

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Implicación de CYLD en la homeostasis y tumorigénesis de piel y en el envejecimiento

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Josefa Pilar Alameda Ubeda-Contreras

Directora

María de los Llanos Casanova Hernández

Madrid, 2018



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Químicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

Tesis doctoral

Implicación de CYLD en la homeostasis y tumorigénesis de piel y en el envejecimiento

Josefa Pilar Alameda Úbeda-Contreras

Directora de tesis: M^a de los Llanos Casanova

CIEMAT

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Químicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

TESIS DOCTORAL

***Implicación de CYLD en la homeostasis y tumorigénesis de piel
y en el envejecimiento***

Josefa Pilar Alameda Úbeda-Contreras

Madrid 2017

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Químicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

TESIS DOCTORAL

***Implicación de CYLD en la homeostasis y tumorigénesis de piel
y en el envejecimiento***

Memoria presentada por Josefa Pilar Alameda Úbeda-Contreras para optar al grado de Doctora por la Universidad Complutense 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), bajo la dirección de la Doctora M^a de los Llanos Casanova Hernández.

Dr. M^a de los Llanos Casanova Hernández

Josefa Pilar Alameda Úbeda-Contreras
Madrid 2017

A la gran familia AUC

Agradecimientos

Siempre preguntan... ¿A quién dedicas esta tesis? Pues...a todos aquellos que de alguna manera han estado a mi vera.

En primer lugar, agradecer el esfuerzo, la paciencia y la constancia a mi directora de tesis, Llanos Casanova. Gracias por la confianza y tranquilidad transmitida en este tiempo, a nivel personal como profesional, sin ello no hubiera sido posible este trabajo.

A Jesús Paramio, gracias por esas charlas un tanto curiosas y sorprendentes para los demás. Y por supuesto agradecida por hacer posible esta continuidad.

A todos los miembros de la Unidad de Oncología Molecular: Corina, Angus, Carmen, Mirentxu, Ramón, Ángel, Manuel, Marta, Sole y Pilar. Gracias por vuestro apoyo y ayuda a lo largo de estos años. De una manera u otra, cada uno de vosotros me habéis enseñado algo. A lo más pequeños, ¿qué os puedo decir? No desistáis, es solo una época en la que quieres lanzar a la gente por la ventana, pero en esos momentos debéis respirar y contar hasta tres, parece que no, pero...la idea termina desapareciendo.

Por supuesto, debo agradecer a aquellas personas (TFM, FP y prácticas) que han estado en el laboratorio y me han ayudado en aquellos momentos en los que mis manos eran solo dos y no había tiempo que perder.

Chicas epitélicas, gracias por vuestra colaboración y consejos en el laboratorio. Y que nunca falten las risas para alegrarnos el día y hacer posible que el día a día sea más ameno.

Los Otros (Hematopoyesis), sois muchos pero cada uno de vosotros (con más o menos relación) me habéis ayudado a comprender y entender este trabajo.

A todos aquellos que habéis pertenecido a mi mundo, escuchando y leyendo mis palabras, gracias por permanecer a mi lado.

Para las nuevas generaciones os transmito una frase de la más grande del laboratorio "si esto sale bien, yo no digo nada".

Miembr@s de esta nuestra Comunidad, es difícil describir en pocas palabras todo lo que habéis aportado en mi paso por el laboratorio en estos años, pero me comprometo a agradecer de manera personal los motivos por los que habéis conseguido que nunca pierda la sonrisa. Sabéis de primera mano mi carácter (lo raspa que soy) y aunque no os lo puedo cantar os lo puedo escribir *“no vine aquí para hacer amigos pero sabes que siempre puedes contar conmigo”*.

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	5
Summary.....	9
Introducción.....	13
1. La piel: características generales.....	15
1.1 Proliferación, diferenciación epidérmica y polaridad epitelial.....	16
1.2 Anejos de la piel: folículos pilosos y glándulas sebáceas y sudoríparas.....	19
1.2.1 El folículo piloso.....	19
1.2.2 Glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas.....	21
2. Cáncer de piel no melanoma.....	22
3. El factor de transcripción NF-κB.....	30
3.1 NF-κB en el desarrollo tumoral.....	32
3.2 NF-κB en el desarrollo y progresión de los SCC cutáneos.....	33
4. Gen <i>Cyld</i> (Cilindromatosis).....	34
5. CYLD: Supresor tumoral de los tumores de los anejos de la piel.....	35
6. Mecanismos a través de los que actúa CYLD.....	36
6.1 CYLD regula negativamente la vía de señalización NF-κB.....	36
6.2 CYLD regula negativamente la vía de JNK y otras vías de señalización.....	36
7. Regulación de CYLD y funciones fisiológicas conocidas de CYLD	37
7.1 Regulación de CYLD.....	37
7.2 Funciones de CYLD.....	38
8. Función supresora tumoral de CYLD en otros tipos tumorales.....	39
9. Función de CYLD en el cáncer de piel no melanoma.....	42
9.1 CYLD en carcinoma de células basales (BCCs).....	42
9.2 CYLD en carcinoma de células escamosas (cSCC).....	42
10. Envejecimiento.....	43
10.1 Factores que influyen en el envejecimiento.....	44
10.2 Papel de los supresores tumorales en el envejecimiento.....	45
10.3 Papel de NF-κB en el envejecimiento.....	48
10.4 Activación de NF-κB, inflamación y envejecimiento.....	49
10.5 Otras vías relacionadas con el envejecimiento.....	50
10.6 NF-κB como biomarcador del envejecimiento.....	51
Objetivos.....	53
Artículo 1.....	57

Resumen artículo 1.....	59
Artículo1: “An inactivating CYLD mutation promotes skin tumor progression by conferring enhanced proliferative, survival and angiogenic properties to epidermal cancer cells”.....	63
Artículo 2.....	75
Resumen artículo 2.....	77
Artículo 2: “CYLD regulates keratinocyte differentiation and skin cancer progression in humans”.....	81
Artículo 3.....	93
Resumen artículo 3.....	95
Artículo 3: “Functional inactivation of CYLD promotes the metastatic potential of tumor epidermal cells”.....	99
Datos inéditos.....	115
• Materiales y métodos.....	117
1. Construcción utilizada.....	117
2. Generación de ratones transgénicos.....	117
3. Animales de experimentación.....	117
4. Análisis genotípico de los ratones.....	118
5. Ensayo del ciclo del pelo.....	118
6. Análisis histológico e inmunohistoquímico.....	119
7. Extracción de proteínas.....	119
8. Análisis por <i>Western blot</i>	120
9. Inmunoprecipitación.....	121
10. Detección de BrdU.....	121
11. Estimulación <i>in vivo</i> de ratones con TNF α	121
• Datos inéditos.....	123
1. Generación de ratones transgénicos, K5-CYLD ^{C/S} , que expresan una forma mutada de CYLD, catalíticamente inactiva.....	123
2. CYLD controla el ciclo de crecimiento del folículo piloso.....	124
3. Los ratones K5-CYLD ^{C/S} presentan un envejecimiento prematuro de la piel.....	127
4. Aumento de la proliferación de las glándulas sebáceas y diferenciación epidérmica impedida en los ratones K5-CYLD ^{C/S}	131
5. Los ratones viejos K5-CYLD ^{C/S} desarrollan tumores en diferentes órganos piel de los ratones K5-CYLD ^{C/S} muestra una activación crónica de las vías NF- κ B, JNK, c-Myc y Akt implicadas en el	

envejecimiento.....	132
6. Los ratones K5-CYLD ^{C/S} muestran un envejecimiento prematuro del timo y el bazo.....	135
7. Los ratones K5-CYLD ^{C/S} presentan inflamación y envejecimiento prematuro en otros órganos.....	139
8. Los ratones K5-CYLD ^{C/S} desarrollan tumores en distintos órganos...	141
Discusión.....	145
1. Función de CYLD en la fisiología cutánea.....	147
2. CYLD como supresor del desarrollo y la progresión de los carcinomas escamosos cutáneos.....	150
3. CYLD como supresor tumoral de la metástasis de los carcinomas escamosos cutáneos.....	154
4. CYLD protege del envejecimiento.....	156
Conclusiones.....	165
Bibliografía.....	169

Abreviaturas

AJs	Uniones adherentes (adherens junctions)
AK	Queratosis actínica (<i>actinic keratosis</i>)
Akt	Serina-treonina quinasa
AP-1	Proteína activadora 1 (<i>activator protein 1</i>)
ATM	Ataxia telangiectasia mutado (<i>Ataxia-telangiectasia Mutated</i>)
BAFF	Factor activador de células B (<i>B cell activating factor</i>)
BCC	Carcinoma de células basales (<i>basal cell carcinoma</i>)
Bcl-3	Linfoma de células B (<i>B-cell lymphoma 3</i>)
BCR	Receptor de células B (<i>B cell receptor</i>)
BMP	proteínas morfogénicas del hueso (<i>bone morphogenetic protein</i>)
BrdU	Bromo-deuxiuridina
BSS	Síndrome Brooke-Spiegler
CAP-Gly	Proteína rica en glicina asociada a citoesqueleto (<i>cytoskeleton-associated protein glycine-rich</i>)
Cdk	Quinasa dependiente de ciclina (<i>cyclin dependent kinase</i>)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CF	Cilindromatosis familiar
CIS	cSCC <i>in situ</i>
CPNM	Cáncer de piel no melanoma
cSCC	Carcinoma escamoso cutáneo (<i>cutaneous squamous cell carcinoma</i>)
CSK	Quinasa de Src (<i>C-terminal Src kinase</i>)
Cyc	Ciclina (<i>cyclin</i>)
CYLD	Cilindromatosis
DAB	Diaminobencidina
DMBA	7,12-dimetilbenz(a)antraceno
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
DUB	Desubiquitinasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor)
EGTA	Ácido etilenglicol bis (β -amino etil éter) tetraacético
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (fibroblast growth factors)
FOXO	Factores de transcripción de la familia <i>forkhead</i> (<i>forkhead box, subgroup O</i>)
FP	Folículo piloso

GAPDH	Gliceroaldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
GS	Glándula sebácea
HA	Hemaglutinina A
HCC	Células de hepatocarcinoma
HDAC	Histonas deacetilasas
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
HSC	Células estrelladas hepáticas
IGF	factor de crecimiento de la insulina (<i>insulin-like growth factor</i>)
IKK	Quinasa de I κ B α (<i>IκB kinase</i>)
IL	Interleuquina
INHQ	Inmunohistoquímica
I κ B	Inhibidor de NF- κ B (<i>inhibitor of NF-κB</i>)
JNK	Quinasa del factor Jun (<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>)
K48/63	Ubiquitinación en lisina 48/63
Lamna	Laminina A
LCK	proteína tirosina quinasa específica de leucocitos (<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>)
LPS	Lipopolisacáridos (<i>Lipopolysaccharide</i>)
LT- β	Linfotoxina- β
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
Mdm2	<i>Murine doble minute 2</i>
MFT	Tricoepitelioma múltiple familiar
miR	microRNA
MMP2/9	Metaloproteasas
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero (messenger ribonucleic acid)
mTOR	Diana en mamíferos de la rapamicina (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NBCC	Síndrome de carcinoma nevoide de células basales
NF- κ B	Factor nuclear κ B (<i>nuclear factor κB</i>)
PAMPs	Moléculas asociadas a patógenos (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PTCH	<i>Patched</i>

PTEN	Fosfatasa homóloga de la tensina delecionada del cromosoma 10 (<i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i>)
RANKL	Ligando receptor del factor NF- κ B(<i>receptor activator for nuclear Factor κB ligand</i>)
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
RTKs	Receptores tirosina quinasa
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia (<i>senescence-associated secretory phenotype</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
Sirt	Sirtuinas (<i>sirtuin</i>)
Sma	Actina del músculo liso (<i>smooth muscle actin</i>)
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SRF	Factor de respuesta a suero
TCR	Receptor de células T (<i>T cell receptor</i>)
TE	Tris-EDTA
TEM	Transición epitelio-mesénquima
NBCC	Síndrome de carcinoma nevoide de células basales
TGF	Factor de crecimiento tumoral (<i>tumor growth factor</i>)
TLR	Receptor tipo <i>Toll</i> (<i>toll-like receptor</i>)
TNFR	Receptor de TNF- α (<i>TNFα receptor</i>)
TNF α	Factor de necrosis tumoral α (<i>tumoral necrosis factor α</i>)
TPA	Tetradecanoil-forbol-acetato
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF- α (<i>TNFα receptor associated factor</i>)
USP	Proteasa específica de ubiquitina (<i>ubiquitin-specific protease</i>)
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VRE	Vaina radicular externa
VRI	Vaina radicular interna
WB	<i>Western Blot</i>
WT	Silvestre (<i>Wild Type</i>)
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>

Resumen

El gen *Cyld* fue identificado como un gen supresor tumoral mutado en la cilindromatosis familiar, enfermedad autosómica dominante que origina el desarrollo de tumores derivados de anejos de la piel (cilindromas). La proteína CYLD es una enzima que tiene en su extremo C-terminal un dominio catalítico con función desubiquitinasa que elimina las cadenas de poliubiquitina en residuos de lisina-63 (la ubiquitinación en este residuo está asociada a diversos procesos biológicos). Es en el dominio C-terminal de CYLD donde se han encontrado en pacientes de cilindromatosis familiar la mayoría de las mutaciones, que dan lugar a una proteína catalíticamente inactiva. CYLD regula negativamente la activación de diferentes vías, entre ellas la de los factores de transcripción NF- κ B, JNK y p38MAPK.

CYLD se expresa de forma ubicua prácticamente en todos los tipos celulares. Sin embargo, su inactivación en pacientes solo origina el desarrollo de tumores de los anejos de la piel, lo que sugiere que su función principal es mantener la homeostasis cutánea. Hasta ahora no se han realizado estudios encaminados a conocer cuál es el papel de CYLD en la piel y éste es uno de nuestros objetivos principales en este trabajo. Además, queremos analizar si CYLD puede actuar también como supresor tumoral de los carcinomas escamosos cutáneos (cSCC), que son el tipo de cáncer de piel no melanoma (CPNM) más agresivo, encontrándose entre un 5 y un 15% de cSCC que metastatizan. Para estos cSCC metastásicos no se ha encontrado un tratamiento eficaz, y la supervivencia es muy baja, por lo que debido a la incidencia tan elevada del CPNM (es el cáncer humano más común), la mortalidad concomitante a los cSCC alcanza cifras muy elevadas. Para conseguir terapias efectivas en el tratamiento de los cSCC más agresivos es necesario encontrar biomarcadores de malignidad y nuevas dianas terapéuticas, por lo que resulta imprescindible caracterizar los mecanismos moleculares encargados de mantener la homeostasis de la piel y de originar el desarrollo y progresión de los cSCC.

La función principal de la piel es la de actuar como barrera contra diferentes tipos de agresiones externas. Está formada por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis; contiene además estructuras especializadas como son los folículos pilosos y las glándulas sebáceas y sudoríparas. La epidermis es la capa más externa y es un epitelio escamoso, estratificado y queratinizado, cuyo componente celular principal son los queratinocitos. Para ser funcional, la epidermis debe conservar un equilibrio entre la proliferación y la diferenciación celular, así como mantener su polaridad. Las

alteraciones en la homeostasis celular y en la respuesta a agresiones conducen a patologías inflamatorias y tumorales, todas ellas de gran importancia clínica.

El objetivo principal de esta tesis es definir el papel que ejerce CYLD en la fisiología de la piel y en el desarrollo y metástasis de los cSCC.

Para la realización de este trabajo se ha generado una construcción que contiene un cDNA de CYLD que porta la mutación puntual C/S en el aminoácido 601 del dominio desubiquitinasa (que asemeja a las que presentan los pacientes de cilindromatosis hereditaria), lo que da lugar a la expresión de una proteína catalíticamente inactiva, CYLD^{C/S}, que actúa como dominante negativo inhibiendo la actividad catalítica de CYLD endógeno. Se ha utilizado además otra construcción que porta un cDNA de CYLD silvestre (CYLD^{wt}). Como modelo de estudio se han empleado queratinocitos tumorales y no tumorales y equivalentes de piel (transfectados con las construcciones CYLD^{C/S} y CYLD^{wt}). También se han generado ratones transgénicos que expresan la forma mutada CYLD^{C/S} bajo los elementos reguladores del gen de la queratina K5 (ratones K5-CYLD^{C/S}). Estos animales expresan el transgén en diversos tipos celulares (en células de la piel, timo pulmón, estómago, etc.). Nuestros resultados muestran que CYLD desempeña una función esencial en la homeostasis epidérmica, ya que regula la diferenciación de los queratinocitos, su polaridad y su muerte por apoptosis. Hemos encontrado que CYLD favorece la diferenciación epidérmica por inhibir la vía de JNK, y promueve la apoptosis de los queratinocitos por inducir la expresión de proteínas pro-apoptóticas. Por el contrario, la inactivación catalítica de CYLD provoca la pérdida de polaridad de los queratinocitos (por deslocalización de Cadherina E y de β -catenina) y les confiere un fenotipo invasivo. El análisis de los ratones K5-CYLD^{C/S} ha permitido además conocer que CYLD desempeña un papel esencial en la regulación de la homeostasis de los anejos de la piel (folículos pilosos y glándulas sebáceas).

Los estudios de carcinogénesis y de metástasis han mostrado que CYLD actúa como supresor del desarrollo y la progresión maligna de los cSCC, de modo que la sobreexpresión de CYLD^{wt} transforma cSCC humanos de elevada agresividad en quistes benignos (por inducción de la diferenciación, apoptosis e inhibición de la angiogénesis tumoral). Por el contrario, la ausencia de la actividad desubiquitinasa de CYLD aumenta la malignidad tumoral de los cSCC (por activación en los queratinocitos de NF- κ B y JNK; inducir la expresión nuclear de Bcl-3, β -catenina y p52; incrementar la angiogénesis; inhibir la apoptosis y aumentar la proliferación). Además, CYLD actúa como inhibidor de metástasis de los cSCC por regular positivamente la expresión del supresor tumoral y de metástasis Maspin y por reprimir Snail. En línea con estos resultados, proponemos que los niveles bajos de expresión de CYLD y de

Maspin en los cSCC pueden ser biomarcadores de los cSCC de alto riesgo de metastatizar.

Hemos descubierto que CYLD, al igual que otros genes supresores tumorales, actúa también como protector del envejecimiento, y proponemos que éste es un mecanismo importante por el que CYLD ejerce su función como supresor tumoral, ya que la falta de CYLD funcional en los ratones K5-CYLD^{C/S} origina de forma espontánea el desarrollo de diversos tipos de tumores. Estos ratones muestran además signos de envejecimiento prematuro en distintos órganos (piel, bazo, timo, hígado, etc.). Entre los mecanismos responsables del envejecimiento precoz de los ratones K5-CYLD^{C/S} se encuentra la activación crónica de la vía de NF-κB (siendo considerada esta vía la principal causante del envejecimiento fisiológico y patológico), la sobreactivación de c-Myc, JNK y Akt, y la inducción de las citoquinas inflamatorias TNF-α e IL-6.

