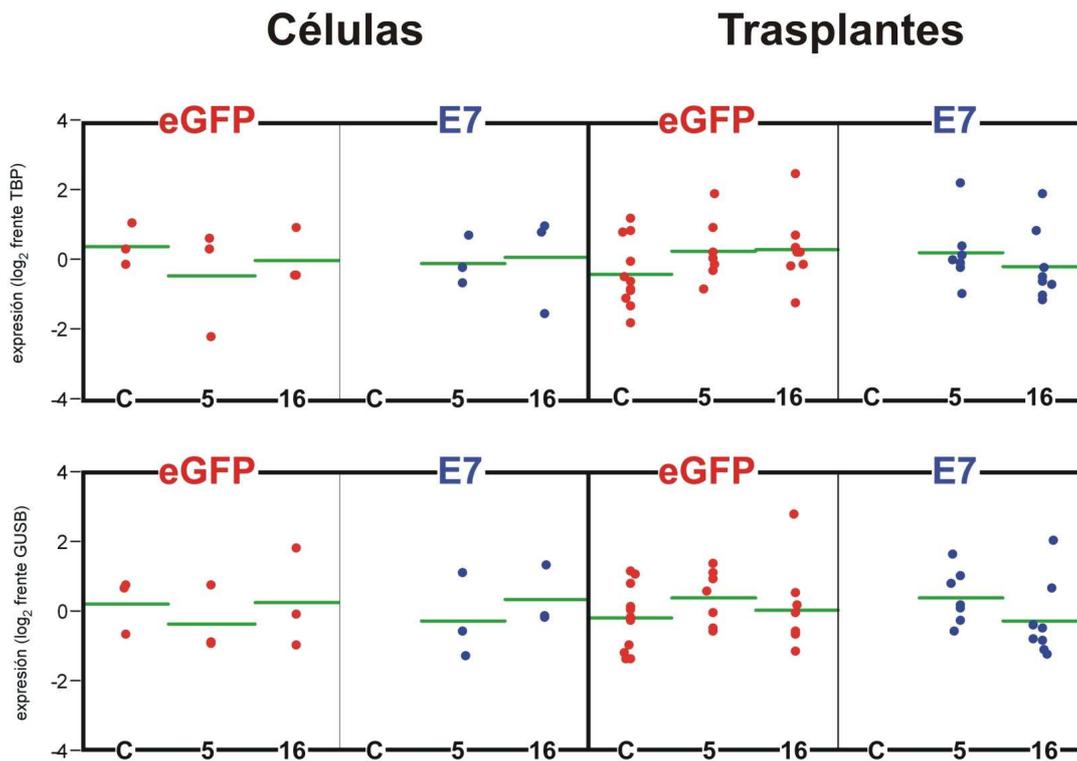
Los resultados sugieren que la reducción en los niveles de pRb y p107 se produce mediante unión previa de 5E7, ya que el mutante en el motivo LxCxE es menos eficiente.

#### 4.4. Alteraciones en piel humana por la expresión de E7 de VPH

Para conocer las consecuencias fenotípicas de la expresión de E7 en un modelo de análisis *in vivo* de piel humana, se reconstituyó piel humana a partir de QPHs que expresan 5E7 ó 16E7, y posteriormente se trasplantó en ratones inmunodeficientes *nu/nu*. Para ello se utilizaron queratinocitos transducidos con el vector retroviral pLZR-E7Flag-IRES-eGFP. Estos QPHs transducidos se pusieron sobre una matriz de fibrina y fibroblastos que fue trasplantada en los ratones inmunodeficientes. A partir de esta matriz se desarrolló una epidermis humana que se mantiene en estos ratones durante 3 ó 6 meses para analizar los efectos fenotípicos de E7 a largo plazo. Se realizaron tres tandas de trasplantes, con cuatro trasplantes por cada vector retroviral (vector vacío, con 5E7 ó con 16E7). Las dos primeras tandas de trasplantes se mantuvieron durante 3 meses, mientras que la última se mantuvo hasta los 6 meses.

##### 4.4.1. **Expresión estable de genes E7 en los trasplantes**

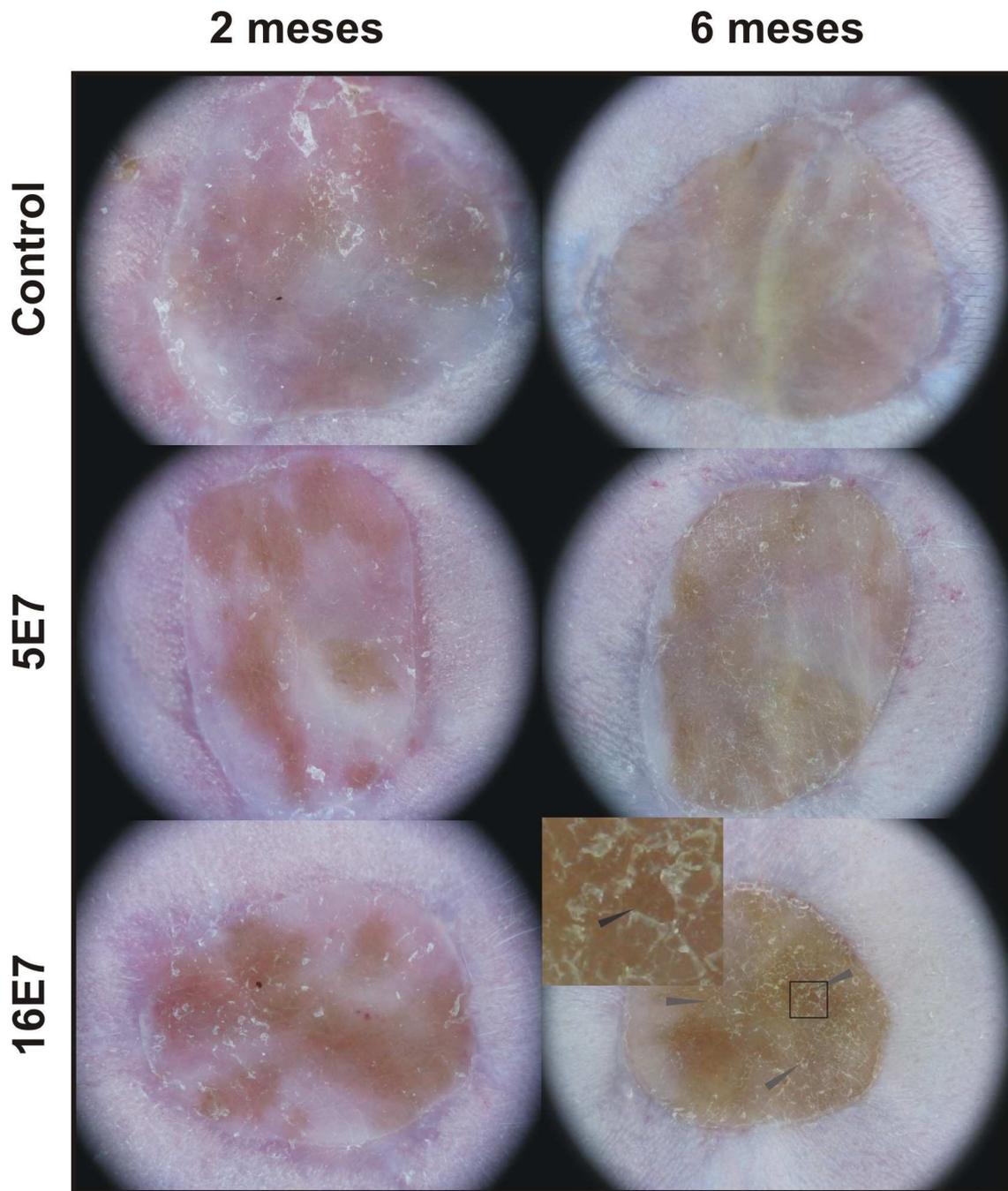
Las pieles mantienen activo el promotor LTR del vector retroviral utilizado durante el período de análisis ya que se visualizó a lo largo de todo el tiempo del trasplante la proteína eGFP mediante lupa con los filtros adecuados. Además, se analizó por qRT-PCR los niveles del ARNm de eGFP y de los E7s tanto en los queratinocitos antes de formar el equivalente cutáneo como al final del trasplante. Los niveles observados en los QPHs antes de ser trasplantados se mantienen también en los equivalentes cutáneos (Figura 20), demostrando que los genes transducidos se expresan a lo largo del tiempo del trasplante sin que haya silenciamiento.



**Figura 20.** Expresión de los genes E7 y eGFP en QPHs y trasplantes. Mediante PCR cuantitativa se cuantificaron los niveles de ARNm de eGFP y los distintos E7s. Los valores fueron normalizados con los niveles de TBP o GUSB, usados como controles de expresión y se corrigieron según el porcentaje de infección obtenido por citometría de flujo de los QPHs .

#### 4.4.2. Análisis macroscópico de los trasplantes mediante dermatoscopio

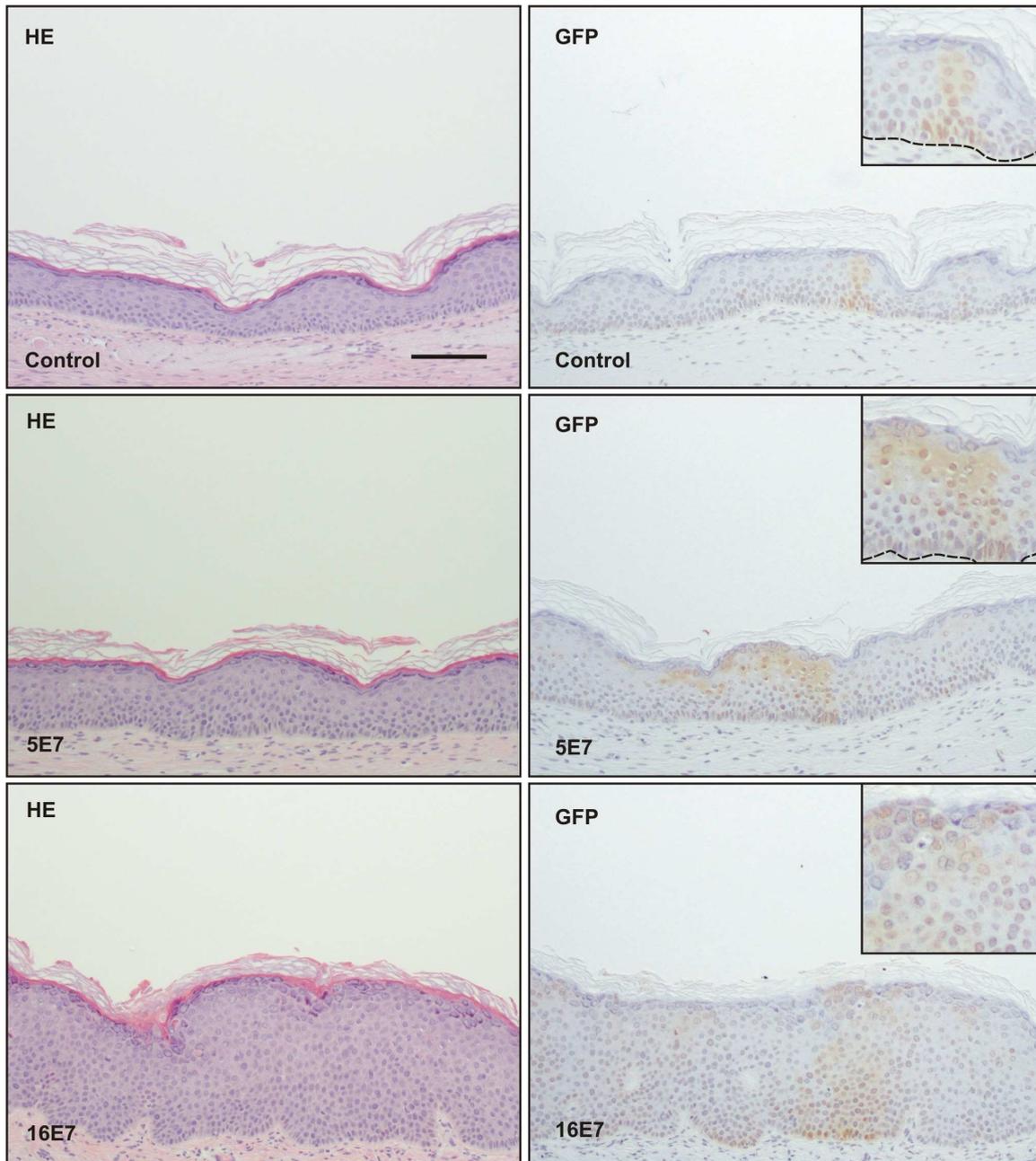
Para observar cambios macroscópicos se utilizó el dermatoscopio, que posee un juego de lentes acopladas a una cámara que permite la obtención de imágenes macroscópicas de la piel de alta calidad. El seguimiento de los equivalentes dermo-epidérmicos a distintos tiempos del trasplante mediante dermatoscopio nos permitió comprobar que las pieles que expresaban las proteínas E7 virales presentaban engrosamiento y descamación, probablemente asociados a hiperqueratosis. El engrosamiento es mucho mayor en las pieles que expresan 16E7. Además, como se puede apreciar en la Figura 21, las pieles que expresan 16E7 presentan criptas y estructuras papilomatosas que se pueden visualizar macroscópicamente a los 6 meses.



**Figura 21. Imágenes de trasplantes mediante dermatoscopio** Seguimiento de los trasplantes de 6 meses mediante dermatoscopio, a los 2 y 6 meses. Las flechas indican zonas con criptas y papilomatosis. El área marcada denota la zona ampliada

#### 4.4.3. Análisis histológico de los trasplantes

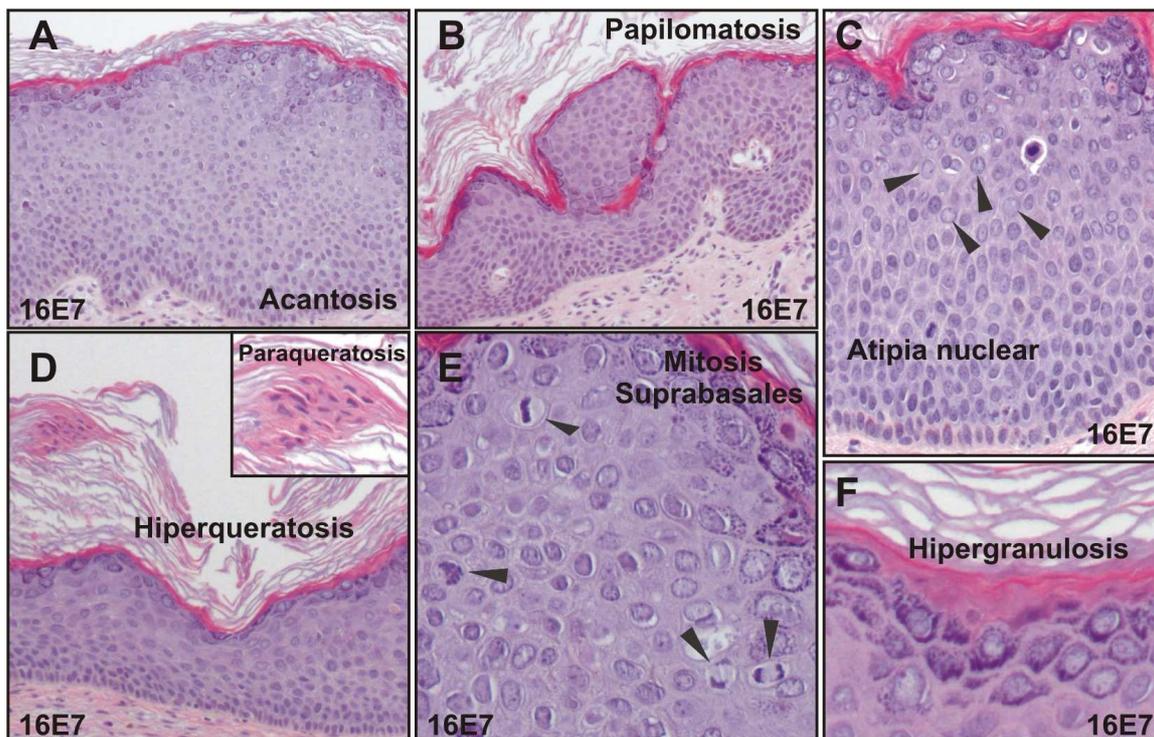
El análisis histológico mediante tinción con hematoxilina-eosina apoya los datos del dermatoscopio, ya que se ve un engrosamiento en las pieles que expresan E7 (Figura 22).



**Figura 22. Histología de los trasplantes y expresión de eGFP.** HE: Tinciones realizadas con hematoxilina-eosina de los trasplantes control, 5E7 y 16E7. GFP: detección por inmunohistoquímica de la proteína eGFP que se expresa cuando el transgén está activo. La barra equivale a 100 $\mu$ m.

Este fenotipo se presenta en los trasplantes que expresan 16E7 a lo largo de todo el trasplante. Aunque no todas las células basales son eGFP positivas, sí que lo son una proporción significativa. Eventualmente, se aprecia una expansión clonal a partir de las células basales hacia capas suprabasales (Figura 22).

El fenotipo observado en el caso de las pieles que expresan 16E7 es claramente distinto al del control. En general, los trasplantes con 16E7 presentan engrosamiento de la epidermis (acantosis), evaginaciones de la epidermis (papilomatosis), y mitosis ectópica en estrato espinoso e incluso granuloso (Figura 23). Además en muchos de ellos hay un aumento de la capa córnea (hiperqueratosis) llegando a aparecer incluso células nucleadas en esta capa (paraqueratosis). También se observa atipia nuclear suprabasalmente (tamaño anormal de núcleos poco condensados en los que se ve marcadamente el nucléolo) y aumento de la capa granulosa (hipergranulosis). Estas características histopatológicas observadas en los trasplantes son comunes de lesiones cervicales como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) e incluso carcinomas de cérvix (Figura 23).



**Figura 23.** 16E7 provoca lesiones típicas de NIC. Todas las imágenes muestran distintas zonas de trasplantes que expresan la proteína 16E7. **A:** Acantosis. **B:** Papilomatosis **C:** Atipia nuclear. **D:** Hiperqueratosis acompañada de paraqueratosis. **E:** Mitosis en capas suprabasales. **F:** Hipergranulosis.

En total se han realizado 36 trasplantes de los equivalentes dermo-epidérmicos en ratones *nu/nu*. Algunos de los ratones no tomaron el trasplante, otros murieron y

dos de los trasplantes eran tan pequeños que no se pudieron utilizar para el estudio. Quedaron finalmente 12 ratones con piel control, 8 con piel que expresan 5E7, y 9 con piel que expresa 16E7. En la Tabla 8 se recogen los datos de los animales utilizados para el estudio y las características histopatológicas observadas con tinciones hematoxilina-eosina. Algunos trasplantes control, como 2, 16 y 28, presentan características típicas de epitelios inmaduros como son la atrofia y la hiperqueratosis. El resto de trasplantes control son normales. En el caso de los trasplantes que expresan 5E7, sólo los correspondientes a los animales 18 y 20 tienen también características típicas de tejidos inmaduros. Por otro lado, algunos trasplantes que expresan 5E7, como los de los ratones 19 y 29, presentan acantosis focal. Los trasplantes que expresan 16E7 tienen todos ellos acantosis a lo largo del trasplante y mitosis suprabasales, la mayoría presentan papilomatosis, atipia nuclear, hipergranulosis y apoptosis focales. En algunas ocasiones las muestras 16E7 presentan paraqueratosis.

	Animal	Meses de trasplante	General	Atrofia	Acantosis	Hiperqueratosis	Papilomatosis	Mitosis Suprabasal	Atipia nuclear	Paraqueratosis	Hipergranulosis	Apoptosis Focal
pLZR	1	3	normal									
	2	3		si		si						
	3	3	normal									
	4	3			si							
	13	3	normal			leve				si		
	14	3	normal			leve						
	15	3	normal									
	16	3		si		si						
	25	6	normal									
	26	6	normal									
	27	6								leve		si
28	6		si		si							
pLZR 5E7	5	3	normal									
	6	3	normal									
	17	3	normal									
	18	3		si		si						
	19	3	normal		focal							si
	20	3		si		si						
	29	6			focal	leve					si	
30	6	normal										

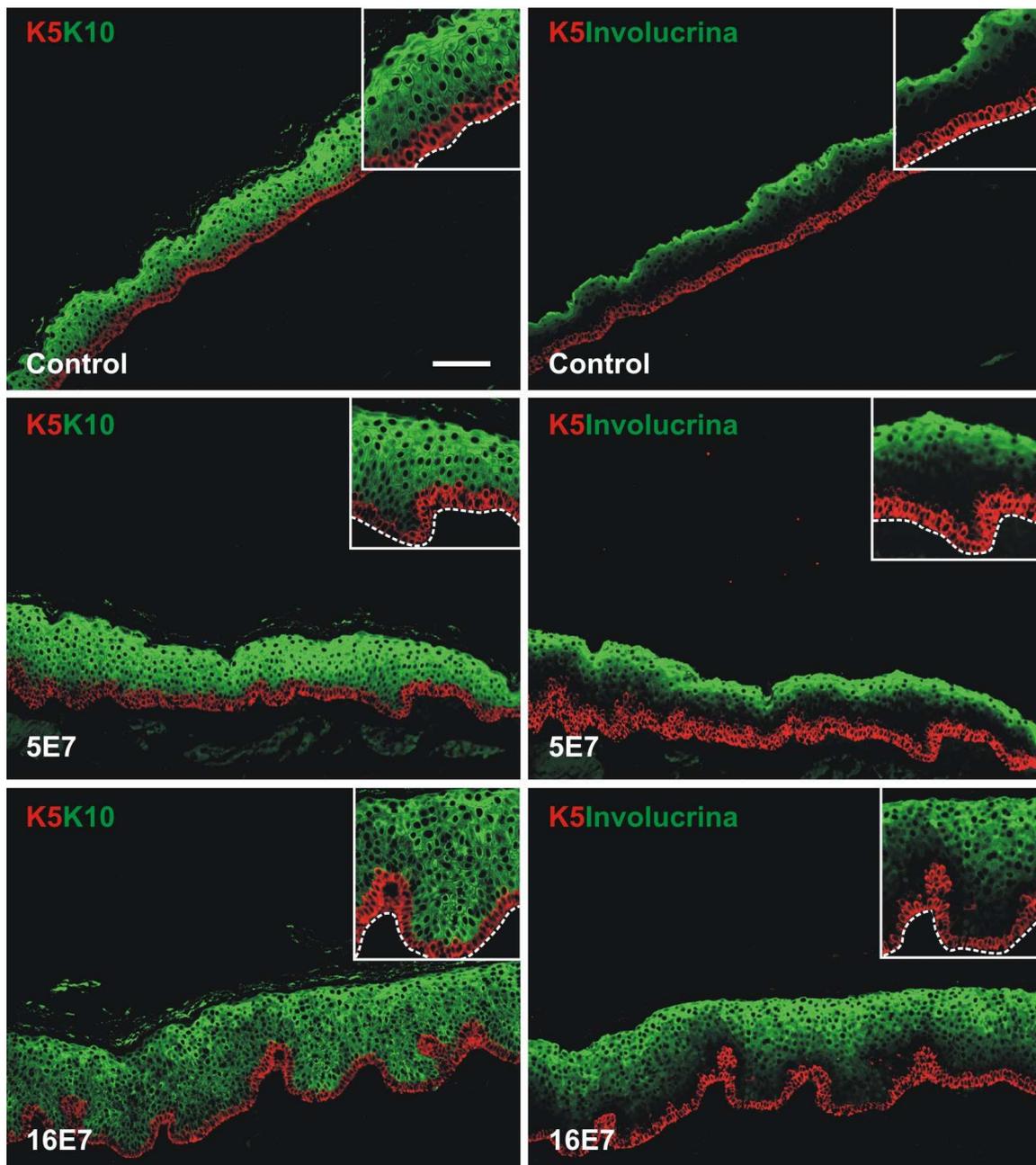
	Animal	Meses de trasplante	General	Atrofia	Acanthosis	Hiperqueratosis	Papilomatosis	Mitosis Suprabasal	Atipia nuclear	Paraqueratosis	Hipergranulosis	Apoptosis Focal
pLZR 16E7	9	3			si	leve	si	si	si		si	si
	11	3			si	si	si	si	leve	si	si	
	12	3			si	si	si	si	leve			si
	21	3			si	si		si	si			si
	23	3			si	si	si	si	si		si	
	33	6			si	si	si	si	si	si	si	si
	34	6			si	si	si	si	si		si	si
	35	6			si	si	si	si	si	si		si
36	6			si	si	si	si			si	si	

Tabla 8. Características histopatológicas de los trasplantes.

#### 4.4.4. E7 altera la diferenciación epitelial en los trasplantes

Siguiendo en la línea de la caracterización de los efectos de E7 de VPH 5 y 16 en los trasplantes, se estudió la diferenciación del tejido. En modelos animales y cultivos organotípicos que expresan 16E7 ya se había visto que existen alteraciones en estas pieles, provocando desorganización en la diferenciación (6, 18). De manera similar a los que ocurre en presencia de 16E7, modelos animales deficientes en pRb en epidermis sufren alteraciones en los patrones de diferenciación (11, 162).

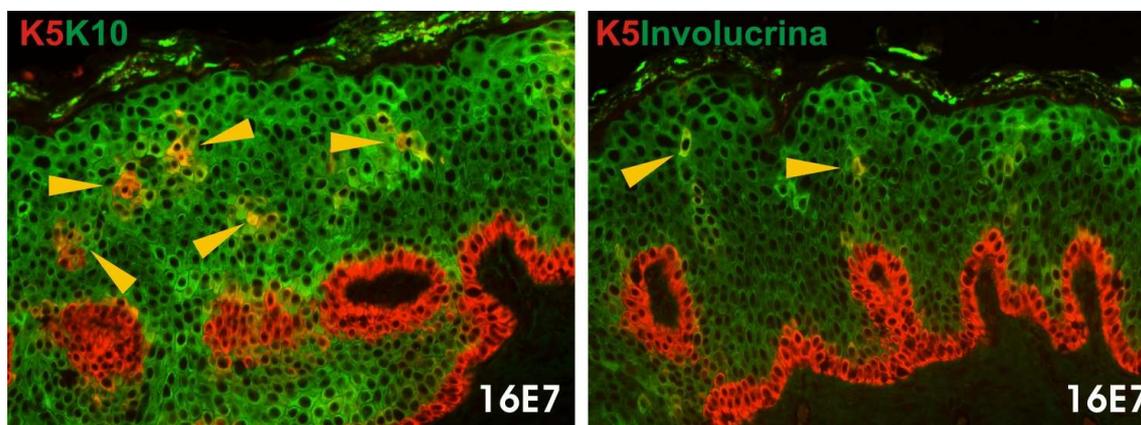
Se realizaron tinciones con los marcadores de diferenciación K5 (marcador de capa basal), K10 (marcador de diferenciación temprana) e involucrina (marcador de diferenciación tardía). Las pieles que expresan 5E7 no presentan diferencias en la expresión de K5, K10 ó involucrina con respecto al control (Figura 24). Por el contrario, los trasplantes que expresan 16E7 tienen expansión de las células que expresan involucrina hacia la zona basal y la expresión de K10 es más tenue en algunas zonas.



**Figura 24. Tinciones K5/K10 y K5/Involucrina de los trasplantes. K5K10:** Doble inmunofluorescencia con marcadores de capa basal (K5, rojo), y diferenciación temprana (K10, verde). **K5Involucrina:** Doble inmunofluorescencia con marcadores de capa basal (K5, rojo) y diferenciación tardía (involucrina, verde). La barra equivale a 100  $\mu\text{m}$ .

Las pieles que expresan 5E7 no presentan alteraciones significativas en los patrones de expresión de estos marcadores. Por otro lado, las pieles que expresan 16E7 presentan alteraciones en los procesos de diferenciación, como células K5/K10 y K5/involucrina positivas, lo que demuestra desacoplamiento entre proliferación y diferenciación, normalmente controlada por la familia del retinoblastoma (Figura 25).

Algunas de las alteraciones descritas se presentan en piel de ratones transgénicos que no expresan pRb (161) o pRb y p130 (111), y que se encuentran agravadas en ausencia de pRb y p107 (112, 162), lo que demuestra que 16E7 está inhibiendo la función de estas proteínas.



**Figura 25. Coexpresión de marcadores basales y de diferenciación en trasplantes con 16E7.** Las imágenes pertenecen a un trasplante que expresan 16E7. **K5K10:** Se aprecian células suprabasales donde colocalizan K5 (rojo) y K10 (verde) en capas altas. **K5Involucrina:** Se aprecian células suprabasales donde colocalizan K5 (rojo) e involucrina (verde). Las flechas indican las zonas de colocalización.

#### 4.4.5. Aumento de proliferación en trasplantes que expresan E7

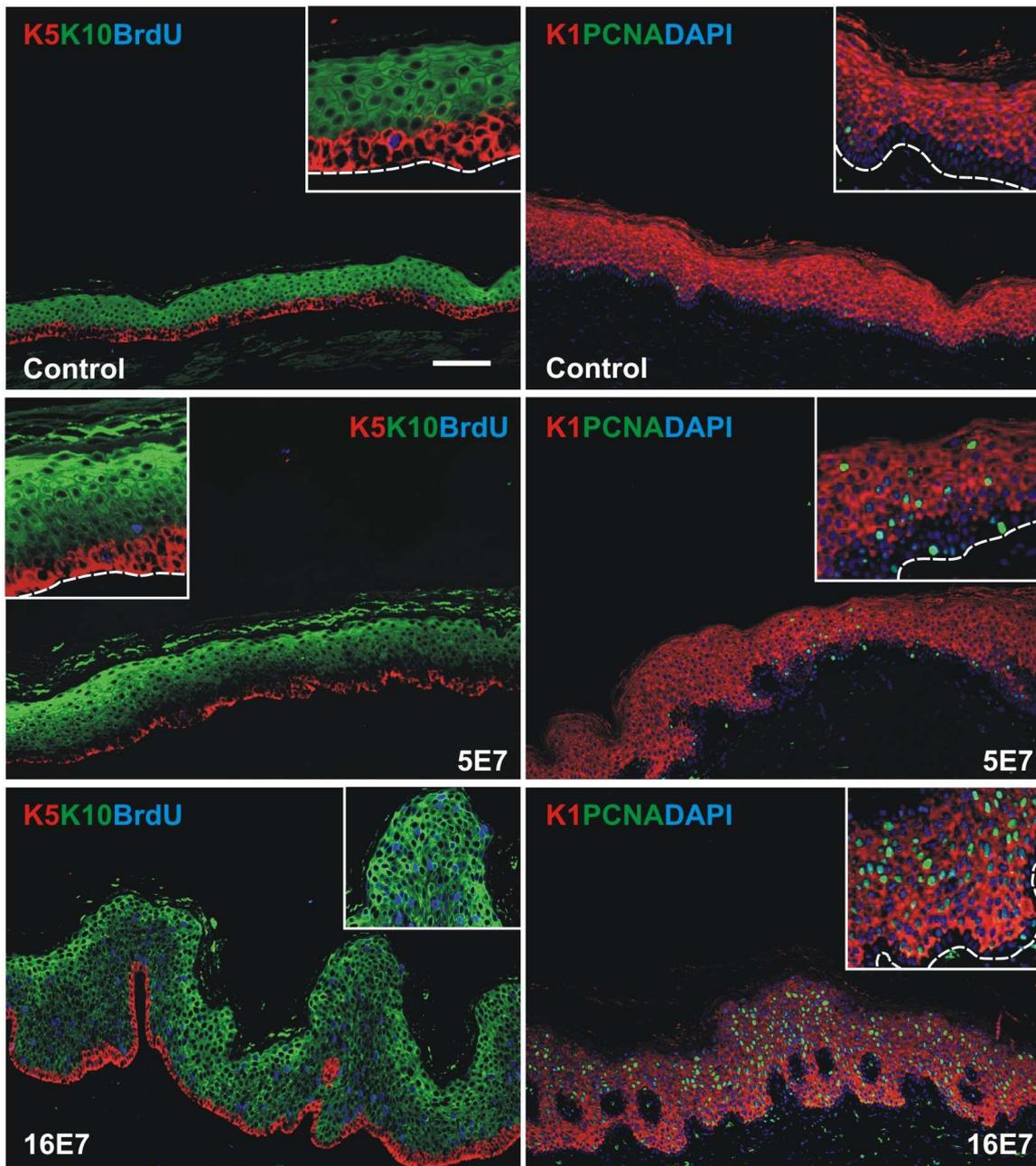
La existencia de células en división en capas suprabasales inducida por 16E7 ha sido demostrado en diferentes modelos de infección por VPH (6, 18, 86). En este estudio hemos descrito mediante análisis por hematoxilina-eosina la presencia de mitosis ectópica en capas suprabasales en las pieles que expresan 16E7. Por ello, se han realizado análisis de proliferación mediante marcaje con BrdU y detección del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en las pieles generadas tras el trasplante.

La inyección de BrdU una hora antes del sacrificio de los animales permite observar las células que se encuentran en división celular, ya que BrdU es un análogo de nucleótido que se incorpora al ADN celular en replicación. En las pieles que expresan 5E7, el marcaje de BrdU está restringido a la zona basal como ocurre en el control (Figura 26). A veces se puede detectar tinción suprabasal, como se puede ver por la colocalización de K10/BrdU (Figura 26). Lo más llamativo es la gran cantidad de células que incorporan BrdU, principalmente en zona suprabasal, en el caso de los

trasplantes que expresan 16E7. El resultado demuestra la existencia de células con capacidad replicativa en capas diferenciadas en los trasplantes que expresan 16E7.

PCNA es un cofactor de la ADN polimerasa delta celular, que colabora en el proceso de síntesis del ADN durante la replicación. Este marcador se expresa en células en proliferación, lo que supone que en la epidermis se expresa únicamente en la capa basal o en las proximidades de ésta, tal y como hemos observado en los trasplantes control (Figura 26). En el caso de los trasplantes que expresan 16E7, existe un número importante de células basales y suprabasales que expresan PCNA, siendo este patrón generalizado a lo largo de todo el trasplante. Mientras, en los trasplantes que expresan 5E7, la expresión suprabasal de PCNA se reduce a zonas muy discretas (Figura 26).

Ambos marcadores de proliferación celular han demostrado que las pieles que expresan 5E7 tienen un patrón normal, excepto zonas muy puntuales en las que se estarían evadiendo los controles de parada de ciclo. Por otro lado, los trasplantes que expresan 16E7 tienen alterado el patrón de proliferación normal del epitelio, permitiendo a las células diferenciadas escapar de la parada de ciclo celular. Este resultado también se presenta en las pieles de los ratones que no expresan pRb, o pRb y p130, y que aparece agravado en pieles sin pRb ni p107.

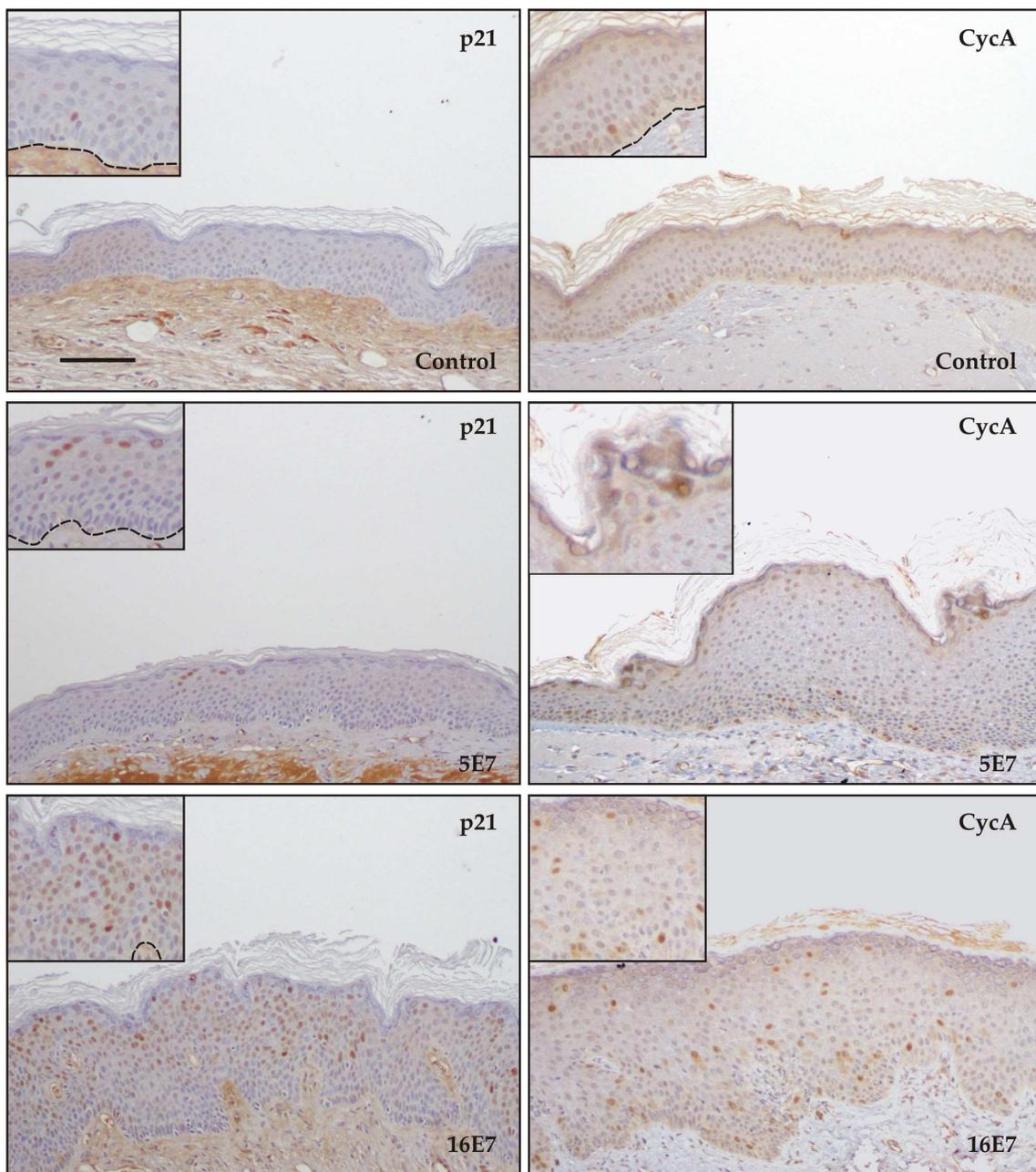


**Figura 26. BrdU y PCNA. K5K10BrdU:** triple tinción por inmunofluorescencia de marcadores de capa basal (K5, rojo), diferenciación temprana (K10, verde) y proliferación (BrdU, azul). **K1PCNADAPI:** triple tinción por inmunofluorescencia de marcadores de diferenciación temprana (K1, rojo), de proliferación (PCNA, verde) y tinción de los núcleos (DAPI, azul). La barra equivale a 100 $\mu$ m.

#### 4.4.6. Expresión de ciclina A y p21 en trasplantes que expresan E7

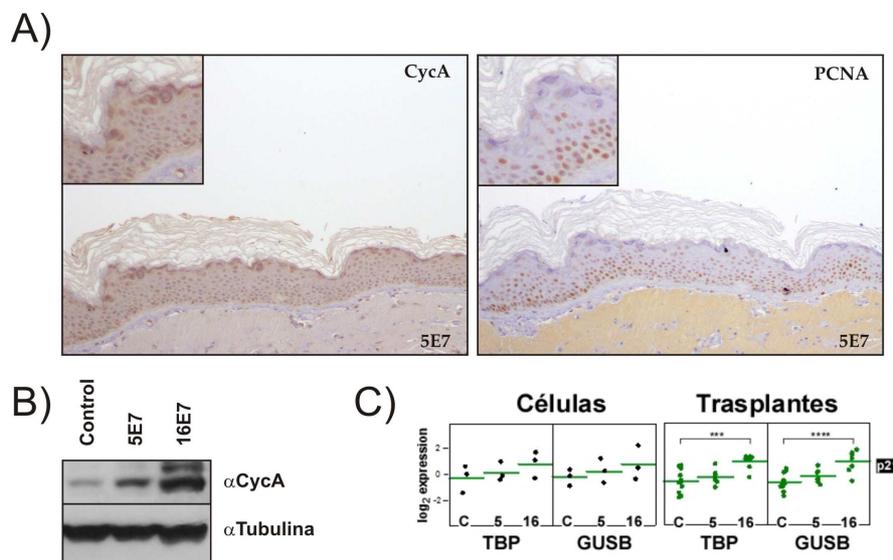
En muchos de los modelos de infección por VPH-AR, así como en lesiones, se ha descrito que hay un aumento de la proteína p21. A pesar de que esta proteína se encarga de parar el ciclo celular a través de la inhibición de PCNA y de los complejos ciclina/cdk, la función de p21 está inhibida por la propia proteína viral a mediante los

aminoácidos CVQ (posiciones 68-70) del dominio C-terminal de E7 (86). El análisis de p21 en los trasplantes realizado mediante inmunohistoquímica, revela que los epitelios con E7 presentan expresión de p21 en capas suprabasales (Figura 27) en comparación con la ausencia de células teñidas en los controles. La expresión es generalizada a lo largo de todo el trasplante en las pieles con 16E7, mientras que en el caso de 5E7 solo se presenta p21 suprabasal en zonas muy concretas. Al igual que ha sido descrito por otros autores, cabe pensar que este p21 podría ser no funcional.



**Figura 27.** Expresión de Ciclina A y p21 en los trasplantes. CycA: detección de ciclina A por inmunohistoquímica. p21: detección por inmunohistoquímica de la proteína p21. La barra equivale a 100 $\mu$ m.

Para profundizar en esto, analizamos la expresión de una de las proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, la ciclina A. La formación del complejo Ciclina A/cdk2 es importante para permitir la replicación del ADN y se ha visto alterada en lesiones intraepiteliales provocadas por VPH-AR. Hay sobreexpresión de ciclina A en lesiones de cervix por infección con VPH-AR (102, 207) a pesar del aumento de p21. Análisis mediante inmunohistoquímica en los trasplantes, demuestra que las pieles que expresan E7 de VPH 5 cutáneo o VPH 16 mucoso presentan una sobreexpresión de ciclina A en capas suprabasales (Figura 27). Esto sugiere que el ciclo celular en estas células continúa progresando a pesar de estar en estratos que normalmente no proliferan. La sobreexpresión de ciclina A en los trasplantes que expresan 16E7 es a lo largo de toda la piel, mientras que en las que expresan 5E7, la expresión suprabasal de ciclina A se reduce a zonas muy discretas. Estas zonas que sobreexpresan ciclina A suprabasal son coincidentes con las zonas que también expresan PCNA (Figura 28A). El aumento en la expresión de ciclina A y de p21 se produce ya en los QPH transducidos, previamente a la formación de los equivalentes cutáneos, tal y como se aprecia mediante *western blot* de Ciclina A (Figura 28B) o qRT-PCR del gen de p21, CDKN2A (Figura 28C).

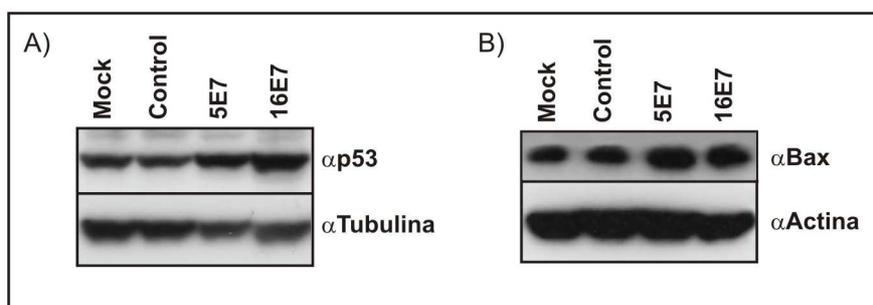


**Figura 28. Alteraciones del ciclo celular en los trasplantes y en QPHs transducidos en cultivo. A:** Inmunohistoquímica para la detección de ciclina A (CycA) y PCNA en zonas equivalentes del trasplantes con 5E7. **B:** Análisis de los niveles de Ciclina A en los extractos de QPHs en cultivo transducidos mediante *western blot*. **C:** Análisis por PCR cuantitativa del ARNm de p21 (CDKN2A) en QPHs transducidos y en trasplantes. Los valores están normalizados con TBP o GUSB como controles de expresión, y corregidos con los porcentajes de células eGFP positivas según citometría. Significancia estadística: \*\*\*: p-valor <0.0005, \*\*\*\*: p-valor <0.00005.

Los resultados obtenidos muestran, tal y como ha sido previamente descrito, que 16E7 aumenta la expresión de p21 en capas suprabasales, aunque posiblemente inhibida funcionalmente como ha sido descrito. También se ha observado p21 suprabasal en los trasplantes de 5E7, pero no sabemos si es capaz de inhibir la función de p21. La expresión suprabasal de ciclina A, junto con el aumento de proliferación según BrdU y PCNA sugiere que en los trasplantes de 5E7 (focalmente) y 16E7 existen células comprometidas a diferenciarse que han reentrado en el ciclo celular, consecuencia de un desacoplamiento de los mecanismos de diferenciación y proliferación, normalmente regulado por la familia del retinoblastoma.

#### 4.4.7. Apoptosis en los trasplantes infectados con E7

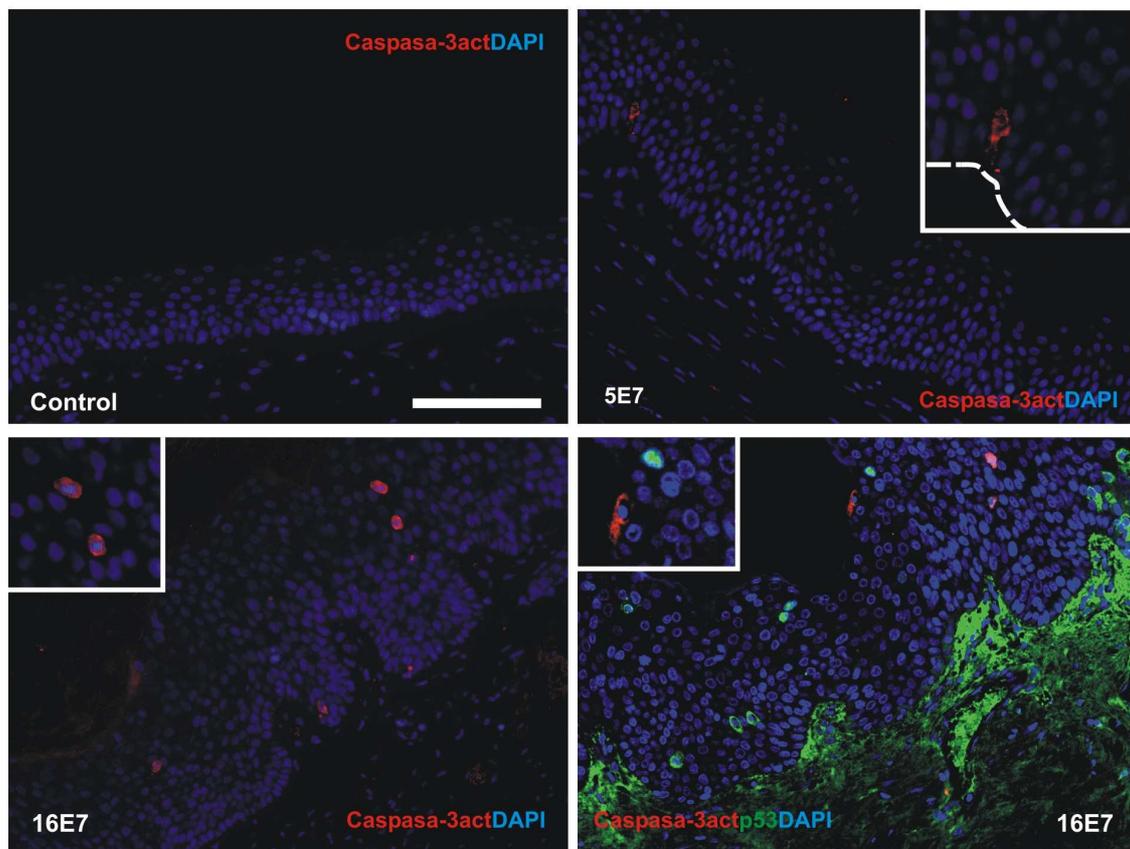
Previamente, ha sido descrito en cultivos organotípicos y modelos animales que la expresión de 16E7 induce la expresión de p53 (158, 184). Ya que p53 es un regulador de apoptosis, quisimos analizar tanto su expresión como la posible activación de muerte celular programada. Mediante *western blot* se vio en los QPHs transducidos que expresan 5E7 y 16E7 un aumento de p53 y de BAX, gen proapoptótico regulado directamente por p53 (Figura 29), lo que podría significar una activación de apoptosis vía p53.



**Figura 29. Apoptosis en QPHs transducidos.** Análisis de los niveles de p53 (A) y Bax (B) en los extractos de QPHs en cultivo transducidos mediante *western blot*.

Para ver si realmente existe una activación de la apoptosis en los trasplantes, se analizó la presencia de la forma activa de caspasa-3 mediante inmunofluorescencia. La activación de caspasa-3 es considerada como marcadora de apoptosis y es común a las rutas dependientes e independientes de p53 en la activación de muerte celular programada. La caspasa-3 está implicada en la desestabilización de la mitocondria y

para que se active es necesario su procesamiento (110, 142). En el caso de los trasplantes que expresan 5E7, el número de células que tienen caspasa-3-activa es muy pequeño (Figura 30). Para ver si la inducción de apoptosis está relacionada con la subida de los niveles de p53 observado en los QPHs transducidos, se realizó una doble tinción para ambos marcadores. No se observó expresión de p53 en el caso de los controles ni en las pieles con 5E7, pero sí en el caso de las pieles con 16E7 (Figura 30), aunque el número de células teñidas era muy pequeño y no se aprecia colocación de p53 con caspasa-3 activa.



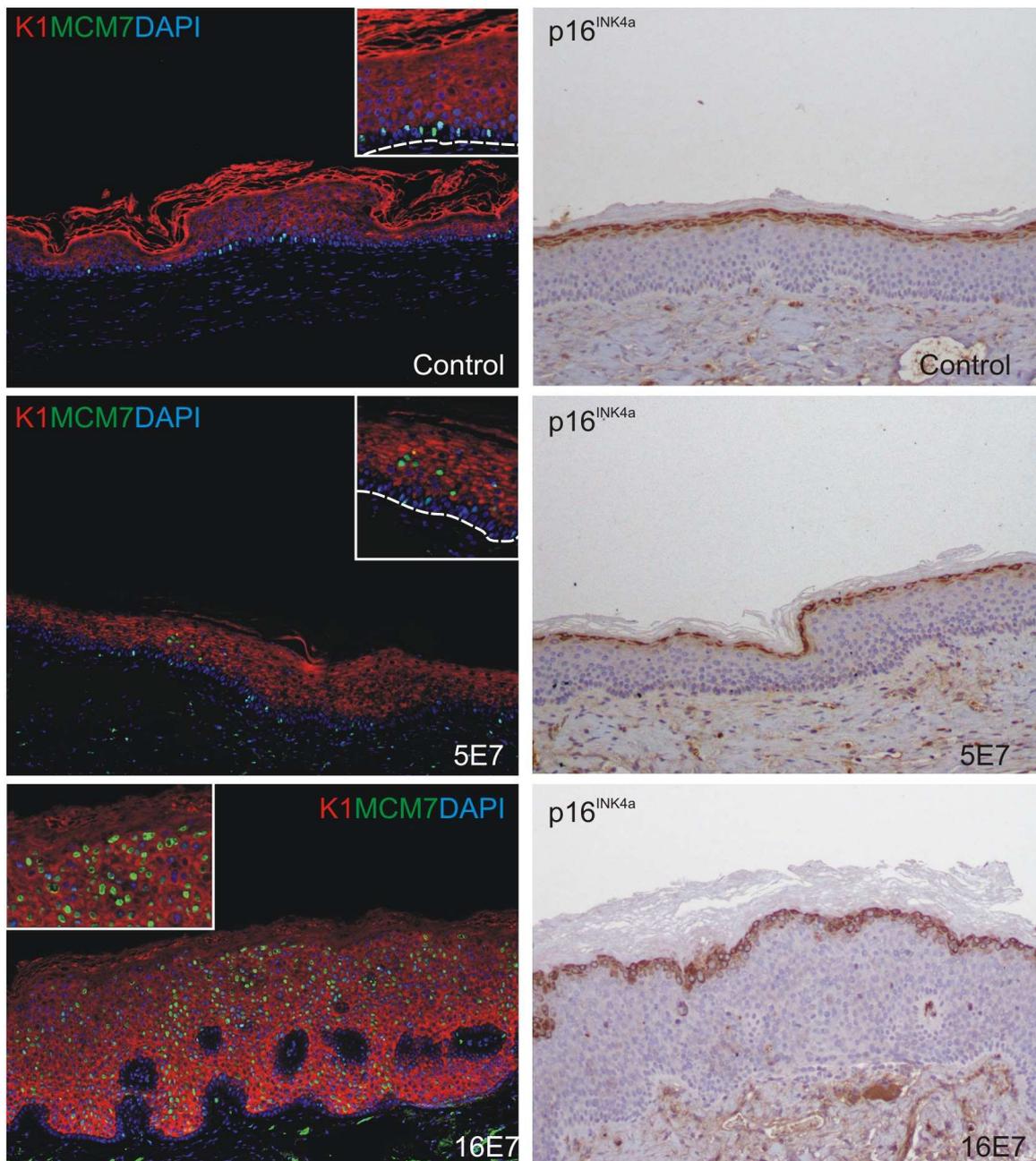
**Figura 30. Apoptosis mediada por E7. Caspasa-3actDAPI:** Tinción por inmunofluorescencia del marcador de apoptosis Caspasa- 3 activa (rojo) y marcaje de núcleos mediante tinción con DAPI (azul). **Caspasa-3act p53 DAPI:** Detección mediante inmunofluorescencia del marcador de apoptosis Caspasa- 3 activa (rojo), el inductor de apoptosis p53 (verde) y marcaje de núcleos mediante tinción con DAPI (azul). La barra equivale a 100  $\mu$ m.

A pesar de que existe un pequeño aumento en la expresión de p53 y una pequeña activación del activador proapoptótico caspasa-3, no parece que haya apoptosis generalizada en los trasplantes que expresan E7.

#### 4.4.8. Expresión de MCM7 y p16<sup>INK4a</sup>, marcadores indirectos de VPH-AR, en los trasplantes de E7

La detección de la presencia de VPH en muestras patológicas de lesiones premalignas y malignas no es fácil. Los oncogenes E6 y E7 se detectan con muchas dificultades mediante inmunohistoquímica. Además, habría que utilizar anticuerpos específicos para los oncogenes dependiendo del tipo de VPH. Aunque se podría utilizar PCR con cebadores degenerados u otras técnicas de tipificación del virus, no todos los servicios de patología hospitalarios tienen acceso o posibilidad de utilizar estas tecnologías. Por tanto, es necesario determinar qué posibles biomarcadores de la infección por VPH existen que se puedan usar fácilmente y con bajo coste en la rutina clínica. Así, MCM7 es una helicasa que se considera como marcador de infección por VPH (132).

Las pieles control generadas tienen una expresión de MCM7 restringida a la capa basal, que es el estrato proliferativo. Sin embargo, las pieles que expresan E7 de VPH 5 y VPH 16 presentan un patrón de expresión de MCM7 en capas suprabasales (Figura 31). En el caso de las pieles que expresan 5E7, las zonas que tienen MCM7 suprabasal son muy discretas, pero en el caso de 16E7 su patrón de expresión se extiende a lo largo del trasplante. Este patrón, que va desde la zona basal a las capas más elevadas de la epidermis, se da en todos los trasplantes de 16E7, y es el que se presenta en NIC de grado II/III y en carcinomas de cérvix (26, 132) (Figura A2 del anexo).



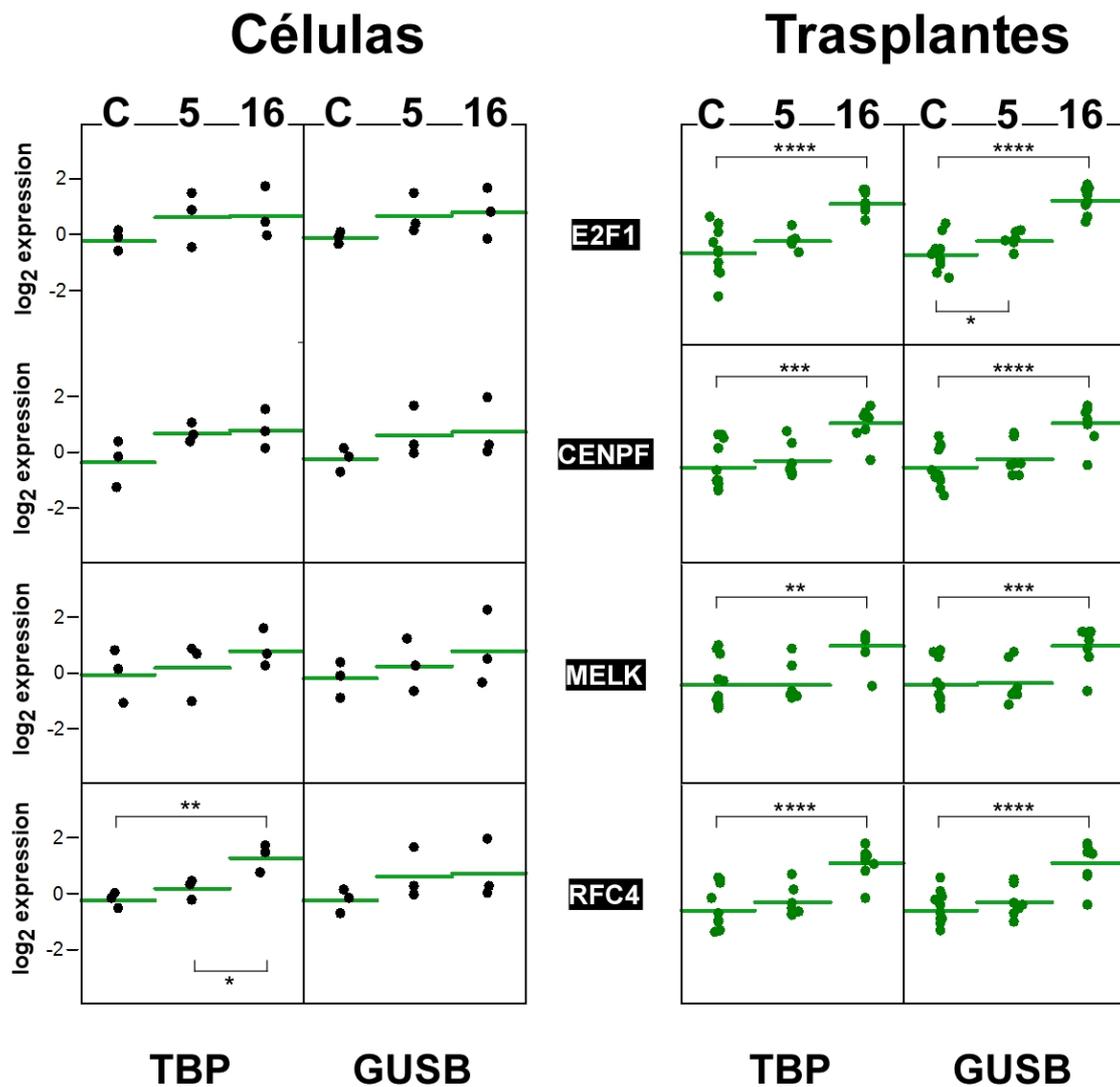
**Figura 31:** Expresión de MCM7 en trasplantes y ausencia de p16<sup>INK4a</sup>. K1MCM7DAPI: triple tinción por inmunofluorescencia del marcador de diferenciación (K1, rojo), marcador de infección por VPH (MCM7, verde) y tinción de núcleos con DAPI (azul). p16<sup>INK4a</sup>: Inmunohistoquímica para la detección de p16<sup>INK4a</sup> (kit *CINtec*).