Summary

The *Cyld* gene was identified as a mutated tumor suppressor gene in familial cylindromatosis, an autosomal dominant disease that causes the development of tumors derived from skin appendages (cylindromas). The CYLD protein is an enzyme containing a C-terminal catalytic domain with a deubiquitinase function, eliminating the polyubiquitin chains in lysine-63 residues (the ubiquitination in this residue is associated to diverse biological processes). In patients with familial cylindromatosis, most of the mutations have been found in the C-terminal domain of CYLD, which results in a catalytically inactive protein. CYLD negatively regulates the activation of different pathways, including those of the NF- κ B transcription factor, JNK and p38MAPK.

CYLD is ubiquitously expressed in almost all cell types. However, its inactivation in patients causes the development of tumors derived from skin appendages, suggesting that its main function is to maintain cutaneous homeostasis. To date, there have not been studies aimed to study the role that CYLD develops in the skin, which is one of our main objectives in this work. In addition, our purpose is to analyze whether CYLD can also act as a tumor suppressor for cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC), as this is the most aggressive type of non-melanoma skin cancer (NMSC). cSCC exhibit a metastasis rate of 5 to 15%. It has not been found any effective treatment for these metastatic cSCCs, and patient survival rate is very low. As a result of the high incidence of NMSC (the most common human cancer), the concomitant mortality associated to cSCC reaches very high levels. To achieve effective therapies in the treatment of the cSCCs with highest risk of metastasis, it is necessary to find biomarkers of malignancy as well as new therapeutic targets. Therefore, the characterization of the molecular mechanisms responsible for maintaining the skin homeostasis is needed; it is also necessary to identify the mechanisms causing the development and progression of cSCC.

The skin is composed of three layers: epidermis, dermis and hypodermis; it provides a barrier against different types of external aggressions. The skin also contains specialized structures, such as the hair follicles and sebaceous and sweat glands. The epidermis is the outermost layer and is composed of stratified layers of keratinocytes. To be functional, the epidermis must maintain a balance between cell proliferation and differentiation, as well as to preserve its cellular polarity. Alterations in both cellular homeostasis and response to aggressions lead to inflammatory and tumor pathologies.

Our main objective is to define the role of CYLD in the skin physiology and in the development and metastasis of cSCC.

In order to carry out this work, a construct containing a CYLD cDNA carrying the C/S point mutation at amino acid 601 of the deubiquitinase domain (which resembles those of hereditary cylindromatosis patients) has been generated, resulting in the expression of a catalytically inactive protein, CYLD^{C/S}, which acts in a dominant negative protein, inhibiting the catalytic activity of endogenous CYLD. In addition, a construct carrying a wild CYLD cDNA (CYLD^{wt}) has been used. Tumor and non-tumor keratinocytes, as well as skin equivalents (transfected with the CYLD^{C/S} and CYLD^{wt} constructs) were used as models of study. Also, we generated transgenic mice expressing the mutated CYLD^{C/S} under the regulatory elements of the K5 keratin gene (K5-CYLD^{C/S} mice). These animals express the transgene in various cell types (in cells of the skin, thymus lung, stomach, etc). Our results show that CYLD plays an essential role in the maintenance of epidermal homeostasis, as it regulates the differentiation of keratinocytes, their polarity and their apoptosis. We found that CYLD favors epidermal differentiation by inhibiting the JNK pathway; it also promotes apoptosis through the induction of pro-apoptotic proteins. In contrast, the catalytic inactivation of CYLD causes the loss of polarity of keratinocytes (by the delocalization of E-cadherin and β -catenin proteins); it also confers them an invasive phenotype. The analysis of the K5-CYLD^{C/S} mice has also revealed that CYLD plays an essential role as regulator of the homeostasis of the skin appendages (hair follicles and sebaceous glands).

The carcinogenesis and metastasis assays have shown that CYLD acts as a suppressor of the development and malignant progression of cSCC, so the overexpression of CYLD^{wt} transforms highly aggressive human cSCC into benign cysts (through different mechanisms, such as the induction of differentiation, apoptosis and inhibition of angiogenesis). In contrast, the absence of CYLD deubiquitinase activity increases tumor malignancy of cSCC as a result of hiperactivation of NF- κ B and JNK signaling pathways in keratinocytes; it also induces nuclear expression of Bcl- 3, β -catenin and p52; expression of the CYLD^{C/S} mutant also increases tumor angiogenesis, and inhibits both the apoptosis and the proliferation rates). In addition, CYLD acts as an inhibitor of cSCC metastasis by both the positive regulation of Maspin and the inhibition of Snail expression. Maspin is a well-recognized suppressor of metastasis while Snail is a pro-oncogenic protein. In line with these results, we propose that low levels of expression of both CYLD and Maspin may be biomarkers of cSCCs with a high risk of metastasis.

We have found that CYLD, like other tumor suppressor genes, also acts as a protector of aging. We propose that this is an important mechanism through which

CYLD exerts its function as a tumor suppressor (the lack of functional CYLD in K5-CYLD^{C/S} mice leads to a spontaneous development of various types of tumors). Transgenic mice also show signs of premature aging in many organs (skin, spleen, thymus, liver, etc). Among the mechanisms responsible for the premature aging of K5-CYLD^{C/S} mice, we found the chronic activation of the NF- κ B pathway (which is considered the driver of both physiological and pathological aging), the hyperactivation of c-Myc, JNK and Akt signaling pathways and the induction of inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. La piel: Características generales

La piel es la cubierta externa del cuerpo humano y uno de los órganos más importantes tanto por su tamaño como por sus funciones. Actúa como barrera protectora que aísla al organismo del medio que lo rodea, protegiéndolo y contribuyendo a mantener íntegras sus estructuras, al tiempo que actúa como sistema de comunicación con el entorno. La piel funciona como barrera contra agresiones mecánicas, químicas, térmicas, radiaciones ultravioleta y microorganismos patógenos. Además, es esencial para el mantenimiento del equilibrio de fluidos corporales impidiendo la posible pérdida de agua. La piel es un órgano bien compartimentalizado, formado por la epidermis (capa más externa), la dermis subyacente y la hipodermis.

La dermis es un tejido que actúa de soporte y proporciona resistencia y elasticidad a la piel; está formada básicamente por tejido conectivo fibroelástico, con una matriz extracelular que contiene fibras de colágeno, elastina y reticulina; en ella se encuentra además fibroblastos, monocitos, macrófagos, vasos sanguíneos, por lo que constituye un tejido vascularizado que sirve de soporte y alimento a la epidermis. Contiene estructuras especializadas de origen ectodérmico, como son los folículos pilosos y las glándulas sebáceas y sudoríparas.

La epidermis es un epitelio escamoso estratificado y queratinizado en constante renovación. Se encuentra constituido por diferentes poblaciones celulares: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel, siendo el queratinocito el más abundante. Los melanocitos son responsables de la pigmentación de la piel, mientras que las células de Langerhans son un tipo de células dendríticas originadas en la médula ósea que cumplen funciones inmunológicas. Por último, las células de Merkel, localizadas en el estrato basal, tienen una función de carácter sensorial. Como resultado de un complejo proceso de proliferación y diferenciación los queratinocitos se organizan en cuatro estratos (Figura 1).

- El estrato basal contiene las células con capacidad proliferativa de la epidermis, responsables de la renovación continua de los queratinocitos epidérmicos.

- El estrato espinoso presenta complejos de adhesión intercelular denominados desmosomas que contribuyen a la integridad y a la función barrera de la epidermis. Las células de este estrato normalmente ya no se dividen, aunque no han perdido completamente su capacidad proliferativa. También se expresan algunas proteínas de la envuelta celular como la involucrina.

- El estrato granuloso se caracteriza por la presencia de gránulos intracelulares de queratohialina formados por proteínas como la profilagrina y gránulos lamelares que le confieren su aspecto característico; el contenido lipídico de estos gránulos es liberado al espacio intercelular, contribuyendo a la función protectora de la epidermis. Otras proteínas como la loricrina y la filagrina también se expresan en este estrato.

- El estrato córneo representa el estado final del proceso de diferenciación de los queratinocitos. Está formado por escamas (que corresponden a células enucleadas y sin orgánulos, los corneocitos) suspendidas en una matriz lipídica, constituyendo una estructura impermeable e insoluble responsable de la función protectora de la epidermis. El proceso de descamación implica la degradación de los lípidos de los espacios intercelulares y la pérdida de las interconexiones desmosomales residuales¹.

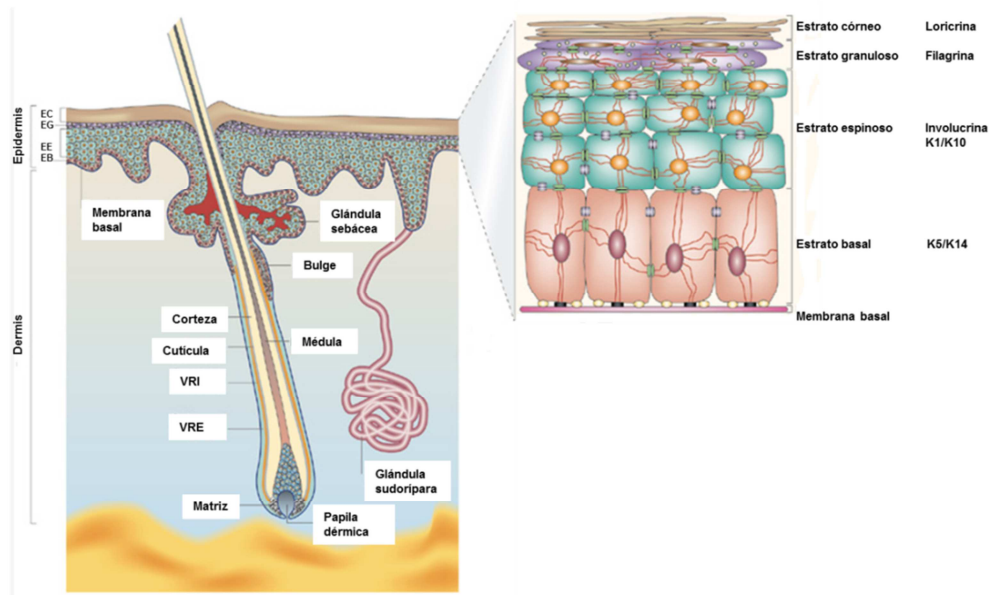


Figura 1. La piel y sus apéndices. Esquema de la piel y de estructuras anejas (folículos pilosos, glándulas sebáceas). Se muestran a más aumentos los estratos que forman la epidermis (córneo, granuloso, espinoso y basal), así como las queratinas y los marcadores de diferenciación que se expresan en cada uno de ellos. Imagen modificada de Fuchs 2002.

1.1 Proliferación, diferenciación epidérmica y polaridad epitelial

La epidermis es un epitelio estratificado cuya capa basal está unida a una lámina basal rica en factores de crecimiento y a la matriz extracelular. Los queratinocitos basales tienen capacidad mitótica, a medida que se diferencian ascienden a capas superiores hasta convertirse en escamas aplanadas y muertas que se desprenden.

El proceso de diferenciación epidérmica está acompañado de la expresión secuencial de diferentes proteínas tanto enzimáticas como estructurales que pueden usarse como marcadores de diferenciación del queratinocito. Los filamentos

intermedios que conforman el citoesqueleto de las células epiteliales (epidérmicas y no epidérmicas) están formados por las queratinas, familia de proteínas con más de veinte miembros, que se expresan en pares característicos y que presentan especificidad tisular y celular en su expresión^{2,3}. Así, en la epidermis, las células del estrato basal expresan las queratinas 5 y 14 (K5 y K14). Sin embargo, en estratos superiores estas proteínas son reemplazadas por las queratinas 1 y 10 (K1 y K10), características por tanto de células suprabasales. La transglutaminasa, loricrina y filagrina son marcadores característicos de diferenciación epidérmica terminal⁴⁻⁶ (Figura 1). La epidermis debe mantener un equilibrio entre la proliferación celular y la pérdida de células por diferenciación terminal y descamación. Las alteraciones en la homeostasis celular y en la respuesta a agresiones llevan a patologías tales como neoplasias cutáneas y enfermedades inflamatorias de la piel, de gran relevancia clínica. Una vía que se ha descrito que desempeña un papel relevante en la diferenciación epidérmica es la vía de JNK. Experimentos *in vitro* e *in vivo* muestran que la activación de JNK inhibe la diferenciación de los queratinocitos^{7,8}.

Durante la morfogénesis epidérmica, las uniones intercelulares y a la matriz extracelular son cruciales para el establecimiento del epitelio y el control de los cambios dinámicos que ocurren en el proceso de diferenciación, así como en el mantenimiento de la homeostasis y polaridad tisular⁹. La adhesión célula-célula se produce principalmente a través de tres tipos de uniones: uniones adherentes (AJs) (Figura 2), uniones estrechas y desmosomas¹⁰⁻¹², constituyendo los llamados complejos de unión intercelular. Los complejos contienen receptores transmembrana, por lo general glicoproteínas que median la unión a la superficie extracelular y determinan la especificidad de la respuesta intracelular¹¹. Además, las proteínas citoplasmáticas asociadas a los receptores median la conexión con el citoesqueleto y establecen líneas moleculares de comunicación con otras uniones célula-célula. La conexión entre estas uniones y el citoesqueleto permite a un epitelio funcionar como un tejido perfectamente coordinado¹¹. Las cadherinas constituyen una familia de proteínas transmembrana de adhesión intercelular dependientes de calcio e implicadas en el establecimiento de uniones adherentes^{13,14}. Cadherina E es el miembro más representativo en epitelios y se ha demostrado que es una proteína esencial para la diferenciación epidérmica. La pérdida de expresión de Cadherina E impide en las células madre embrionarias la agregación celular, lo que resulta en la muerte temprana del embrión¹⁵. Además, diferentes estudios de delección específica de Cadherina E en epitelios estratificados demuestran que es esencial tanto en el desarrollo epidérmico y en la diferenciación terminal de los queratinocitos, como durante la morfogénesis folicular¹⁶⁻¹⁹. Cadherina E tiene un papel muy relevante en los

procesos neoplásicos; se ha observado que la disminución o pérdida de expresión de Cadherina E está relacionada con la progresión y metástasis de ciertos tipos de tumores, incluidos tumores de piel^{20,21}. Recíprocamente, el restablecimiento de la expresión de Cadherina E en líneas celulares tumorales de origen epitelial tiene como consecuencia la reversión de un fenotipo invasivo a otro benigno²². Esto indica que Cadherina E se comporta como un gen supresor del fenotipo tumoral invasivo. A este respecto, se ha establecido que la invasión de células tumorales está asociada con la pérdida de expresión de genes epiteliales, como Cadherina E, y la ganancia de expresión de genes mesenquimales^{23,24}, mediante un proceso equivalente a la transición epitelio-mesénquima (TEM) que ocurre durante el desarrollo embrionario. Diversos experimentos indican que el silenciamiento de la expresión de Cadherina E puede implicar cambios genéticos y epigenéticos²⁵. Se ha descrito que la expresión de Cadherina E es reprimida por diferentes factores de transcripción, entre ellos Snail, E47, ZEB-1 y ZEB-2^{23,24,26-28}.

Las uniones adherentes conectan la membrana celular con los microfilamentos de actina. Para ello, el dominio intracelular de Cadherina E se une a β -catenina, que a su vez se une a α -catenina. Esta interacción media el acoplamiento del citoesqueleto intracelular de actina con las células adyacentes¹⁴. β -catenina, dependiendo de su localización intracelular, puede desempeñar una función tanto en adhesión como en señalización intracelular, concretamente de la vía de Wnt/Lef²⁹. En ratones *knockout* se ha descrito que la pérdida de β -catenina tiene consecuencias sobre la morfogénesis folicular, la diferenciación terminal de los queratinocitos y el balance entre proliferación y muerte celular³⁰. La estabilización de β -catenina tiene un papel clave en la señalización de la epidermis que conduce al desarrollo del pelo, y su activación aberrante puede originar la formación de tumores derivados del pelo³⁰.

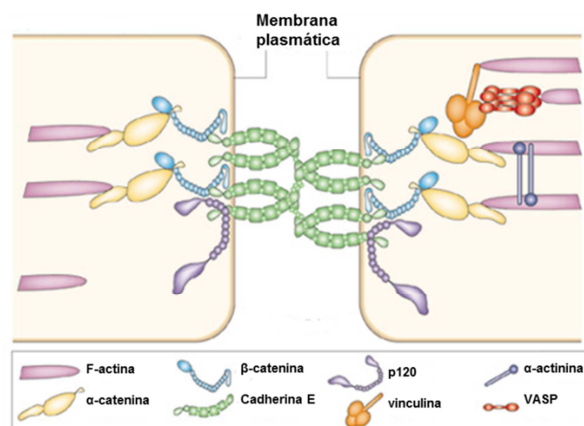


Figura 2. Esquema representativo de las uniones adherentes, así como de las proteínas que las forman. Imagen modificada de Fuchs 2002.

El mantenimiento de los contactos célula-célula y la polaridad celular es un requisito esencial para la funcionalidad y la homeostasis de los tejidos epiteliales. Esta organización del tejido se pierde durante la progresión tumoral y es particularmente evidente en la fase de invasión, cuando las células tumorales adquieren un fenotipo de TEM.

1.2 Anejos de la piel: folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas

En mamíferos existen diversas estructuras (pelos, uñas, glándulas sudoríparas, sebáceas, mamas) que se desarrollan como apéndices del ectodermo embrionario. Todos estos apéndices son el resultado de complejas interacciones epitelio-mesénquima en las que intervienen diversas moléculas señalizadoras de las familias Shh, Wnt, BMPs y FGF^{31,32}.