Por otro lado, se ensayó la presencia de p16<sup>INK4a</sup> en los trasplantes mediante el kit de inmunohistoquímica *CINtec*, frecuentemente utilizado en clínica para aumentar la precisión del diagnóstico de NIC y CC. Numerosos estudios demuestran que p16<sup>INK4a</sup> se expresa mucho en virtualmente todos los casos de NIC de grado II y III, y en CCE de

cérvix, pero se detecta raramente en epitelio mucoso (105, 106). El resultado muestra que, a diferencia de lo que pasa con muestras de carcinomas de cérvix, ningún trasplante con E7 mostraba expresión de p16<sup>INK4a</sup> (Figura 31). Este resultado está en contradicción con el obtenido con MCM7, así como con la existencia de mitosis ectópica en las capas más altas. También está en contradicción con otras características fenotípicas descritas en esta tesis, que globalmente demuestran que los trasplantes que expresan 16E7, y 5E7 (focalmente), disrumpan los procesos regulados por la familia del retinoblastoma.

#### **4.4.9. Expresión génica en los trasplantes de biomarcadores de carcinomas asociados a VPH-AR extraídos de estudios de expresión génica global.**

El análisis de la sobreexpresión o represión de genes es una herramienta cada vez más utilizada para la caracterización de diversos tumores. En nuestro estudio hemos utilizado una lista de genes sobreexpresados en muestras infectadas que previamente habíamos obtenido mediante un meta análisis comparativo de diversos estudios de expresión génica global de tumores CCECC ó CC infectados con VPH. La lista de genes obtenidos pueden ser considerados biomarcadores de VPH (29). Así, se analizó la expresión del ARNm de 4 de estos biomarcadores mediante PCR cuantitativa: E2F1 (*E2F transcription factor 1*), CENPF (*centromere protein F*), MELK (*maternal embryonic leucine zipper kinase*), y RFC4 (*replication factor C 4*). Los resultados demuestran que todos ellos están sobreexpresados en los trasplantes de 5E7 y 16E7, a excepción de MELK, cuyo patrón no cambia con 5E7. Sin embargo, sólo en el caso de los trasplantes de 16E7 el aumento de expresión de los 4 genes es significativo estadísticamente, comparado con los trasplantes control (Figura 32).



**Figura 32. . Sobreexpresión de biomarcadores de tumores VPH positivos.** Se muestran los resultados de los análisis por PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de E2F1, CENPF, MELK y RFC4 en queratinocitos transducidos y en los trasplantes. Estos han sido normalizados con TBP o GUSB y corregidos con los datos de expresión de eGFP de células y de los trasplantes en cada caso. \*: p-valor <0.5, \*\*: p-valor <0.005, \*\*\*: p-valor <0.0005, \*\*\*\*: p-valor <0.00005.

Los resultados demuestran que los trasplantes de E7, especialmente 16E7, sobreexpresan genes que distinguen tumores humanos infectados con VPH-AR, tanto de cabeza y cuello como de cérvix. Posibles terapias dirigidas contra alguno de estos genes (u otros) podrían ser ensayadas con carácter preclínico en estos trasplantes.

#### 4.4.10. Desregulación de microARNs implicados en cáncer de cérvix

Los microARN son ARN de pequeño tamaño (21-25 nucleótidos) que funcionan reprimiendo la expresión de sus genes diana. En muchos tumores hay alteraciones en

la expresión de diversos microARN (119, 131), que podrían servir como indicadores de malignidad o ser utilizados como dianas terapéuticas. En este estudio se realizaron análisis mediante PCR cuantitativa de algunos de los microARN de interés en CC. Así se ha demostrado que miR-146a (115, 198), miR-21 (115, 120, 198), y miR-148a (147, 198) están sobrepresados en muestras de CC, mientras que miR-145 (124, 147, 198) y miR-203 (115, 147) están expresados negativamente. Por otro lado, se ha demostrado que miR-200a está poco expresado en CC de mal pronóstico (88), por lo que puede ser utilizado como predictor de malignidad. A pesar de no haber visto diferencias en la expresión de miR-148a, miR-145 o miR-203, si que existen cambios en la expresión de miR-146a, miR-21 y miR-200a en los trasplantes que expresan E7 (Figura 33), siendo significativos estadísticamente sólo en el caso de 16E7.

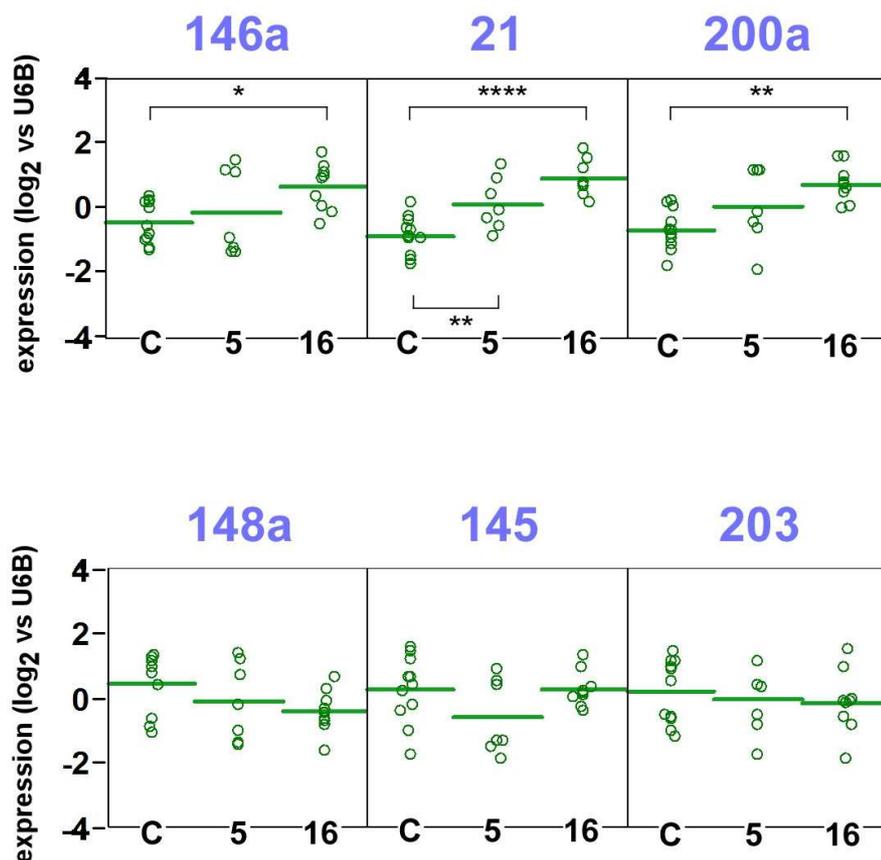


Figura 33. Expresión de micro ARN en queratinocitos transducidos y en los trasplantes. Resultado de los análisis mediante PCR cuantitativa de la expresión de miR-146a, miR-21, miR-200a, miR-148a, miR-145 y miR-203 normalizados con U6B y corregidos con los datos de expresión de eGFP de células y de los trasplantes en cada caso. \*:  $p < 0.5$ , \*\*:  $p < 0.005$ , \*\*\*:  $p < 0.00005$ .

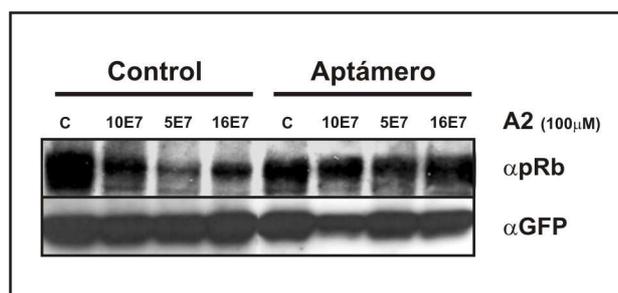
Los resultados demuestran que en los trasplantes que expresan E7, especialmente 16E7, existe desregulación de microARNs previamente implicados en carcinogénesis en general, y de CC en particular. Por tanto, los trasplantes pueden ser utilizados como herramientas para analizar la posible actividad antitumoral de inhibidores de microARNs asociados a patologías del virus del pailoma humano.

#### 4.5. El aptámero A2 impide la degradación de pRb

Los aptámeros son moléculas de ARN que se pueden sintetizar obteniendo una librería de aptámeros, que tras un proceso de amplificación y selección denominado SELEX, permite el enriquecimiento del aptámero de interés (155).

El aptámero A2, se ha visto que es capaz de impedir la unión entre pRb y 16E7 *in vitro* (141). Experimentos realizados por este mismo grupo muestran que A2 también impide la degradación de pRb mediada por 16E7 en la línea celular SiHa, inhibe la proliferación celular e induce apoptosis en estas células que tienen integrado parte del genoma de VPH 16 (datos pendientes de publicación).

Para ver si el aptámero A2 no sólo impide degradación de pRb mediada por 16E7, si no también la posiblemente mediada por 5E7, se transfectaron células Saos2 con el aptámero A2 tras cotransfectar con vectores de expresión de pRb y E7 (Figura 34). El aptámero A2 inhibe la reducción de los niveles de pRb, no sólo en presencia de 16E7, sino también de 5E7.



**Figura 34: Efecto de A2 sobre células transfectadas con E7 de VPH 5 y VPH 16.** Análisis mediante *western blot* de los extractos proteicos procedentes de células Saos2 cotransfectadas con vectores de expresión de pRb, E7 y GFP como control y una cotransfección 48 horas después con el aptámero A2.

El resultado sugiere que el aptamero A2 inhibe la unión de pRb tanto a 16E7 como 5E7, posiblemente mediante el bloqueo de la interacción a través del motivo LxCxE, conservado en ambas proteínas E7. Futuros análisis son necesarios para comprobar si A2 puede ser utilizado como terapia anti-VPH, posiblemente mediante aplicación tópica en trasplantes que expresen E7.



## 5. DISCUSIÓN



### 5.1. E7 de VPH 5 y la familia del retinoblastoma

Un número importante de evidencias demuestran que la oncogénesis de VPH-AR depende, esencialmente, de la expresión de los genes E6 y E7. En el caso de E7, sus dianas moleculares más estudiadas son los miembros de la familia del retinoblastoma (pRb, p107 y p130). La proteína viral es capaz de inactivar la función de éstas proteínas mediante unión directa e inducción de su degradación rápida vía proteosoma. Ésta unión es esencial para la degradación, ya que mutantes de E7 en el dominio de interacción LxCxE (incapaces de unir) no desestabilizan las proteínas del retinoblastoma. Aunque E7 de VPH-AR se une o altera la función de otras proteínas celulares, numerosos estudios demuestran que su actividad oncogénica depende principalmente de su capacidad de unir y degradar la familia del retinoblastoma.

La posible inactivación de ésta familia en el contexto de carcinogénesis de piel asociada a VPH-EV ha sido estudiada con escaso detalle. Sin embargo, los resultados que hemos obtenido en el laboratorio en los últimos años, mediante la creación y caracterización de ratones transgénicos con modificaciones genéticas de la familia del retinoblastoma, obligan a analizar dicha inactivación (ver apartado 1.7). En este contexto, la pérdida simultánea de pRb y p107 en la epidermis de ratones induce la formación de tumores espontáneamente (35, 112). Se sabe que las proteínas E7 de VPH 5 y 38 son capaces de unir pRb (33, 204). Además, se ha podido demostrar que las proteínas E7 de VPH 8 y 38 son capaces de reducir los niveles de pRb (5, 33). También se ha analizado las consecuencias de la expresión de E7 de diversos VPH-EV en cultivos organotípicos de piel humana y en ratones transgénicos. Sin embargo, la capacidad de degradación de la familia del retinoblastoma y mecanismo implicado no ha sido estudiada. En esta tesis doctoral hemos demostrado, por primera vez, que la proteína E7 de VPH 5 es capaz de reducir los niveles de pRb y de p107 (Figura 16 y Figura 17), tanto en la línea celular de osteosarcoma humano Saos2 (mediante transfección) como en la célula diana de la infección, el queratinocito de piel humana (mediante transducción retroviral). Sin embargo, no hemos sido capaces de observar, en ninguno de los dos tipos celulares, una reducción en los niveles de la otra proteína de la familia, p130 (datos no mostrados). Dado que tampoco hemos observado

reducción en los niveles tras la expresión de 16E7 (datos no mostrados), es preciso realizar nuevos abordajes experimentales con el fin de demostrar la posible degradación de p130 por 5E7.

Además, hemos demostrado que la reducción en los niveles de pRb y p107 tras la expresión de 5E7 es dependiente del motivo LxCxE que se conserva en la proteína (Figura 19). Este resultado permite sugerir que 5E7 reduce los niveles de ambas proteínas previa unión directa a través de dicho motivo, tal y como ocurre en el caso de 16E7 (Figura 19) (24, 77). Por otro lado, el mecanismo de reducción de los niveles de pRb, p107 ó p130 no ha sido investigado en el caso de E7 de VPH-EV. En el caso de pRb y 16E7, se sabe que tiene lugar mediante degradación por la ruta del proteosoma previa ubiquitinación de pRb (15, 24, 98). Tal y como ha sido descrito, hemos podido observar ausencia de degradación de pRb y p107 en presencia del inhibidor del proteosoma MG132 en Saos2 transfectadas con E7 de VPH 16 (Figura 16 y Figura 17). Sin embargo, los niveles de pRb y p107 no se recuperan de la misma manera en presencia de MG132 en Saos2 que expresan 5E7 (Figura 16 y Figura 17), lo que nos permite sugerir que 5E7 podría actuar por otros mecanismos diferentes de 16E7. Análisis de la expresión del ARNm de pRb y p107 en QPHs transducidos nos han permitido demostrar que la reducción en los niveles de las proteínas correspondientes no se debe a cambios en la expresión de los genes correspondientes y/o estabilidad del mensajero. Aunque no podemos descartar completamente una posible inhibición de la traducción producida por micro ARN sería poco probable ya que los sitios de unión de micro ARN suelen localizarse en la región no traducida en la zona 3' o en intrones, secuencias que no se expresan desde los plásmidos pRb y p107-HA en las transfecciones en Saos2. Futuros experimentos nos ayudarán a analizar desestabilización de las proteínas pRb y p107 mediante otros mecanismos conocidos como son: i) el sistema lisosomal, ii) el sistema de caspasas, o iii) el sistema de calpaína (42). Dado que la ruta del proteosoma constituye uno de los procesos más frecuentes de degradación proteica, otros inhibidores como lactacistina deben usarse para descartar dicha ruta completamente. Finalmente, la contribución de más de un sistema en la posible degradación de pRb y p107 por la expresión de 5E7 tampoco es descartable.

## 5.2. Fenotipo de trasplantes con expresión de E7 de VPH 16

El análisis histológico mediante tinción con hematoxilina-eosina de los trasplantes que expresan la proteína E7 de VPH 16 ha demostrado la existencia de características patológicas displásicas que se encuentran en lesiones intraepiteliales y carcinomas de cérvix (Figura 23 y Tabla 8) (acantosis, papilomatosis, mitosis suprabasal, hiperqueratosis, ó paraqueratosis) y ningún signo de invasión en tejido subyacente. Algunas de éstas características han sido previamente descritas tras expresión de E7 en cultivos organotípicos de VPH 16 y 18, así como en modelos de ratón de VPH 16. La displasia observada en los trasplantes de 16E7 es acompañada por i) reentrada en ciclo celular en capas suprabasales según tinción de BrdU, PCNA ó ciclina A (Figura 26 y Figura 27), ii) desorganización de la diferenciación (según marcadores como K1 ó K10, K5, o involucrina) con eventual aparición de células K5/K10 o K5/involucrina positivas (Figura 25), iii) sobreexpresión de genes descritos como biomarcadores de tumores humanos con infección de VPH-AR, tanto CC como CCECC (E2F1, CENPF, MELK, p21 y RFC4) (Figura 32), y iv) sobreexpresión de microARNs que aparecen aumentados en líneas celulares o carcinomas de cérvix (miR-21 y miR-146a) (Figura 33). Es importante destacar que miR-21 es considerado un importante oncomir, ya que además de que se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de cáncer, un número importante de estudios funcionales demuestran que posee actividad oncogénica y metastásica (170). Así, esta sobreexpresado en líneas celulares y muestras patológicas de CC (115, 120), y además su expresión es mayor en muestras de CC de mal pronóstico (88). Entre los genes regulados por miR-21 se encuentran TGFB1, MMP2 y 9, BCL2, STAT3, FASL, PTEN o SPRY2, todos ellos importantes reguladores de procesos asociados a carcinogénesis. Por otro lado, cambios de expression de miR-146a se han descrito en psoriasis de piel, en el desarrollo de muchos tipos de cáncer (como CC, en referencias 115, 120) y en la regulación negativa de inflamación inducida por la vía de respuesta inmune innata. Además, su expression está dirigida por el factor de transcripción NF-kappaB, que ha sido implicado como un nexo de unión entre inflamación y carcinogenesis. No sabemos cuales son las mecanismos por los que miR-21 y miR-146a están sobreexpresados en los trasplantes con E7, pero su patrón de expresión son similares a los que se presentan en tumores malignos.

Adicionalmente, trasplantes de 16E7 que llegaron a término, presentan sobreexpresión de MCM7 en todo el grosor del epitelio (Figura 31 y Figura A2 del anexo), alcanzando las capas más altas de queratinocitos. Este patrón de tinción, que no se confina sólo al primer o segundo tercio del epitelio, es el que se presenta en lesiones de NIC II/III o en carcinomas invasivos de cérvix (26, 132). Aunque la inmunotinción con *CINtec* para p16<sup>INK4a</sup> dio un resultado negativo en estos trasplantes (Figura 31), la caracterización a nivel histopatológico y molecular de los trasplantes con expresión del oncogen E7 de VPH 16 indican que hemos validado un modelo de patogénesis asociada a VPH-AR, con características similares a neoplasias intraepiteliales de alto grado, y, en algunos aspectos, a carcinomas invasivos. De manera importante, se trata del primer modelo de estas características obtenido con células de origen humano. Asimismo, los trasplantes pudieron mantenerse durante al menos 6 meses, lo que demuestra que el sistema retroviral utilizado permite un mantenimiento a largo plazo de la expresión del oncogen.

### **5.3. Fenotipo de trasplantes con expresión de E7 de VPH 5**

Los trasplantes que expresan la proteína E7 de VPH 5 presentan, en la mayoría de los casos, un aspecto histológico normal (Figura 22). En algún caso se encuentra acantosis focal, hiperqueratosis, o hipergranulosis. Sin embargo, la caracterización molecular permitió encontrar en algunos trasplantes áreas localizadas con marcaje suprabasal de PCNA, p21, ciclina A, ó MCM7. Además, análisis mediante qRT-PCR permitió encontrar sobreexpresión de biomarcadores como E2F1, CENPF, p21 y RFC4 ó de miR-21 y miR-146a, aunque los niveles alcanzados son inferiores a los obtenidos en el caso de trasplantes con 16E7 (Figura 32 y Figura 33). El aumento en la expresión según qRT-PCR puede ser debido a las áreas discretas mencionadas, que aunque no cubren todo el trasplante, pueden contribuir a la expresión del trasplante globalmente. Por tanto, la caracterización histológica y molecular de los trasplantes que expresan E7 de HPV5 muestra cierto fenotipo en áreas focales, lo que los diferencia de los obtenidos tras expresión de 16E7. Además, ya ha sido descrito previamente que la expresión de E7 de algunos VPH-ER en cultivo organotípico humano induce un ligero fenotipo que afecta a la diferenciación, y a la proliferación en capa basal (23, 199). Por consiguiente,

la pregunta obvia es: ¿Por qué son diferentes los trasplantes de 5E7 respecto de los de 16E7? Una posible explicación es que en el caso de 5E7, su expresión sea silenciada tras la transducción retroviral. Sin embargo, los análisis de inmunotinción de eGFP así como de qRT-PCR de eGFP y 5E7 han mostrado que las secuencias transducidas mantienen su expresión a niveles similares a los obtenidos en los trasplantes de 16E7 (Figura 20 y Figura 22). Además, el hecho de que se mantenga durante tanto tiempo la expresión (hasta 6 meses), indica que ha habido una infección retroviral eficiente en células madre epiteliales, a partir de las cuales se ha regenerado la piel humana y se ha mantenido el trasplante. Otra posibilidad es que en los trasplantes con 5E7 haya un aumento de la apoptosis en células que expresan 5E7. Sin embargo, el mantenimiento continuo de la expresión de eGFP y 5E7 (y por tanto de las células que los expresan), así como la ausencia de apoptosis significativa según la inmunotinción con caspasa 3 activa (Figura 30) excluyen dicha posibilidad. Explicaciones más difíciles de demostrar son: i) poca eficiencia en la reducción de los niveles de pRb y p107 (y posiblemente p130) en el contexto de una piel reconstituída; ii) ausencia de otras actividades independientes de la familia del retinoblastoma que sí están presentes en la proteína E7 de VPH 16. En este sentido, ya hemos mencionado que existen otros genes celulares que interaccionan con 16E7 o cuya función se ve afectada por 16E7. De hecho, algunos estudios realizados en ratones transgénicos demuestran que actividades independientes de la inactivación de pRb (10), o dependientes de la inactivación de p21 (172) contribuyen al establecimiento del fenotipo producido tras la expresión de 16E7. No sabemos si 5E7 es capaz de inactivar p21, o es capaz de unir/inhibir otras proteínas celulares. Sí podemos decir que la zona de 16E7 supuestamente implicada en la inactivación de p21 está bien conservada en 5E7, y que ya hemos obtenido un mutante de delección que aún no ha sido analizado. Por otro lado, la proteína GST-5E7 con la que hemos trabajado podría ser inmovilizada en columnas de afinidad, e incubada con extractos de QPHs con el objetivo de hallar interacciones con proteínas celulares cuya función pudiera afectar. Estos experimentos se han iniciado en colaboración con el grupo del Dr. Andrew Macdonald de la Universidad de Leeds, en el Reino Unido.

Finalmente, es importante recordar que estudios epidemiológicos han demostrado que hasta el 80% de la población normal está infectada con uno o más

tipos de VPH-EV, pero que sólo una proporción desarrolla patologías relacionadas con la infección como verrugas, keratosis actínica o carcinomas. Además, se ha podido comprobar que dicha infección puede mantenerse asintomática durante años, lo que sugiere por un lado que existen otros factores que pueden contribuir al establecimiento de posibles patologías (inmunodepresión, luz solar, factores genéticos), y por otro que el virus puede infectar células madre epidérmicas. Por tanto, es posible que para observar un fenotipo más evidente en el caso de trasplantes de 5E7 haga falta inducir daño en ADN mediante radiación UV. Cambios genéticos (posiblemente asociados a luz UV) que podrían predisponer a los queratinocitos de la piel infectados con VPH-EV hacia la formación de tumores como mutaciones en el gen p53. Así, se ha podido comprobar que mutaciones en p53 son altamente frecuentes en carcinomas de piel infectados con VPH 38 (32). No hay que descartar que sea igualmente necesario expresar otras proteínas virales, como E6 ó E2. Aunque las proteínas E6 de VPH-EV no son capaces de inducir la desestabilización de p53, sí son capaces de inhibir apoptosis inducidas por rutas dependientes e independientes de p53 (3). Por otro lado, la proteína E2 de VPH 8, de la familia EV, es capaz de inducir tumores en la piel de ratones transgénicos, que tras luz UV pueden eventualmente ser tumores espinocelulares agresivos (148).

#### **5.4. Trasplantes de 16E7 como modelo preclínico de terapias anti-VPH-AR.**

El VPH tiene un ciclo de infección íntimamente dependiente de la diferenciación del queratinocito en el epitelio estratificado, bien en la piel, bien en epitelios mucosos. Este hecho hace muy difícil el establecimiento de modelos de análisis del ciclo de infección completo, por lo que sólo es fácilmente reproducible el estudio funcional de genes individuales o grupos de genes en sistemas celulares, fuera del contexto global del ciclo de infección completo. Así, pocos grupos son capaces de analizar el efecto que tiene la delección de genes o la eliminación de motivos funcionales en la amplificación del genoma viral o en la generación de virus maduros. Los sistemas de análisis de la función de genes virales más completos y utilizados que existen son cultivos organotípicos tridimensionales, y ratones transgénicos. Los primeros tienen como principal problema que sólo pueden permanecer en cultivos unos pocos días,

aunque tienen la ventaja de estar formados por células humanas. Los segundos, aunque pueden analizarse durante meses o incluso más de un año, son modelos formados por células no humanas. Por lo tanto, en la presente tesis presentamos y caracterizamos un nuevo modelo de análisis de patologías asociadas a VPH, que supera a los anteriormente descritos ya que permite un análisis prolongado en el tiempo del efecto de oncogenes virales en piel humana en un organismo vivo. Hemos demostrado que la expresión de los genes virales es estable durante meses en el ratón, y que además se mantienen características histopatológicas y moleculares (proteínas, genes y ARN micro) presentes en lesiones y tumores humanos asociados a la infección por VPH-AR.

Estas características hacen posible el análisis de terapias anti-VPH que intenten revertir el fenotipo asociado. Las principales ventajas del modelo presentado son: i) mantenimiento en el tiempo de la expresión del transgen; ii) posibilidad de análisis de terapias anti-VPH en el contexto de un organismo vivo; iii) posibilidad de aplicación tópica de terapias que eviten efectos secundarios de tratamientos sistémicos.

En consecuencia, el modelo desarrollado en este trabajo podría permitir identificar y diseñar nuevos fármacos anti-VPH, convirtiéndose en herramientas preclínicas esenciales.



## 6. CONCLUSIONES



1. La proteína E7 de VPH 5 de la familia EV (5E7) se une a pRb.
2. 5E7 reduce los niveles de pRb y p107, tal y como sucede con las proteínas E7 de VPH 16 y 18 (16E7 y 18E7) asociados a cáncer de cérvix.
3. El motivo LxCxE de 5E7 es necesario para la reducción de niveles de pRb y p107.
4. La expresión de 16E7 provoca alteraciones histológicas en el desarrollo de piel humana (trasplantada en ratones inmunodeficientes) tales como acantosis, mitosis ectópicas, hiperqueratosis, atipia nuclear, papilomatosis, paraqueratosis, ó hipergranulosis, que se presentan en neoplasia intraepitelial cervical asociada a la infección por virus de alto riesgo, como VPH 16. La expresión de 5E7 no induce alteraciones histológicas significativas en piel humana.
5. La expresión de 16E7 induce en piel humana desorganización de la diferenciación epidérmica, y desacoplamiento entre diferenciación y proliferación. La expresión de 5E7 no induce cambios significativos en diferenciación epidérmica.
6. La expresión de 5E7 y 16E7 induce en piel humana aumento de proliferación, y reentrada en ciclo celular de células diferenciadas suprabasales, aunque en el caso de 5E7 ocurre focalmente.
7. La expresión de marcadores indirectos de la infección por VPH de alto riesgo mediante histoquímica, o PCR cuantitativa de genes y micro ARNs demuestra que la expresión de 16E7 en piel humana trasplantada es un buen modelo de lesiones pretumorales asociadas a la infección con VPH de alto riesgo. Este modelo puede ser utilizado para análisis preclínico de terapias antitumorales.
8. El aptámero de ARN A2 puede inhibir la reducción en los niveles de pRb causada por la expresión de 5E7 y de 16E7, por lo que es un posible candidato para ser utilizado en terapia anti-VPH.



## 7. BIBLIOGRAFÍA



1. **Accardi, R., W. Dong, A. Smet, R. Cui, A. Hautefeuille, A. S. Gabet, B. S. Sylla, L. Gissmann, P. Hainaut, and M. Tommasino.** 2006. Skin human papillomavirus type 38 alters p53 functions by accumulation of deltaNp73. *EMBO Rep* **7**:334-40.
2. **AEP 2011,** posting date. Calendario de vacunaciones de la AEP 2011 [Online.]
3. **Akgul, B., J. C. Cooke, and A. Storey.** 2006. HPV-associated skin disease. *J Pathol* **208**:165-75.
4. **Akgul, B., R. Garcia-Escudero, L. Ghali, H. J. Pfister, P. G. Fuchs, H. Navsaria, and A. Storey.** 2005. The E7 protein of cutaneous human papillomavirus type 8 causes invasion of human keratinocytes into the dermis in organotypic cultures of skin. *Cancer Res* **65**:2216-23.
5. **Akgul, B., L. Ghali, D. Davies, H. Pfister, I. M. Leigh, and A. Storey.** 2007. HPV8 early genes modulate differentiation and cell cycle of primary human adult keratinocytes. *Exp Dermatol* **16**:590-9.
6. **Arbeit, J. M., K. Munger, P. M. Howley, and D. Hanahan.** 1994. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J Virol* **68**:4358-68.
7. **Armstrong, B. K., and A. Kricger.** 2001. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* **63**:8-18.
8. **Baker, C. C., W. C. Phelps, V. Lindgren, M. J. Braun, M. A. Gonda, and P. M. Howley.** 1987. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* **61**:962-71.
9. **Balsitis, S., F. Dick, N. Dyson, and P. F. Lambert.** 2006. Critical roles for non-pRb targets of human papillomavirus type 16 E7 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res* **66**:9393-400.
10. **Balsitis, S., F. Dick, D. Lee, L. Farrell, R. K. Hyde, A. E. Griep, N. Dyson, and P. F. Lambert.** 2005. Examination of the pRb-dependent and pRb-independent functions of E7 in vivo. *J Virol* **79**:11392-402.
11. **Balsitis, S. J., J. Sage, S. Duensing, K. Munger, T. Jacks, and P. F. Lambert.** 2003. Recapitulation of the effects of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene on mouse epithelium by somatic Rb deletion and detection of pRb-independent effects of E7 in vivo. *Mol Cell Biol* **23**:9094-103.
12. **Barr, B. B., E. C. Benton, K. McLaren, M. H. Bunney, I. W. Smith, K. Blessing, and J. A. Hunter.** 1989. Papillomavirus infection and skin cancer in renal allograft recipients. *Lancet* **2**:224-5.
13. **Barrandon, Y., V. Li, and H. Green.** 1988. New techniques for the grafting of cultured human epidermal cells onto athymic animals. *J Invest Dermatol* **91**:315-8.
14. **Bavinck, J. N., A. De Boer, B. J. Vermeer, M. M. Hartevelt, F. J. van der Woude, F. H. Claas, R. Wolterbeek, and J. P. Vandenbroucke.** 1993. Sunlight, keratotic skin lesions and skin cancer in renal transplant recipients. *Br J Dermatol* **129**:242-9.
15. **Berezutskaya, E., B. Yu, A. Morozov, P. Raychaudhuri, and S. Bagchi.** 1997. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ* **8**:1277-86.
16. **Bergeron, C., J. Ordi, D. Schmidt, M. J. Trunk, T. Keller, and R. Ridder.** Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* **133**:395-406.

17. **Berkhout, R. J., J. N. Bouwes Bavinck, and J. ter Schegget.** 2000. Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* **38**:2087-96.
18. **Blanton, R. A., M. D. Coltrera, A. M. Gown, C. L. Halbert, and J. K. McDougall.** 1992. Expression of the HPV16 E7 gene generates proliferation in stratified squamous cell cultures which is independent of endogenous p53 levels. *Cell Growth Differ* **3**:791-802.
19. **Bousarghin, L., A. Touze, P. Y. Sizaret, and P. Coursaget.** 2003. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol* **77**:3846-50.
20. **Bouwes Bavinck, J. N., M. Feltkamp, L. Struijk, and J. ter Schegget.** 2001. Human papillomavirus infection and skin cancer risk in organ transplant recipients. *J Invest Dermatol Symp Proc* **6**:207-11.
21. **Bouwes Bavinck, J. N., D. R. Hardie, A. Green, S. Cutmore, A. MacNaught, B. O'Sullivan, V. Siskind, F. J. Van Der Woude, and I. R. Hardie.** 1996. The risk of skin cancer in renal transplant recipients in Queensland, Australia. A follow-up study. *Transplantation* **61**:715-21.
22. **Bouwes Bavinck, J. N., R. E. Neale, D. Abeni, S. Euvrard, A. C. Green, C. A. Harwood, M. N. de Koning, L. Naldi, I. Nindl, M. Pawlita, H. Pfister, C. M. Proby, W. G. Quint, J. ter Schegget, T. Waterboer, S. Weissenborn, and M. C. Feltkamp.** Multicenter study of the association between betapapillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **70**:9777-86.
23. **Boxman, I. L., L. H. Mulder, F. Noya, V. de Waard, S. Gibbs, T. R. Broker, F. ten Kate, L. T. Chow, and J. ter Schegget.** 2001. Transduction of the E6 and E7 genes of epidermodysplasia- verruciformis-associated human papillomaviruses alters human keratinocyte growth and differentiation in organotypic cultures. *J Invest Dermatol* **117**:1397-404.
24. **Boyer, S. N., D. E. Wazer, and V. Band.** 1996. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* **56**:4620-4.
25. **Boyle, J., R. M. MacKie, J. D. Briggs, B. J. Junor, and T. C. Aitchison.** 1984. Cancer, warts, and sunshine in renal transplant patients. A case-control study. *Lancet* **1**:702-5.
26. **Brake, T., J. P. Connor, D. G. Petereit, and P. F. Lambert.** 2003. Comparative analysis of cervical cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: identification of minichromosome maintenance protein 7 as an informative biomarker for human cervical cancer. *Cancer Res* **63**:8173-80.
27. **Brash, D. E., J. A. Rudolph, J. A. Simon, A. Lin, G. J. McKenna, H. P. Baden, A. J. Halperin, and J. Ponten.** 1991. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:10124-8.
28. **Bryan, J. T., and D. R. Brown.** 2001. Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology* **281**:35-42.
29. **Buitrago-Perez, A., G. Garaulet, A. Vazquez-Carballo, J. M. Paramio, and R. Garcia-Escudero.** 2009. Molecular Signature of HPV-Induced Carcinogenesis: pRb, p53 and Gene Expression Profiling. *Curr Genomics* **10**:26-34.
30. **Butz, K., C. Denk, A. Ullmann, M. Scheffner, and F. Hoppe-Seyler.** 2000. Induction of apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6693-7.

31. **Caldeira, S., E. M. de Villiers, and M. Tommasino.** 2000. Human papillomavirus E7 proteins stimulate proliferation independently of their ability to associate with retinoblastoma protein. *Oncogene* **19**:821-6.
32. **Caldeira, S., R. Filotico, R. Accardi, I. Zehbe, S. Franceschi, and M. Tommasino.** 2004. p53 mutations are common in human papillomavirus type 38-positive non-melanoma skin cancers. *Cancer Lett* **209**:119-24.
33. **Caldeira, S., I. Zehbe, R. Accardi, I. Malanchi, W. Dong, M. Giarre, E. M. de Villiers, R. Filotico, P. Boukamp, and M. Tommasino.** 2003. The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J Virol* **77**:2195-206.
34. **Collins, A. S., T. Nakahara, A. Do, and P. F. Lambert.** 2005. Interactions with pocket proteins contribute to the role of human papillomavirus type 16 E7 in the papillomavirus life cycle. *J Virol* **79**:14769-80.
35. **Costa, C.** 2011. Tesis: Papel de los genes Rb1 y E2F1 en las alteraciones epidérmicas asociadas a la pérdida del gen Rb1 en ratones modificados. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
36. **Coussens, L. M., D. Hanahan, and J. M. Arbeit.** 1996. Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *Am J Pathol* **149**:1899-917.
37. **Chen, Y., C. Miller, R. Mosher, X. Zhao, J. Deeds, M. Morrissey, B. Bryant, D. Yang, R. Meyer, F. Cronin, B. S. Gostout, K. Smith-McCune, and R. Schlegel.** 2003. Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. *Cancer Res* **63**:1927-35.
38. **Cheng, S., D. C. Schmidt-Grimminger, T. Murrant, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 1995. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* **9**:2335-49.
39. **Chiang, C. M., M. Ustav, A. Stenlund, T. F. Ho, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 1992. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5799-803.
40. **D'Souza, G., A. R. Kreimer, R. Viscidi, M. Pawlita, C. Fakhry, W. M. Koch, W. H. Westra, and M. L. Gillison.** 2007. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **356**:1944-56.
41. **Dahle, J., E. Kvam, and T. Stokke.** 2005. Bystander effects in UV-induced genomic instability: antioxidants inhibit delayed mutagenesis induced by ultraviolet A and B radiation. *J Carcinog* **4**:11.
42. **Darnell, G. A., W. A. Schroder, T. M. Antalis, E. Lambley, L. Major, J. Gardner, G. Birrell, A. Cid-Arregui, and A. Suhrbier.** 2007. Human papillomavirus E7 requires the protease calpain to degrade the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* **282**:37492-500.
43. **Day, P. M., D. R. Lowy, and J. T. Schiller.** 2003. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* **307**:1-11.
44. **de Fijter, J. W.** 2007. Use of proliferation signal inhibitors in non-melanoma skin cancer following renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* **22 Suppl 1**:i23-6.
45. **de Sanjose, S., W. G. Quint, L. Alemany, D. T. Geraets, J. E. Klaustermeier, B. Lloveras, S. Tous, A. Felix, L. E. Bravo, H. R. Shin, C. S. Vallejos, P. A. de Ruiz, M. A. Lima, N.**

- Guimera, O. Clavero, M. Alejo, A. Llombart-Bosch, C. Cheng-Yang, S. A. Tatti, E. Kasamatsu, E. Iljazovic, M. Odida, R. Prado, M. Seoud, M. Grce, A. Usubutun, A. Jain, G. A. Suarez, L. E. Lombardi, A. Banjo, C. Menendez, E. J. Domingo, J. Velasco, A. Nessa, S. C. Chichareon, Y. L. Qiao, E. Lerma, S. M. Garland, T. Sasagawa, A. Ferrera, D. Hammouda, L. Mariani, A. Pelayo, I. Steiner, E. Oliva, C. J. Meijer, W. F. Al-Jassar, E. Cruz, T. C. Wright, A. Puras, C. L. Llave, M. Tzardi, T. Agorastos, V. Garcia-Barriola, C. Clavel, J. Ordi, M. Andujar, X. Castellsague, G. I. Sanchez, A. M. Nowakowski, J. Bornstein, N. Munoz, and F. X. Bosch. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* **11**:1048-56.
46. **de Villiers, E. M.** 1989. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* **63**:4898-903.
47. **de Villiers, E. M.** 1998. Human papillomavirus infections in skin cancers. *Biomed Pharmacother* **52**:26-33.
48. **de Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard, and H. zur Hausen.** 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**:17-27.
49. **DeGregori, J., T. Kowalik, and J. R. Nevins.** 1995. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* **15**:4215-24.
50. **Dehn, D., K. C. Torkko, and K. R. Shroyer.** 2007. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* **111**:1-14.
51. **Del Rio, M., F. Larcher, F. Serrano, A. Meana, M. Munoz, M. Garcia, E. Munoz, C. Martin, A. Bernad, and J. L. Jorcano.** 2002. A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. *Hum Gene Ther* **13**:959-68.
52. **DePinho, R. A.** 2000. The age of cancer. *Nature* **408**:248-54.
53. **Dong, W., U. Kloz, R. Accardi, S. Caldeira, W. M. Tong, Z. Q. Wang, L. Jansen, M. Durst, B. S. Sylla, L. Gissmann, and M. Tommasino.** 2005. Skin hyperproliferation and susceptibility to chemical carcinogenesis in transgenic mice expressing E6 and E7 of human papillomavirus type 38. *J Virol* **79**:14899-908.
54. **Doorbar, J., S. Ely, J. Sterling, C. McLean, and L. Crawford.** 1991. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**:824-7.
55. **Duensing, A., Y. Liu, S. A. Perdreau, J. Kleylein-Sohn, E. A. Nigg, and S. Duensing.** 2007. Centriole overduplication through the concurrent formation of multiple daughter centrioles at single maternal templates. *Oncogene* **26**:6280-8.
56. **Duensing, S., A. Duensing, C. P. Crum, and K. Munger.** 2001. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res* **61**:2356-60.
57. **Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger, and E. Harlow.** 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**:934-7.
58. **Eichner, R., T. T. Sun, and U. Aebi.** 1986. The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. *J Cell Biol* **102**:1767-77.

59. **el-Deiry, W. S., J. W. Harper, P. M. O'Connor, V. E. Velculescu, C. E. Canman, J. Jackman, J. A. Pietenpol, M. Burrell, D. E. Hill, Y. Wang, and et al.** 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* **54**:1169-74.
60. **el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein.** 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**:817-25.
61. **Espana, A., M. A. Martinez-Gonzalez, M. Garcia-Granero, I. Sanchez-Carpintero, G. Rabago, and J. Herreros.** 2000. A prospective study of incident nonmelanoma skin cancer in heart transplant recipients. *J Invest Dermatol* **115**:1158-60.
62. **Evander, M., I. H. Frazer, E. Payne, Y. M. Qi, K. Hengst, and N. A. McMillan.** 1997. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* **71**:2449-56.
63. **Fakhry, C., W. H. Westra, S. Li, A. Cmelak, J. A. Ridge, H. Pinto, A. Forastiere, and M. L. Gillison.** 2008. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* **100**:261-9.
64. **Favre, M., N. Ramoz, and G. Orth.** 1997. Human papillomaviruses: general features. *Clin Dermatol* **15**:181-98.
65. **Fawcett, D. W.** 1987. Tratado de histología, Decimoprimer ed. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid.
66. **Fehrmann, F., and L. A. Laimins.** 2003. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* **22**:5201-7.
67. **Feltkamp, M. C., R. Broer, F. M. di Summa, L. Struijk, E. van der Meijden, B. P. Verlaan, R. G. Westendorp, J. ter Schegget, W. J. Spaan, and J. N. Bouwes Bavinck.** 2003. Seroreactivity to epidermodysplasia verruciformis-related human papillomavirus types is associated with nonmelanoma skin cancer. *Cancer Res* **63**:2695-700.
68. **Ferlay J, S. H., Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM.** 2010, posting date. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. [Online.]
69. **Ferreira, L. M.** Cancer metabolism: the Warburg effect today. *Exp Mol Pathol* **89**:372-80.
70. **Florin, L., C. Sapp, R. E. Streeck, and M. Sapp.** 2002. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol* **76**:10009-14.
71. **Frattini, M. G., and L. A. Laimins.** 1994. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* **204**:799-804.
72. **Frost, C. A., and A. C. Green.** 1994. Epidemiology of solar keratoses. *Br J Dermatol* **131**:455-64.
73. **Fuchs, E.** 1990. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* **111**:2807-14.
74. **Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman, and D. A. Galloway.** 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* **11**:2090-100.
75. **Giampieri, S., R. Garcia-Escudero, J. Green, and A. Storey.** 2004. Human papillomavirus type 77 E6 protein selectively inhibits p53-dependent transcription of proapoptotic genes following UV-B irradiation. *Oncogene* **23**:5864-70.

76. **Gillison, M. L., G. D'Souza, W. Westra, E. Sugar, W. Xiao, S. Begum, and R. Viscidi.** 2008. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* **100**:407-20.
77. **Gonzalez, S. L., M. Stremlau, X. He, J. R. Basile, and K. Munger.** 2001. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol* **75**:7583-91.
78. **Goodwin, E. C., and D. DiMaio.** 2000. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:12513-8.
79. **Grubauer, G., K. R. Feingold, R. M. Harris, and P. M. Elias.** 1989. Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier. *J Lipid Res* **30**:89-96.
80. **Guo, C. P., K. W. Liu, H. B. Luo, H. B. Chen, Y. Zheng, S. N. Sun, Q. Zhang, and L. Huang.** Potent Anti-Tumor Effect Generated by a Novel Human Papillomavirus (HPV) Antagonist Peptide Reactivating the pRb/E2F Pathway. *PLoS One* **6**:e17734.
81. **Hammarstedt, L., D. Lindquist, H. Dahlstrand, M. Romanitan, L. O. Dahlgren, J. Joneberg, N. Creson, J. Lindholm, W. Ye, T. Dalianis, and E. Munck-Wikland.** 2006. Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer* **119**:2620-3.
82. **Harbour, J. W., and D. C. Dean.** 2000. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* **14**:2393-409.
83. **Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S. J. Elledge.** 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**:805-16.
84. **Hartevelt, M. M., J. N. Bavinck, A. M. Kootte, B. J. Vermeer, and J. P. Vandenbroucke.** 1990. Incidence of skin cancer after renal transplantation in The Netherlands. *Transplantation* **49**:506-9.
85. **Harwood, C. A., T. Suretheran, J. M. McGregor, P. J. Spink, I. M. Leigh, J. Breuer, and C. M. Proby.** 2000. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* **61**:289-97.
86. **Helt, A. M., J. O. Funk, and D. A. Galloway.** 2002. Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. *J Virol* **76**:10559-68.
87. **Herber, R., A. Liem, H. Pitot, and P. F. Lambert.** 1996. Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J Virol* **70**:1873-81.
88. **Hu, X., J. K. Schwarz, J. S. Lewis, Jr., P. C. Huettner, J. S. Rader, J. O. Deasy, P. W. Grigsby, and X. Wang.** A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. *Cancer Res* **70**:1441-8.
89. **Hufbauer, M., D. Lazic, B. Akgul, J. L. Brandsma, H. Pfister, and S. J. Weissenborn.** Enhanced human papillomavirus type 8 oncogene expression levels are crucial for skin tumorigenesis in transgenic mice. *Virology* **403**:128-36.

90. **Hughes, F. J., and M. A. Romanos.** 1993. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res* **21**:5817-23.
91. **Ikenberg, H., L. Gissmann, G. Gross, E. I. Grussendorf-Conen, and H. zur Hausen.** 1983. Human papillomavirus type-16-related DNA in genital Bowen's disease and in Bowenoid papulosis. *Int J Cancer* **32**:563-5.
92. **Jablonska, S., and S. Majewski.** 1994. Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* **186**:157-75.
93. **Jackson, S., C. Harwood, M. Thomas, L. Banks, and A. Storey.** 2000. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev* **14**:3065-73.
94. **Jeon, S., B. L. Allen-Hoffmann, and P. F. Lambert.** 1995. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* **69**:2989-97.
95. **Jeon, S., and P. F. Lambert.** 1995. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:1654-8.
96. **Johnson, D. G., and R. Schneider-Brossard.** 1998. Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front Biosci* **3**:d447-8.
97. **Jones, D. L., R. M. Alani, and K. Munger.** 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* **11**:2101-11.
98. **Jones, D. L., and K. Munger.** 1997. Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* **71**:2905-12.
99. **Jones, D. L., D. A. Thompson, E. Suh-Burgmann, M. Grace, and K. Munger.** 1999. Expression of the HPV E7 oncoprotein mimics but does not evoke a p53-dependent cellular DNA damage response pathway. *Virology* **258**:406-14.
100. **Karagas, M. R., H. H. Nelson, P. Sehr, T. Waterboer, T. A. Stukel, A. Andrew, A. C. Green, J. N. Bavinck, A. Perry, S. Spencer, J. R. Rees, L. A. Mott, and M. Pawlita.** 2006. Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *J Natl Cancer Inst* **98**:389-95.
101. **Kaufmann, A. M., J. D. Nieland, I. Jochmus, S. Baur, K. Friese, J. Gabelsberger, F. Giesecking, L. Gissmann, B. Glasschroder, T. Grubert, P. Hillemanns, R. Hopfl, H. Ikenberg, J. Schwarz, M. Karrasch, A. Knoll, V. Kuppers, M. Lechmann, R. J. Lelle, H. Meissner, R. T. Muller, M. Pawlita, K. U. Petry, H. Pilch, E. Walek, and A. Schneider.** 2007. Vaccination trial with HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles in women suffering from high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3). *Int J Cancer* **121**:2794-800.
102. **Kim, Y. T., and M. Zhao.** 2005. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J* **46**:597-613.
103. **Kinsella, T. M., and G. P. Nolan.** 1996. Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther* **7**:1405-13.

104. **Kiyono, T., S. A. Foster, J. I. Koop, J. K. McDougall, D. A. Galloway, and A. J. Klingelutz.** 1998. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396**:84-8.
105. **Klaes, R., A. Benner, T. Friedrich, R. Ridder, S. Herrington, D. Jenkins, R. J. Kurman, D. Schmidt, M. Stoler, and M. von Knebel Doeberitz.** 2002. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* **26**:1389-99.
106. **Klaes, R., T. Friedrich, D. Spitkovsky, R. Ridder, W. Rudy, U. Petry, G. Dallenbach-Hellweg, D. Schmidt, and M. von Knebel Doeberitz.** 2001. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* **92**:276-84.
107. **Klingelutz, A. J., S. A. Foster, and J. K. McDougall.** 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **380**:79-82.
108. **Koutsky, L.** 1997. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* **102**:3-8.
109. **Kreimer, A. R., G. M. Clifford, P. Boyle, and S. Franceschi.** 2005. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**:467-75.
110. **Kuribayashi, K., P. A. Mayes, and W. S. El-Deiry.** 2006. What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? *Cancer Biol Ther* **5**:763-5.
111. **Lara, M. F., R. Garcia-Escudero, S. Ruiz, M. Santos, M. Moral, A. B. Martinez-Cruz, C. Segrelles, C. Lorz, and J. M. Paramio.** 2008. Gene profiling approaches help to define the specific functions of retinoblastoma family in epidermis. *Mol Carcinog* **47**:209-21.
112. **Lara, M. F., M. Santos, S. Ruiz, C. Segrelles, M. Moral, A. B. Martinez-Cruz, P. Hernandez, J. Martinez-Palacio, C. Lorz, R. Garcia-Escudero, and J. M. Paramio.** 2008. p107 acts as a tumor suppressor in pRb-deficient epidermis. *Mol Carcinog* **47**:105-13.
113. **Larcher, F., M. Del Rio, F. Serrano, J. C. Segovia, A. Ramirez, A. Meana, A. Page, J. L. Abad, M. A. Gonzalez, J. Bueren, A. Bernad, and J. L. Jorcano.** 2001. A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin-targeted keratinocyte grafts. *Faseb J* **15**:1529-38.
114. **Lee, J. O., A. A. Russo, and N. P. Pavletich.** 1998. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* **391**:859-65.
115. **Lee, J. W., C. H. Choi, J. J. Choi, Y. A. Park, S. J. Kim, S. Y. Hwang, W. Y. Kim, T. J. Kim, J. H. Lee, B. G. Kim, and D. S. Bae.** 2008. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clin Cancer Res* **14**:2535-42.
116. **Leemans, C. R., B. J. Braakhuis, and R. H. Brakenhoff.** The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* **11**:9-22.
117. **Leptak, C., S. Ramon y Cajal, R. Kulke, B. H. Horwitz, D. J. Riese, 2nd, G. P. Dotto, and D. DiMaio.** 1991. Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *J Virol* **65**:7078-83.
118. **Leverrier, S., D. Bergamaschi, L. Ghali, A. Ola, G. Warnes, B. Akgul, K. Blight, R. Garcia-Escudero, A. Penna, A. Eddaoudi, and A. Storey.** 2007. Role of HPV E6 proteins in preventing UVB-induced release of pro-apoptotic factors from the mitochondria. *Apoptosis* **12**:549-60.

119. **Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz, and T. R. Golub.** 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**:834-8.
120. **Lui, W. O., N. Pourmand, B. K. Patterson, and A. Fire.** 2007. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res* **67**:6031-43.
121. **Lukas, J., B. O. Petersen, K. Holm, J. Bartek, and K. Helin.** 1996. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol* **16**:1047-57.
122. **Lutzner, M. A., C. Blanchet-Bardon, and G. Orth.** 1984. Clinical observations, virologic studies, and treatment trials in patients with epidermodysplasia verruciformis, a disease induced by specific human papillomaviruses. *J Invest Dermatol* **83**:18s-25s.
123. **Marks, R.** 1996. Squamous cell carcinoma. *Lancet* **347**:735-8.
124. **Martinez, I., A. S. Gardiner, K. F. Board, F. A. Monzon, R. P. Edwards, and S. A. Khan.** 2008. Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene* **27**:2575-82.
125. **Martinez, I., J. Wang, K. F. Hobson, R. L. Ferris, and S. A. Khan.** 2007. Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer* **43**:415-32.
126. **Massague, J.** 2004. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**:298-306.
127. **Mazurek, S., W. Zwerschke, P. Jansen-Durr, and E. Eigenbrodt.** 2001. Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex. *Biochem J* **356**:247-56.
128. **McLaughlin-Drubin, M. E., and K. Munger.** 2009. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res* **143**:195-208.
129. **McMillan, N. A., E. Payne, I. H. Frazer, and M. Evander.** 1999. Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* **261**:271-9.
130. **Meana, A., J. Iglesias, M. Del Rio, F. Larcher, B. Madrigal, M. F. Fresno, C. Martin, F. San Roman, and F. Tevar.** 1998. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns* **24**:621-30.
131. **Meltzer, P. S.** 2005. Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature* **435**:745-6.
132. **Middleton, K., W. Peh, S. Southern, H. Griffin, K. Sotlar, T. Nakahara, A. El-Sherif, L. Morris, R. Seth, M. Hibma, D. Jenkins, P. Lambert, N. Coleman, and J. Doorbar.** 2003. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* **77**:10186-201.
133. **Mohr, I. J., R. Clark, S. Sun, E. J. Androphy, P. MacPherson, and M. R. Botchan.** 1990. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* **250**:1694-9.
134. **Moldovan, G. L., and A. D. D'Andrea.** 2009. How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet* **43**:223-49.
135. **Moreno, V., F. X. Bosch, N. Munoz, C. J. Meijer, K. V. Shah, J. M. Walboomers, R. Herrero, and S. Franceschi.** 2002. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* **359**:1085-92.

136. **Munger, K., A. Baldwin, K. M. Edwards, H. Hayakawa, C. L. Nguyen, M. Owens, M. Grace, and K. Huh.** 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* **78**:11451-60.
137. **Munger, K., and W. C. Phelps.** 1993. The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochim Biophys Acta* **1155**:111-23.
138. **Narayan, G., V. Bourdon, S. Chaganti, H. Arias-Pulido, S. V. Nandula, P. H. Rao, L. Gissmann, M. Durst, A. Schneider, B. Pothuri, M. Mansukhani, K. Basso, R. S. Chaganti, and V. V. Murty.** 2007. Gene dosage alterations revealed by cDNA microarray analysis in cervical cancer: identification of candidate amplified and overexpressed genes. *Genes Chromosomes Cancer* **46**:373-84.
139. **Nasman, A., P. Attner, L. Hammarstedt, J. Du, M. Eriksson, G. Giraud, S. Ahrlund-Richter, L. Marklund, M. Romanitan, D. Lindquist, T. Ramqvist, J. Lindholm, P. Sparen, W. Ye, H. Dahlstrand, E. Munck-Wikland, and T. Dalianis.** 2009. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer* **125**:362-6.
140. **Nelson, W. G., and T. T. Sun.** 1983. The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J Cell Biol* **97**:244-51.
141. **Nicol, C., D. H. Bunka, G. E. Blair, and N. J. Stonehouse.** Effects of single nucleotide changes on the binding and activity of RNA aptamers to human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*.
142. **Nicholson, D. W., A. Ali, N. A. Thornberry, J. P. Vaillancourt, C. K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P. R. Griffin, M. Labelle, Y. A. Lazebnik, and et al.** 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**:37-43.
143. **Orth, G.** 1986. Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses. *Ciba Found Symp* **120**:157-74.
144. **Orth, G.** 2008. Host defenses against human papillomaviruses: lessons from epidermodysplasia verruciformis. *Curr Top Microbiol Immunol* **321**:59-83.
145. **Ostrow, R. S., M. Bender, M. Niimura, T. Seki, M. Kawashima, F. Pass, and A. J. Faras.** 1982. Human papillomavirus DNA in cutaneous primary and metastasized squamous cell carcinomas from patients with epidermodysplasia verruciformis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:1634-8.
146. **Park, J. W., H. C. Pitot, K. Strati, N. Spardy, S. Duensing, M. Grompe, and P. F. Lambert.** Deficiencies in the Fanconi anemia DNA damage response pathway increase sensitivity to HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res* **70**:9959-68.
147. **Pereira, P. M., J. P. Marques, A. R. Soares, L. Carreto, and M. A. Santos.** 2010. MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One* **5**:e11780.
148. **Pfefferle, R., G. P. Marcuzzi, B. Akgul, H. U. Kasper, F. Schulze, I. Haase, C. Wickenhauser, and H. Pfister.** 2008. The human papillomavirus type 8 E2 protein induces skin tumors in transgenic mice. *J Invest Dermatol* **128**:2310-5.
149. **Pfister, H.** 2003. Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*:52-6.
150. **Pfister, H., and J. Ter Schegget.** 1997. Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin Dermatol* **15**:335-47.

151. **Phelps, W. C., K. Munger, C. L. Yee, J. A. Barnes, and P. M. Howley.** 1992. Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* **66**:2418-27.
152. **Presland, R. B., and B. A. Dale.** 2000. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* **11**:383-408.
153. **Pretet, J. L., J. F. Charlot, and C. Mougin.** 2007. [Virological and carcinogenic aspects of HPV]. *Bull Acad Natl Med* **191**:611-23; discussion 623.
154. **Pyeon, D., M. A. Newton, P. F. Lambert, J. A. den Boon, S. Sengupta, C. J. Marsit, C. D. Woodworth, J. P. Connor, T. H. Haugen, E. M. Smith, K. T. Kelsey, L. P. Turek, and P. Ahlquist.** 2007. Fundamental differences in cell cycle deregulation in human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative head/neck and cervical cancers. *Cancer Res* **67**:4605-19.
155. **Que-Gewirth, N. S., and B. A. Sullenger.** 2007. Gene therapy progress and prospects: RNA aptamers. *Gene Ther* **14**:283-91.
156. **Ramoz, N., L. A. Rueda, B. Bouadjar, L. S. Montoya, G. Orth, and M. Favre.** 2002. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet* **32**:579-81.
157. **Rheinwald, J. G., and H. Green.** 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**:331-43.
158. **Riley, R. R., S. Duensing, T. Brake, K. Munger, P. F. Lambert, and J. M. Arbeit.** 2003. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res* **63**:4862-71.
159. **Roden, R., and T. C. Wu.** 2006. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer* **6**:753-63.
160. **Rosty, C., M. Sheffer, D. Tsafrir, N. Stransky, I. Tsafrir, M. Peter, P. de Cremoux, A. de La Rochefordiere, R. Salmon, T. Dorval, J. P. Thiery, J. Couturier, F. Radvanyi, E. Domany, and X. Sastre-Garau.** 2005. Identification of a proliferation gene cluster associated with HPV E6/E7 expression level and viral DNA load in invasive cervical carcinoma. *Oncogene* **24**:7094-104.
161. **Ruiz, S., M. Santos, M. F. Lara, C. Segrelles, C. Ballestin, and J. M. Paramio.** 2005. Unexpected roles for pRb in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* **65**:9678-86.
162. **Ruiz, S., M. Santos, C. Segrelles, H. Leis, J. L. Jorcano, A. Berns, J. M. Paramio, and M. Vooijs.** 2004. Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis. *Development* **131**:2737-48.
163. **Ruiz, S., C. Segrelles, A. Bravo, M. Santos, P. Perez, H. Leis, J. L. Jorcano, and J. M. Paramio.** 2003. Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130. *Development* **130**:2341-53.
164. **Scotto, L., G. Narayan, S. V. Nandula, H. Arias-Pulido, S. Subramaniam, A. Schneider, A. M. Kaufmann, J. D. Wright, B. Pothuri, M. Mansukhani, and V. V. Murty.** 2008. Identification of copy number gain and overexpressed genes on chromosome arm 20q by an integrative genomic approach in cervical cancer: potential role in progression. *Genes Chromosomes Cancer* **47**:755-65.