1.2.1 El folículo piloso

El folículo piloso (FP) es el apéndice de la epidermis de los mamíferos que origina el pelo. En ratones, se inducen múltiples pelos en todo el cuerpo y se modelan para formar pestañas, vibras y el pelaje. Todos cumplen una amplia gama de funciones, como son: control de la temperatura corporal, protección física, transmisión de información sensorial y táctil, y como fin decorativo para las interacciones sociales. El folículo piloso está compuesto por componentes epidérmicos (epitelial) y dérmicos (mesenquimal), y la interacción entre los mismos juega un papel importante en su morfogénesis y crecimiento. El folículo piloso es una estructura cilíndrica compleja, que consiste en muchas capas concéntricas de células epiteliales. El compartimento más externo es la vaina radicular externa (VRE) que se extiende hacia la epidermis, donde la proliferación celular tiene lugar dentro de la capa de células basales, adyacente a la matriz extracelular. La diferenciación es progresiva desde la capa basal hacia adentro, hacia el eje central del pelo. La capa adyacente (interna) a la VRE es una capa simple de células pequeñas y aplanadas; a continuación hacia el interior está la vaina radicular interna (VRI). Clásicamente, la iniciación de la morfogénesis del folículo se describe en términos de una serie ordenada de interacciones epitelio-mesénquima. Durante el desarrollo embrionario del folículo piloso, las células mesenquimales de la dermis se agregan debajo de la epidermis formando agregados llamadas placodas y que marcan la localización del nuevo folículo piloso. Las placodas inducen a las células dérmicas subyacentes para la formación de la placoda dérmica que envía señales al compartimento epidérmico (células madre del folículo piloso, localizados en la parte superior) para estimular la proliferación y el crecimiento del pelo hacia abajo. La activación de la vía canónica Wnt/ β -catenina, en epidermis y dermis es

necesaria para inducir la formación de la placoda del pelo^{33,34}. Otro elemento importante del FP es el bulge, una protuberancia de la vaina VRE, próxima a la glándula sebácea, donde se localizan las células madre que dan origen tanto a la epidermis como a los FP y glándulas sebáceas^{35,36}.

A lo largo de la vida, el folículo piloso sufre una serie de cambios cíclicos que guardan similitud con el proceso de su morfogénesis³⁷⁻³⁹. Como se representa en la Figura 3, cada ciclo se divide en tres etapas: 1) Anagén: fase activa o de crecimiento. El folículo crece y penetra en la capa grasa subdérmica. 2) Catagén: fase de regresión donde el folículo involuciona hacia la zona subepidérmica, quedando reducido hasta un tercio de su tamaño. 3) Telogén: fase de quiescencia del folículo. En el ratón, no se observan folículos anagénicos maduros hasta varios días después del nacimiento; todos los FP ciclan de forma sincronizada durante los dos primeros ciclos, perdiéndose la sincronización en ciclos posteriores³⁸.

En el ser humano hay numerosas patologías que cursan con alteraciones de los folículos pilosos, como son la alopecia, acné, forúnculos, hirsutismo o la enfermedad de Verneuil entre otros. Además, es importante destacar la implicación de los folículos pilosos en el desarrollo de tumores de piel, bien sean del propio folículo como los tricoepiteliomas, pilomatricomas o carcinomas triquilemales, u otros tipos tumorales de los que se ha propuesto que se originan a partir de los FP, tanto en humanos como en modelos animales⁴⁰.

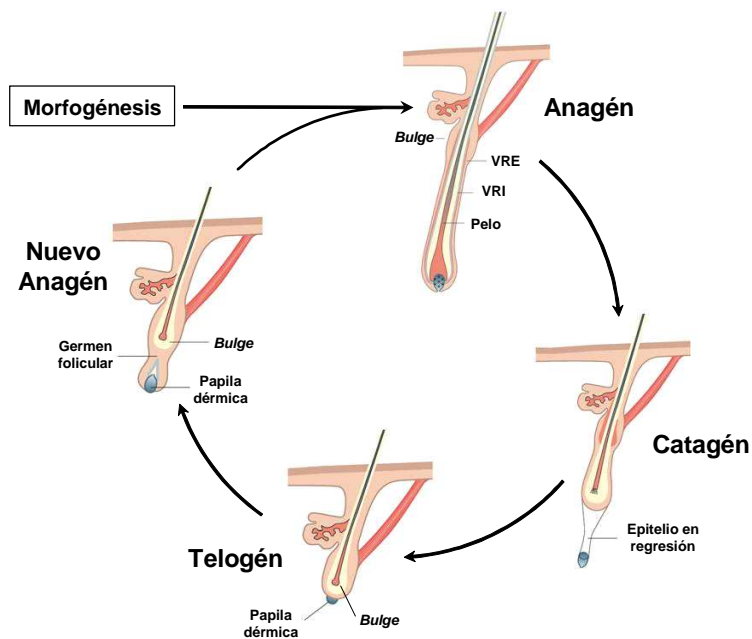


Figura 3. Etapas del ciclo del folículo piloso. Representación esquemática de las características morfológicas de las distintas fases del proceso de ciclaje. Adaptado Fuchs 2007.

1.2.2 Glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas

Las glándulas sudoríparas están localizadas exclusivamente en las almohadillas palmares y plantares vertiendo su contenido directamente a la superficie epidérmica; su función es la regulación de la temperatura corporal.

La piel de ratón contiene numerosas glándulas sebáceas asociadas a los folículos pilosos, con algunas excepciones, como son las glándulas de Meibomio y de Tyson, que son glándulas sebáceas modificadas⁴¹. En la periferia de las glándulas sebáceas se encuentra una capa de células basales que progresan hacia la parte media de la glándula y acumulan gotas de lípidos a medida que adquieren la diferenciación terminal. Los sebocitos totalmente diferenciados están llenos de lípidos y carecen de otros orgánulos celulares. En un estadio posterior se desorganiza la membrana y la célula se rompe eliminando su contenido al canal sebáceo. Las palmas de manos y de los pies, que no tiene FP están desprovistas de glándulas sebáceas. En los anejos oculares hay cinco tipos de glándulas sebáceas: glándulas de Zeiss, de Meibomio, de las cejas, de la carúncula y de los finos pelos de la piel del párpado. Las glándulas de Meibomio son las de mayor diferenciación histológica, tamaño y número de acinos; su función es secretar una sustancia aceitosa que evita la sequedad de los ojos.

En el ser humano, hay varias condiciones médicas que involucran el exceso de sebo por parte de las glándulas sebáceas, incluyendo acné, quistes sebáceos, hiperplasia y adenoma sebáceo. En la diferenciación de las glándulas sebáceas toman parte varias vías de señalización, destacando la vía de Wnt, la cual si está activa de manera aberrante origina glándulas sebáceas hiperplásicas. Además, hay otros factores de transcripción como son, Blimp1 y c-Myc, que regulan la proliferación y formación de las glándulas sebáceas. Se ha estudiado que en los ratones Blimp1^{-/-}, la expresión de c-Myc se encuentra incrementada, resultando en una hiperproliferación de la glándula sebácea. Estudios previos en los ratones transgénicos CYLD^{EΔ9/Δ9}, deficientes en la actividad catalítica de CYLD, mostraron que CYLD regulaba negativamente la expresión de c-Myc, de modo que la ausencia de la función DUB de CYLD favorece la expresión de c-Myc y el desarrollo de glándulas sebáceas hiperplásicas en estos ratones (Figura 4)⁴².

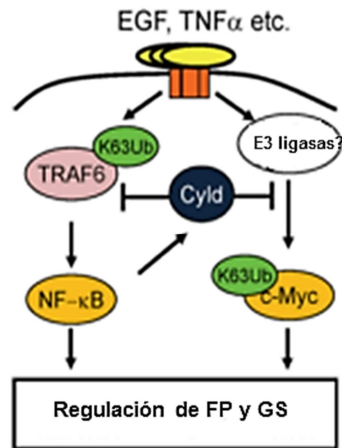


Figura 4. CYLD en la regulación del desarrollo del folículo piloso y de la glándula sebácea. CYLD regula negativamente la activación de NF- κ B y de c-Myc en estos apéndices de la piel por medio de su función desubiquitinasa. Imagen modificada de Jin 2016.

2. Cáncer de piel no melanoma

Como se ha comentado, las alteraciones en la homeostasis de la piel pueden conducir al desarrollo de enfermedades cutáneas y al cáncer de piel no melanoma. El CPNM es el cáncer más común y su incidencia ha aumentado notoriamente en todo el mundo, siendo en Estados Unidos de Norteamérica (USA) y Australia el cáncer más frecuente de todos los diagnosticados⁴³, y en Europa occidental su incidencia es aproximadamente igual a la de cáncer de pulmón o de mama⁴⁴, siendo Reino Unido el país europeo en el que más casos de CPNM se diagnostican. Se ha comprobado que la incidencia del CPNM se dobla cada 15-20 años, por lo que se ha convertido en un importante problema de salud. Se acepta universalmente que la exposición a la radiación solar es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de cáncer cutáneo, especialmente el CPNM, y que la radiación ultravioleta (UV) presente en la radiación solar es el principal factor etiopatogénico, siendo la exposición exagerada al sol más importante para el desarrollo del CPNM que la disminución de la capa de ozono^{45,46}. El envejecimiento de la población también contribuye al aumento del CPNM, ya que éste afecta principalmente a adultos mayores de 60 años (el 80% de los CPNM diagnosticados); aunque lo que es más preocupante es que ha aumentado su incidencia en personas menores de 35 años (principalmente por la exposición recreacional al sol)⁴⁷. Estos datos muestran la importancia de conocer las vías moleculares que conducen al desarrollo del CPNM, lo que resultará en una mejora en el diagnóstico, prevención y tratamiento de estos tumores.

El CPNM comprende dos formas principales: los carcinomas basocelulares (BCCs, del inglés *Basal Cell Carcinoma*) y los carcinomas de células escamosas (cSCC, del inglés *Cutaneous Squamous Cell Carcinoma*). Ambos tipos de tumores constituyen el 90% del CPNM.

Los BCCs son los tumores cutáneos más frecuentes (representan el 80% de los cánceres de piel diagnosticados), y la forma más común de cáncer en humanos. Además de la luz UV, otros factores de riesgo que se han asociado al desarrollo de BCCs son radiación ionizante, sustancias químicas (arsénico, psoralenos) e inmunosupresión. Los BCCs raramente metastatizan (<0,1%) aunque pueden ser altamente invasivos localmente y pueden causar daños tisulares masivos; se caracterizan por la falta de inestabilidad cromosómica, siendo en este sentido unos carcinomas inusuales. Los BCCs se pueden desarrollar de forma esporádica, o en síndromes como el de Gorlin (o síndrome de carcinoma nevoide de células basales, NBCC), trastorno autosómico dominante caracterizado entre otras manifestaciones, por el desarrollo de múltiples BCCs; también se forman BCCs en pacientes del síndrome hereditario raro *xeroderma pigmentosum* (XP) de carácter autosómico recesivo, caracterizado por defectos en los mecanismos de reparación del DNA por daño UV. El origen celular de los BCCs no está del todo claro, por una parte, se ha descrito que derivan de las células basales de la epidermis interfolicular (los queratinocitos basales y los BCCs comparten similitudes histológicas, como se refleja en su nombre), aunque también se ha propuesto que pueden tener su origen en células de la vaina radicular externa de los folículos pilosos y del bulge.

Los cSCC, constituyen el 20% de los cánceres de piel diagnosticados y son mucho más agresivos que los BCCs. Aunque la mayoría de los cSCC muestran un comportamiento benigno y pueden ser completamente erradicados mediante cirugía y otros procedimientos dermatológicos, lo que se traduce en una supervivencia global a 5 años tras resección del cSCC superior al 90%, y una tasa de mortalidad de aproximadamente el 1%; sin embargo, existen unos cSCC que muestran capacidad de desarrollar metástasis nodal y que presentan una elevada morbimortalidad. La frecuencia de metástasis de los cSCC está comprendida entre el 5% y 15%, por lo que debido a la incidencia tan elevada del CPNM, la mortalidad concomitante a este tipo de cáncer alcanza cifras muy elevadas. Se considera que se desarrollan a partir de las células madre epidérmicas asociadas a los folículos pilosos o de la capa basal de la epidermis, aunque también pueden formarse a partir de la VRE de los FP, como ocurre en el caso de los papilomas (tumores benignos). Mientras que la exposición intensa al sol en edades tempranas se ha relacionado con los BCCs, una exposición solar acumulada a lo largo de toda la vida ha sido asociada con un mayor riesgo de

desarrollar cSCC⁴⁸. Otros factores externos que favorecen el desarrollo de cSCC son las radiaciones ionizantes, ciertas sustancias químicas (hidrocarburos, tabaco, arsénico), infección del virus del papiloma humano y del herpes simple. La incidencia de cSCC es también alta en personas que reciben una terapia inmunosupresora y en pacientes de determinadas genodermatosis (XP, albinismo oculocutáneo, epidermolisis bulosa distrófica); pueden además desarrollarse en áreas de úlceras crónicas o cicatrices.

Como se ha comentado, el factor de riesgo más significativo para el desarrollo del CPNM es la radiación ultravioleta de la luz solar, específicamente la radiación UVB, que es la principal causa de daño del DNA, del fotoenvejecimiento y de la transformación maligna en la piel. La activación de la apoptosis tras la exposición a la radiación UV permite la eliminación de células dañadas irreversiblemente que pueden albergar mutaciones oncogénicas. Sin embargo, la radiación UV también activa cascadas de señalización que promueven la supervivencia de estas células potencialmente cancerosas, lo que puede dar lugar a la iniciación tumoral. Por lo tanto, la respuesta a la luz UV en la piel es multifacética y requiere la activación coordinada de numerosas vías que controlan la reparación de daño al DNA, la inflamación y la transducción de señal mediada por quinasas que conducen a la supervivencia o a la muerte celular.

En el descubrimiento de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del CPNM ha tenido una vital importancia la generación de modelos animales de ratón, ya que reflejan los mecanismos de la carcinogénesis humana en muchos aspectos⁴⁹.

En el caso de los BCCs, tanto esporádicos, como los que se desarrollan en pacientes de NBCC o de XP, está aceptado que se producen por la activación inapropiada de la vía de señalización de Sonic Hedgehog (Shh). Así, se han encontrado mutaciones muy frecuentes en los diferentes miembros de esta vía, especialmente en el gen supresor tumoral *PTCH1* (receptor de la glicoproteína Shh), que dan lugar a la pérdida de función de *PTCH1* y a la activación constitutiva e inapropiada de la vía de señalización de Shh. Como consecuencia de la activación aberrante de Shh, en los BCCs se encuentra consistentemente sobreexpresadas sus dianas *Gli1* y *Gli2*. En la caracterización de los mecanismos que dan lugar al desarrollo de los BCCs se han utilizado modelos de ratones transgénicos para diferentes miembros de la vía Shh, que han mostrado que la activación de la señalización Shh es suficiente para la formación de BCCs^{50,51}. Además de las mutaciones en los miembros de la vía Shh, aproximadamente en el 50% de los BCCs esporádicos, se han encontrado también mutaciones en el gen supresor tumoral *p53*, aunque existe controversia en cuanto a su significación, ya que hay datos que sugieren que estas

mutaciones son eventos secundarios que no contribuyen significativamente a la tumorigénesis de los BCCs, mientras que otros estudios sugieren que las mutaciones en *p53* en los BCCs son cruciales, aunque suponen un evento tardío de la progresión tumoral⁵².

Los cSCC se pueden desarrollar a través de estadios precancerosos histológicamente bien definidos como son la queratosis actínica (AK, del inglés "actinic keratosis) y los cSCC *in situ* (CIS). Ambas lesiones cutáneas, AK y CIS representan etapas pretumorales y preinvasivas, pudiendo progresar a cSCC invasivos, aunque no todas las AK progresan a cSCC, y también hay cSCC "de novo", es decir que no proceden de una lesión AK. El locus *p53* parece desempeñar un papel importante en la patogénesis del cSCC. *p53* participa en la inducción de apoptosis en las células epidérmicas después de daño al DNA inducido por radiación UV. Por lo tanto, la pérdida de *p53* proporciona una ventaja de supervivencia a los queratinocitos dañados por UV. *p53* se encuentra mutado en el 60-90% de los cSCC y AK. Las mutaciones puntuales en *p53* aparecen tempranamente, como lo demuestra el hecho de que se encuentran a menudo en casos de displasia epidérmica leve o moderada. La pérdida de heterocigosidad (LOH) del alelo funcional de *p53*, típica de los genes supresores tumorales en los cánceres suele ocurrir en etapas más tardías, asociada a la transición entre AK y CIS. La inactivación temprana de *p53* en los cSCC crea las condiciones perfectas para que aparezcan otras numerosas mutaciones, por lo que se considera que los cSCC son los tumores que tienen la tasa más alta de mutaciones. Resulta de interés, el que a pesar del alto porcentaje de cSCC que presentan mutaciones en *p53*, sin embargo, los individuos que sufren el Síndrome de Li-Fraumeni, debido a una mutación hereditaria de *p53* en la línea germinal, no presentan mayor riesgo de desarrollar cSCC, aunque de acuerdo con el papel de *p53* como el supresor tumoral más importante, estos pacientes sí son propensos a desarrollar una amplia variedad de neoplasias internas, como son sarcomas, cáncer de mama, tumores cerebrales y linfomas⁵³. Otras mutaciones caracterizadas en AK y cSCC son mutaciones en H-Ras y K-Ras inducidas por UV. Esto parece indicar que son necesarios otros eventos mutagénicos o la activación de otras vías para el desarrollo de los cSCC. La progresión de AK a cSCC se ha correlacionado también con la supresión de los genes supresores tumorales *p16INK4a/p14ARF*⁴⁸. Es posible que la inactivación de las vías de *INK4a/Rb* y *ARF/p53* cooperen en la promoción de los cSCC.

Entre las vías de señalización que son activadas en respuesta a la radiación UV se ha descrito la de la familia de proteínas PI3K quinasas (fosfatidilinositol 3 quinasa), específicamente ATM y ATR, que detienen el ciclo celular para permitir la reparación del DNA o, si el daño al DNA tras UV es excesivo, inducen la apoptosis celular. Ambas

proteínas aumentan la estabilidad de p53 y por tanto su actividad. De acuerdo con estas funciones, los ratones transgénicos con inhibición completa de ATR presentan mayor desarrollo tumoral^{54,55}.