165. **Schaper, I. D., G. P. Marcuzzi, S. J. Weissenborn, H. U. Kasper, V. Dries, N. Smyth, P. Fuchs, and H. Pfister.** 2005. Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8. *Cancer Res* **65**:1394-400.
166. **Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, and P. M. Howley.** 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**:1129-36.
167. **Slecht, N. F., R. D. Burk, L. Adrien, A. Dunne, N. Kawachi, C. Sarta, Q. Chen, M. Brandwein-Gensler, M. B. Prystowsky, G. Childs, R. V. Smith, and T. J. Belbin.** 2007. Gene expression profiles in HPV-infected head and neck cancer. *J Pathol* **213**:283-93.
168. **Schroeder, A., O. Mueller, S. Stocker, R. Salowsky, M. Leiber, M. Gassmann, S. Lightfoot, W. Menzel, M. Granzow, and T. Ragg.** 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* **7**:3.
169. **Schwarz, E., U. K. Freese, L. Gissmann, W. Mayer, B. Roggenbuck, A. Stremlau, and H. zur Hausen.** 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**:111-4.
170. **Selcuklu, S. D., M. T. Donoghue, and C. Spillane.** 2009. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochem Soc Trans* **37**:918-25.
171. **Shew, J. Y., B. T. Lin, P. L. Chen, B. Y. Tseng, T. L. Yang-Feng, and W. H. Lee.** 1990. C-terminal truncation of the retinoblastoma gene product leads to functional inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:6-10.
172. **Shin, M. K., S. Balsitis, T. Brake, and P. F. Lambert.** 2009. Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21Cip1 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res* **69**:5656-63.
173. **Slebos, R. J., Y. Yi, K. Ely, J. Carter, A. Evjen, X. Zhang, Y. Shyr, B. M. Murphy, A. J. Cmelak, B. B. Burkey, J. L. Netterville, S. Levy, W. G. Yarbrough, and C. H. Chung.** 2006. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **12**:701-9.
174. **Smith, P. P., C. L. Friedman, E. M. Bryant, and J. K. McDougall.** 1992. Viral integration and fragile sites in human papillomavirus-immortalized human keratinocyte cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* **5**:150-7.
175. **Song, S., H. C. Pitot, and P. F. Lambert.** 1999. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol* **73**:5887-93.
176. **Spardy, N., A. Duensing, D. Charles, N. Haines, T. Nakahara, P. F. Lambert, and S. Duensing.** 2007. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein activates the Fanconi anemia (FA) pathway and causes accelerated chromosomal instability in FA cells. *J Virol* **81**:13265-70.
177. **Stockfleth, E., C. Ulrich, T. Meyer, R. Arndt, and E. Christophers.** 2001. Skin diseases following organ transplantation--risk factors and new therapeutic approaches. *Transplant Proc* **33**:1848-53.
178. **Stoppler, H., D. P. Hartmann, L. Sherman, and R. Schlegel.** 1997. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere length. *J Biol Chem* **272**:13332-7.
179. **Storey, A.** 2002. Papillomaviruses: death-defying acts in skin cancer. *Trends Mol Med* **8**:417-21.

180. **Strati, K., and P. F. Lambert.** 2007. Role of Rb-dependent and Rb-independent functions of papillomavirus E7 oncogene in head and neck cancer. *Cancer Res* **67**:11585-93.
181. **Stubenrauch, F., and L. A. Laimins.** 1999. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* **9**:379-86.
182. **Termorshuizen, F., M. C. Feltkamp, L. Struijk, F. R. de Gruijl, J. N. Bavinck, and H. van Loveren.** 2004. Sunlight exposure and (sero)prevalence of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus. *J Invest Dermatol* **122**:1456-62.
183. **Thomas, M., and L. Banks.** 1998. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* **17**:2943-54.
184. **Ueno, T., K. Sasaki, S. Yoshida, N. Kajitani, A. Satsuka, H. Nakamura, and H. Sakai.** 2006. Molecular mechanisms of hyperplasia induction by human papillomavirus E7. *Oncogene* **25**:4155-64.
185. **van den Heuvel, S., and N. J. Dyson.** 2008. Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:713-24.
186. **van Zeeburg, H. J., P. J. Snijders, T. Wu, E. Gluckman, J. Soulier, J. Surralles, M. Castella, J. E. van der Wal, J. Wennerberg, J. Califano, E. Velleuer, R. Dietrich, W. Ebell, E. Bloemena, H. Joenje, C. R. Leemans, and R. H. Brakenhoff.** 2008. Clinical and molecular characteristics of squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients. *J Natl Cancer Inst* **100**:1649-53.
187. **Veldman, T., I. Horikawa, J. C. Barrett, and R. Schlegel.** 2001. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* **75**:4467-72.
188. **Veress, G., K. Szarka, X. P. Dong, L. Gergely, and H. Pfister.** 1999. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* **80 ( Pt 4)**:1035-43.
189. **Vinokurova, S., N. Wentzensen, I. Kraus, R. Klaes, C. Driesch, P. Melsheimer, F. Kisseljov, M. Durst, A. Schneider, and M. von Knebel Doeberitz.** 2008. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* **68**:307-13.
190. **Vitaliano, P. P., and F. Urbach.** 1980. The relative importance of risk factors in nonmelanoma carcinoma. *Arch Dermatol* **116**:454-6.
191. **von Knebel Doeberitz, M., C. Rittmuller, H. zur Hausen, and M. Durst.** 1992. Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int J Cancer* **51**:831-4.
192. **Wahl, G. M., and A. M. Carr.** 2001. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol* **3**:E277-86.
193. **Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer, and N. Munoz.** 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**:12-9.
194. **Walder, B. K., M. R. Robertson, and D. Jeremy.** 1971. Skin cancer and immunosuppression. *Lancet* **2**:1282-3.
195. **Wang, H. K., A. A. Duffy, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 2009. Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes. *Genes Dev* **23**:181-94.

196. **Wang, J., A. Sampath, P. Raychaudhuri, and S. Bagchi.** 2001. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene* **20**:4740-9.
197. **Wang, W.** 2007. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet* **8**:735-48.
198. **Wang, X., S. Tang, S. Y. Le, R. Lu, J. S. Rader, C. Meyers, and Z. M. Zheng.** 2008. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One* **3**:e2557.
199. **Westphal, K., B. Akgul, A. Storey, and I. Nindl.** 2009. Cutaneous human papillomavirus E7 type-specific effects on differentiation and proliferation of organotypic skin cultures. *Cell Oncol* **31**:213-26.
200. **Wieland, U., A. Ritzkowsky, M. Stoltidis, S. Weissenborn, S. Stark, M. Ploner, S. Majewski, S. Jablonska, H. J. Pfister, and P. G. Fuchs.** 2000. Communication: papillomavirus DNA in basal cell carcinomas of immunocompetent patients: an accidental association? *J Invest Dermatol* **115**:124-8.
201. **Wong, Y. F., T. H. Cheung, G. S. Tsao, K. W. Lo, S. F. Yim, V. W. Wang, M. M. Heung, S. C. Chan, L. K. Chan, T. W. Ho, K. W. Wong, C. Li, Y. Guo, T. K. Chung, and D. I. Smith.** 2006. Genome-wide gene expression profiling of cervical cancer in Hong Kong women by oligonucleotide microarray. *Int J Cancer* **118**:2461-9.
202. **Wong, Y. F., Z. E. Selvanayagam, N. Wei, J. Porter, R. Vittal, R. Hu, Y. Lin, J. Liao, J. W. Shih, T. H. Cheung, K. W. Lo, S. F. Yim, S. K. Yip, D. T. Ngong, N. Siu, L. K. Chan, C. S. Chan, T. Kong, E. Kutlina, R. D. McKinnon, D. T. Denhardt, K. V. Chin, and T. K. Chung.** 2003. Expression genomics of cervical cancer: molecular classification and prediction of radiotherapy response by DNA microarray. *Clin Cancer Res* **9**:5486-92.
203. **Yabe, Y., Y. Tanimura, A. Sakai, T. Hitsumoto, and N. Nohara.** 1989. Molecular characteristics and physical state of human papillomavirus DNA change with progressing malignancy: studies in a patient with epidermodysplasia verruciformis. *Int J Cancer* **43**:1022-8.
204. **Yamashita, T., K. Segawa, Y. Fujinaga, T. Nishikawa, and K. Fujinaga.** 1993. Biological and biochemical activity of E7 genes of the cutaneous human papillomavirus type 5 and 8. *Oncogene* **8**:2433-41.
205. **Yang, S., R. Delgado, S. R. King, C. Woffendin, C. S. Barker, Z. Y. Yang, L. Xu, G. P. Nolan, and G. J. Nabel.** 1999. Generation of retroviral vector for clinical studies using transient transfection. *Hum Gene Ther* **10**:123-32.
206. **Yee, C., I. Krishnan-Hewlett, C. C. Baker, R. Schlegel, and P. M. Howley.** 1985. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* **119**:361-6.
207. **Zehbe, I., A. Ratsch, M. Alunni-Fabroni, A. Burzlaff, E. Bakos, M. Durst, E. Wilander, and M. Tommasino.** 1999. Overriding of cyclin-dependent kinase inhibitors by high and low risk human papillomavirus types: evidence for an in vivo role in cervical lesions. *Oncogene* **18**:2201-11.
208. **Zhai, Y., R. Kuick, B. Nan, I. Ota, S. J. Weiss, C. L. Trimble, E. R. Fearon, and K. R. Cho.** 2007. Gene expression analysis of preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinomas identifies HOXC10 as a key mediator of invasion. *Cancer Res* **67**:10163-72.

- 
209. **Zhang, B., W. Chen, and A. Roman.** 2006. The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:437-42.
  210. **Zhang, H., G. J. Hannon, and D. Beach.** 1994. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* **8**:1750-8.
  211. **Zheng, Z. M., and C. C. Baker.** 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* **11**:2286-302.
  212. **Ziegert, C., N. Wentzensen, S. Vinokurova, F. Kisseljov, J. Einenkel, M. Hoeckel, and M. von Knebel Doeberitz.** 2003. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene* **22**:3977-84.
  213. **zur Hausen, H.** 1999. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin Cancer Biol* **9**:405-11.
  214. **zur Hausen, H.** 1996. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* **1288**:F55-78.
  215. **zur Hausen, H., and E. M. de Villiers.** 1994. Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* **48**:427-47.



## 8. ANEXO



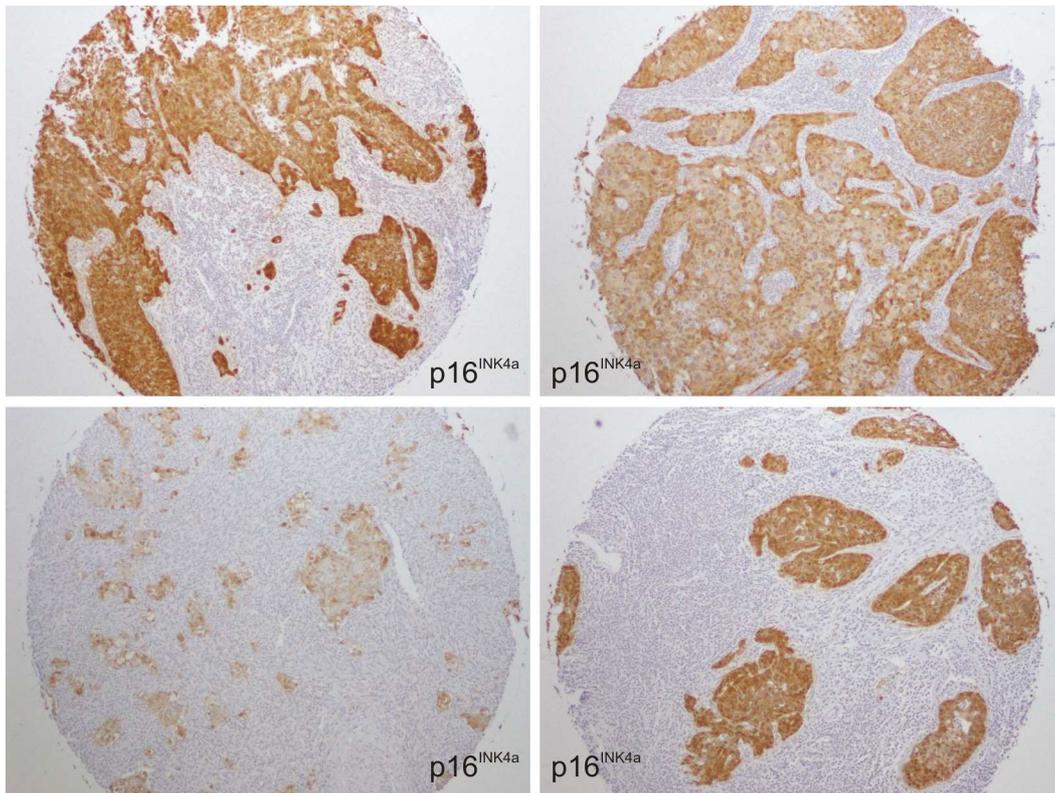


Figura A1. Expresión de de p16<sup>INK4a</sup> en *tissue array* de carcinomas de cérvix humano (kit *CINtec*).

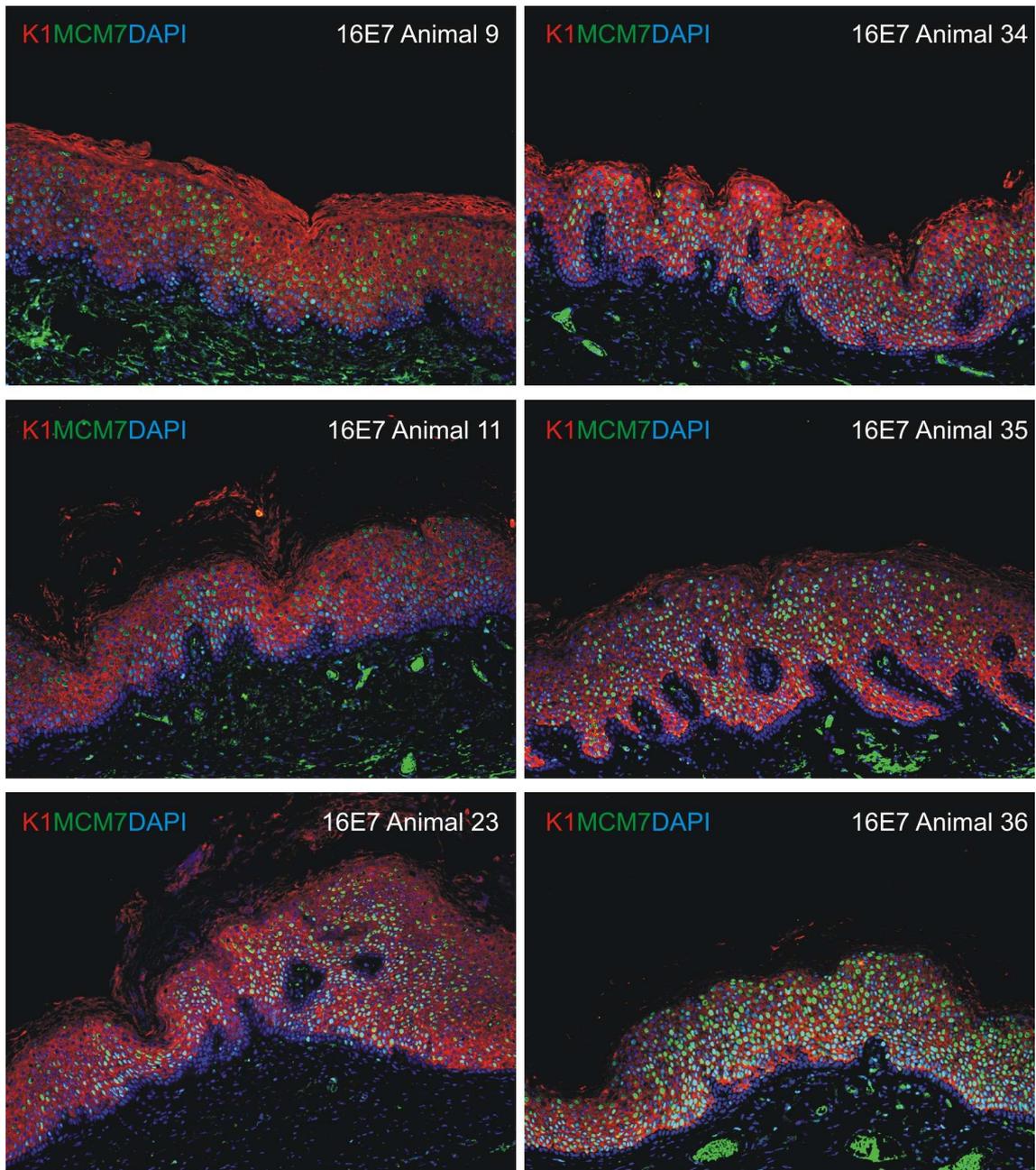


Figura A2. Expresión de MCM7 en los trasplantes con 16E7.

## Molecular Signature of HPV-Induced Carcinogenesis: pRb, p53 and Gene Expression Profiling

Águeda Buitrago-Pérez, Guillermo Garaulet, Ana Vázquez-Carballo, Jesús M. Paramio and Ramón García-Escudero\*

*Molecular Oncology Unit, Molecular Biomedicine Division, CIEMAT, Ave. Complutense 22, E-28040 Madrid, Spain*

**Abstract:** The infection by mucosal human papillomavirus (HPV) is causally associated with tumor development in cervix and oropharynx. The mechanisms responsible for this oncogenic potential are mainly due to the product activities of two early viral oncogenes: E6 and E7. Although a large number of cellular targets have been described for both oncoproteins, the interaction with tumor suppressors p53 and retinoblastoma protein (pRb) emerged as the key functional activities. E6 degrades tumor suppressor p53, thus inhibiting p53-dependent functions, whereas E7 binds and degrades pRb, allowing the transcription of E2F-dependent genes. Since these two tumor suppressors exert their actions through transcriptional modulation, functional genomics has provided a large body of data that reflects the altered gene expression of HPV-infected cells or tissues. Here we will review the similarities and differences of these findings, and we also compare them with those obtained with transgenic mouse models bearing the deletion of some of the viral oncogene targets. The comparative analysis supports molecular evidences about the role of oncogenes E6 and E7 in the interference with the mentioned cellular functions, and also suggests that the mentioned transgenic mice can be used as models for HPV-associated diseases such as human cervical, oropharynx, and skin carcinomas.

**Received on: November 11, 2008 - Revised on: November 30, 2008 - Accepted on: December 5, 2008**

**Key Words:** Human papillomavirus, E6, E7, cervical cancer, oropharyngeal cancer, gene expression profiling, pRb, p53.

### INTRODUCTION

Human papillomaviruses (HPV) are the etiological agents responsible for a number of pathologies affecting the stratified epithelia of the skin and anogenital and oropharyngeal sites [1-3]. Specific HPV types ("low risk" HPVs) cause benign warts, but other types ("high risk" HPVs) are strongly associated with premalignant and malignant invasive carcinomas, especially in the uterine cervix. Cervical cancer (CC) is the second most frequent type of women cancer worldwide, being especially important in the developing countries, where gynecological screening is not sufficiently implemented in the clinical routine [3]. Although less frequently, HPV infections have also been associated with carcinoma development in skin and oropharynx. Overall, about 25% of the head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs) are infected with "high risk" HPVs, and display clinical and molecular features that distinguish them from the remaining HNSCCs [4].

Multiple molecular studies have reported that HPV-mediated carcinogenesis is mainly due to the oncogenic activities of the viral early proteins E6 and E7. E6 is able to induce the degradation of p53 *via* direct binding to the ubiquitin ligase E6AP, inhibiting p53-dependent signaling upon stress stimuli, and contributing to tumorigenesis [5-7]. On the other hand, E7 oncoprotein E7 associates with the retinoblastoma family of proteins (pRb, p107 and p130) and disrupts their association with the E2F family of transcription

factors, subsequently transactivating cellular proteins required for cellular and viral DNA replication. Moreover, E7 binds and induces the proteasomal-mediated degradation of all pRb, p107 and p130 proteins [8-10]. p53 and pRb are well-known cellular tumor suppressors involved in processes such as cell cycle progression, DNA repair, apoptosis, differentiation, senescence, and chromatin remodeling. Very importantly, in the vast majority of human tumors pRb and/or p53 functions are impaired.

Recently, preventive vaccination against HPV infections has been launched in some countries, protecting from most of the benign and malignant lesions in the cervix. Epidemiological studies estimate that about 10% of the women population is already infected with "high risk" mucosal HPVs in the genital area, population in which vaccination would not be worthy, as it is not curative. Although the infection is not sufficient (but necessary) for tumor development, it is important to develop curative therapies for HPV-related carcinogenesis [11].

Gene expression profiling analysis using DNA microarray technologies has emerged in the last decade as a powerful tool to search for reliable gene markers of specific cancers, to determine the molecular features than distinguished or grouped different histological types of cancers, and to correlate specific gene expression patterns with clinical outcome [12]. Moreover, microarray analysis provides a powerful tool to compare molecular features of mouse models of human cancer and their human counterparts [12]. A large number of reports have described gene expression deregulation of cervical cancer and HPV-infected or non-infected HNSCC [13-23]. Interestingly, some of the deregulated

\*Address correspondence to this author at the Molecular Oncology Unit, Division of Biomedicine, CIEMAT, Ave. Complutense 22, E-28040 Madrid, Spain; Tel: (34) 913460865; E-mail: ramon.garcia@ciemat.es

# **Humanized mouse model of HPV-associated neoplasia based on E7 expression**

Águeda Buitrago-Pérez<sup>1</sup>, Marta Dueñas<sup>1</sup>, Belén Lloveras<sup>2</sup>, Almudena Holguín<sup>3</sup>, Blanca Duarte<sup>4</sup>, Juan Luis Santiago<sup>5</sup>, Baki Akgul<sup>6</sup>, Alan Storey<sup>7</sup>, Fernando Larcher<sup>4</sup>, Marcela del Rio<sup>3</sup>, Jesús M. Paramio<sup>1</sup>, and Ramón García Escudero<sup>1\*</sup>

## **Affiliations**

1. Molecular Oncology Unit, Division of Biomedicine, CIEMAT, Madrid, Spain
2. IDIBELL, Instituto Catalán de Oncología, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España; Hospital del Mar, Barcelona, España
3. Regenerative Medicine Unit, Division of Biomedicine, CIEMAT, Madrid, Spain
4. Cutaneous Diseases Modeling Unit, Division of Biomedicine, CIEMAT, Madrid, Spain
5. Departamento de Dermatología, Hospital General de Ciudad Real, Universidad de Castilla - La Mancha, Ciudad Real
6. Institute of Virology, University of Cologne, Cologne, Germany
7. Molecular Oncology Unit, University of Oxford, Johan Radcliffe Hospital, Headington, Oxford, United Kingdom

## **Corresponding author.**

\* Ramón García-Escudero. Molecular Oncology Unit. Division of Biomedicine, CIEMAT, Ave. Complutense 22, E-28040 Madrid, Spain.

E-mail: [ramon.garcia@ciemat.es](mailto:ramon.garcia@ciemat.es)

## **Abstract**

Human papillomavirus (HPV) is the causative agent of human cervical cancer and is associated with cutaneous squamous cell carcinoma. Virus oncogenicity is due in part to the molecular activities of the E7 early gene, able to inactivate retinoblastoma protein family. Although a prophylactic vaccine for cervical cancer would prevent new infections for the most frequent high-risk HPV types, there is a need to developed new targeted therapies for already infected people, that should be tested in appropriate models. Here we describe an *in vivo* model of HPV-pathology based on the expression of E7 in human primary keratinocytes used to regenerate human skin that is grafted in nude mice. Expression of E7 was stable during the 3- 6 months after transplantation, allowing the appearance of lesions that, in the case of HPV 16 E7, histopathologically resemble human cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Moreover, analyses of biomarker expression using immunodetection and/or quantitative PCR from mRNA and miRNA confirmed that the E7-transplants share the molecular features of human HPV-associated pretumoral and tumoral lesions. In conclusion, our model recapitulates several features of pathological samples of HPV infection. Accordingly, this system could be used for basic analysis or preclinical testing of HPV-associated antitumor therapies.

## Introduction

Human papillomaviruses (HPVs) are small DNA viruses with tropism for squamous epithelium, such as epidermis and genital or oral mucosa. Certain HPV types are associated with human cancer in the skin, anogenital region, and oropharynx<sup>1-3</sup>. Association between cervical cancer (CC) and HPVs was first described in 1976 by Harald zur Hausen, for which he received the 2008 Nobel Prize. CC is the second leading cause of cancer deaths in women worldwide. Today there is overwhelming evidence that certain high-risk (HR) subtypes of mucosal HPVs are the causative agents of CC. HPV 16 and 18 types are responsible of about 70% of CC worldwide<sup>4</sup>. On the other hand, association between cutaneous HPV and skin cancer was first suspected in patients with the rare inherited disease epidermodysplasia verruciformis (EV). These patients have a high susceptibility to infection with betapapillomavirus (betaPV) types (such as HPV 5 and 8) and develop frequently keratotic skin lesions and squamous cell carcinomas (SCC) in the skin<sup>5,6</sup>. BetaPV DNA is present in a high proportion of skin SCCs and actinic keratoses (AK) in organ transplant recipients (OTRs)<sup>7</sup> and immunocompetent people<sup>8</sup>. The prevalence of betaPV infection in people with SCC is known to exceed 80%<sup>9</sup>.

HPV infects the squamous epithelium from the basal layer, where the virus DNA is maintained for years in episomal form<sup>10</sup>. Virus life cycle depends on the differentiation of the host cell, as the mature particles are released from the terminally differentiated upper layers<sup>1,11</sup>. As the virus replication requires the cell machinery, HPV induces the expression of host DNA replication proteins in differentiated cells by disrupting the coupling between cell cycle arrest and differentiation<sup>12</sup>. Cellular regulators of these processes are the retinoblastoma protein (pRb) and the p53 tumor suppressors, which are inhibited by HR-HPV E7 and E6 virus oncogenes, respectively<sup>13-15</sup>. E7 protein from HPV 16 bind directly the 3 members of the retinoblastoma protein family: pRb, p107 and p130. Upon interaction, these proteins are targeted for degradation<sup>16,17</sup>, and transcription factors E2Fs induce the expression of genes involved in G1-S transition, activating cellular proliferation. Mouse models have demonstrated that the somatic inactivation of pRb promotes the uncoupling between cell cycle arrest and the onset of differentiation in epidermis<sup>18</sup>, and such reduction can also inhibit the cell cycle arrest mediated by keratinocyte differentiation proteins<sup>19</sup>. HPV 16 E7 protein can also inhibit other negative regulators of the cell cycle, such as p21 through direct binding<sup>20-22</sup>.

Although the virus DNA is normally maintained in the cell as an episome, during the malignant transformation of cervical lesions, both E6 and E7 are integrated into the cellular genome <sup>23</sup>, concomitant with a more efficient oncogene expression. The interaction with pRb, p53 and p21 tumor suppressors, and additional genetic alterations may eventually transform infected cells and induce the formation of invasive carcinomas. Cutaneous betaPVs are thought to act by potentiating the harmful effects of UV radiation, for example by impairing DNA repair and apoptosis following UV-induced damage through E6 molecular activities <sup>24-29</sup>. Mucosal HR HPVs could possibly act together with steroid hormone signaling or tobacco consumption <sup>30, 31</sup>. Finally, immunosuppression also contributes to carcinoma progression, especially for skin SCCs.

Papanicolaou smears (PAP smears) have reduced the incidence of CC very significantly in developed countries. Also, there are vaccines against CC based on HR mucosal HPVs, but they are not effective in patients already infected with the subtypes included (HPV 16 and 18) <sup>32</sup>. CC patients are treated with conventional therapy, such as surgery, chemotherapy or radiotherapy. In the case of cutaneous AK and SCC, diagnosis and removal of the lesions is easy. However, the high incidence of such lesions in OTRs is a clinical problem. No targeted therapy is been used in the clinical setting for cutaneous SCCs nor CCs. Therefore, there is a need to search for cellular targets and biomarkers for therapy in HPV-infected tumors, and to set up adequate model systems to analyze the HPV oncogenesis and test those therapies. In the present report, we made use of an organ model system that we have previously described <sup>33-35</sup> in order to analyze the long-term *in vivo* molecular and phenotypic consequences of the expression of the E7 proteins of the betaPV HPV 5 and the HR HPV 16 in primary human keratinocytes (PHKs). Upon retroviral transduction, a human skin is reconstituted and transplanted into *nu/nu* immunodeficient mice as previously described <sup>34-36</sup>. Grafted engineered skin is maintained for up to 6 months, allowing the development and maintenance of histological features that resemble, in the case of HPV 16 E7, cervical intraepithelial neoplasia (CIN) lesions. Immunodetection and quantitative PCR of HPV-infected pretumoral and tumoral samples biomarkers demonstrated that the *in vivo* organ model is suitable for basic analysis of virus oncogene function, and for preclinical analysis of anti-HPV therapies.

## **Materials and Methods**

### **E7 plasmid vectors and construction of mutants**

In order to follow the expression of the E7 proteins of HPVs, we cloned them with Flag epitopes. Two complementary oligonucleotides (Supplementary Table 1) were hybridized and cloned into the *EcoRI* site of pcDNA3.1(-) (Invitrogen) containing the Flag sequence ended with a stop codon, to obtain pcDNA3.1(-)-FLAG. E7 genes from HPV 10, HPV 5 and HPV 16 were obtained upon PCR with specific primers (Supplementary Table 1) from plasmids pcDNA3-10E7, pBP-5E7 and pBP-16E7, respectively. The primers allowed the cloning into pcDNA3.1(-)-FLAG upon digestion with *NotI/EcoRI* (10E7) or *EcoRI* (5E7 and 16E7) enzymes. Reverse primers lack the stop codon, so the epitope was inserted in frame at the E7 C-terminal end. E7-Flag fusions were sequenced to avoid the use of clones with sequence errors. Mutants from 5E7 and 16E7 genes in the LxCxE motif (5E7\_ΔDLFC and 16E7\_ΔDLYC, respectively) were obtained using Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and specific primers (Supplementary Table 1) following the manufacturer recommendations. Plasmid clones were sequenced to select appropriate incorporation of mutations. In order to purify E7 proteins, we cloned E7-flagged genes into pGEX-2T (GE Healthcare) from the corresponding pcDNA3.1(-)-E7FLAG plasmids to obtain Glutathione-S-transferase (GST)-E7-Flag proteins. Thus, 5E7-Flag and 16E7-Flag fragments were extracted after digestion with *EcoRV/PmeI* and cloned into pGEX-2T linearized with *SmaI*. GST-E7-Flag genes were sequenced to check that the fusions were properly inserted. Retroviral transductions of 5E7-Flag and 16E7-Flag genes were performed with the pLZR-IRES-GFP retroviral vector<sup>36,37</sup>, which allows the expression of the E7 genes from the same transcript of enhanced green fluorescence protein (eGFP). 5E7-Flag and 16E7-Flag fragments were extracted from the corresponding pcDNA3.1(-)-E7FLAG plasmids upon digestion with *PmeI*, and cloned into pLZR-IRES-GFP linearized with *XhoI/PmeI*. Ligation clones were sequenced to select the adequate insertion of E7-flagged genes in the retroviral vector.

### **Cell transfections and retroviral transduction**

Saos2 human osteosarcoma cells were obtained from the ATCC, maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), and incubated at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Transfections including pcDNA3.1(-)-E7Flag, pcDNA3-eGFP, and pcDNA3-pRb or pcDNA3-p107HA were done using Fugene HD (Promega). Protein levels were analyzed by

western blot 48 hours post transfection. Foreskin primary human keratinocytes (PHKs) and fibroblasts were obtained from healthy donors according to previously described methods<sup>34, 38</sup>. Donors provided informed consent for biopsy. Permission was obtained for specimens taken from organ donors. PHKs were cultivated on a feeder layer of lethally irradiated 3T3-J2 cells, as described<sup>34, 38</sup>. Human dermal fibroblasts were derived from skin biopsies and cultured in DMEM containing 10% FBS as described<sup>33, 34</sup>. Cells were cultured at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The culture medium was changed every 2 days. Preconfluent or newly confluent first-passage PHKs were trypsinized and seeded at a density of 1 x 10<sup>5</sup> cells per 100-mm dish onto the feeder layer. The culture medium was a 3:1 mixture of DMEM and Ham-F12 supplemented with 10% HyClone FetalClone II (Termo Scientific), insulin (5 mg/ml), hydrocortisone (0.4 mg/ml), triiodothyronine (1.3 ng/ml), cholera toxin (8 ng/ml) and adenine (24 mg/ml). The medium was changed every three days, and at the end of the first change, epidermal growth factor (EGF) (10 ng/ml) was added. Foreskin PHKs were infected twice with a recombinant EGFP-expressing LZR-based amphotropic retrovirus generated by transient transfection in 293T cells with empty vector pLZRS-IRES-eGFP, pLZRS-5E7Flag-IRES-eGFP or pLZRS-16E7Flag IRES-eGFP as described<sup>36, 37</sup>. Keratinocytes were analyzed by fluorescence-activated cell (FACS, Becton Dickinson, San Jose, CA) to quantify the proportion of cells with eGFP expression. Aliquots of the infected cells were harvested for protein or RNA expression.

### **Fibrin-based artificial skin preparation**

A fibrin matrix populated with live fibroblasts was used as the dermal component of the artificial skin. The fibrin matrix was prepared according to a procedure previously described<sup>34, 35</sup>. Organotypic cultures were grown submerged up to keratinocyte confluence, manually detached from the plate and placed orthotopically on the backs of *nu/nu* mice. Twelve mice were grafted in three series of grafting experiments. Surviving individual mice with successful graft take were injected intraperitoneally with 100 µg of BrdU 1 hour before sacrifice by CO<sub>2</sub> inhalation. 1 hour before, mice were injected intraperitoneally with 100 µg of BrdU. The regenerated human skin grafts were excised along with approximately 2 mm of surrounding mouse skin. Part of the graft was immediately snap frozen in liquid nitrogen for protein analysis, another part was submerged in RNA later for genetic analysis, and the remainder was placed in 4% buffered formalin or 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin for hematoxylin-

eosin (H&E) staining or immunostaining of specific protein markers. Green fluorescence was readily visualized in the intact xenograft *in vivo*, using a fluorescence stereomicroscope under blue light (Olympus America, Melville, NY).

### **Immunostaining on paraffin embedded grafted tissue.**

Sections of 5  $\mu\text{m}$  fixed, paraffin-embedded samples used for conventional immunohistochemistry were used after deparaffination and treatment with  $\text{H}_2\text{O}_2$  to remove endogenous peroxidase. Sections for immunofluorescence were incubated with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  to remove autofluorescence due to formol. Antigen unmasking was done for some antibodies using conventional citrate buffer. BrdU incorporation was done after treatment with 2N HCl to denature DNA. For immunohistochemistry, detection of the secondary antibody was done using the avidin/streptavidin-peroxidase system (ABC Kit, Vectastain) and diaminobenzidine chromogen as substrate (Peroxidase Substrate Kit DAB, Vector Laboratories) following manufacturers recommendations. For immunofluorescence, secondary antibodies used were coupled to convenient fluorochromes. When necessary, DAPI (Roche) was added to identify the nuclei. Image analysis was done with a microscope (Zeiss Axioplan2 imaging) equipped with an epifluorescence source and adequate filters. Images were captured with a digital camera (AxioCam MRm) and visualized with the software AxioVision Rel.4.6. Primary antibodies used are listed in Supplementary Table 2.

### **Western blot analysis of proteins**

Proteins were extracted from cultured cells using scraper or trypsin treatment. Cell lysis was done using RIPA buffer (Trizma-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 0.1% SDS, 1% Triton X-100 and 0.5% DOC) supplemented with proteases inhibitors (Roche). Protein concentration was measured using Bradford (BioRad), and separated using precasted 4-12% gradient SDS-PAGE system (Invitrogen). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and incubated with primary antibodies. Peroxidase-coupled secondary antibodies were detected using the Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) following manufacturer recommendations. Primary antibodies used are listed in Supplementary Table 2.

### **Quantitative real-time PCR from mRNA and miRNA.**

Purification of total RNA including miRNA was done using miRNAeasy Mini Kit (Qiagen). Skin transplants were disrupted and homogenized using MixerMill 301 (Retsch). RNA integrity was tested using Bioanalyzer (Agilent). Reverse transcription was done with the Omniscript® Reverse Transcription kit (Qiagen) using oligo-dT primers. Real-time PCR was performed using gene specific primers and the SYBR Green system (Applied Biosystems). TBP and GUSB genes were selected as normalizing control genes. TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems) were used to quantify miRNAs in samples according to the manufacturer instructions with the TaqMan® Universal PCR Master Mix reagent kit (Applied Biosystems). Normalization was performed using U6 as endogenous control. qRT-PCR for mRNA and miRNA was performed in an ABI 7500fast Real-Time PCR System.

## Results

### **E7-flagged protein of cutaneous HPV 5 can bind pRb and reduce pRb and p107 protein levels**

As no antibodies to the E7 protein of cutaneous HPV 5 are available, we have generated an E7-Flag fusion protein, with the epitope located at the C-terminal end. A similar protein was described to be functional in the case of 16E7<sup>17</sup>, which was also used in this study. Proteins 5E7 and 16E7 can bind the retinoblastoma protein pRb<sup>13, 39, 40</sup>. To check that flagged proteins can bind pRb, the genes were cloned in Glutathione-S-transferase (GST) expression vectors in order to purify them by affinity chromatography using immobilized glutathione. Purified GST-E7-Flag proteins of both HPV 16 and HPV 5 can bind *in vitro* to pRb (Fig. 1A), showing that the incorporation of the epitope does not affect the binding activity. On the other hand, upon binding, E7 targets pRb for proteasome degradation<sup>16</sup>. Thus, when cotransfected with a pRb-expression vector, both 5E7-Flag and 16E7-Flag proteins reduced dramatically the pRb-protein levels in Saos2 cells (Fig. 1B), which express a truncated, non functional pRb. A similar result was obtained with a p107-HA tagged cotransfected protein (Fig. 1C), again for both E7 proteins. The results demonstrate that flagged E7 proteins are functional as they can bind pRb and reduce pRb and p107 protein levels. Importantly, we are showing that 5E7 is able to reduce p107-protein levels, a finding that has not been reported previously, as far as we are aware. Furthermore, 5E7 also binds to pRb, although with less affinity than 16E7 as reported<sup>40</sup>.

### **E7-Flagged proteins in retrovirally transduced PHKs**

The retroviral pLZRS-IRES-eGFP vector allows expression from the same transcript of the E7 and eGFP genes, using an IRES sequence located between them. The advantage of this system is that the expression of the transgenes can be followed using green fluorescence detection. Foreskin PHKs were transduced with the E7-flagged genes of HPV 5 and HPV 16, or control retrovirus. Primary cells were infected twice at low cell density in the presence of irradiated NIH 3T3 feeder cells. The experiment was repeated 3 times. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) for 5E7, 16E7 and eGFP from purified RNA showed that the E7-IRES-eGFP cassette was expressed (Fig. 2A). The overall proportion of infected cells was 46% ± 10% as determined by FACS analyses of eGFP positive cells (Supplementary Figure 1). Immunodetection of E7, pRb, and p107

demonstrated effective and functional expression of HPV oncogenes. No recombinant protein for 16E7-Flag was detected with flag antibodies, but a specific 16E7 antibody was used (Fig. 2B). As expected, the reduction of the levels of pRb and p107 proteins was not due to reduced expression of the corresponding transcript levels as determined by qRT-PCR (Fig. 2A).

### **E7-transplants induced histological features of HPV-associated neoplasia**

Infected cells were subsequently embedded within a fibrin gel with foreskin fibroblasts, and transplanted into the back of nude mice. The E7-transplants were maintained onto the mice for 3 to 6 months in order to analyze long-term phenotypic effects of the viral oncogene expression. Green fluorescence was used to check for transgene expression in all cases (Supplementary Fig.2). In total, we performed 4 transplantations per retrovirus (control, 5E7 and 16E7), and repeated it three times (3 sets of 12 transplants). Two sets were maintained for about 3 months and one set for 6 months. qRT-PCR analyses showed that the transplants expressed the E7 proteins at the time of collection (Supplementary Fig. 2), demonstrating that the humanized mouse skin model allows the analysis of long-term effects of HPV oncogenes.

Dermatoscope visualization identified macroscopical differences between control and E7-samples, such as epidermal thickening and desquamation probably associated to hyperkeratosis (Fig. 3). Moreover, 16E7 samples also display crypts and papillomatous structures. A closer inspection of the paraffin embedded transplants confirm macroscopical analysis, and showed that both E7 genes induced phenotypic changes when compared with control transplants, which were more pronounced in the case of 16E7 (Fig. 4). Most 16E7 samples display acanthosis associated with hyperplasia, suprabasal mitotic figures, hyperkeratosis, parakeratosis, hypergranulosis, nuclear atypia and papillomatosis (Fig. 4 and Table 1). Most of these histopathological features are present in high grade CIN<sup>41</sup>. Thus, reconstituted human skin transplanted onto nude mice represents a good model of HPV- pathobiology.

### **Epithelial differentiation and proliferation in E7-transplants**

Histologically, the E7-transplants display features of abnormal differentiation, such as parakeratosis hyperkeratosis and hypergranulosis. We performed immunofluorescence of epidermal differentiation markers. Staining with cytokeratin 5 (K5), a marker of basal cells, demonstrated no major changes in the transplants (Fig. 5), although K5-positive

cells in suprabasal layers could eventually appear in 16E7-samples, concomitant with expression of cytokeratin 10 (K10, early differentiation marker) or involucrin (late differentiation marker) (Supplementary Figure 3). This result indicates that 16E7 can uncouple proliferation and differentiation, as we have previously demonstrated that occurs in the skin of pRb or pRb/p107 mutant transgenic mice<sup>18, 42</sup>. K10 expression pattern is suprabasal in all cases, but in 16E7-transplants, areas of reduced expression can be observed (Fig. 5). Finally, involucrin expression is normally confined to the uppermost layers of spinous cells and granulous layer in controls, whereas a clear expansion of involucrin positive cells was observed in 16E7-transplants, in agreement with the observed acanthosis. No major differentiation changes were observed in 5E7-transplants (Fig. 5).

The phenotype observed in 16E7-transplants suggested augmented tissue proliferation as previously described using organotypic skin cultures of E7 from HPV 18 and 16<sup>12, 43</sup>. BrdU incorporation as well as the expression of PCNA corroborated such augmented proliferation in basal and suprabasal layers (Fig. 6). The proliferation was especially evident in 16E7, where the staining patterns can reach the upper layers of suprabasal cells. In 5E7-transplants, only spotted areas display a similar phenotype of ectopic suprabasal proliferation, showing that, although no major phenotypic changes can be observed for 5E7-transplants, spotted areas of molecular activity exist.

### **E7 proteins allow aberrant expression of cell cycle regulators**

Previously, it has been reported that E7 induce expression of cell cycle regulators p21 and Cyclin A in organotypic cultures or pathological HPV-infected samples<sup>44, 45</sup>. Immunohistochemistry analyses demonstrate almost absent expression of both proteins in normal, control transplants (Fig. 7A and D). However, expression can be eventually observed in 5E7-samples (Fig 7B and E) or along 16E7-transplants (Fig 7C and F). The number of positive cells was higher in the case of p21. Moreover, augmented expression of both p21 and Cyclin A was observed in the PHKs soon after retroviral infection, before they were put to form a tridimensional skin (Fig. 7G). Although the expression of p21 was patched in 5E7 samples, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) from mRNA showed that p21 gene was moderately increased in the cells and in the tissues. Whether p21 is active or not in the E7-transplants remain to be ascertained, although 16E7 can inhibit p21 function<sup>20-22</sup>.

### **Apoptosis in E7-transplants**

Previously, it has been reported that E7 protein from HPV 16 is able to stabilize tumor suppressor p53 and induce apoptosis<sup>15</sup>. In agreement, in the E7-transduced PHKs, previously to animal grafting, we found an increase in p53 and Bax, a proapoptotic inducer directly regulated by p53 (Fig. 8). Histological examination of our E7-grafts showed apoptotic areas in the case of 16E7-transplants (Table 1). In order to determine whether cell death is taking place in the E7-transplants, we performed immunofluorescence with an antibody which detects the active form of caspase-3, a which signals both extrinsic (death ligand) and intrinsic (mitochondrial) apoptosis pathways<sup>46</sup>, and p53. The result showed that no significant apoptosis in E7-transplants, although a few p53-positive cells appeared in 16E7 grafts (Fig. 8).. These results show that no major cell death is induced in E7-transplants.

### **Biomarkers of HPV-infection**

In order to validate the *in vivo* model of HPV analysis, biomarker detection was done in the E7-transplants. Cellular proteins, p16-INK4A and MCM7 are surrogate markers of HPV-E7 expression in clinical samples<sup>47-50</sup>. Immunohistochemistry analysis showed overexpression of both markers in basal and suprabasal cells, in spotted areas of 5E7-transplants and throughout 16E7-samples (Fig. 9). The result corroborates that the transplants described can recapitulate molecular features that characterize CIN and carcinoma lesions.

On the other hand, we performed qRT-PCR assays in order to validate aberrant expression of biomarkers that have been identified using gene expression analyses. In a comparative meta-analysis of genome-wide microarray experiments performed on HPV-infected samples, such as cervical carcinomas (CC) and head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), we have previously described reproducible overexpression of genes such as E2F1, CENPF, MELK and RFC4 in a significant number of independent reports<sup>51</sup>. PCR quantification was done for these genes after transplantation, and the results demonstrated that the E7 gene from HPV 16 significantly induced expression of all 4 biomarkers (Fig. 10). In the case of E7 from HPV 5, overexpression was also found, although to a lesser extent. This result together with the quantification of the p21 transcript shows that although no evident phenotypical changes are present in 5E7-transplants, some differences at the molecular

level are observed. Some of these differences could also be observed before in the PHKs skin transplantation (Fig. 10).

Finally, we have performed qRT-PCR of specific miRNAs. A number of reports have described deregulation of particular miRNAs in infected CC or HNSCC, some of them in association with clinical parameters <sup>52-56</sup>. No differences were observed in the expression of miR-148a, miR-145 or miR-203 (Supplementary Figure 4). However, the results demonstrated significant overexpression of miR-146a and miR-200a in 16E7-grafts, and miR-21 in both 5E7- and 16E7-grafts (Fig. 11). Overall, qRT-PCR demonstrated that E7-transplants displayed molecular deregulation of HPV-infected carcinomas, specially in the case of 16E7.

## Discussion

E7 oncogene from HR HPVs has been extensively analyzed in order to find cellular targets, functional activities, and physiopathological features using cultured cells, organ model systems (such as organotypic skin), or animal models such as transgenic mouse<sup>57</sup>. Also, E7 protein has been used as a target for therapeutic intervention, although no clinical treatment based in these findings has reached the standard of care for HPV-associated cancer. However, 16E7 expression is able to recapitulate features of human CC samples in organotypic skin, or “raft” cultures<sup>12</sup>. A major limitation of raft cultures is that the time window to used antitumor therapies is reduced to a few days. On the other hand, hormone treatment or the chemical carcinogen 4NQO in K14-16E7 transgenic mice induce the appearance of cervical cancer<sup>58</sup> or head and neck cancer<sup>59</sup>, respectively. Although animal models represent optimal organism systems, they do not fully recapitulate the human molecular interactions and histopathology.

Examination of 16E7-grafts showed histopathological features that can be observed in HPV-associated CIN and CC. Importantly, the augmented proliferation in basal and suprabasal cells, the disorganization of the differentiation, and the eventual appearance of K5/K10 and K5/involutrin positive suprabasal cells, demonstrates that 16E7 can uncouple differentiation and proliferation in the grafted human skin. Similar findings are observed in the skin of transgenic mice with constitutive somatic elimination of Rb gene in epidermis (Rb<sup>ΔEpi</sup> mice). Rb<sup>ΔEpi</sup> mice display a hyperproliferative condition and disengagement of proliferation and differentiation<sup>18</sup>, which is augmented in the absence of p107 (Rb<sup>ΔEpi</sup>;p107<sup>-/-</sup> mice)<sup>18,42</sup>, but not in the absence of p130 (Rb<sup>ΔEpi</sup>;p130<sup>-/-</sup> mice)<sup>60</sup>. These results demonstrate that 16E7 is able to inhibit retinoblastoma family function in the grafted skin. However, the inhibition may not be complete, as somatic inactivation of both pRb and p107 in transgenic mice derive in epidermal tumors<sup>42</sup>, demonstrating that p107 acts as a tumor suppressor in the absence of pRb.

Molecular characterization using surrogate markers of HPV-infection as well as biomarkers of infected CC and HNSCC samples showed that human skin 16E7-grafts represent a valid model of HPV-pathobiology. In addition, molecular analyses showed 5E7 molecular activity in discrete areas with positive staining of p21, cyclin A, or MCM7. This result is in contrast with the molecular finding that 5E7 is able to reduce protein levels of the retinoblastoma proteins in Saos2 cells and PHKs so similar levels that 16E7. qRT-PCR analyses demonstrate that 5E7 gene is expressed (as well as 16E7)

during the transplantation time period. Also, 5E7-samples display a moderate increase of some biomarkers of infected carcinomas, although to a much lesser extent than 16E7. Histological analysis of 5E7-grafts showed a mild phenotype, with some focal acanthosis, hiperkeratosis or hipergranulosis. Phenotypical differences between both E7 proteins have been previously described in raft cultures. Thus, 5E7 induces only a mild phenotype which affects the differentiation and basal proliferation<sup>61, 62</sup>. In our transplants, differences are not due to loss of E7 transgene expression in the case of 5E7, as both 5E7 and 16E7 transplants display stable expression as evidenced by qRT-PCR of eGFP and E7 genes. On the other hand, the absence of caspase-3 activation showed no apoptosis in 5E7-transplants, so a negative selection of 5E7-transduced cells by means of cell death could be discarded. Importantly, mouse models have demonstrated that activities independent of pRb inactivation<sup>63</sup> or dependent on p21 inactivation<sup>64</sup> contribute to the phenotype observed upon expression of 16E7. Possibly, 5E7 is not able to inhibit p21 or other possible 16E7-targets, thus explaining a partial phenotype of 5E7-transplants. Moreover, although transfection in Saos2 or transduction in PHK before transplantation showed efficient reduction of pRb and p107 levels, 5E7 may not be able to disrupt pRb and/or p107 in the context of *in vivo* skin.

Biomarker characterization of grafts showed induction of miR-21, miR-146a and miR-200a. Importantly, miR-21 is overexpressed in many cancers, and a significant number of functional studies have shown that it displays oncogenic and metastatic activity<sup>65</sup>. Moreover, miR-21 is overexpressed in cell lines and pathological specimens of CC<sup>52, 53</sup> and HNSCC<sup>66</sup>, and miR-21 expression is higher in CC samples of poorer prognosis<sup>67</sup>. Among the genes regulated by miR-21 are tumor suppressors RECK, FASL, PTEN or SPRY2, all of them important regulators of processes associated with carcinogenesis. Although the mechanism by which miR-21 is induced in CC and in our 5E7 and 16E7 grafts is not known, it seems clear that the *in vivo* consequences of miR-21 inhibition could be tested on the grafts. On the other hand, changes in expression of miR-146a have been described not only in pathological samples of CC<sup>52, 53</sup> and many types of cancer but also in psoriasis of the skin, and in the negative regulation of inflammation-induced innate immune response pathway. Moreover, its expression is directed by the transcription factor NF-kappaB which has been implicated as a link between inflammation and carcinogenesis<sup>68</sup>. Targets of miR-146a are TRAF6 and IRAK1, transducers of the IL1 downstream signaling cascade towards NF-kappaB activation of proinflammatory cytokines, or STAT3 activation. miR-146a would potentially inhibit

the activation of inflammation upon *in vivo* infection NF-kappaB, thus contributing to the progression of asymptomatic HPV-associated pathology. Interestingly, in cervical carcinoma cell lines and organotypic cultures of HPV18-infected primary human vaginal keratinocytes, miR-146a is not overexpressed, although it enhances cell proliferation when transfected into HeLa or HCT116 cells <sup>56</sup>. The absence in cell lines and 3D-cultures and the overexpression in the 16E7-transplants suggest that the regulation of miR-146a in CC is only observed *in vivo* upon expression of the 16E7 protein. Finally, we have found overexpression of miR-200a in the 16E7-grafts. Previously, it has been described that miR-200a negatively regulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) by regulating the expression of ZEB1 <sup>69</sup> and ZEB2 <sup>70</sup>. Moreover, transfection of miR-200a into HeLa cells suppresses genes controlling cell motility <sup>71</sup>. Possibly, topical administration of miR-200a inhibitors in 16E7-skin transplants could induce EMT by the expression of positive regulators (such as ZEB1 and 2).

Here we present a model system where the HPV E7 oncogene is expressed in basal cells of PHKs that have been used to reconstitute human skin, which is maintained for several months in the back on immunosuppressed mice. Histologically, 16E7-transplants are similar to human CIN. As far as we know, this is the first *in vivo* human model system for HPV in which it is possible to fully recapitulate the neoplastic lesions associated with HR HPVs. We suggest that coexpression with E6, able to degrade tumor suppressor p53, would induce the appearance of higher grade, more aggressive phenocopies of HPV-malignant carcinomas. The model can be used to test synergistic effects of E6 and E7 together, to perform functional studies on mutant variants of these oncogenes, or to search for additional molecular targets. Importantly, the system is optimal to test antitumor therapies, as a high proportion of initial transplants succeeded (more than 80%). Topical application using inhibitors candidate proteins or miRNAs could be preclinically tested in order to find, new efficient targeted therapies against HPV-associated malignancies.

## **Acknowledgements**

## References

1. zur Hausen H: Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis, *J Natl Cancer Inst* 2000, 92:690-698
2. Pfister H: Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer, *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003, 52-56
3. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA: HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic, *Lancet Oncol* 2010, 11:781-789
4. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, Guimera N, Clavero O, Alejo M, Llombart-Bosch A, Cheng-Yang C, Tatti SA, Kasamatsu E, Iljazovic E, Odida M, Prado R, Seoud M, Grce M, Usulutun A, Jain A, Suarez GA, Lombardi LE, Banjo A, Menendez C, Domingo EJ, Velasco J, Nessa A, Chichareon SC, Qiao YL, Lerma E, Garland SM, Sasagawa T, Ferrera A, Hammouda D, Mariani L, Pelayo A, Steiner I, Oliva E, Meijer CJ, Al-Jassar WF, Cruz E, Wright TC, Puras A, Llave CL, Tzardi M, Agorastos T, Garcia-Barriola V, Clavel C, Ordi J, Andujar M, Castellsague X, Sanchez GI, Nowakowski AM, Bornstein J, Munoz N, Bosch FX: Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study, *Lancet Oncol* 2010, 11:1048-1056
5. Gewirtzman A, Bartlett B, Tyring S: Epidermodysplasia verruciformis and human papilloma virus, *Curr Opin Infect Dis* 2008, 21:141-146
6. Orth G: Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses, *Semin Immunol* 2006, 18:362-374
7. de Jong-Tieben LM, Berkhout RJ, ter Schegget J, Vermeer BJ, de Fijter JW, Bruijn JA, Westendorp RG, Bouwes Bavinck JN: The prevalence of human papillomavirus DNA in benign keratotic skin lesions of renal transplant recipients with and without a history of skin cancer is equally high: a clinical study to assess risk factors for keratotic skin lesions and skin cancer, *Transplantation* 2000, 69:44-49
8. Asgari MM, Kiviat NB, Critchlow CW, Stern JE, Argenyi ZB, Raugi GJ, Berg D, Odland PB, Hawes SE, de Villiers EM: Detection of human papillomavirus DNA in cutaneous squamous cell carcinoma among immunocompetent individuals, *J Invest Dermatol* 2008, 128:1409-1417
9. de Koning MN, Weissenborn SJ, Abeni D, Bouwes Bavinck JN, Euvrard S, Green AC, Harwood CA, Naldi L, Neale R, Nindl I, Proby CM, Quint WG, Sampogna F, ter Schegget J, Struijk L, Wieland U, Pfister HJ, Feltkamp MC: Prevalence and associated factors of betapapillomavirus infections in individuals without cutaneous squamous cell carcinoma, *J Gen Virol* 2009, 90:1611-1621
10. Doorbar J: The papillomavirus life cycle, *J Clin Virol* 2005, 32 Suppl 1:S7-15
11. Stoler MH, Broker TR: In situ hybridization detection of human papillomavirus DNAs and messenger RNAs in genital condylomas and a cervical carcinoma, *Hum Pathol* 1986, 17:1250-1258
12. McCance DJ, Kopan R, Fuchs E, Laimins LA: Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85:7169-7173
13. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E: The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product, *Science* 1989, 243:934-937
14. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM: A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18, *EMBO J* 1991, 10:4129-4135

15. Jones DL, Thompson DA, Munger K: Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis, *Virology* 1997, 239:97-107
16. Boyer SN, Wazer DE, Band V: E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway, *Cancer Res* 1996, 56:4620-4624
17. Gonzalez SL, Strelau M, He X, Basile JR, Munger K: Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7, *J Virol* 2001, 75:7583-7591
18. Ruiz S, Santos M, Segrelles C, Leis H, Jorcano JL, Berns A, Paramio JM, Vooijs M: Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis, *Development* 2004, 131:2737-2748
19. Paramio JM, Casanova ML, Segrelles C, Mitnacht S, Lane EB, Jorcano JL: Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16, *Mol Cell Biol* 1999, 19:3086-3094
20. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA: Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein, *Genes Dev* 1997, 11:2090-2100
21. Jones DL, Alani RM, Munger K: The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2, *Genes Dev* 1997, 11:2101-2111
22. Helt AM, Funk JO, Galloway DA: Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells, *J Virol* 2002, 76:10559-10568
23. Smith PP, Friedman CL, Bryant EM, McDougall JK: Viral integration and fragile sites in human papillomavirus-immortalized human keratinocyte cell lines, *Genes Chromosomes Cancer* 1992, 5:150-157
24. Akgul B, Lemme W, Garcia-Escudero R, Storey A, Pfister HJ: UV-B irradiation stimulates the promoter activity of the high-risk, cutaneous human papillomavirus 5 and 8 in primary keratinocytes, *Arch Virol* 2005, 150:145-151
25. Giampieri S, Garcia-Escudero R, Green J, Storey A: Human papillomavirus type 77 E6 protein selectively inhibits p53-dependent transcription of proapoptotic genes following UV-B irradiation, *Oncogene* 2004, 23:5864-5870
26. Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A: Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins, *Genes Dev* 2000, 14:3065-3073
27. Jackson S, Storey A: E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage, *Oncogene* 2000, 19:592-598
28. Leverrier S, Bergamaschi D, Ghali L, Ola A, Warnes G, Akgul B, Blight K, Garcia-Escudero R, Penna A, Eddaoudi A, Storey A: Role of HPV E6 proteins in preventing UVB-induced release of pro-apoptotic factors from the mitochondria, *Apoptosis* 2007, 12:549-560
29. Underbrink MP, Howie HL, Bedard KM, Koop JI, Galloway DA: E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation, *J Virol* 2008, 82:10408-10417
30. Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S: Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study, *Lancet* 2002, 359:1085-1092