Otras vías de señalización que son clásicamente activadas por la radiación UV son las vías inflamatorias, que tienen efectos beneficiosos, pero también pueden estimular la tumorigénesis⁵⁶. Hay estudios clínicos que demuestran que la inflamación está implicada en la progresión de AK a cSCC; además, en la periferia invasiva de las células tumorales en pacientes se observa consistentemente inflamación crónica⁵⁷. En concreto, la principal vía inflamatoria clave implicada en la inflamación inducida por UV es NF-κB. La vía NF-κB ha sido ampliamente estudiada y se ha descrito que es crucial en la mediación de la inflamación de la piel⁵⁸. La inducción de la vía canónica de NF-κB puede ocurrir por activación directa de la radiación UV o por la unión de citoquinas inducidas por UV a receptores de membrana plasmática. Los receptores comúnmente asociados con la activación de NF-κB en CPNM son los receptores tirosina quinasas (RTKs), los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR1) y los receptores Toll-like (TLRs). Una vez activado NF-κB, el heterodímero NF-κB (p65/p50) activo transloca al núcleo para promover la transcripción de los genes pro-inflamatorios, así como de los genes que conducen a la producción de citoquinas que regulan la respuesta inmune/inflamatoria (TNF-α, IL-1, IL-6 y IL-8)⁵⁹ (explicado en más detalle en el apartado 3). Se ha descrito que NF-κB se encuentra constitutivamente activado en cSCC humanos y murinos y como consecuencia de esta activación se observa la sobreexpresión de numerosos genes diana de NF-κB, incluyendo genes relacionados con el crecimiento, angiogénesis e inflamación (citoquinas inflamatorias) en los cSCC⁶⁰. Posteriormente se demostró que la inhibición de NF-κB por antagonistas farmacológicos o por la expresión de un dominante negativo de NF-κB (un mutante de IκBα (IκBαM), o IκBαM inducible), suprimía la supervivencia tumoral, la expresión de citoquinas, la migración, angiogénesis y la tumorigénesis de los cSCC humanos y murinos^{61,62}. Estudios más recientes realizados en ratones transgénicos han confirmado que la subunidad p65 de NF-κB es esencial para la carcinogénesis de la piel en ratones, ya que la pérdida de p65 previene tanto el desarrollo de cSCC como la promoción tumoral⁶³. Estas evidencias demuestran que NF-κB es un activador esencial del programa de expresión génica y del fenotipo maligno de los cSCC. Nuestro grupo ha comprobado además recientemente que la sobreexpresión de la proteína IKKα, activadora de NF-κB, actúa como promotor tumoral de los cSCC, promoviendo en queratinocitos humanos el desarrollo de una variedad de cSCC acantolíticos, que se asocian en pacientes a una malignidad elevada y a una alta capacidad metastásica⁶⁴; en ratones transgénicos IKKα inducía el desarrollo de una

piel hiperproliferativa, la inhibición de la expresión del supresor tumoral y de metástasis Maspin y la inducción de Twist (promotor de la transición epitelio-mesénquima), lo que condujo en experimentos de carcinogénesis química de piel al desarrollo de cSCC invasivos⁶⁵.

Junto a la respuesta inflamatoria, otro efecto de la radiación UV es provocar una respuesta angiogénica, estimulando la dilatación de los vasos sanguíneos para aumentar el suministro de sangre al lugar de la lesión, y una reestructuración microvascular que ayuda a las proteínas plasmáticas a entrar desde el torrente sanguíneo. Estas respuestas crean un microambiente que ayuda en la curación de heridas, sin embargo, este entorno también puede estimular la tumorigénesis. Uno de los factores angiogénicos más relevantes para el desarrollo de los cSCC es VEGF (factor de crecimiento de células endoteliales), cuya expresión es inducida, al menos en gran parte, por la activación de NF- κ B y de EGFR. Nuestro grupo demostró, mediante la generación de un modelo de ratones transgénicos que expresaban un dominante negativo del EGFR (dnEGFR) en los queratinocitos, que la señalización por EGFR era la principal vía responsable de la inducción de la expresión de VEGF por *Ha-ras*-mutado. Los ratones transgénicos dnEGFR tenían impedido el desarrollo de cSCC en experimentos de carcinogénesis química, lo que demostraba que la señalización de EGFR era esencial para el desarrollo de este tipo de cáncer en ratón, al igual que ocurre en humanos, en donde EGFR se encuentra sobreexpresado y activado. Además demostramos que un mecanismo principal por el que el dnEGFR inhibía la tumorigénesis de piel era por inhibir la expresión de VEGF, ya que cuando se forzaba la expresión de VEGF en los queratinocitos dnEGFR se restauraba el desarrollo de cSCC⁶⁶.

La exposición a radiación UV induce estrés oxidativo en queratinocitos, caracterizado por un aumento en la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) y una reducción de defensas anti-oxidantes que, como consecuencia, ocasiona daño al DNA y mutaciones activadoras de múltiples vías de respuesta a estrés. El estrés oxidativo ha sido relacionado con el inicio de numerosos cánceres, incluyendo el CPNM⁶⁷. Una de las vías críticas que se activan en respuesta al estrés oxidativo inducido por UV es la vía de c-Jun N-terminal quinasa (JNK). JNK, es un miembro de la familia MAPK que se activa en respuesta a la producción de ROS. Una diana principal de JNK es la proteína-1 (AP-1), formada por dímeros de c-Jun y/o c-Fos y conocida principalmente como un factor de transcripción oncogénico, ya que está implicada en la promoción de la proliferación celular, mediante la transcripción de genes reguladores del ciclo celular (tales como Ciclina D1, Ciclina A, Ciclina E, p53, p21, p16Ink4a y p19ARF). Además, AP-1 promueve supervivencia celular a través de

la colaboración con NF- κ B⁶⁸. La relevancia de la vía de JNK en la formación de cSCC se ha demostrado *in vivo*, mediante un modelo de ratones transgénicos que expresan un dominante negativo de c-Jun, al comprobar que estos ratones estaban protegidos frente al desarrollo de cSCC inducidos por la radiación UVB⁶⁹. Además, JNK promueve la tumorigenicidad de los cSCC por colaborar con otros oncogenes, como Ras, a múltiples niveles moleculares⁷⁰. La activación de JNK induce también la expresión de c-Myc⁷¹, habiéndose demostrado que la sobreexpresión de c-Myc en la epidermis de ratones transgénicos origina el desarrollo de papilomas espontáneos y de cSCC; y además hace a estos ratones susceptibles al desarrollo tumoral en el modelo de carcinogénesis de piel en 2 pasos (en la que se da 1 o 2 aplicaciones tópicas del carcinógeno DMBA-que muta Ha-Ras- y después se tratan los animales con el promotor TPA durante 16-20 semanas)⁷².

Los RTKs pertenecen a una familia de receptores que se activan rápidamente en respuesta a la radiación UV y se han vinculado al CPNM. La activación de RTKs en queratinocitos inicia predominantemente respuestas anti-apoptóticas y proliferativas, que son críticas en procesos fisiológicos de cicatrización, sin embargo, una activación aberrante inducida por UVB puede conducir a la iniciación y promoción de cSCC⁷³. Algunas RTKs implicadas en el desarrollo de los cSCC son el EGFR (comentada anteriormente) y la vía de PI3K/Akt/mTOR. Akt es un regulador central de numerosos procesos celulares, entre ellos de supervivencia celular, metabolismo, traducción de proteínas y angiogénesis. Nuestro grupo ha comprobado que la activación de Akt en la piel de ratones transgénicos aumenta la susceptibilidad al desarrollo de cSCC y a la conversión maligna de los mismos^{74,75}.

A pesar de los diversos métodos de tratamiento de los cSCC disponibles y de los recientes avances en las técnicas de diagnóstico (no invasivas o mínimamente invasivas), el riesgo de recurrencia y de metástasis están lejos de ser despreciables. Así, aunque hay métodos eficaces de tratamiento de los cSCC, ninguno de ellos puede asegurar una curación completa, por lo que una media del 8% de los cSCCs se reproducen y el 5% de ellos metastatiza en 5 años⁷⁶. Estos cSCC pueden presentar diseminación linfática y en ocasiones invasión de órganos distantes, asociándose a los cSCC metastásicos un comportamiento a largo plazo extremadamente agresivo, con una tasa de supervivencia a los 10 años menor del 20%. De estos datos se concluye que la mortalidad en el cSCC es un problema importante, teniendo en cuenta que estamos ante una de las tumoraciones más prevalentes del mundo.

Se ha comprobado que el riesgo de metástasis y de recurrencia de los cSCC varía dependiendo de la localización anatómica, por ejemplo los cSCC localizados en los labios o las orejas se correlacionan con un riesgo de invasión mayor (10-25%);

también influye el tamaño inicial del tumor, aquellos mayores de 2 cm, tienen un 15% de posibilidades de recurrencia y 30% de posibilidades de metástasis; las características histológicas también afectan a la progresión de los cSCC (los subtipos con mayor riesgo de metástasis son los desmoplásicos, acantolíticos, los sarcomatoides y los cSCC “de novo”); la velocidad del crecimiento del tumor, la profundidad (> 4 cm), la escasa diferenciación, los cSCC de grado II (50% del tumor diferenciado y 50% indiferenciado) y III-IV (tres cuartas partes del tumor indiferenciado) se asocian a mayor recurrencia y muerte del paciente, aunque hay estudios que han mostrado que la mitad de las metástasis son debidas a tumores bien diferenciados, grado I⁷⁷; la existencia o no de invasión perineural también influye en el riesgo de metástasis de los cSCC, así como los antecedentes clínicos del paciente (trastornos genéticos, inmunosupresión, lesiones preexistentes, etc.).⁷⁸ El 70% de pacientes con cSCC metastásico presentan una o más de las características establecidas como factores de riesgo de metastatizar, sin embargo el 20-30% restante de pacientes de cSCC metastásico no presentan ninguno de los factores de riesgo de los anteriormente comentados, lo que sugiere la existencia de otras variables todavía no conocidas que deben tener un papel importante en su metástasis. Dentro de este grupo adquieren importancia determinadas alteraciones moleculares que parecen decretar la existencia de cSCC con comportamiento más agresivo. Entre ellas, las mutaciones en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y en menor medida mutaciones en p16 y CKS1B se postulan como las principales alteraciones moleculares en el cSCC de alto riesgo^{79,80}, aunque hasta el momento no hay muchos estudios sobre el tema. Recientemente se ha asociado la localización nuclear de IKK α y una disminución de la expresión de Maspin con cSCC de alto riesgo de metastatizar⁸¹.

Una correcta evaluación de marcadores histológicos y moleculares que permitan discernir entre cSCC de mayor agresividad y alto riesgo de metastatizar es fundamental para mejorar la supervivencia en este tipo de cáncer. La caracterización de la biología molecular de los cSCC y el análisis de las diferencias genéticas entre los cSCC de mayor o menor malignidad permitirán optimizar la actuación terapéutica mediante fármacos que actúen sobre dianas moleculares clave en el proceso de carcinogénesis epidérmica. Además el manejo individualizado de los pacientes en base a estos conocimientos permitirá reducir la mortalidad asociada a esta tumoración maligna.

Por tanto, en este trabajo, para conocer posibles marcadores moleculares de los cSCC más agresivos, nos hemos centrado en una de las vías que parecen desempeñar un papel más importante en el desarrollo y la progresión de los cSCC,

como es la vía NF- κ B (ya que entre otras funciones, favorece la angiogénesis tumoral y la inflamación) y en un gen, el gen *Cyld*, poco estudiado hasta el momento, que aparece como candidato a desempeñar un papel relevante en el CPNM, ya que, aunque se expresa de forma ubicua en casi todos los tipos celulares, se ha descrito que su mutación e inactivación funcional sólo origina el desarrollo de tumores derivados de la piel (a través de la activación de la vía de NF- κ B).

3. El factor de transcripción NF- κ B

NF- κ B es un importante factor de transcripción dimérico, expresado en el citoplasma de todos los tipos celulares. Desempeña un papel crucial en diversos procesos biológicos, incluyendo la respuesta inmune, la inflamación, la supervivencia y desarrollo celular, la respuesta al estrés y la maduración de distintos tipos celulares. Aunque se requiere la activación de NF- κ B para proteger a los organismos de los efectos ambientales, la actividad desregulada de NF- κ B lleva al desarrollo de diversos trastornos autoinmunes incluyendo artritis reumatoide, aterosclerosis, enfermedades inflamatorias del intestino, esclerosis múltiples y desarrollo de cáncer⁸².

El sistema de señalización de NF- κ B consiste en heterodímeros u homodímeros formados por 5 miembros: RelA (p65), RelB, cRel, NF- κ B1 (p105/p50) y NF- κ B2 (p100/p52). Los diferentes complejos diméricos se expresan en cualquier tipo celular, siendo p65/p50 el dímero predominante en piel⁸². p65, RelB y c-Rel tienen un dominio de unión a DNA (dominio de homología Rel), y un dominio de transactivación a través del cual activan la transcripción de los genes. Por el contrario, p50 y p52 solo tienen un dominio de unión a DNA y carecen de un dominio de transactivación, por lo que p50 y p52 solo son capaces de promover la transcripción de genes si forman un heterodímero con p65, RelB, c-Rel o con el coactivador Bcl-3, que tiene un dominio de transactivación que cambia las propiedades de transcripción de p50 o p52, de un estado represor a un estado de activación⁸³.

Se han descrito 2 vías principales de activación de NF- κ B: la vía canónica o clásica y la vía no canónica o alternativa (Figura 5).

Las proteínas inhibitoras clásicas en el sistema de señalización de NF- κ B, están formadas por la familia I κ Bs: I κ B α , I κ B β , Bcl-3, IKK γ , I κ B ϵ y las proteínas precursoras p100 y p105. En células no estimuladas, I κ B se une a la secuencia de localización nuclear de los dímeros NF- κ B, inhibiendo su translocación nuclear. Tras la estimulación celular, el complejo I κ B quinasa (IKK) fosforila I κ B, marcándolo para su ubiquitinación y consiguiente degradación vía proteosoma, liberando los dímeros NF- κ B y su translocación al núcleo⁸².

En la **vía canónica de activación de NF- κ B** desempeña un papel esencial el complejo I κ B quinasa (IKK) está formado por 2 subunidades catalíticas, IKK α e IKK β , y una subunidad reguladora, IKK γ o NEMO. El complejo IKK está implicado en la activación de la vía NF- κ B, por medio de la fosforilación de la familia de inhibidores I κ B⁸⁴.

La vía canónica se activa mediante señales pro-inflamatorias como las citoquinas (IL-1 β , TNF- α), moléculas asociadas a patógenos (PAMPs), lipopolisacáridos (LPS), receptores de células T y B (TCR y BCR, respectivamente). Tras la estimulación de estas señales, los receptores de la familia TNF, en este caso TRAF2 y TRAF6, con función ubiquitin ligasa K63, inducen la autoubiquitinación y ubiquitinación de proteínas dianas implicadas en la activación del complejo quinasa IKK (como NEMO), y la fosforilación de IKK α/β . La activación del complejo IKK conduce a la fosforilación, poliubiquitinación y degradación principalmente de I κ B α , liberando los dímeros de NF- κ B que migran al núcleo y activan sus correspondientes genes diana^{82,85,86}.

La **vía no canónica de activación de NF- κ B** está mediada por la participación de homodímeros de IKK α y del procesamiento de p100 y p105 (que actúan como inhibidores I κ B). Los estímulos que activan la señalización no canónica incluyen β -linfotoxina (LT β), factor activador de células B (BAFF), ligando CD40 y el receptor del activador de ligando NF- κ B (RANKL). La unión al receptor induce la activación de NIK, que activa un complejo formado por dímeros de IKK α ; éste fosforila p100, lo que conduce a su proteólisis parcial, originando p52, la cual forma parte del herodímero p52/RelB⁸⁷.

La ubiquitinación de Bcl-3 en residuos K63 ha sido descrita como un mecanismo atípico de activación de NF- κ B que se ha encontrado en queratinocitos⁸³. En ella, CYLD interacciona físicamente con Bcl-3 a través de una región específica que es diferente al dominio que media la unión a TRAF2 y a NEMO. CYLD inhibe la ubiquitinación en K63 y la translocación nuclear de Bcl-3.

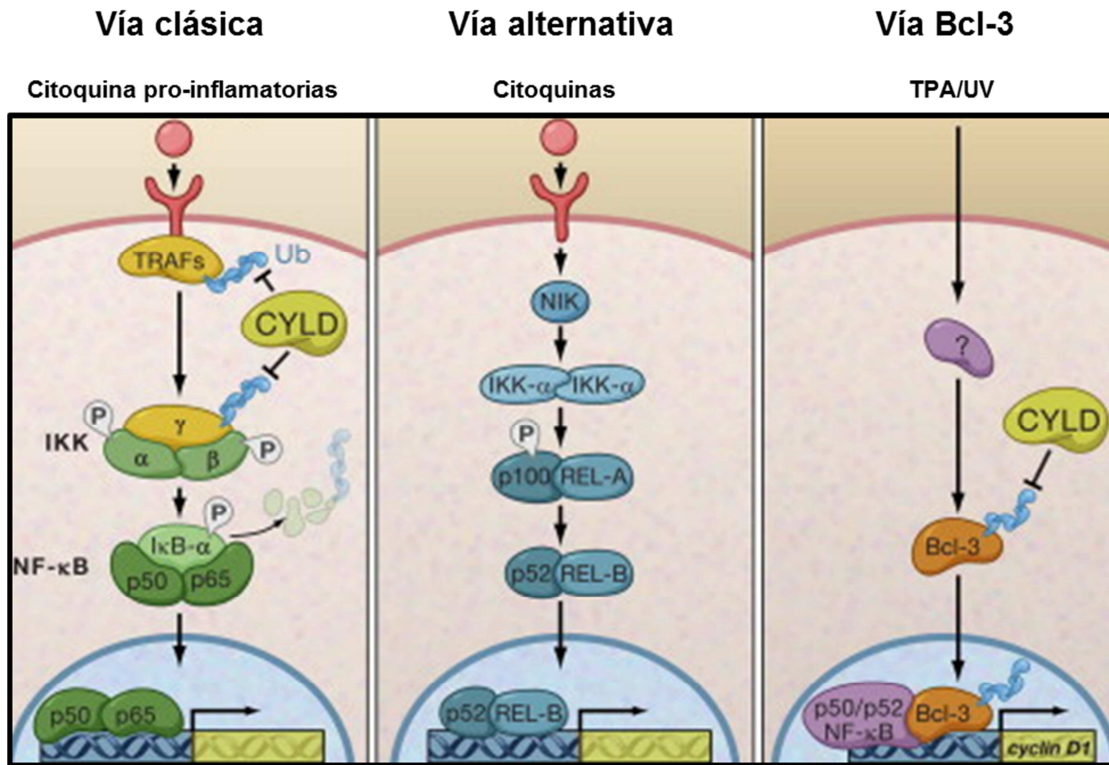


Figura 5. Principales vías de activación de NF-κB. La vía clásica (izquierda) se inicia principalmente tras la señalización por citoquinas pro-inflamatorias (TNF-α) y la vía alternativa (en medio) a través de ligandos como LTα/β, CD40L o BAFF. Activación de NF-κB por la ubiquitinación de Bcl-3 (derecha). Imagen modificada de Ikeda 2006.