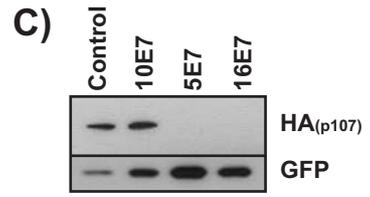
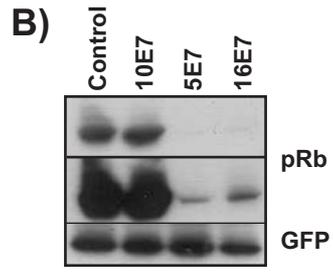
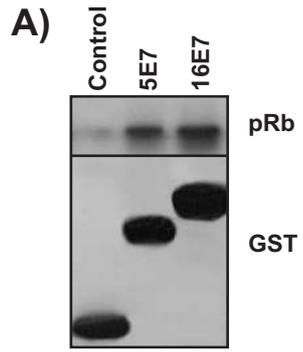
31. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX: Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study, *Lancet* 2002, 359:1093-1101
32. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuind A, Costa Clemens SA, Dubin G: Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial, *Lancet* 2006, 367:1247-1255
33. Rio MD, Larcher F, Meana A, Segovia J, Alvarez A, Jorcano J: Nonviral transfer of genes to pig primary keratinocytes. Induction of angiogenesis by composite grafts of modified keratinocytes overexpressing VEGF driven by a keratin promoter, *Gene Ther* 1999, 6:1734-1741
34. Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, Martin C, San Roman F, Tevar F: Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels, *Burns* 1998, 24:621-630
35. Del Rio M, Larcher F, Serrano F, Meana A, Munoz M, Garcia M, Munoz E, Martin C, Bernad A, Jorcano JL: A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo, *Hum Gene Ther* 2002, 13:959-968
36. Larcher F, Del Rio M, Serrano F, Segovia JC, Ramirez A, Meana A, Page A, Abad JL, Gonzalez MA, Bueren J, Bernad A, Jorcano JL: A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin-targeted keratinocyte grafts, *Faseb J* 2001, 15:1529-1538
37. Yang S, Delgado R, King SR, Woffendin C, Barker CS, Yang ZY, Xu L, Nolan GP, Nabel GJ: Generation of retroviral vector for clinical studies using transient transfection, *Hum Gene Ther* 1999, 10:123-132
38. Rheinwald JG, Green H: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells, *Cell* 1975, 6:331-343
39. Schmitt A, Harry JB, Rapp B, Wettstein FO, Iftner T: Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7 protein of the low-risk human papillomavirus type 1, *J Virol* 1994, 68:7051-7059
40. Yamashita T, Segawa K, Fujinaga Y, Nishikawa T, Fujinaga K: Biological and biochemical activity of E7 genes of the cutaneous human papillomavirus type 5 and 8, *Oncogene* 1993, 8:2433-2441
41. Crum CP, Ikenberg H, Richart RM, Gissman L: Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia, *N Engl J Med* 1984, 310:880-883
42. Lara MF, Santos M, Ruiz S, Segrelles C, Moral M, Martinez-Cruz AB, Hernandez P, Martinez-Palacio J, Lorz C, Garcia-Escudero R, Paramio JM: p107 acts as a tumor suppressor in pRb-deficient epidermis, *Mol Carcinog* 2008, 47:105-113
43. Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murrant T, Broker TR, Chow LT: Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes, *Genes Dev* 1995, 9:2335-2349
44. Jian Y, Schmidt-Grimminger DC, Chien WM, Wu X, Broker TR, Chow LT: Post-transcriptional induction of p21<sup>cip1</sup> protein by human papillomavirus E7 inhibits unscheduled DNA synthesis reactivated in differentiated keratinocytes, *Oncogene* 1998, 17:2027-2038

45. Ruesch MN, Laimins LA: Human papillomavirus oncoproteins alter differentiation-dependent cell cycle exit on suspension in semisolid medium, *Virology* 1998, 250:19-29
46. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ, Los M: Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes, *J Med Genet* 2009, 46:497-510
47. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, Duensing S, Sheets EE, Munger K, Crum CP: Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia, *Am J Surg Pathol* 2001, 25:884-891
48. Keating JT, Ince T, Crum CP: Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis, *Adv Anat Pathol* 2001, 8:83-92
49. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel Doeberitz M: p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia, *Am J Surg Pathol* 2002, 26:1389-1399
50. Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J: Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers, *J Virol* 2003, 77:10186-10201
51. Buitrago-Perez A, Garaulet G, Vazquez-Carballo A, Paramio JM, Garcia-Escudero R: Molecular Signature of HPV-Induced Carcinogenesis: pRb, p53 and Gene Expression Profiling, *Curr Genomics* 2009, 10:26-34
52. Lee JW, Choi CH, Choi JJ, Park YA, Kim SJ, Hwang SY, Kim WY, Kim TJ, Lee JH, Kim BG, Bae DS: Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas, *Clin Cancer Res* 2008, 14:2535-2542
53. Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A: Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer, *Cancer Res* 2007, 67:6031-6043
54. Martinez I, Gardiner AS, Board KF, Monzon FA, Edwards RP, Khan SA: Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells, *Oncogene* 2008, 27:2575-2582
55. Pereira PM, Marques JP, Soares AR, Carreto L, Santos MA: MicroRNA expression variability in human cervical tissues, *PLoS One* 2010, 5:e11780
56. Wang X, Tang S, Le SY, Lu R, Rader JS, Meyers C, Zheng ZM: Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth, *PLoS One* 2008, 3:e2557
57. McLaughlin-Drubin ME, Munger K: The human papillomavirus E7 oncoprotein, *Virology* 2009, 384:335-344
58. Riley RR, Duensing S, Brake T, Munger K, Lambert PF, Arbeit JM: Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis, *Cancer Res* 2003, 63:4862-4871
59. Strati K, Lambert PF: Role of Rb-dependent and Rb-independent functions of papillomavirus E7 oncogene in head and neck cancer, *Cancer Res* 2007, 67:11585-11593
60. Lara MF, Garcia-Escudero R, Ruiz S, Santos M, Moral M, Martinez-Cruz AB, Segrelles C, Lorz C, Paramio JM: Gene profiling approaches help to define the specific functions of retinoblastoma family in epidermis, *Mol Carcinog* 2008, 47:209-221
61. Boxman IL, Mulder LH, Noya F, de Waard V, Gibbs S, Broker TR, ten Kate F, Chow LT, ter Schegget J: Transduction of the E6 and E7 genes of epidermodysplasia-

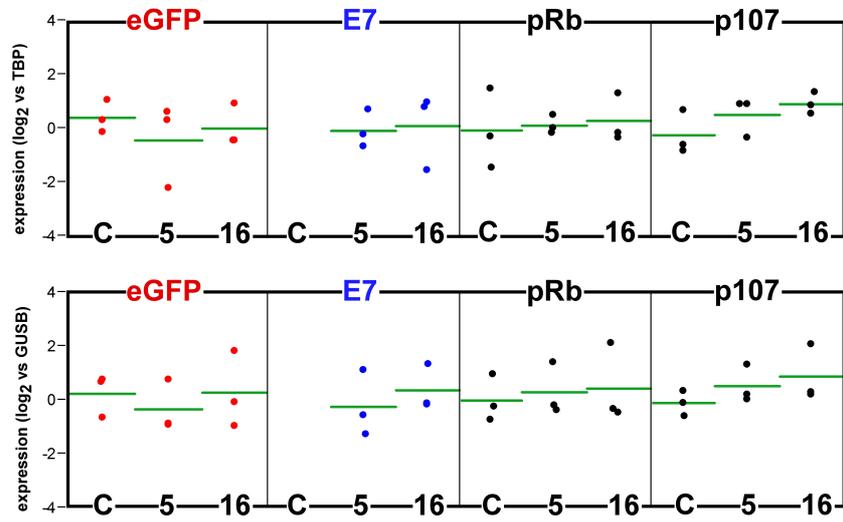
- verruciformis-associated human papillomaviruses alters human keratinocyte growth and differentiation in organotypic cultures, *J Invest Dermatol* 2001, 117:1397-1404
62. Westphal K, Akgul B, Storey A, Nindl I: Cutaneous human papillomavirus E7 type-specific effects on differentiation and proliferation of organotypic skin cultures, *Cell Oncol* 2009, 31:213-226
63. Balsitis S, Dick F, Lee D, Farrell L, Hyde RK, Griep AE, Dyson N, Lambert PF: Examination of the pRb-dependent and pRb-independent functions of E7 in vivo, *J Virol* 2005, 79:11392-11402
64. Shin MK, Balsitis S, Brake T, Lambert PF: Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21Cip1 in cervical carcinogenesis, *Cancer Res* 2009, 69:5656-5663
65. Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C: miR-21 as a key regulator of oncogenic processes, *Biochem Soc Trans* 2009, 37:918-925
66. Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, Perez-Ordenez B, Jurisica I, O'Sullivan B, Waldron J, Gullane P, Cummings B, Liu FF: Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas, *Clin Cancer Res* 2010, 16:1129-1139
67. Azuma M, Ritprajak P, Hashiguchi M: Topical application of siRNA targeting cutaneous dendritic cells in allergic skin disease, *Methods Mol Biol* 2010, 623:373-381
68. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D: NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103:12481-12486
69. Saydam O, Shen Y, Wurdinger T, Senol O, Boke E, James MF, Tannous BA, Stemmer-Rachamimov AO, Yi M, Stephens RM, Fraefel C, Gusella JF, Krichevsky AM, Breakefield XO: Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway, *Mol Cell Biol* 2009, 29:5923-5940
70. Xia H, Cheung WK, Sze J, Lu G, Jiang S, Yao H, Bian XW, Poon WS, Kung HF, Lin MC: miR-200a regulates epithelial-mesenchymal to stem-like transition via ZEB2 and beta-catenin signaling, *J Biol Chem* 2010, 285:36995-37004
71. Hu X, Schwarz JK, Lewis JS, Jr., Huettner PC, Rader JS, Deasy JO, Grigsby PW, Wang X: A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis, *Cancer Res* 2010, 70:1441-1448

**Table 1.** Histopathology analysis of E7-transplants

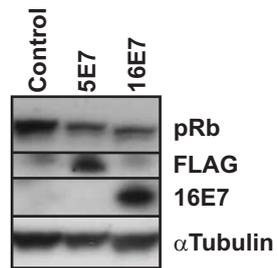
Transplant Set	Genotype	Sample ID	Atrophy	Acanthosis	Hyperkeratosis	Parakeratosis	Hypergranulosis	Papillomatosis	Suprabasal Mitosis	Nuclear Atypia	Apoptosis
1	Control	4986									
1	Control	4987	yes		yes						
1	Control	4988									
1	Control	4989									
2	Control	5763							yes		
2	Control	5765									
2	Control	5766									
2	Control	5768	yes		yes						
3	Control	7424	yes		yes						
3	Control	7485									
3	Control	7484									
1	5E7	4990									
1	5E7	4991									
2	5E7	5762	yes		yes						
2	5E7	5760			yes			yes			
2	5E7	5761		yes							
2	5E7	5758									
3	5E7	7497									
1	16E7	4992		yes	yes				yes	yes	yes
1	16E7	4994		yes	yes	yes		yes	yes	yes	
1	16E7	4995		yes	yes			yes	yes	yes	
2	16E7	5770		yes	yes				yes	yes	
2	16E7	5771A		yes	yes		yes	yes	yes	yes	
3	16E7	7489		yes	yes					yes	
3	16E7	7490		yes	yes			yes	yes	yes	
3	16E7	7620		yes	yes	yes			yes		
3	16E7	7491		yes	yes				yes	yes	yes
3	16E7	7493		yes	yes					yes	yes



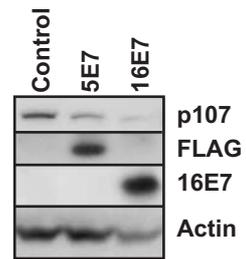
A)



B)



C)



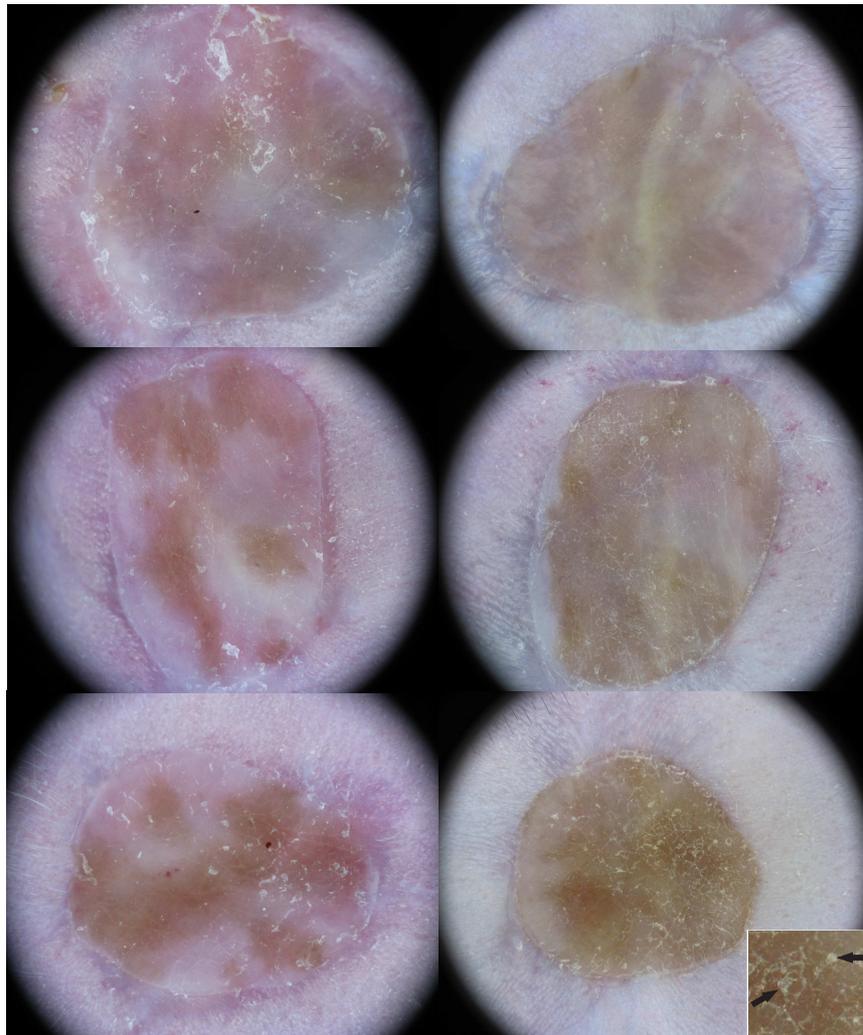
2 months

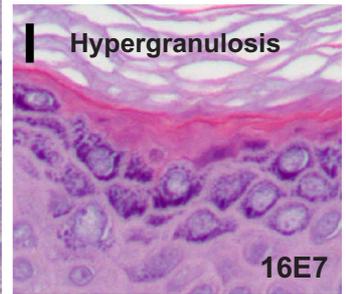
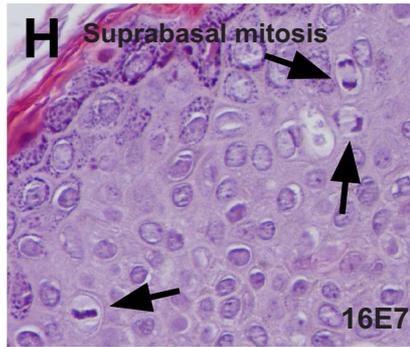
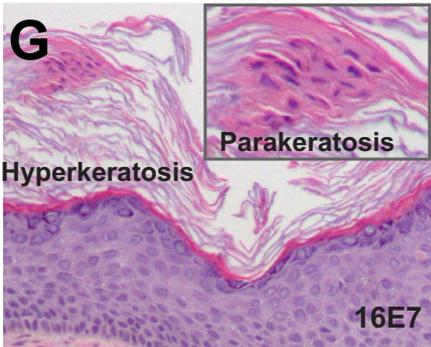
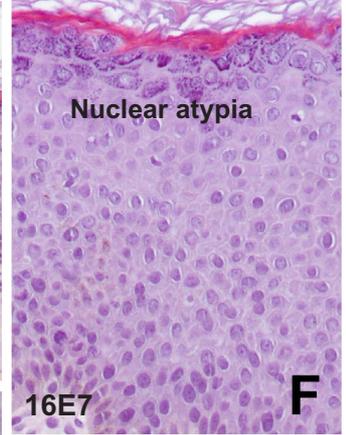
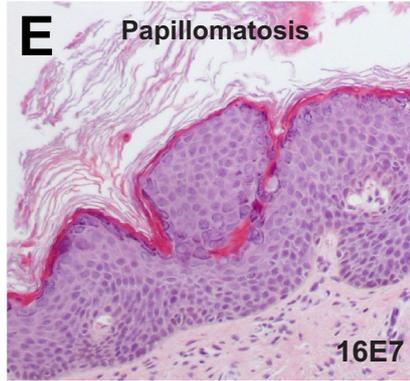
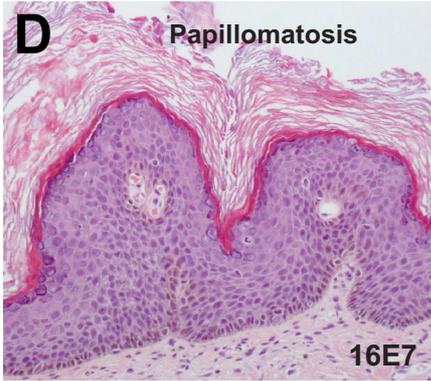
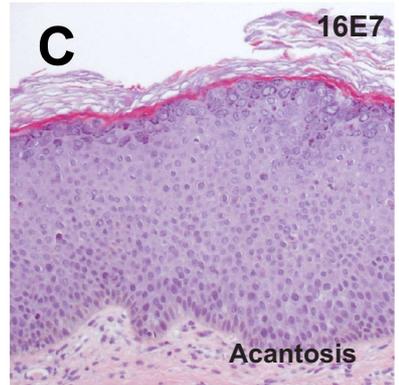
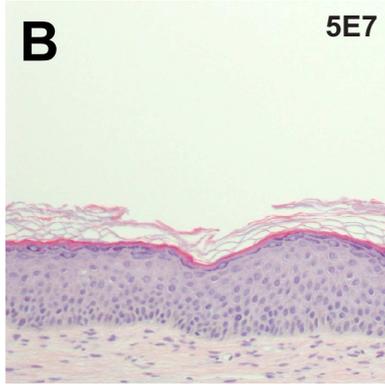
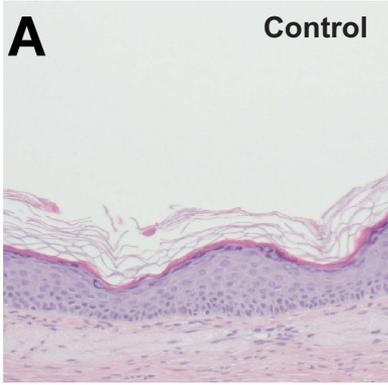
6 months

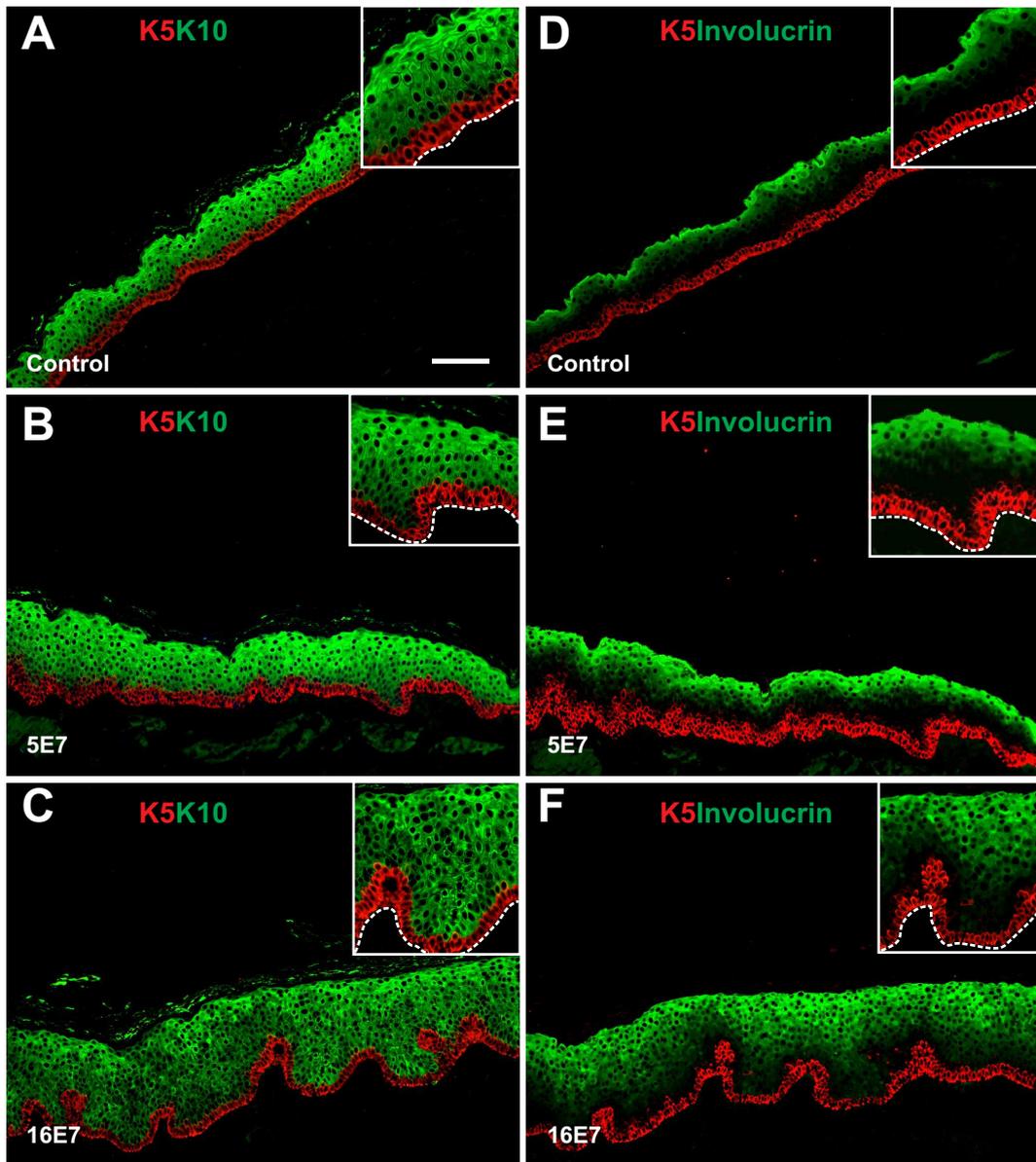
Control

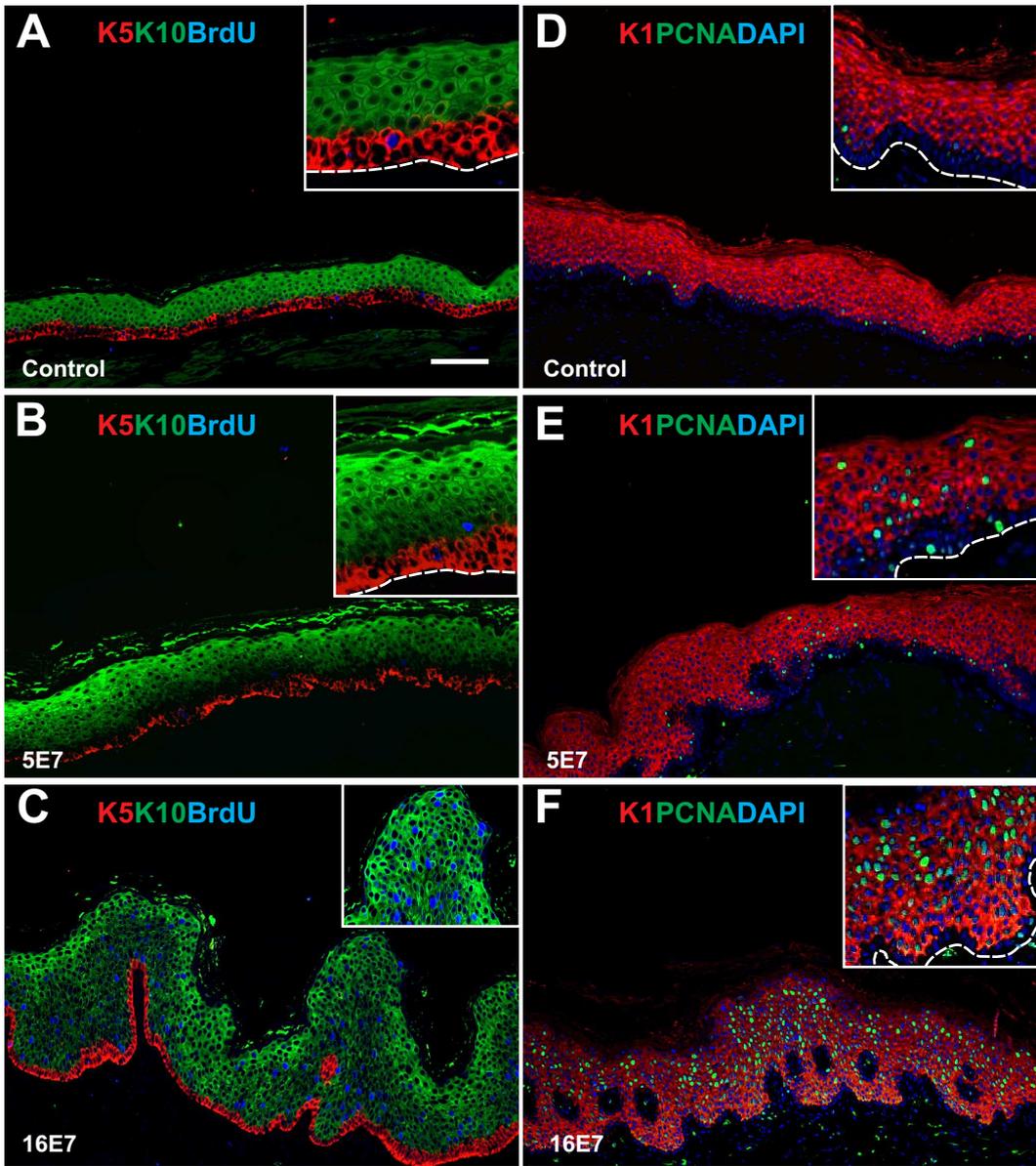
5E7

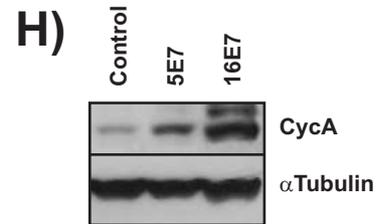
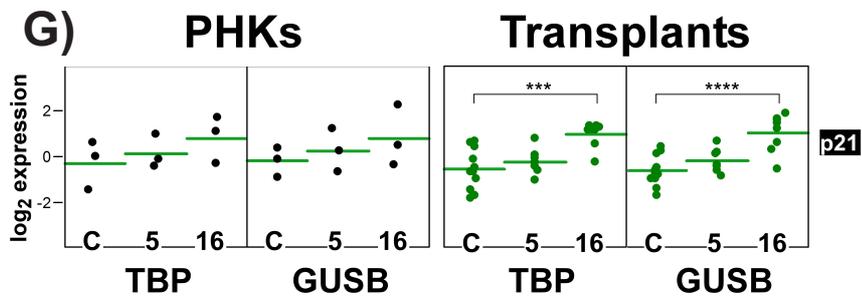
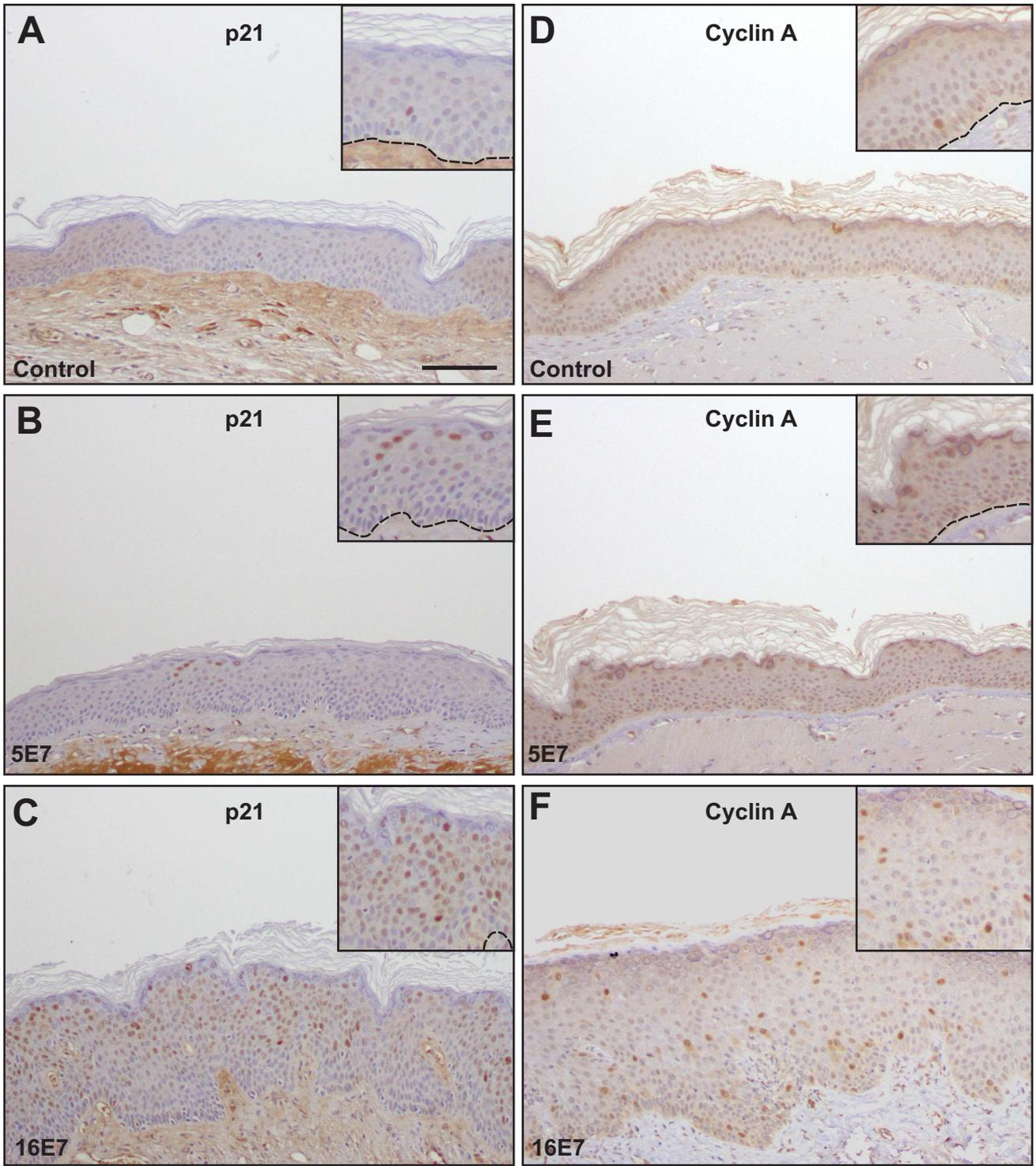
16E7