3.1 NF-κB en el desarrollo tumoral

La vía de NF-κB está constitutivamente activada en una gran variedad de tumores hematológicos y de tumores sólidos. Esta vía regula la expresión de numerosos genes implicados en distintos aspectos del proceso tumoral^{88,89}. Así, promueve la proliferación celular (activa la transcripción de los genes Ciclina D1 y c-Myc); estimula la supervivencia celular (aumenta la expresión de factores anti-apoptóticos como Bcl-2, Bcl-XL o proteínas inhibidoras de apoptosis c-IAP) y favorece la angiogénesis y la migración celular (induce la expresión de VEGF, de metaloproteasas MMP2/9 y moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1). Además puede ser activada por vías oncogénicas como PI3K/Akt o Ras⁹⁰ y por oncoproteínas virales.

Muchos tumores están asociados a inflamación crónica⁹¹. Recientemente diversos estudios genéticos han mostrado una asociación entre inflamación, activación de NF-κB y desarrollo tumoral, indicando que NF-κB puede tener un papel pro-tumorigénico⁹²⁻⁹⁴. Utilizando diferentes modelos murinos de cáncer asociado a inflamación se ha observado que NF-κB promueve el desarrollo tumoral actuando a través de mecanismos diferentes en las células tumorales y en las células

inflamatorias asociadas al tumor. Por ejemplo, en un modelo de ratón de cáncer de colon asociado a colitis en el que se inactivó selectivamente IKK β en enterocitos o en células mieloides, se demostró que la falta de activación de NF- κ B contribuía a la promoción tumoral al suprimir la apoptosis de los enterocitos premalignos, mientras que en células mieloides estimulaba la producción de citoquinas que actúan como factores de crecimiento de los enterocitos tumorales⁹². Recientemente en el caso de algunos hepatocarcinomas y de tejido precanceroso de cirrosis (se estima que alrededor del 80 % de los hepatocarcinomas se desarrollan en pacientes que presentan cirrosis, con inflamación crónica del hígado) se ha detectado activación constitutiva de NF- κ B. Se ha comprobado que el uso de inhibidores de NF- κ B puede servir como agentes preventivos y terapéuticos de este tipo de lesiones⁹⁵. En el caso de cáncer pulmonar se ha descrito que la inactivación de PTEN da lugar a una invasividad mayor de las células de cáncer de pulmón que está mediada por la activación de la vía PI3K/Akt/NF- κ B, actuando en este caso también la activación de la vía de NF- κ B como promotor de malignidad tumoral⁹⁶. En el cáncer gástrico se ha encontrado que el incremento de la actividad de p50 en cáncer gástrico tiene efectos importantes en la proliferación y motilidad de las células tumorales, habiéndose encontrado en humanos que la homocigosis para un SNP (rs4648068 GG) de NF- κ B1 (que conlleva el incremento de actividad transcripcional de p50) está asociado a mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico en la población china⁹⁷.

3.2 NF- κ B en el desarrollo y progresión de los SCC cutáneos

El papel de NF- κ B en el desarrollo de tumores de piel es complejo, ya que exhibe tanto propiedades de supresor como de promotor tumoral en diferentes tipos celulares⁹⁸. Durante un tiempo se ha sugerido que la señalización de NF- κ B ejercía en los queratinocitos, funciones principalmente supresoras del desarrollo de tumores⁶². Por ejemplo los ratones transgénicos que expresan en la piel las subunidades p50 y p65 y tienen activada la vía de NF- κ B, presentan solo una o dos capas de queratinocitos en la epidermis y tienen impedido el crecimiento celular⁹⁹. En línea con estos resultados se encontró que los ratones K5-I κ B α que expresaban un mutante de I κ B α dominante negativo, no fosforilable por el complejo IKK (y por tanto no degradable), y tenían inhibida la vía de NF- κ B, presentaban una epidermis hiperplásica y desarrollaban espontáneamente cSCC⁶². Sin embargo, también se ha descrito el efecto contrario, así se ha visto que en ratones sometidos a carcinogénesis química de piel en dos pasos, DMBA/TPA (en los que se produce la mutación y activación del gen Ha-Ras y el desarrollo de papilomas), la señalización de NF- κ B dependiente de p65 promueve la formación de tumores de piel, demostrando además

que la inhibición de NF-κB impide tanto la iniciación como la promoción tumoral y la inducción de inflamación⁶³. Otra observación a favor de la acción pro-tumoral de NF-κB en los cSCC son los resultados que muestran que la actividad de NF-κB aumenta con la progresión tumoral en la carcinogénesis de ratón¹⁰⁰.

4. Gen *Cyld* (Cilindromatosis)

El gen *Cyld* se localiza en el cromosoma 16q12-q13 en humanos, está formado por 20 exones y codifica para una proteína de 107Kda^{101,102}. La secuencia proteica de CYLD presenta 2 dominios esenciales: en el extremo N-terminal se localizan 3 dominios CAP-Gly (secuencias ricas en residuos de glicina) que interaccionan con miembros de la familia TRAF, IKKγ y Bcl-3 (proteínas implicadas en la activación de la vía NF-κB), en el extremo C-terminal se encuentra el dominio catalítico USP (proteasa específica de ubiquitina) con función desubiquitinasa (DUB)¹⁰²⁻¹⁰⁵ (Figura 6).

La ubiquitinación es una modificación post-transcripcional de las proteínas, en la que se produce la unión covalente de una o varias moléculas de ubiquitina por medio de residuos de lisina y metionina. Es un proceso inducible y reversible que regula la estabilidad, función y localización de las proteínas. Este mecanismo molecular está bajo el control de enzimas ubiquitinasas y desubiquitinasas. La unión de las moléculas de ubiquitina puede realizarse en residuos metionina 1(M1), lisina 6 (K6), K11, K27, K29, K33, K48 y K63. Cuando la ubiquitinación se produce en el residuo K48, la proteína es marcada para su degradación vía proteosoma, mientras que la ubiquitinación en el residuo de K63 participan en diversos procesos celulares, como son: transducción de señal, respuesta inmune, control del ciclo celular, endocitosis, reparación de DNA, presentación de antígeno, apoptosis y transporte vesicular. La eliminación de ubiquitinas o cadenas de poliubiquitina de la proteína diana es catalizada por enzimas DUBs, como CYLD. En los últimos años, diversos trabajos moleculares, *in vitro* e *in vivo*, han proporcionado una mayor comprensión de cómo CYLD regula diferentes vías de señalización, tanto en condiciones normales como patológicas, a través de su función catalítica DUB¹⁰⁵⁻¹¹¹.

La expresión de la proteína CYLD es ubicua, se localiza en el citoplasma y en la región perinuclear de múltiples tipos de células. A diferencia de otras DUBs, CYLD se expresa constitutivamente, aunque a niveles basales bajos, en un gran porcentaje de células, siendo las células inmunes las que expresan niveles más altos. CYLD se ha detectado en: cerebro, testículos, músculo esquelético, placenta, leucocitos, hígado, corazón, riñón, bazo, ovario, pulmón, próstata, intestino, etc¹⁰². En la piel humana,

CYLD se expresa en la epidermis interfolicular y en los anejos de la piel (foliculos pilosos y glándulas)¹⁰¹.

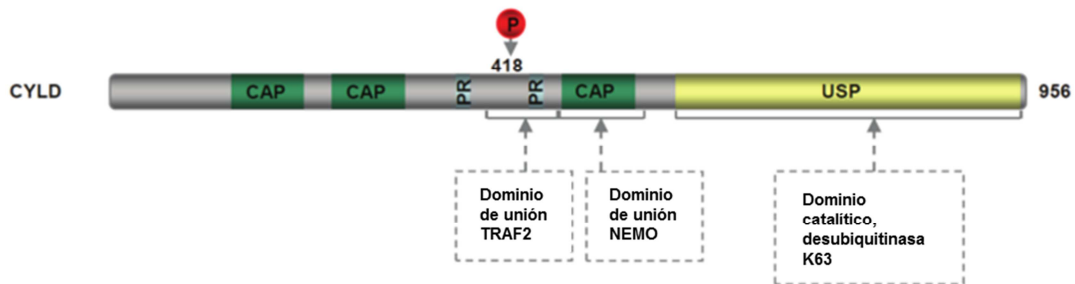


Figura 6. Representación esquemática de los dominios funcionales de CYLD. Se indican los sitios de interacción con las proteínas TRAF2 y NEMO (IKK γ), un sitio de fosforilación en serina 418 y el dominio catalítico con función DUB. Imagen adaptada de Xiao 2011.

5. CYLD: Supresor tumoral de los tumores de los anejos de la piel

El gen CYLD fue originalmente identificado como un gen mutado en la cilindromatosis familiar (CF), enfermedad autosómica dominante, que predispone a los pacientes al desarrollo de tumores benignos (cilindromas) derivados de anejos de la piel. Los cilindromas comienzan a aparecer en la segunda o tercera década de la vida, aumentando en número y tamaño con la edad; se localizan principalmente en la cabeza y el cuello (aproximadamente el 90% de los casos). La CF es una enfermedad rara, con penetrancia variable y que afecta con mayor frecuencia a las mujeres que a los hombres (2 a 1). El desarrollo de muchos tumores en el cuero cabelludo conduce a menudo a la formación de una masa tumoral confluyente, por lo que a este tipo de tumores se les ha denominado también tumores en turbante. Después se comprobó que existían otras dos enfermedades que eran originadas por mutaciones en el mismo gen, CYLD, y que se caracterizaban también por el desarrollo de tumores derivados de los anejos de la piel, son el Tricoepitelioma familiar múltiple (TFM), que da lugar a la formación de tricoepiteliomas múltiples, y el síndrome de Brooke-Spiegler (BSS, en el que los pacientes desarrollan cilindromas, tricoepiteliomas y espiradenomas). BSS, CF y TFM se describieron originalmente como entidades clínicas distintas, pero ahora se consideran como variantes que representan un espectro fenotípico de una misma enfermedad¹¹², por eso estas enfermedades son también conocidas como el síndrome cutáneo de CYLD. Los cilindromas pueden aparecer además de manera esporádica, debido a mutaciones de *novo*, ya sea en la línea germinal o somática. En general,

estos tumores (cilindromas, tricopeiteliomas, espiadenomas) son benignos, aunque se han descrito casos en los que pueden malignizar y llegar a metastatizar^{102,113-115}. Hasta ahora se han identificado aproximadamente 95 mutaciones diferentes en el gen CYLD que causan el desarrollo de BSS, cilindromatosis familiar (CF) y tricopeitelioma familiar múltiple (MFT). La mayoría de los cambios mutacionales son debidos a inserciones o deleciones de nucleótidos (48%), o mutaciones sin sentido (27%). La mayoría de las mutaciones se encuentran en el dominio carboxilo terminal, entre los exones 9-20. El análisis genético de los tumores de la piel de cilindromatosis, reveló que el alelo silvestre heredado de los padres que no porta la mutación se pierde por heterocigosidad (LOH), característica de los genes supresores tumorales¹¹².

6. Mecanismos a través de los que actúa CYLD

6.1 CYLD regula negativamente la vía de señalización NF- κ B

El primer mecanismo por el que se encontró que CYLD ejercía su función supresora tumoral era por inhibir la activación de NF- κ B. Diferentes grupos han demostrado, que la proteína CYLD está implicada en la regulación negativa de NF- κ B, por la desubiquitinación de diferentes sustratos de la vía como son NEMO, TRAF2, TRAF6, TRAF7, RIP1, TAK1 y Bcl-3. CYLD se une directamente a estas proteínas eliminando las cadenas de ubiquitina en residuos K63, lo que conlleva la inhibición del complejo IKK y la estabilización del inhibidor I κ B, por lo que los dímeros de NF- κ B quedan retenidos en el citoplasma y se impide la activación de NF- κ B¹¹⁶⁻¹¹⁹. De modo que la inactivación de CYLD resulta en la activación constitutiva de la vía de NF- κ B.

6.2 CYLD regula negativamente la vía de JNK y otras vías de señalización

Posteriormente se ha demostrado que CYLD regula negativamente otras vías, por ejemplo, la señalización de JNK (c-Jun N-terminal Kinase), que desempeña una función crítica como mediador de la supervivencia celular. Esta función de CYLD está de acuerdo con su actividad DUB de TRAF (común a la vía de NF- κ B y de JNK). De modo que la inhibición de CYLD resulta en el aumento de la ubiquitinación de TRAF2 y en la activación de JNK¹²⁰.

CYLD regula además otras vías de señalización como la vía de Wnt/ β -catenina, ya que se observó que la pérdida de CYLD impedía la desubiquitinación de Dvl en residuos K63, aumentando de esta manera la acumulación nuclear de β -catenina

inducida por Wnt¹²¹; también inhibe la señalización de p38MAPK; del factor de crecimiento transformante β (TGF- β)^{122,123}, de Hippo y Notch^{124,125}; CYLD interacciona además con Bcl-3 impidiendo su translocación nuclear en queratinocitos y melanoma^{83,105}.

7. Regulación de CYLD y funciones fisiológicas conocidas de CYLD

7.1 Regulación de CYLD

La regulación de CYLD, como corresponde a un efector de la desubiquitinación en residuos en K63, es compleja. La expresión de CYLD puede ser regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional, siendo las modificaciones post-transcripcionales las que desempeñan un papel más crítico en su regulación (Figura 7). La transcripción de CYLD puede ser reprimida por metilación del DNA, por desacetilación de histonas y por el reclutamiento directo del represor transcripcional Snail^{105,126}; también Gli1, Lef1 y Hes1/Notch1 inhiben la expresión de CYLD¹²⁷. Se demostró que las especies reactivas de oxígeno regulaban negativamente también la transcripción de *Cyld*¹²⁸. La unión de BAF57 al promotor de *Cyld* modifica la estructura de la cromatina, promoviendo su transcripción¹²⁹. A nivel post-transcripcional se ha descrito que CYLD puede ser fosforilado por IKK α , IKK β y, más eficientemente por IKK ϵ ^{106,130}, como consecuencia de ello pierde su actividad DUB. CYLD puede ser regulado por suero a través de la activación del factor de respuesta a suero (SRF) y de MAPK¹³¹. También puede ser regulado por rotura proteolítica, por ejemplo por Caspasa 8, dando lugar a la generación de señales de supervivencia, mientras que la pérdida de Caspasa 8 se ha comprobado que previene la degradación de CYLD, produciendo la muerte por necrosis¹³². CYLD también puede ser regulado por la unión directa de miRNAs, por ejemplo, miR-21, miR-181b (activados por STAT3) inhiben CYLD dando lugar a la activación de NF- κ B¹³³. CYLD puede además ser ubiquitinado y marcado así para su degradación por la vía del proteosoma¹³⁴.

Hay pocas evidencias que indiquen la regulación de la expresión de CYLD por agentes farmacológicos, pero se piensa que se podrían regular indirectamente sus niveles mediante agentes que actúen sobre factores que regulan la expresión de CYLD, como inhibidores de quinasa y agentes que inhiban la inflamación¹²⁸.

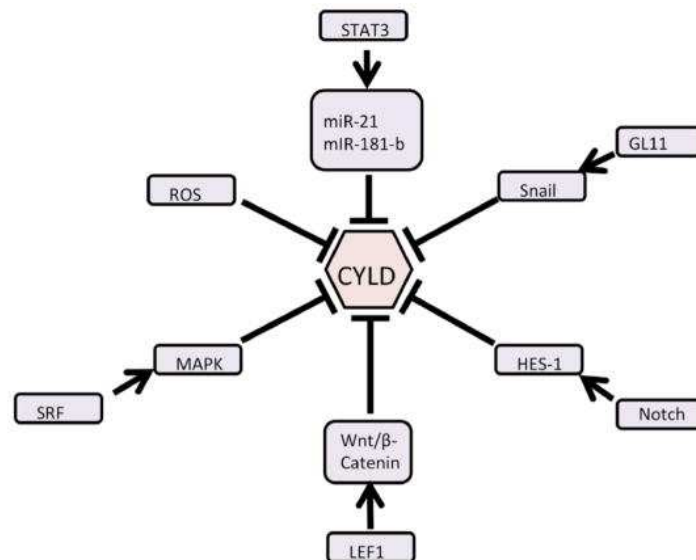


Figura 7. Regulación de CYLD. Imagen representativa de la regulación de CYLD a nivel transcripcional y post-transcripcional. Imagen de Mathis 2015.

7.2 Funciones de CYLD

De acuerdo con las diferentes vías de señalización en las que interviene CYLD, se le han atribuido diferentes funciones celulares, y se han descrito numerosos sustratos de CYLD, como se ilustra en la Figura 8.

CYLD regula la proliferación y ciclo celular: la asociación CYLD-Bcl-3 conduce a una reducción significativa de la polubiquitinación de Bcl-3 en K63, un proceso importante para la translocación nuclear de Bcl-3 y la inducción de Ciclina D1¹³⁵. La interacción directa entre CYLD y HDAC6 conduce a la inactivación de HDAC6, que a su vez eleva los niveles totales de acetilación de α -tubulina, lo que provoca un retraso en la fase de citocinesis de la mitosis^{136,137}. La desubiquitinación de PLK1 por CYLD promueve la división celular y es necesaria para la entrada en mitosis¹³⁸.

Supervivencia y apoptosis: La eliminación de las cadenas de poliubiquitina en residuos K63 de TRAF2, TRAF6 o NEMO por CYLD atenúa la señalización de la vía clásica de NF- κ B inducida por TNF- α , y conduce a la muerte celular programada¹¹⁶⁻¹¹⁸. Además, CYLD aumenta la supervivencia celular por desubiquitinar a TRAF2, lo que conduce a la activación de JNK¹²⁰. Una interacción directa entre TRIP y CYLD es necesaria para la regulación negativa de la actividad de NF- κ B después de haberse producido la estimulación por TNF- α y la consiguiente supervivencia celular¹¹⁹.

Inflamación: CYLD regula negativamente la inflamación inducida por patógenos y la señalización de NF- κ B mediante la desubiquitinación de TRAF6 y TRAF7¹³⁹.

Desarrollo y activación de linfocitos T: la desubiquitinación de TAK1 mediada por CYLD previene la activación espontánea de TAK1 y su señalización. Esta

actividad evita la inflamación sostenida¹⁴⁰. La desubiquitación de LCK mediada por CYLD (aunque en este caso en residuos K48) bloquea la señalización de TCR¹⁴¹.

Respuesta antiviral: CYLD puede regular negativamente las respuestas antivirales innatas a través de la desubiquitinación de RIG-I^{142,143}.

Espermatogénesis: CYLD desubiquitina RIP1 en células germinales y bloquea la expresión aberrante de genes de supervivencia a través de la señalización de NF- κ B^{144,145}.

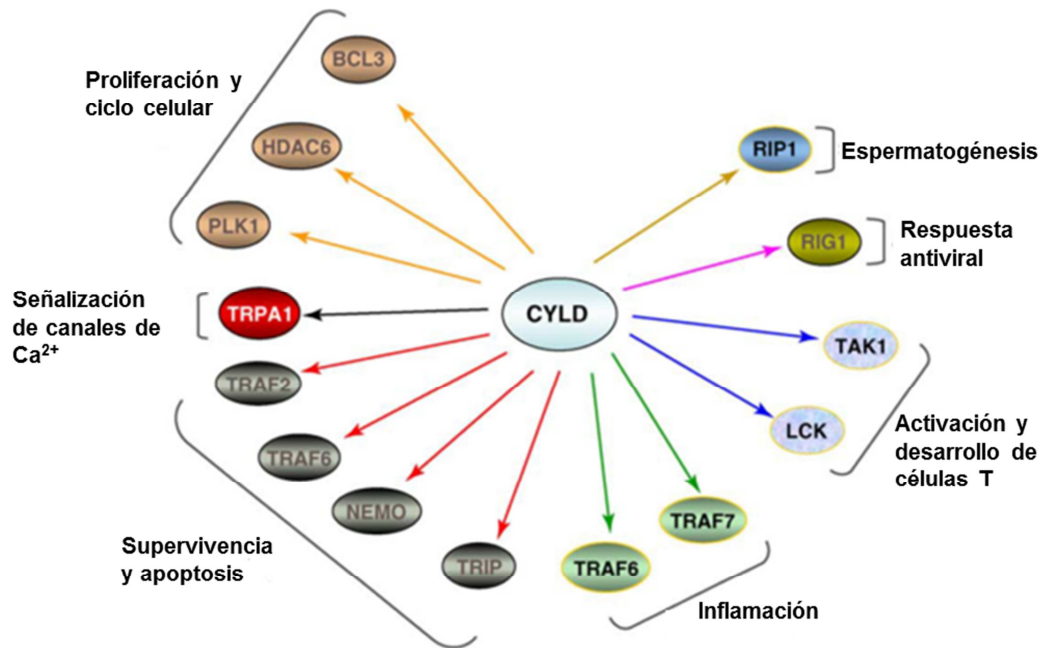


Figura 8. Los sustratos de CYLD y sus funciones. Esquema representativo de las diferentes funciones adscritas a CYLD. Imagen modificada de Massoumi 2010.

8. Función supresora tumoral de CYLD en otros tipos tumorales

Además de su función como supresor tumoral de cilindromas, tricoepiteliomas y espiadenomas; en los últimos años, diversos estudios genéticos asocian la pérdida de funcionalidad de CYLD con diferentes cánceres no cutáneos de gran prevalencia en la población, entre ellos: mieloma múltiple, colon, pulmón, riñón, hígado, mama, estómago, melanoma y carcinoma cervical. En estos tipos de cáncer, se ha demostrado la disminución de la expresión de CYLD, ya sea debida a mutaciones somáticas o silenciamiento del gen^{146,147}.

CYLD actúa como promotor de los hepatocarcinomas (HCC). En el hígado (humano y murino) CYLD se expresa tanto en hepatocitos como en las células no parenquimatosas de Kupffer y las células estrelladas hepáticas (HSC). Se ha descrito que CYLD contribuye a la homeostasis hepática y a la restauración de las lesiones del

hígado, de modo que las mutaciones o la interrupción de la actividad de CYLD en animales agrava las lesiones hepáticas agudas y crónicas y promueve el desarrollo y la progresión del cáncer hepatocelular. Este efecto está mediado por la activación de vías pro-inflamatorias, pro-fibrogénicas y pro-oncogénicas¹⁴⁸. En concreto, se ha encontrado que en la fase de iniciación del desarrollo de HCC los ratones deficientes en CYLD sufren la activación prolongada de JNK, que a su vez facilita la apoptosis de los hepatocitos; aunque después, durante la progresión de HCC, la delección de CYLD causa un aumento en la tasa de proliferación de las células cancerosas mediado por la activación de AP-1 y de la expresión de Ciclina D1 y c-Myc. Se ha encontrado reducción o pérdida de la expresión de mRNA CYLD en líneas celulares de HCC y en hepatocarcinomas humanos¹⁴⁹.

En el caso del carcinoma de colon, también se ha descrito la inhibición de la expresión de CYLD en líneas celulares, así como en biopsias de cáncer de colon de pacientes¹⁴⁹. Además la reducción de la expresión de mRNA de CYLD ocurre también en pacientes con Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, siendo esta última un factor de riesgo para el cáncer colorrectal, por lo que se ha sugerido que la expresión reducida de CYLD puede predisponer a los pacientes con colitis ulcerosa a desarrollar carcinoma de colon. En este tipo de cáncer y en el melanoma el reclutamiento directo de un represor transcripcional como SNAIL, HIC1 o ZNF202 al promotor de CYLD se ha propuesto que causan la represión de CYLD¹⁴⁶.

En el melanoma también se ha detectado represión de la expresión de CYLD, por lo que el proto-oncogén Bcl-3 no puede ser desubiquitinado y transloca al núcleo, donde activa los promotores de Ciclina D1 y Cadherina N, que finalmente promueven la proliferación e invasión de las células de melanoma¹²⁶.

También se ha sugerido que CYLD desempeña un papel importante en la génesis del cáncer de pulmón del tipo no microcítico, también denominado cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC, del inglés *non small cell lung cancer*). Estos son el tipo más común de cánceres de pulmón y comprende tres subtipos: carcinoma escamoso o epidermoide, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes. Se ha encontrado que en este tipo tumoral la expresión de CYLD está inhibida y esta inhibición se produce por mecanismos epigenéticos¹⁵⁰. Se ha comprobado además que la sobreexpresión de CYLD contribuye a la muerte de las células tumorales de cáncer de pulmón¹⁵¹.

En el cáncer de próstata se ha descrito también la inhibición de la expresión de CYLD¹⁵². Tanto en el caso del cáncer de pulmón como en el de próstata, se ha encontrado que los mecanismos que median el silenciamiento de CYLD son la

metilación del promotor CYLD y la desacetilación de histonas, que inducen la represión transcripcional del gen de CYLD.

En el caso del cáncer de mama, se ha detectado que IKK ϵ está amplificado y sobreexpresado en más del 30% de los tumores, y se ha encontrado que el mecanismo potencial por el cual IKK ϵ induce tumorigénesis de mama es a través de la inactivación de CYLD como consecuencia de la fosforilación de CYLD por IKK ϵ ¹³⁰.

En el cáncer de cabeza y cuello y en el cáncer cervical, la polubiquitinación de CYLD a través de K48 mediada por el virus del papiloma humano marca a CYLD para su degradación por el proteasoma, lo que promueve la progresión de estos tipos tumorales¹⁴⁶.

Además de la pérdida de heterocigosidad (LOH) que se observa en los tumores del síndrome cutáneo de CYLD (cilindromas, tricoepiteliomas y espiradenomas), se ha encontrado que la LOH de CYLD, debido a mutaciones en el gen *Cyld* o a deleciones cromosómicas, conduce al desarrollo de mieloma múltiple, tumores de las glándulas salivales y carcinoma de células renales¹⁴⁶.

Además de estas alteraciones en la regulación de la expresión de CYLD que se han descrito en distintos tipos de tumores humanos y que pueden ser responsables del desarrollo y la progresión tumoral, recientemente se han encontrado mutaciones somáticas en el gen *Cyld* en diversos cánceres en pacientes. Entre los tipos tumorales que presentan una tasa de mutación de CYLD $\geq 3\%$ se incluyen: el carcinoma endometrial (o uterino) (5,2%, 13/248 casos); el carcinoma de células escamosas de pulmón (4,5%, 8/177 casos); adenocarcinoma gástrico (3,8%, 15/395 casos), adenocarcinoma pulmonar (3%, 7/230 casos); SCCs de cabeza y cuello (2,9%, 8/279 casos). Otros 14 tipos de cánceres portan mutaciones somáticas de CYLD a tasas de $\sim 1-3\%$, como son cáncer de piel, esófago, colon, glioma, páncreas, hígado, colangiocarcinoma intrahepático, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma de células B grandes, timoma, carcinoma de células renales, mieloma múltiple, melanoma uveal y glioblastoma¹⁵³. Curiosamente, dos de las mutaciones en línea germinal de CYLD (S371* y R758*) encontradas en los pacientes con síndrome cutáneo de CYLD se detectan también en los tumores de cabeza y cuello, pulmón y estómago, aunque la función de estas mutaciones de CYLD en estos tumores sólidos no ha sido estudiado todavía. En conjunto, estos datos sugieren que las alteraciones de CYLD pueden participar en la tumorigénesis de muchos cánceres humanos.

9. Función de CYLD en el cáncer de piel no melanoma

Mientras que la función de CYLD en el desarrollo y la progresión de los BCCs está bien definida, la participación de CYLD en el origen de los cSCC y en su progresión y metástasis ha sido menos estudiada o no se ha abordado hasta el momento. Y en los casos en que se ha hecho, se han obtenido resultados diferentes.

9.1 CYLD en Carcinomas de células basales (BCCs)

La expresión de CYLD en los BCCs está altamente inhibida (tanto a nivel de mRNA como de proteína) comparada con la que se detecta en los queratinocitos. Esta reducción en la expresión de CYLD es el resultado del reclutamiento del regulador transcripcional Snail al promotor del gen *Cyld*. A su vez la expresión de Snail es inducida por GLI1. Dado que la regulación negativa de CYLD o incluso su pérdida de expresión se observó desde las primeras fases del desarrollo de los BCCs (también en muestras de tumores de pacientes con diferentes grado de comportamiento invasivo) y se ha sugerido que la represión de CYLD ocurre en etapas tempranas del desarrollo de los BCCs¹⁵⁴.

9.2 CYLD en Carcinoma de células escamosas (SCC)

Se han realizado intentos de estudiar la función de CYLD en el desarrollo y progresión de los tumores más agresivos del CPNM, los cSCC. Para ello se han utilizado modelos de ratones transgénicos, que son o bien deficientes en CYLD o bien expresan una forma catalíticamente inactiva de CYLD que carece de su función DUB. Sin embargo los resultados que se han obtenido han sido completamente diferentes, lo que hace pensar que se necesita un modelo diferente de aproximación a estos estudios. Es lo que hemos realizado en el presente trabajo.

A diferencia de lo que ocurre en los BCCs, en los cSCC no se han encontrado cambios significativos en los niveles de expresión de CYLD en comparación con el de los queratinocitos; además, en los tumores cutáneos inducidos químicamente utilizando DMBA/TPA en ratones deficientes en CYLD dio como resultado el desarrollo de papilomas cutáneos benignos, sin signos de cSCC⁸³. Es la inactivación catalítica de CYLD en la piel la causa que se considera que provoca la conversión de células epidérmicas no tumorales a células malignas. En los papilomas desarrollados por los ratones deficientes en CYLD por tratamiento de la piel con DMBA/TPA se ha detectado un aumento en la localización nuclear de Bcl-3 y p52 así como un incremento en la expresión de Ciclina D1, que explicarían el crecimiento de los papilomas. Es interesante señalar que en estos ratones no se observó el crecimiento espontáneo de ningún tipo tumoral⁸³. En otro estudio se generaron ratones que

expresaban bajo el promotor de la queratina K14 una forma mutante de CYLD catalíticamente inactiva (carente de 21 residuos de aminoácidos en el extremo C-terminal), los ratones K14-CYLDmut. Estos animales no desarrollaron espontáneamente ningún tumor (ni de piel, ni de otros órganos); la exposición de los ratones CYLDmut a DMBA/TPA resultó en el desarrollo de papilomas que progresaban a neoplasias malignas, cSCC, con metástasis en nódulos linfáticos por un mecanismo que implicaba la activación de JNK/AP1. En esta vía, CYLDm aumentó los niveles basales de c-Jun y c-Fos, de modo que se sugirió que el aumento de c-Jun/c-Fos era responsable del desarrollo de los cSCC asociados con la pérdida de la función DUB en el gen CYLD¹³⁵. Se ha generado un tercer modelo de ratones transgénicos que expresan también una forma mutada de CYLD, sin actividad DUB, los ratones K14-Cyld^{EΔ9/Δ942}. A diferencia de los otros dos modelos, que no presentaban ningún fenotipo, estos ratones presentan anomalías en el pelo e hiperplasia de las glándulas sebáceas. El tratamiento tópico con DMBA/TPA, mostró que los ratones K14-Cyld^{EΔ9/Δ9} desarrollaban principalmente tumores sebáceos y basaloides, en vez de los papilomas que se obtienen comúnmente en este tipo de carcinogénesis química de piel. El análisis molecular de los tumores reveló un incremento en la ubiquitinación de TRAF6 y de c-Myc (K63-Ub) y así como un aumento de c-Myc activado (fosforilado), que serían los responsables de la carcinogénesis en los ratones K14-Cyld^{EΔ9/Δ9}.

Es decir que los estudios realizados hasta la fecha sobre la implicación de CYLD en el desarrollo de SCC cutáneos han mostrado que la deficiencia de CYLD en ratones transgénicos origina, en tratamientos con DMBA/TPA, papilomas benignos; y en ratones con CYLD carente de función DUB, este tratamiento origina el desarrollo de cSCC en un modelo y de tumores basaloides y sebáceos, benignos, en otro. En ninguno de los tres modelos los ratones desarrollan tumores de forma espontánea, como ocurre en los pacientes de CH y en otros que, como se ha comentado, presentan represión o mutación de *Cyld*.

10. Envejecimiento.

El envejecimiento constituye un proceso que aparece como consecuencia de la acción del tiempo sobre los seres vivos, por el cual se produce un detrimento progresivo de las funciones fisiológicas, pérdida de la homeostasis, y la disfunción de tejidos y órganos, lo que supone la disminución de la capacidad de adaptación en cada uno de los órganos, aparatos y sistemas, así como de la capacidad de respuesta a los agentes lesivos que inciden en el individuo. Como consecuencia se incrementa la vulnerabilidad y se acumulan lesiones subletales que pueden conducir a la muerte. Ha

sido considerado un proceso multifactorial y complejo, que contempla aspectos genéticos y ambientales. El envejecimiento de la población representa uno de los principales problemas para las autoridades en salud pública en todos los países. En España hay unos 8 millones de personas mayores de 65 años, lo que representa un 17,5% de la población total y según las previsiones, en 2050 este número ascenderá hasta sobrepasar los 16 millones de personas. Por el contrario, para esas fechas, los menores de 65 sumarán unos 27 millones de la población total (respecto a los 38 que representan actualmente). El envejecimiento demográfico afecta a España, pero también a los principales países de Europa occidental y al resto del mundo.

10.1 Factores que influyen en el envejecimiento

Se han descrito diferentes rutas bioquímicas que influyen sobre la longevidad de muchas especies animales, desde moscas y gusanos hasta ratones y hombres. Muchas de estas rutas giran alrededor de una serie de eslabones comunes, incluyendo el factor de crecimiento a la insulina IGF-1, proteínas con actividad quinasa, entre ellas Akt y mTOR, factores de transcripción de la familia FOXO, enzimas modificadoras de la cromatina como las sirtuínas, o componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, avalando la idea de que todos ellos desempeñan funciones decisivas en el mantenimiento de la homeostasis celular. Se han establecido también conexiones moleculares entre los procesos de senescencia celular y el envejecimiento global de órganos y tejidos. Una clave fundamental para estos hallazgos ha sido el progreso en el estudio de las bases moleculares del cáncer, el cual posee muchas conexiones moleculares con el envejecimiento.

Entre los factores que se consideran más relevantes en el proceso de envejecimiento o en la protección frente al envejecimiento se encuentran:

- El daño en el DNA nuclear y los errores en los mecanismos de respuesta y reparación frente al daño genético, actúan como causa directa del envejecimiento. A menos que sea reparado, el daño en el DNA puede conducir a una mutación y/u otras consecuencias celulares que pueden ser deletéreas. Existen muchos factores que dañan el DNA: fuentes externas, tales como la radiación ionizante y los fármacos genotóxicos, y otras fuentes que se encuentran en las propias células, tales como los errores de replicación, los cambios químicos espontáneos en el DNA, programas del desarrollo y agentes que dañan el DNA¹⁵⁵. Entre estos factores que dañan el DNA, se puede destacar la producción de las especies reactivas de oxígeno. La producción de ROS puede causar la peroxidación lipídica, daño a proteínas, y varios tipos de lesiones del DNA, contribuyendo al envejecimiento¹⁵⁶.

- Daño en el DNA mitocondrial. Las mutaciones del DNA mitocondrial se acumulan progresivamente durante la vida y son directamente responsables de la deficiencia en la actividad de la fosforilación oxidativa celular, permitiendo incrementar la producción de ROS¹⁵⁷.

- Las sirtuínas son una familia de proteínas histona desacetilasas (HDACs) de clase III dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), que han sido relacionadas, principalmente Sirt1, con una protección contra enfermedades asociadas al envejecimiento como el cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, gracias a una variedad de mecanismos que incluyen la regulación de la respuesta al estrés, la apoptosis y la reparación del DNA¹⁵⁸. En este contexto, se ha propuesto que la restricción calórica, dentro de unos parámetros saludables, aumenta la esperanza de vida por activar a las sirtuínas ya que en esta situación, el metabolismo anaerobio se ve reducido mientras que el aerobio se ve incrementado, lo que conlleva el incremento del ratio NAD⁺/NADH y la actividad de las sirtuínas^{159,160}. Igualmente, el resveratrol (polifenol que se encuentra en las uvas y en el vino tinto), puede prevenir la progresión de varias enfermedades como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la artritis, etc, además de alargar la vida en varios organismos desde la levadura a los vertebrados, como resultado de la activación de SIRT1¹⁶¹.

- Las proteínas FOXO, subgrupo de la familia *Forkhead* de factores de transcripción, se caracterizan por un dominio conservado de unión al DNA (la «*Forkhead box*», o FOX) y cuenta con más de 100 miembros en los seres humanos, que se clasifican de FOXA a FOXR. Los miembros de la clase «O» son mediadores evolutivamente conservados de señalización de la insulina y del factor de crecimiento insulínico IGF-1 y son reprimidos por la vía de señalización insulina/PI3K/Akt. En las moscas, la sobreexpresión de dFOXO es suficiente para aumentar la longevidad¹⁶², y en mamíferos se ha sugerido también que los factores FOXO podrían estar involucrados en la longevidad, ya que los ratones que carecen del receptor de la insulina o del receptor de IGF-1, pueden vivir hasta un 30% más que los ratones control¹⁶³.