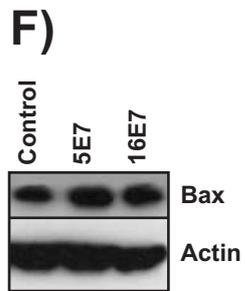
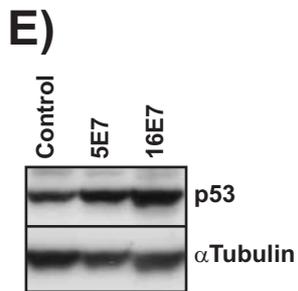
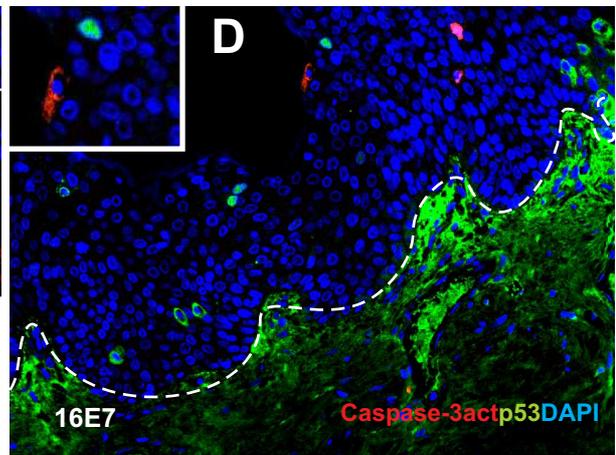
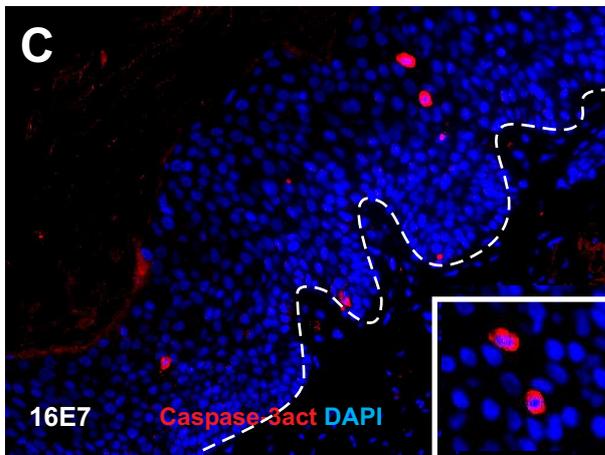
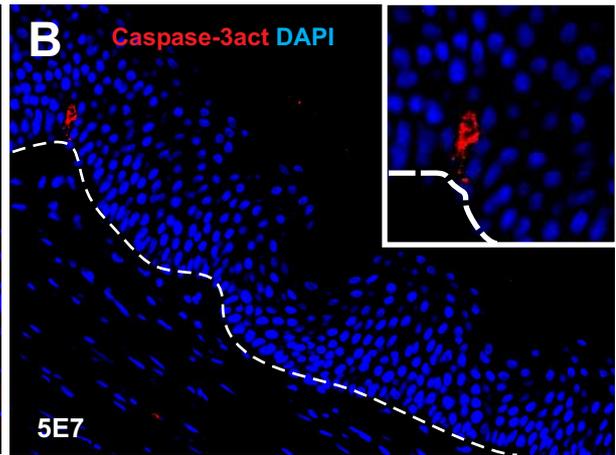
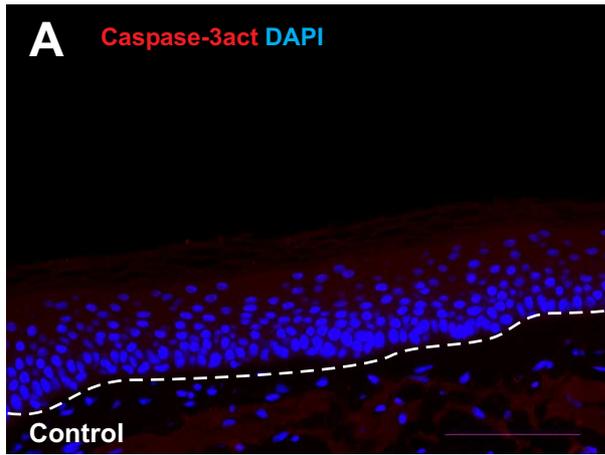


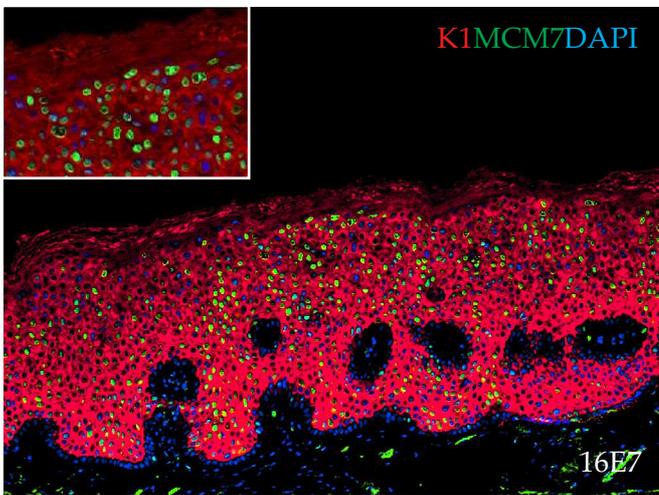
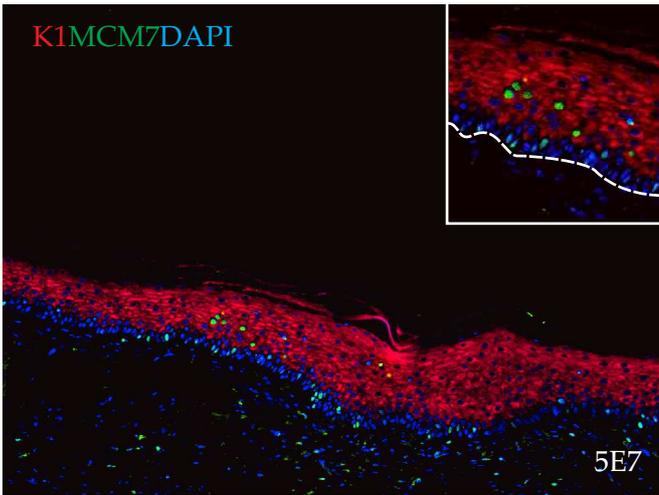
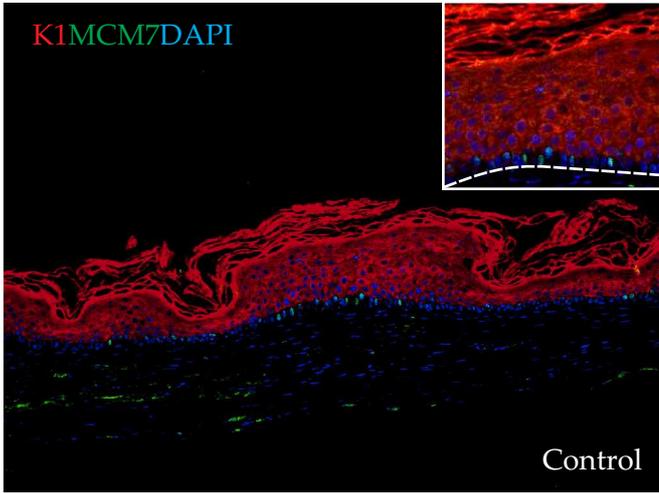






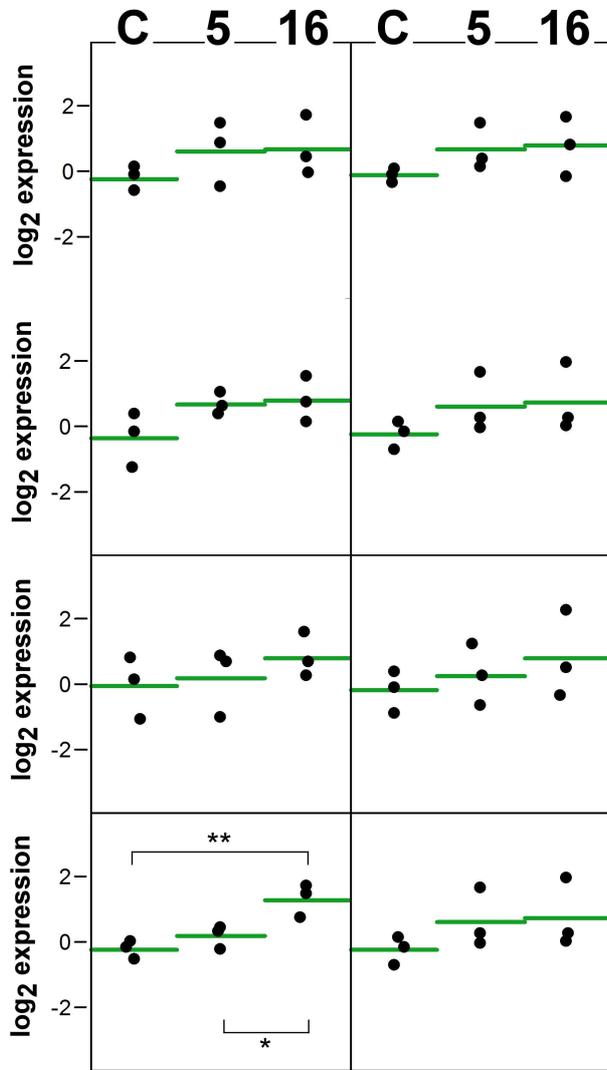






AQUI FALTA INMUNO  
p16

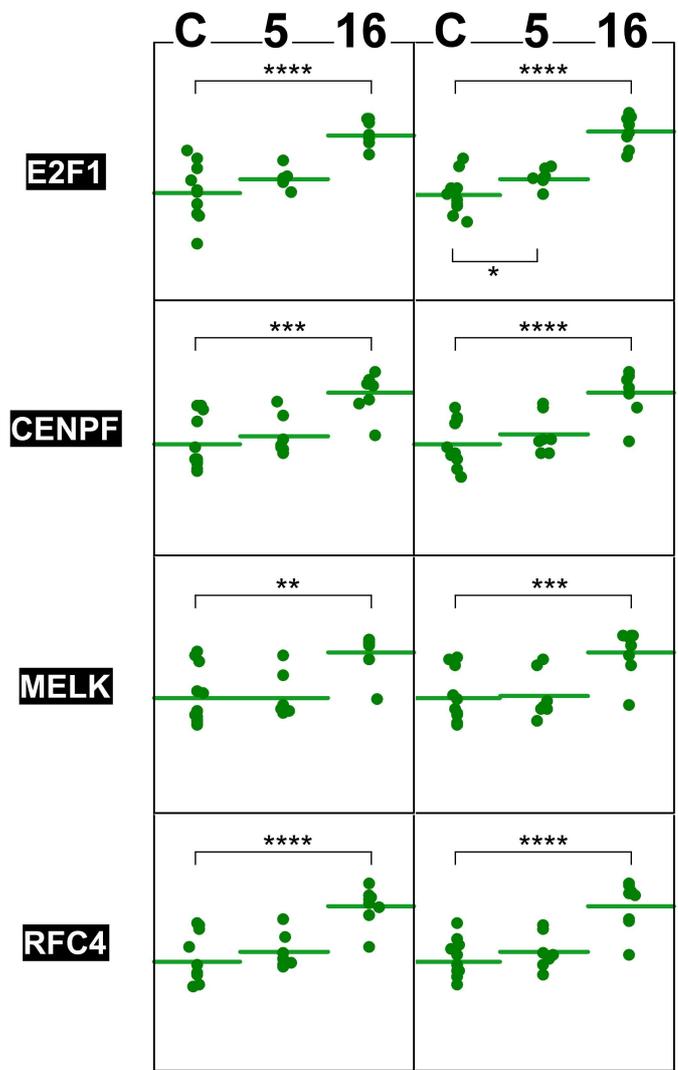
## PHKs



TBP

GUSB

## Transplants



E2F1

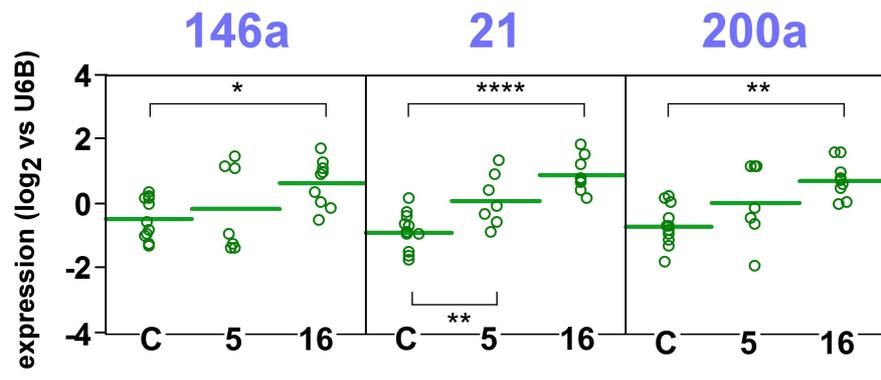
CENPF

MELK

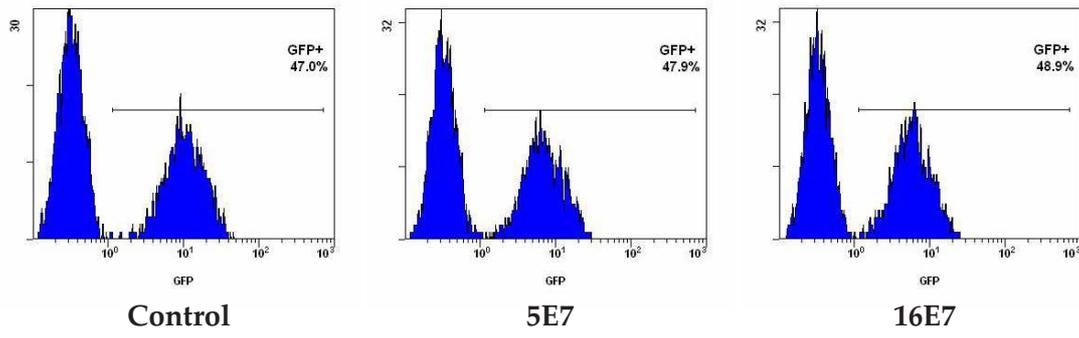
RFC4

TBP

GUSB



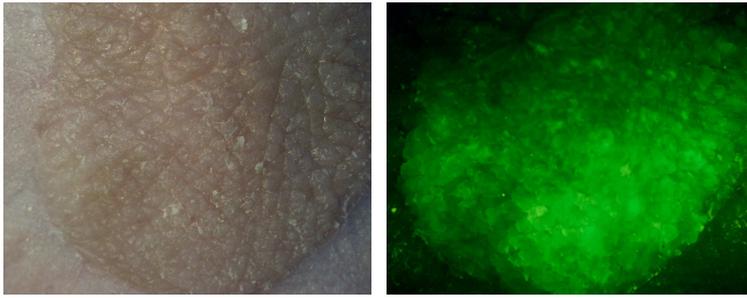
**A)**



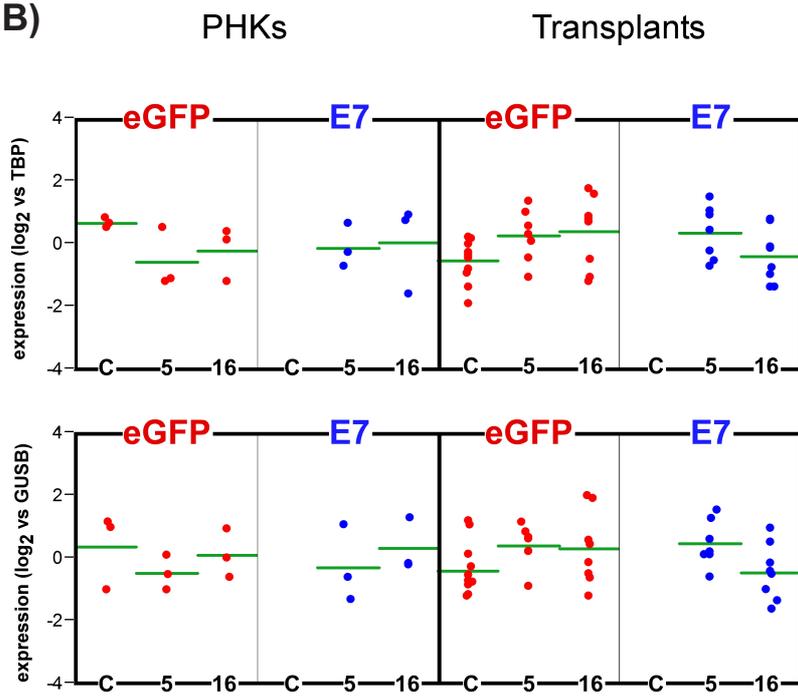
**B)**

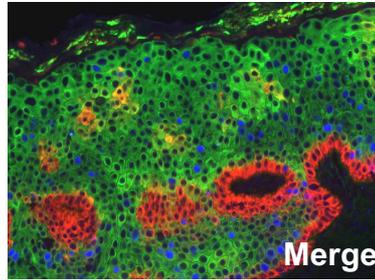
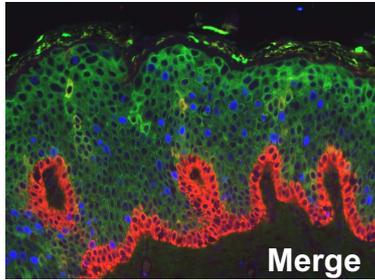
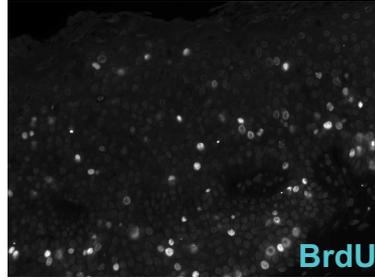
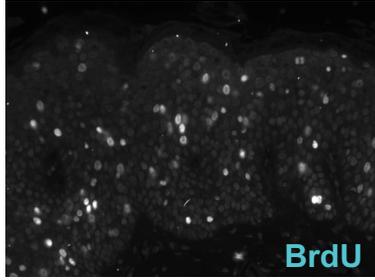
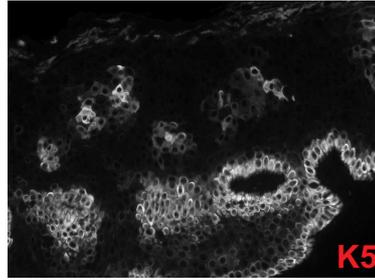
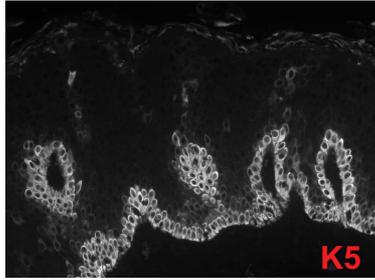
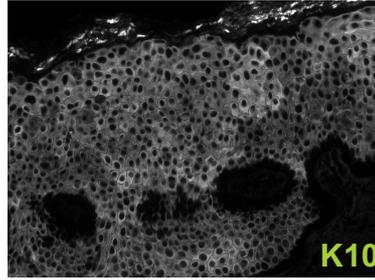
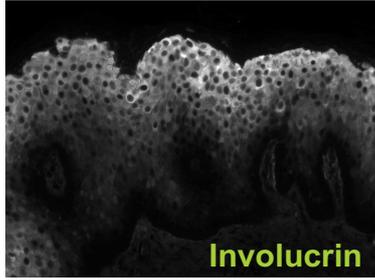
Infection Set	Control	5E7	16E7
1	44%	41%	24%
2	47%	48%	49%
3	63%	51%	47%

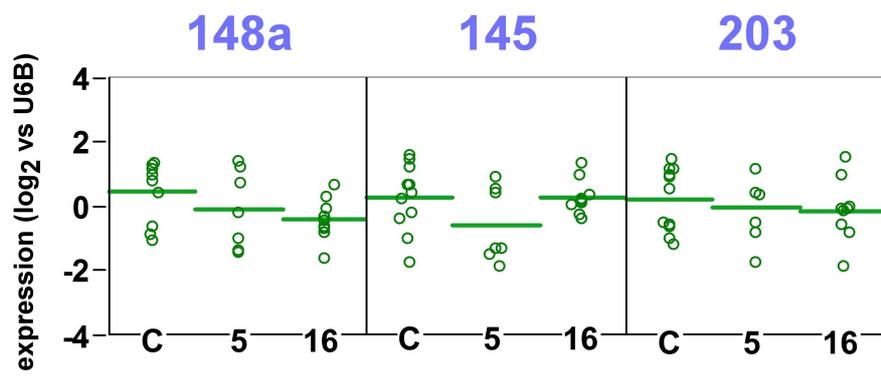
A)



B)







**Supplementary Table 1.** Oligonucleotides used

Used for	Name	Sequence
Cloning FLAG in pcDNA3.1(-)	FLAG.Eco-f	AATTCGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAAC
	FLAG.Eco-r	AATTGTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCG
Cloning E7s by PCR in pcDNA3.1(-)-FLAG	HPV10-f	GCGCGCGGCCGCAATGCACGGTCCGCATCCC
	HPV10-r	GCGCGAATTCCACGCAGCGAGGACACAC
	HVP5-f	GCGCGAATTCATGATTGGTAAAGAGGTC
	HPV5*-r	GCGCGAATTCTGATCCGTCATGTTTGCAG
	HPV16-f	GCGCGAATTCATGCATGGAGATACACCT
	HPV16-r	GCGCGAATTCTGTTTCTGAGAACAGAT
Obtention of E7 mutants	mut5E7-f	GAAGAGGAATTACCAACGAGC
	mut5E7-r	AACTGGTAGCACTTCGGGCTGC
	mut16E7-f	TATGAGCAATTAATGACAGC
	mut16E7-r	AGTTGTCTCTGGTTGCAAATC
qRT-PCR	q5E7-f	TTGTCACGCCACAGAAT
	q5E7-r	AGCCGTCATGTTTGCAGTTT
	q16E7-f	GCTGGACAAGCAGAACCG
	q16E7-r	GCACAACCGAAGCGTAGA
	qCENPF-f	GAGTCCTCCAACCAACAGC
	qCENPF-r	TCCGCTGAGCAACTTTGAC
	qMELK-f	CAGGTGTCATTAGCCCTGAGA
	qMELK-r	CAAACACTTTGGCTCCCTTT
	qRFC4-f	TGTGTCAGGAAGTCGCTCAG
	qRFC4-r	GGGTGGTTTTCGACTCCTTC
	qRb1-f	TCTTCATGCAGAGACTGAAAACA
	qRb1-r	AGGTATTGGTGACAAGGTAGGG
	qRb1-f	TTGGCGAATCAGGACCATA
	qRb1-r	TGAGCCTGGCTGTTGTTAAT
	qRb2-f	ACTTCAGCAACAGTCCTTCAA
	qRb2-r	TCCAAAAGAATTCCCTCTTTTTAGT
	qGUSB-f	CCTGTGACCTTTGTGAGCAA
	qGUSB-r	AACAGATCACATCCACATACGG
	qTBP-f	AGTGAAGAACAGTCCAGACTG
	qTBP-r	CCAGGAAATAACTCTGGCTCAT
	qeGFP-f	GGAGCGCACGATCTTCTTCA
	qeGFP-r	AGGGTGTGCGCCCTCGAA
	qCDKN1A-f	CCTCATCCCGTGTCTCCTTT
	qCDKN1A-r	GTACCACCCAGCGGACAAGT
	qCCNB2-f	GAAGATTGGGAGAACCCTCA
	qCCNB2-r	TGTGGGTTTATGGACTGCAA

\* Primer introduces a silent mutation to remove a BamHI site within the 5E7 gene

**Supplementary Table 2. Antibodies used**

<b>Used for</b>	<b>Antigen</b>	<b>Provider</b>	<b>Dilution</b>	<b>Unmasking</b>
Immunostaining	BrdU (BMC 9318)	Roche	1:50	No
	BrdU [BU1/75 (ICR1)]	Abcam	1:50	No
	Active Caspase 3 (Asp175)	Cell Signaling	1:1000	No
	Cyclin A (Ab-7)	Thermo Scientific	1:500	Yes
	eGFP	Invitrogen	1:200	No
	Involucrine (SY5)	Sigma	1:500	No
	cytokeratin 1	Sigma	1:500	Yes
	cytokeratin 5 (AF138)	Covance	1:500	Yes
	cytokeratin 10 (DE-K10)	DakoCytomation	1:250	No
	MCM7/CDC47 (47DC141)	Thermo Scientific	1:50	Yes
	p16 (F-12)	Santa Cruz	1:200	No
	p21 (SXM30)	DB Pharmingen	1:20	No
	PCNA (PC10)	Thermo Scientific	1:250	Yes
Western	Actin (I-19)	Santa Cruz	1:2000	
	Bax (P-19)	Santa Cruz	1:200	
	Cyclin A (Ab-7)	Thermo Scientific	1:100	
	FLAG	Sigma	1:500	
	eGFP (B-2)	Santa Cruz	1:200	
	HA (16B12)	Covance	1:500	
	HPV16 E7 (NM2)	Santa Cruz	1:500	
	p107 (C-18)	Santa Cruz	1:500	
	p53 (FL-393)	Santa Cruz	1:500	
	pRb (G3-245)	DB Pharmingen	1:500	
$\alpha$ -Tubulin (B-5-1-2)	Sigma	1:2500		

**Supplementary Table 1.** Oligonucleotides used

Used for	Name	Sequence
Cloning FLAG in pcDNA3.1(-)	FLAG.Eco-f	AATTCGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAAC
	FLAG.Eco-r	AATTGTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCG
Cloning E7s by PCR in pcDNA3.1(-)-FLAG	HPV10-f	GCGCGCGCCGCAATGCACGGTCCGCATCCC
	HPV10-r	GCGCGAATTCACGCAGCGAGGACACAC
	HVP5-f	GCGCGAATTCATGATTGGTAAAGAGGTC
	HPV5*-r	GCGCGAATTCGATCCGTCATGTTTGCAG
	HPV16-f	GCGCGAATTCATGCATGGAGATACACCT
	HPV16-r	GCGCGAATTCGGTTTCTGAGAACAGAT
qRT-PCR	q5E7-f	TTGTCCACGCCACAGAAT
	q5E7-r	AGCCGTCATGTTTGCAGTTT
	q16E7-f	GCTGGACAAGCAGAACCG
	q16E7-r	GCACAACCGAAGCGTAGA
	qCENPF-f	GAGTCTCCAACCAACAGC
	qCENPF-r	TCCGCTGAGCAACTTTGAC
	qMELK-f	CAGGTGTCATTAGCCCTGAGA
	qMELK-r	CAAACACTTTGGCTCCCTTT
	qRFC4-f	TGTGTCAGGAAGTCGCTCAG
	qRFC4-r	GGGTGGTTTTCGACTCCTTC
	qRb1-f	TCTTCATGCAGAGACTGAAAACA
	qRb1-r	AGGTATTGGTGACAAGGTAGGG
	qRbl1-f	TTGGCGAATCAGGACCATA
	qRbl1-r	TGAGCCTGGCTGTTGTTTAAAT
	qRbl2-f	ACTTCAGCAACAGTCCCTTCAAA
	qRbl2-r	TCCAAAAGAATTCCTCTCTTTTTAGT
	qGUSB-f	CCTGTGACCTTTGTGAGCAA
	qGUSB-r	AACAGATCACATCCACATACGG
	qTBP-f	AGTGAAGAACAGTCCAGACTG
	qTBP-r	CCAGGAAATAACTCTGGCTCAT
	qeGFP-f	GGAGCGCACGATCTTCTTCA
	qeGFP-r	AGGGTGTGCGCCCTCGAA
	qCDKN1A-f	CCTCATCCCGTGTTCCTTT
	qCDKN1A-r	GTACCACCCAGCGGACAAGT
	qCCNB2-f	GAAGATTGGGAGAACCCTCA
	qCCNB2-r	TGTGGGTTTATGGACTGCAA

\* Primer introduces a silent mutation to remove a BamHI site within the 5E7 gene

**Supplementary Table 2. Antibodies used**

<b>Used for</b>	<b>Antigen</b>	<b>Provider</b>	<b>Dilution</b>	<b>Unmasking</b>
Immunostaining	BrdU (BMC 9318)	Roche	1:50	No
	BrdU [BU1/75 (ICR1)]	Abcam	1:50	No
	Active Caspase 3 (Asp175)	Cell Signaling	1:1000	No
	Cyclin A (Ab-7)	Thermo Scientific	1:500	Yes
	eGFP	Invitrogen	1:200	No
	Involucrine (SY5)	Sigma	1:500	No
	cytokeratin 1	Sigma	1:500	Yes
	cytokeratin 5 (AF138)	Covance	1:500	Yes
	cytokeratin 10 (DE-K10)	DakoCytomation	1:250	No
	MCM7/CDC47 (47DC141)	Thermo Scientific	1:50	Yes
	p21 (SXM30)	DB Pharmingen	1:20	No
	PCNA (PC10)	Thermo Scientific	1:250	Yes
Western	Actin (I-19)	Santa Cruz	1:2000	
	Bax (P-19)	Santa Cruz	1:200	
	Cyclin A (Ab-7)	Thermo Scientific	1:100	
	FLAG	Sigma	1:500	
	eGFP (B-2)	Santa Cruz	1:200	
	HA (16B12)	Covance	1:500	
	HPV16 E7 (NM2)	Santa Cruz	1:500	
	p107 (C-18)	Santa Cruz	1:500	
	p53 (FL-393)	Santa Cruz	1:500	
	pRb (G3-245)	DB Pharmingen	1:500	
a-Tubulin (B-5-1-2)	Sigma	1:2500		