10.2 Papel de los supresores tumorales en el envejecimiento

Como se ha comentado, el envejecimiento va asociado a múltiples enfermedades y discapacidades, y el cáncer es una de ellas, siendo de las principales causas de morbilidad y mortalidad. La relación entre cáncer y envejecimiento es bien conocida desde hace décadas. Pese a encontrarse personas jóvenes que han desarrollado algún tipo de cáncer, el mayor factor de riesgo para el desarrollo de una enfermedad

neoplásica es la edad, como lo indica el hecho de que la incidencia de cáncer aumenta de manera exponencial conforme se incrementa la edad. El deterioro en la función inmunitaria, junto con la pérdida de genes supresores de tumores, se ha propuesto como una de las principales causas asociadas con este fenómeno.

En los últimos años se ha encontrado que los genes supresores tumorales, además de ser esenciales para prevenir el desarrollo de cáncer, pueden estar actuando de un modo más general como mecanismos de defensa frente a distintos tipos de daño evitando el envejecimiento. Así, existe evidencia del efecto protector contra el cáncer y el envejecimiento de los cuatro principales genes supresores tumorales *Pten*, *Ink4a*, *Arf* y *p53*.

El locus *Ink4/Arf* codifica dos miembros de la familia Ink4 de inhibidores de ciclina-dependientes de quinasa, p16^{Ink4a} y p15^{Ink4b}, y la proteína no relacionada, p19^{Arf}. Éste es uno de los locus más frecuentemente inactivados en tumores humanos, lo que refleja su papel central en la prevención del desarrollo del cáncer. Los tres productos del locus participan en las respuestas anti-proliferativas celulares clave, como son la senescencia y la apoptosis. Las proteínas p16^{Ink4a} y p15^{Ink4b} inhiben la actividad de las quinasas Cdk4,6/cycD, promoviendo la parada proliferativa mediada por Rb; mientras que p19^{Arf} inhibe la ubiquitina ligasa Mdm2, promoviendo así la estabilización de p53¹⁶⁴. Se comprobó que el aumento de la dosis del gen *Ink4/Arf* en ratones transgénicos producía un retraso en el envejecimiento y una prolongación de la longevidad. Estos animales presentaban además una mayor protección contra el cáncer¹⁶⁵. En el caso de *Ink4a,b*, su actividad anti-envejecimiento se debe a su capacidad de oponerse a la sobre-estimulación mitogénica, evitando así el agotamiento innecesario del potencial proliferativo, particularmente de las células progenitoras y de las células madre. En el de *Arf*, su actividad anti-envejecimiento está mediada por p53, incluyendo su efecto antioxidante y, también, su capacidad de disminuir la tasa de proliferación. En este caso se observó que la protección frente al cáncer y al envejecimiento eran actividades separables del locus *Ink4/Arf*¹⁶⁴.

El supresor tumoral p53 es un factor de transcripción que se expresa de forma ubicua en todos los tipos celulares en estado inactivo, latente, y se activa sólo cuando existe daño celular. Este gen es crítico en la prevención del cáncer, es el supresor tumoral más frecuentemente mutado en tumores humanos de diferentes tipos (aproximadamente en el 50% de los casos). Su acción supresora tumoral es debida a su capacidad de detener la proliferación y provocar la muerte celular tras producirse daño en el DNA y por estrés oncogénico. Estos efectos producen beneficios en el organismo, sin embargo, un exceso de la función p53 podría eventualmente traducirse en un comienzo prematuro de envejecimiento. En este sentido se han realizado

diversos estudios que han revelado un papel dual de p53 en el envejecimiento que parece depender de la intensidad de su actividad. Por un parte se han generado ratones transgénicos que portan una mutación del gen *p53* que da lugar a una proteína truncada (un fragmento carboxi-terminal de p53). Esta mutación confiere fenotipos consistentes con p53 activado en lugar de p53 inactivado. Los ratones mutantes ($p53^{+/m}$) presentan mayor resistencia a la formación de tumores espontáneos, aunque a medida que envejecen, presentan una aparición temprana de fenotipos asociados con el envejecimiento¹⁶⁶, lo que sugiere que p53 constitutivamente activo podría provocar el envejecimiento acelerado de los organismos. Sin embargo, el estudio de los ratones transgénicos que llevan copias extra de p53 (además de las endógenas), los ratones “Super p53”, están protegidos de manera significativa frente al desarrollo de cáncer y no muestran ninguna señal de envejecimiento prematuro¹⁶⁷. Por tanto, estos resultados sugieren que el papel de p53 en el envejecimiento es complejo y parece depender de la intensidad de su actividad. Así, se ha descrito también que un aumento modesto de la actividad de Arf/p53 tiene actividad anti-envejecimiento¹⁶⁴, por lo que p53 podría ser beneficioso o perjudicial para el envejecimiento en función de su intensidad y su regulación¹⁶⁸.

Pten es un gen frecuentemente mutado en tumores humanos. La proteína se expresa de forma ubicua en todos los tipos celulares. Las mutaciones de *Pten* que inactivan su actividad enzimática conducen a una mayor proliferación celular, reducción de la muerte celular y el desarrollo tumoral. La función más destacada de PTEN es contrarrestar la actividad de fosfatidilinositol 3-quinasa tipo I (PI3K)¹⁶⁹, que media señales desencadenadas por la insulina y otras moléculas involucradas en el crecimiento celular, metabolismo, supervivencia y proliferación. La activación de PI3K es seguida por la activación de Akt, que a su vez desencadena una cascada compleja de eventos que incluyen la inhibición de los factores de transcripción de FOXO. Mediante la generación de un modelo de ratón que sobreexpresa PTEN bajo sus propios elementos reguladores se ha comprobado que un modesto aumento sistémico en la actividad de PTEN prolonga la longevidad en ratones: PTEN regula positivamente el gasto energético, lo que supone una protección sistémica contra el daño metabólico, incluyendo la resistencia a insulina asociada al envejecimiento, de modo que los ratones que sobreexpresan PTEN están protegidos contra el daño metabólico y el cáncer^{164,170}.

10.3 Papel de NF-κB en el envejecimiento

Estudios retrospectivos sugieren que el mantenimiento del estado envejecido requiere de programas activos de señalización. Hay numerosas evidencias que demuestran que la actividad de NF-κB desempeña una función central como motor del envejecimiento, mostrando un papel integrador de señales celulares y sistémicas que causan inflamación crónica.

Hay numerosos estudios que han mostrado un aumento de la actividad de NF-κB con el envejecimiento; por ejemplo, los fibroblastos humanos de individuos envejecidos y de pacientes con síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford presentan sobreactivación de NF-κB^{171,172}. La unión del DNA a NF-κB está aumentada en la piel, el hígado, el riñón, el cerebelo, el músculo cardíaco y la mucosa gástrica de los ratones de edad avanzada¹⁷³⁻¹⁷⁵. Y lo que es muy relevante, en experimentos de patrones de expresión génica, NF-κB ha sido identificado como el factor de transcripción más asociado con el envejecimiento en mamíferos¹⁷².

La activación crónica de NF-κB se observa además en numerosas enfermedades asociadas con el envejecimiento¹⁷⁶, incluyendo atrofia muscular¹⁷⁷, procesos de arterosclerosis y desarrollo de calcificación vascular por un mecanismo dependiente de ATM¹⁷⁸, osteoporosis¹⁷⁹, enfermedades cardíacas¹⁸⁰, fenotipos renales de envejecimiento¹⁸¹, diabetes tipo 1 y tipo 2¹⁸², osteoartritis¹⁸³; también se han asociado alteraciones en NF-κB con una importante contribución de la inflamación en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

Sin embargo, estos estudios no demuestran una relación causal entre la activación de NF-κB y el envejecimiento. Lo que ha demostrado que la activación constitutiva de NF-κB promueve el envejecimiento han sido los estudios en los que la inhibición genética o farmacológica de NF-κB producen un rejuvenecimiento y la reversión de patologías en organismos envejecidos; incluso cuando las estrategias de intervención por bloqueo de NF-κB se aplican en edades tardías. De esta manera se prueba además que la activación de esta vía no es solo necesaria para que se manifiesten los signos de envejecimiento, sino que para mantener el estado envejecido, la vía NF-κB tiene que estar permanentemente activada.

Entre los ejemplos en los que se ha demostrado la reversión del envejecimiento tras la inhibición de la activación de NF-κB se encuentran modelos animales con mutaciones en genes implicados en el envejecimiento y que representan modelos de progeria, por ejemplo, la mejora del síndrome progeroide en ratones deficientes en Sirt-6 mediante la inhibición genética de NF-κB¹⁸⁷; en dos modelos murinos diferentes del síndrome de progesterona XFE (ratones *Ercc1* y *Ercc1*^{-Δ}) la inhibición de NF-κB

amplía el estado de salud y mejora diversas manifestaciones del envejecimiento¹⁸⁸; en los ratones con fenotipo del síndrome de progeria, *Zmpste24*^{-/-} y *Lamna*^{G609G/G609G} (por mutaciones que impiden la expresión o maduración de la laminina A, componente de la lámina nuclear), el bloqueo de NF-κB evitó completamente en la piel las alteraciones asociadas con la edad¹⁸⁹. Los cambios cutáneos asociados al envejecimiento prematuro fueron también revertidos en el modelo de ratón p16INK4a de dermatitis por radiación aguda, como consecuencia de la atenuación de la expresión de genes dependientes de NF-κB¹⁹⁰; en los ratones IKKβ que sufren desgaste muscular (y representan un modelo de sarcopenia), el bloqueo de NF-κB revierte el fenotipo¹⁷⁷; en los ratones XFE de síndrome progeroide por defectos en la reparación del DNA, la reducción genética de un alelo de la subunidad p65 de NF-κB o el tratamiento con un inhibidor farmacológico retrasó los síntomas y patologías relacionadas con la edad y redujo el daño oxidativo del DNA¹⁸⁸.

Y lo que es muy significativo, la generación de ratones *Nfkb1*^{-/-} deficientes en la subunidad p50 NF-κB que presentan activación constitutiva de NF-κB (forman dímeros p65/p65), ha mostrado que la hiperactivación de NF-κB es suficiente para inducir el envejecimiento acelerado^{191,192}.

10.4 Activación de NF-κB, inflamación y envejecimiento

Recientemente se ha incorporado la inflamación crónica como un factor predominante y recurrente que se asocia con el proceso del envejecimiento fisiológico y patológico. Tanto es así que en inglés se ha acuñado el término *inflamm-aging* para describir el papel que juega la inflamación en el deterioro y las enfermedades asociadas a la vejez¹⁹³.

NF-κB se encuentra en el eje de la red inflamatoria de envejecimiento: se activa por diferentes factores, tales como la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la activación de respuestas innatas/inflamatorias, inducción elevada de la vía de insulina/IGF-1 y daño del DNA; factores, todos ellos, que aumentan con la edad y determinan así una activación sostenida de NF-κB, provocando un mecanismo de defensa del huésped, responsable de la liberación de una serie de moléculas que en conjunto se denominan SASP (fenotipo secretor asociado a la senescencia, del inglés *senescence-associated secretory phenotype*). El SASP se produce en diversos tipos celulares (en fibroblastos, células epiteliales, endoteliales, astrocitos, preadipocitos, leucocitos, etc.) y se caracteriza por un incremento en la secreción de aproximadamente 40-80 factores involucrados en diferentes vías de señalización intracelular¹⁹⁴, que pueden ser solubles o proteínicos (interleuquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y proteasas) y componentes insolubles o no proteínicos

(ROS). Asimismo, el SASP colabora en la inflamación crónica que se observa en el envejecimiento, favoreciendo a su vez el proceso de envejecimiento y la aparición de enfermedades degenerativas relacionadas con la edad avanzada. Por lo tanto, la inflamación crónica predispone a los individuos a diversas enfermedades del envejecimiento. Entre los principales marcadores de inflamación asociados con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la depresión, la aterosclerosis, el cáncer, la diabetes, la artritis, la osteoporosis y el fallo renal, entre otras, se encuentran varios de los componentes del SASP, entre los que destacan los niveles elevados de IL-6 y TNF- α ¹⁹⁵.

Los experimentos de parabiosis, en los que los sistemas circulatorios de ratones jóvenes y viejos están conectados artificialmente, han mostrado el potencial de los factores sistémicos para prevenir ciertas características del envejecimiento¹⁹⁶. Por otro lado, los factores solubles han demostrado también efectos pro-envejecimiento¹⁹⁷, pudiendo la secreción de moléculas de señalización por parte de las células de animales viejos contribuir de manera importante al desarrollo de la progeria, ya que las moléculas secretadas pueden actuar sobre los órganos distantes, amplificando la cascada de señales de envejecimiento. En esta vía de señalización por factores solubles sistémicos, NF- κ B juega un papel clave al integrar las alteraciones autonómicas y sistémicas del curso del envejecimiento.

10.5 Otras vías relacionadas con el envejecimiento

Se ha propuesto la intervención de otras vías de señalización en los procesos de envejecimiento y longevidad, sin embargo se ha demostrado que NF- κ B es el factor central en el que finalmente convergen todas estas vías. Es decir, las señales que promueven envejecimiento activan NF- κ B, por el contrario, las que favorecen la longevidad la inhiben¹⁷⁶. Así se ha reportado que las vías de supervivencia y procrecimiento, conocidas por promover fenotipos de envejecimiento, como son la de Insulina/IGF-1 y mTOR estimulan a NF- κ B: la vía de insulina/IGF-1 actúa a través de dos mecanismos, la señalización Akt y mTOR, para activar NF- κ B. En este caso, además, la señalización de insulina/IGF-1, a través de AKT también interactúa con los procesos conocidos por promover la longevidad inhibiendo FOXO. Además, las vías de estrés (como JNK) y daño al DNA promueven cambios asociados a la edad, incluyendo estrés genotóxico, ROS e inflamación que también activan NF- κ B. Como efecto de la activación de NF- κ B por estas diferentes vías pro-envejecimiento, NF- κ B, actúa a su vez promoviendo el envejecimiento al inducir cambios que contribuyen a la senescencia celular, SASP, señales apoptóticas y respuestas inflamatorias. Por el

contrario, los otros factores conocidos de longevidad, SIRT, la restricción calórica y FOXO inhiben la señalización de NF- κ B (Figura 9).

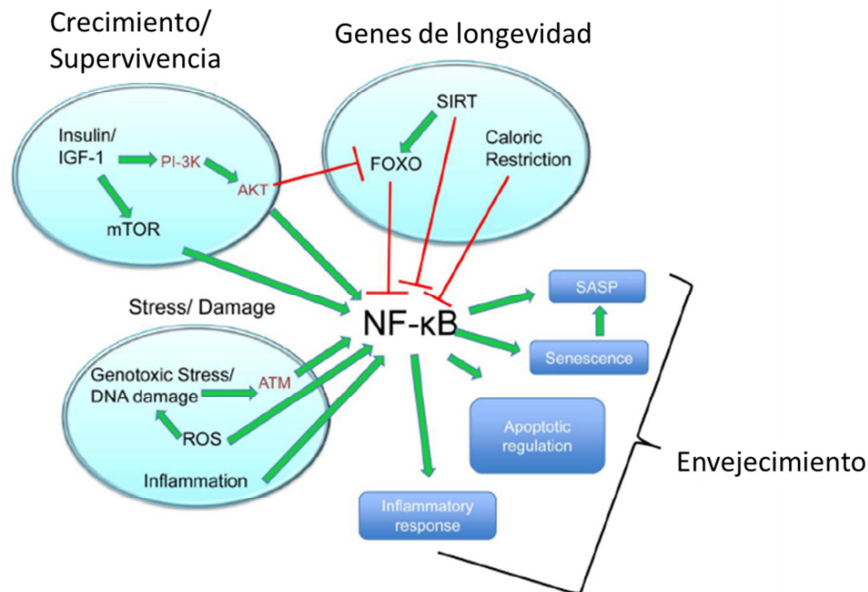


Figura 9. Esquema ilustrativo del papel central de NF- κ B en las vías de envejecimiento y longevidad. La vías de supervivencia y crecimiento, conocidas por promover fenotipos de envejecimiento, estimulan la activación de NF- κ B. Por el contrario, los factores conocidos por aumentar la longevidad, inhiben la señalización por NF- κ B. Imagen modificada de Tilstra 2011.

También se ha relacionado el acortamiento de los telómeros con el envejecimiento: la disfunción de los telómeros, que provoca inestabilidad genómica e induce una respuesta a daño en el DNA, es causa de senescencia celular y se ha descrito que promueve el envejecimiento. Así, en los ratones deficientes en telomerasa ($Terc^{-/-}$), la disfunción severa de telómeros inducida por su acortamiento conduce a un fenotipo de progeria¹⁹⁸, habiéndose comprobado que en estos animales hay una actividad de NF- κ B aumentada, y un incremento de la expresión de COX-2 y de los niveles de ROS. De modo que en este caso también se demuestra la convergencia final de este mecanismo de envejecimiento en la señalización por NF- κ B.

10.6 NF- κ B como biomarcador de envejecimiento

La posibilidad de identificar factores asociados con el envejecimiento saludable y el alargamiento de la esperanza de vida se basa en la detección de biomarcadores que predigan el riesgo de desarrollar patologías asociadas a la edad. Recientemente, se ha probado que la inflamación mediada por NF- κ B puede ser un buen biomarcador de envejecimiento: se han realizado estudios en una gran cohorte de centenarios, y se ha demostrado que la supresión de la inflamación (mediada por NF- κ B) es el factor

más importante de la longevidad, siendo susceptible de ser contrarrestada farmacológicamente¹⁹⁹. En el mismo estudio, otros biomarcadores propuestos del envejecimiento y la inmunosenescencia, como la longitud de los telómeros, han mostrado limitaciones en su capacidad predictiva ya que por sí sola no predice el riesgo de mortalidad ni la existencia de mayor riesgo asociado a la edad, sino que tendría que ser combinado con otros factores relacionados como la inestabilidad de los telómeros²⁰⁰.

Objetivos

OBJETIVOS

En la población caucásica las enfermedades más frecuentes son las de la piel, y el tipo de cáncer más abundante es el de piel no melanoma (CPNM), que comprende BCCs (carcinomas basocelulares), en su mayoría benignos, y cSCC (carcinomas escamosos cutáneos). El CPNM representa el 90% de los tumores diagnosticados. De ellos cerca del 5% de los cSCC metastatizan, por lo que debido a la incidencia tan elevada del CPNM, la mortalidad concomitante a este tipo de tumor alcanza cifras muy elevadas. Todo ello hace que sea muy necesario conocer los mecanismos moleculares que mantienen la homeostasis cutánea y las alteraciones que dan lugar al desarrollo de los cSCC. El gen *Cyld* es principalmente conocido porque su mutación y falta de función origina el síndrome de CYLD, que se caracteriza por la aparición de múltiples tumores cutáneos de los anejos de la piel (glándulas y folículos pilosos). Más recientemente se ha descrito también que *Cyld* actúa como supresor tumoral de los BCCs. El hecho de que aunque la expresión de *Cyld* es ubicua, su inactivación funcional en pacientes origine los tumores cutáneos descritos, sugiere que su función principal es mantener la homeostasis de la piel. Sin embargo, se desconoce qué función/funciones son éstas y si *Cyld* actúa como supresor del desarrollo, progresión y metástasis del CPNM más agresivo, los cSCC. Dado que recientemente se ha descrito que algunos de los genes supresores tumorales más relevantes protegen también frente al envejecimiento, nos planteamos conocer si éste sería el caso de CYLD, es decir, si protege contra el cáncer y contra el envejecimiento.

Para ello, se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Estudiar cuál es la función fisiológica de CYLD en la piel. Lo que se ha realizado mediante diferentes aproximaciones:
 - 1.1. Por medio del estudio de queratinocitos humanos en monocapa y mediante la generación de cultivos 3D de equivalentes de piel.
 - 1.2. Mediante la generación y caracterización del fenotipo epidérmico de un modelo de ratones transgénicos que expresa en la piel una forma mutada de CYLD (CYLD^{C/S}) catalíticamente inactiva y que actúa como dominante negativo. Los ratones K5-CYLD^{C/S}.

2. Conocer la función de CYLD en la formación, progresión y metástasis de los cSCC:
 - 2.1. Estudiar el efecto de la inactivación funcional de CYLD en células SCC epidérmicas humanas y murinas que expresan la construcción CYLD^{C/S}.
Caracterización de sus propiedades tumorales:
 - 2.1.1. *In vitro*, en cultivos en monocapa.
 - 2.1.2. *In vivo*, en los tumores obtenidos en experimentos de carcinogénesis en ratones inmunodeficientes (por inoculación subcutánea de las células SCC deficientes en CYLD), también denominados experimentos de *xenoinjerto*.
 - 2.2. Realización de experimentos de metástasis en ratones inmunodeficientes (por inoculación intravenosa de las células SCC que expresan la forma CYLD^{C/S} catalíticamente inactiva de CYLD).
 - 2.3. Determinar si la sobreexpresión de la forma nativa de CYLD (CYLD^{wt}) puede inhibir el crecimiento de cSCC y su metástasis.
 - 2.4. Caracterizar posibles biomarcadores de los cSCC más agresivos y con mayor riesgo de metastatizar.

3. Estudiar el posible papel de CYLD como protector del envejecimiento:
 - 3.1. Caracterización de posibles signos de envejecimiento acelerado en el modelo de ratón K5-CYLD^{C/S}.
 - 3.2. Determinar si la función protectora del envejecimiento de CYLD puede ser un mecanismo por el que CYLD actúa como supresor tumoral.

Artículo 1

Resumen del trabajo “An inactivating CYLD mutation promotes skin tumor progression by conferring enhanced proliferative, survival and angiogenic properties to epidermal cancer cells”. Oncogene. 2010 Dec 16;29(50):6522-32. doi: 10.1038/onc.2010.378. Epub 2010 Sep 13.

El cáncer de piel no melanoma (BCCs y cSCC) representa la neoplasia más diagnosticada y su incidencia va en aumento. Aunque los cSCC son menos frecuentes que los BCCs (representan un 20% del CPNM), sin embargo pueden ser muy agresivos y metastatizar (entre un 5 y 15 % de ellos), no existiendo hasta la fecha una terapia eficaz para el tratamiento de estos cSCC de alto riesgo tan agresivos. Nuestro objetivo ha sido analizar si CYLD, proteína conocida por su función supresora tumoral de diversos tipos de cáncer, entre ellos de los tumores de los apéndices de la piel de los pacientes de cilindromatosis hereditaria, actúa también como supresor tumoral de los cSCC y podría servir como diana para el tratamiento de los cSCC más agresivos para los que no hay un tratamiento eficaz. Para la realización de este trabajo hemos generado una construcción que contiene un DNA complementario de CYLD que porta la mutación puntual C/S en el aminoácido 601 (cisteína) del dominio desubiquitinasa, lo que da lugar a la expresión de una proteína catalíticamente inactiva que actúa como dominante negativo inhibiendo la actividad catalítica de CYLD endógeno (esta mutación simula las encontradas en el gen *Cyld* de los pacientes de cilindromatosis hereditaria). La construcción CYLD^{C/S} la hemos expresado en las células epidérmicas tumorales PDVC57 que tienen el gen Ha-Ras mutado, como ocurre también en los cSCC humanos, y hemos seleccionado pools de células (para minimizar cualquier efecto potencial de la selección clonal) que expresan la forma mutada CYLD^{C/S} (células C57-CYLD^{C/S}) o el plásmido vacío (células C57-Control). Lo primero que hicimos fue comprobar mediante inmunoprecipitación con IKK γ , proteína sustrato de CYLD, que las células C57-CYLD^{C/S} presentaban inhibición de la función desubiquitinasa de CYLD. A continuación analizamos la vía de señalización de NF- κ B, ya que CYLD es principalmente conocido por ser un regulador negativo de esta vía, y observamos que las células C57-CYLD^{C/S} tenían constitutivamente activada la vía clásica de señalización de NF- κ B (aumento de P-p65). El análisis morfológico de las células C57-CYLD^{C/S} mostró un cambio significativo, ya que mientras que las células C57-Control tenían un fenotipo epitelial, las C57-CYLD^{C/S} presentaban un aspecto fibroblastoide, que se acompañaba de la pérdida de localización transmembranal de Cadherina E. En consecuencia con estas alteraciones, las células C57-CYLD^{C/S} presentaban menor cohesión célula-célula, y en los experimentos de cicatrización, mostraron mayor capacidad migratoria. La expresión de la forma mutada CYLD^{C/S} confería además

ventaja proliferativa a las células C57 por incremento de la expresión de Ciclina D1. Se observó también que las células C57-CYLD^{C/S} eran más resistentes a muerte por apoptosis (por disminución de la expresión de las proteínas pro-apoptóticas Caspasa 3 y Bax). Presentaban asimismo mayor capacidad de supervivencia en experimentos de crecimiento en suspensión, lo que estaba mediado en gran parte por el aumento de la expresión de VEGF. La expresión incrementada de VEGF está asociada en tumorigénesis al aumento de angiogénesis y de oncogenicidad, por lo que analizamos la expresión de proteínas que pueden actuar como oncogenes y que están relacionadas con la vía de NF- κ B, como son Bcl-3 y β -catenina, y comprobamos que ambas proteínas estaban sobreexpresadas y deslocalizadas, ya que en las células C57-CYLD^{C/S} se localizaban principalmente en el núcleo. Por tanto, las alteraciones encontradas en las células C57-CYLD^{C/S} indicaban que la falta de función desubiquitinasa de CYLD aumentaba *in vitro* la malignidad tumoral de las células epidérmicas, por lo que a continuación realizamos experimentos de carcinogénesis mediante *xenoinjertos* para comprobar si *in vivo* CYLD tenía también este efecto antitumoral. Para estos estudios se inocularon subcutáneamente las células C57-Control y C57-CYLD^{C/S} en ratones inmunodeficientes. Se comprobó que los tumores que se desarrollaban a partir de las células C57-Control eran carcinomas bien diferenciados, por el contrario, los de las células C57-CYLD^{C/S} estaban pobremente diferenciados y expresaban marcadores de malignidad; el volumen de los carcinomas C57-CYLD^{C/S} era aproximadamente entre 6 y 7 veces mayor que el de los tumores C57-Control, debido a una mayor proliferación (tienen inducida la expresión de Ciclina D1) y menor apoptosis (tienen inhibida la expresión de Bax). Además los carcinomas C57-CYLD^{C/S} presentaban mayor expresión de diversos factores angiogénicos, entre ellos VEGF (el principal factor pro-angiogénico), lo que se correspondía con la presencia de mayor número de vasos sanguíneos, grandes y permeables. Tanto el incremento de la expresión de VEGF como la angiogénesis aumentada favorecen a su vez el crecimiento y la progresión tumoral. En conjunto, nuestros datos indican que la inhibición de la función desubiquitinasa de CYLD confiere a las células epidérmicas tumorales características más agresivas, aumentando la proliferación celular, migración, supervivencia y angiogénesis, lo que finalmente conduce a un aumento de la progresión tumoral de los cSCC.

Aportación personal en este trabajo**Parte experimental:**

Crecimiento de los clones PDVC57-Control y PDVC57-CYLD^{C/S} (previamente generados en el laboratorio) para su inoculación subcutánea en ratones inmunodeficientes y para la realización de experimentos de carcinogénesis mediante *xenoinjerto*. Seguimiento del crecimiento tumoral (realización de medidas de volumen y observación macroscópica diaria). Realización de las necropsias y recogida de las muestras tumorales para su posterior estudio y caracterización mediante distintos procedimientos: análisis histológico y tinciones inmunohistoquímicas (fijación en formol); conservación en N₂ líquido de muestras sólidas para obtención de extractos proteicos. Realización de experimentos de inmunoprecipitación para análisis funcional de la actividad desubiquitinasa de CYLD. Caracterización de las propiedades migratorias y de supervivencia celular en ausencia de suero. Caracterización molecular por inmunoblot de las proteínas expresadas por células y tumores mediante análisis de extractos proteicos totales y/o específicamente en el núcleo o citoplasma celular. Ensayo de Azul de Evans para la determinación de la permeabilidad de vasos sanguíneos.

En la elaboración del artículo:

Discusión de los resultados.

Contribución a la elaboración de figuras para la publicación.

ORIGINAL ARTICLE

An inactivating CYLD mutation promotes skin tumor progression by conferring enhanced proliferative, survival and angiogenic properties to epidermal cancer cells

JP Alameda^{1,4}, R Moreno-Maldonado^{1,4}, M Navarro¹, A Bravo², A Ramírez¹, A Page¹, JL Jorcano¹, MJ Fernández-Aceñero³ and ML Casanova¹

¹Division of Epithelial Biomedicine, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Madrid, Spain; ²Department of Veterinary Clinical Sciences, Veterinary Faculty, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain and ³Department of Pathology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

In this study, we demonstrate that the expression in tumorigenic epidermal cells of a catalytically inactive form of CYLD (CYLD^{C/S}) that mimics the identified mutations of *cyld* in human tumors and competes with the endogenous CYLD results in enhanced cell proliferation and inhibition of apoptosis; it also stimulates cell migration and induces the expression of angiogenic factors, including vascular endothelial growth factor-A. Altogether, these characteristics indicate an increased oncogenicity of the tumorigenic epidermal CYLD^{C/S} mutant cells *in vitro*. Moreover, we show the increase in malignancy of epidermal squamous cell carcinomas that express the CYLD^{C/S} transgene in an *in vivo* xenograft model. Tumors carrying the mutated CYLD^{C/S} exhibit a fast growth, are poorly differentiated and present a robust angiogenesis. CYLD^{C/S} tumors are also characterized by their elevated proliferation rate and decreased apoptosis. In contrast with previous studies showing the development of benign tumors by mutations in the *CYLD* gene, here we provide evidence that the occurrence of mutations in the *CYLD* gene in tumorigenic epidermal cells (carrying previous mutations) increases the aggressiveness of carcinomas, mainly through enhancement of the expression of angiogenic factors, having therefore a key role in epidermal cancer malignancy.

Oncogene (2010) 29, 6522–6532; doi:10.1038/onc.2010.378; published online 13 September 2010

Keywords: CYLD; angiogenesis; skin cancer; tumor progression

Introduction

Cyld encodes a 956-amino acid enzyme (CYLD) that is ubiquitously expressed and contains a deubiquitinating domain at the C-terminus, which removes lysine 63

linked polyubiquitin chains from distinct members of the nuclear factor (NF)- κ B pathway (Brummelkamp *et al.*, 2003; Kovalenko *et al.*, 2003; Regamey *et al.*, 2003; Trompouki *et al.*, 2003). CYLD negatively regulates NF- κ B activation, and mutations that inactivate the carboxyl-terminal deubiquitinating domain of CYLD deregulate the NF- κ B activity, underlying the development of skin appendage tumors in humans (Brummelkamp *et al.*, 2003; Kovalenko *et al.*, 2003; Trompouki *et al.*, 2003). CYLD was originally identified as a gene mutated in familial cylindromatosis (FC), a genetic condition that predisposes patients for the development of cylindromas, benign tumors that typically appear on the scalp (Bignell *et al.*, 2000). Cylindromatosis patients carry heterozygous germ-line mutations in the carboxyl-terminal end of the *CYLD* gene, but the wild-type CYLD allele undergoes loss of heterozygosity, indicating that CYLD appears as a tumor-suppressor gene (Bignell *et al.*, 2000). Cylindromas are usually benign, although occasionally they can malignize (Durani *et al.*, 2001; De Francesco *et al.*, 2005). Additional studies have associated *Cyld* down-regulation with the development of other types of human cancer including tumors of colon, lung and kidney, as well as melanomas and cervical and hepatocellular carcinomas (Strobel *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2004; Hirai *et al.*, 2004; Costello *et al.*, 2005; Hellerbrand *et al.*, 2007; Keats *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2007; Massoumi *et al.*, 2009). In the case of multiple myeloma and melanoma, it has been shown that its grade of malignancy is directly related with the silencing of CYLD, being of poor prognosis those tumors with lower expression level of CYLD (Annunziata *et al.*, 2007; Jenner *et al.*, 2007; Massoumi *et al.*, 2009).

Depending on the external signals, CYLD negatively regulates different NF- κ B pathways: inactivation of TRAF2 or TRAF6 causes survival and inflammation because of the classical NF- κ B constitutive activation (Brummelkamp *et al.*, 2003; Kovalenko *et al.*, 2003; Trompouki *et al.*, 2003) whereas inhibition of Bcl-3 controls proliferation and tumor growth. Thus, mice deficient in CYLD are more susceptible to develop chemically induced skin tumors (Massoumi *et al.*, 2006; Massoumi and Paus, 2007). In this case, the loss of

Correspondence: Dr ML Casanova, Division of Epithelial Biomedicine, CIEMAT, Avenida Complutense 22, Madrid 28040, Spain.
E-mail: llanos.casanova@ciemat.es

⁴These authors contributed equally to this work.

Received 18 December 2009; revised 18 March 2010; accepted 17 July 2010; published online 13 September 2010

CYLD in keratinocytes was linked to hyperproliferation and elevation in cyclin D1 levels because of increased nuclear activity of Bcl-3-associated NF- κ B p50 and p52 and is independent of the classical p65/NF- κ B pathway (Massoumi *et al.*, 2006). These investigators reported that in the case of non-melanoma skin cancer (NMSC) the analysis by microarrays of different types of human tumors suggests that there is a relationship between the level of CYLD expression and the grade of malignancy of the tumor: CYLD is clearly detected in normal skin, less expressed in benign basal cell carcinomas and poorly detected in malignant squamous cell carcinomas (SCCs) (Massoumi *et al.*, 2006). However, the relationship between CYLD silencing and worsening of tumors is not so firmly established in NMSC as in melanomas (Massoumi *et al.*, 2009).

The incidence of both benign and malignant skin neoplasms has been rising at an alarming rate for the past several years. NMSC is one of the most common malignancies in humans: basal cell carcinomas and SCCs represent the vast majority of the tumors diagnosed (Limmer, 2001). NMSC are believed to arise from stem cells of the hair follicles and their growth and development seems to rely on an early burst of neo-vascularization in which vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) is the main and most powerful factor involved (Larcher *et al.*, 1996, 1998; Detmar, 2000a).

To obtain a deeper understanding for possible skin SCCs therapies, it is important to find the signalling proteins involved in the progression of these carcinomas. Here, we have focused our attention to the study of the possible involvement of CYLD in skin tumor progression, as this gene has been implicated in the progression of different cancer cell types such as melanoma, colon, hepatocellular and multiple myeloma (Annunziata *et al.*, 2007; Hellerbrand *et al.*, 2007; Jenner *et al.*, 2007; Massoumi *et al.*, 2009).

In this study, we demonstrate that the expression of a catalytically inactive mutant form of CYLD (CYLD^{C/S}) in tumorigenic epidermal cells diminished the deubiquitinating activity of the endogenous CYLD, resulting in increased expression of several angiogenic factors, including VEGF-A, and accelerated proliferation and migration of tumoral cells, enhancing tumor progression.

Results

Effects of the catalytically inactive CYLD^{C/S} mutant in the PDVC57 tumorigenic epidermal cells

To explore the consequences of the expression of a mutant CYLD (defective in the deubiquitinating function) in tumoral epidermal cells, we introduced the mutant CYLD^{C/S} complementary DNA in the PDVC57 cell line. This mutant carries the 601^{C/S} point mutation in the cysteine box of the deubiquitinase domain, resulting in a catalytically inactive protein that is able to compete with the endogenous CYLD (Brummelkamp *et al.*, 2003; Trompouki *et al.*, 2003; Massoumi *et al.*, 2006, 2009). The PDVC57 cells were chosen because they bear a

Ha-*ras* mutation carried by all the chemically induced mouse skin tumors and some human skin carcinomas (Pierceall *et al.*, 1991; Spencer *et al.*, 1995). PDVC57 cells were stably transfected with the mouse CYLD^{C/S} complementary DNA tagged with a hemagglutinin-A epitope under the control of the β -actin promoter (Figure 1a) or with the empty vector. Pooled stable transfectants from approximately 60 different colonies were used to minimize any potential effect of clonal selection. They were designated as C57-CYLD^{C/S} and compared with C57-Control cells (expressing the CYLD^{C/S} transgene and the empty vector respectively). Western blotting against hemagglutinin-A and CYLD showed that C57-CYLD^{C/S} cells expressed the transgene and had increased levels of CYLD (Figure 1b) compared with endogenous CYLD in the C57-Control cells. To test the CYLD deubiquitination function we immunoprecipitated IKK γ /NEMO, a known substrate of CYLD, in untreated and tumor necrosis factor (TNF)- α treated C57-Control and CYLD^{C/S} cells and subsequently determined the modification of IKK γ with ubiquitin. In untreated cells, the polyubiquitination of IKK γ was weak and not very different between the two cell types. TNF- α stimulation failed to increase the polyubiquitination of IKK γ in control cells. By contrast, in agreement with the described competition of the catalytically inactive CYLD^{C/S} with the endogenous CYLD, TNF- α stimulation resulted in significant polyubiquitination of IKK γ in C57-CYLD^{C/S} cells (Figure 1c).

We analyzed the activation of the canonical NF- κ B pathway by measuring the active form of NF- κ B in cellular extracts from each cell type and found that CYLD^{C/S} caused an increase in NF- κ B activity both in the basal, unstimulated state of the C57-CYLD^{C/S} cells as well as after TNF- α stimulation (Figure 1d). The increased NF- κ B activity in mutant cells is in agreement with the increased levels of P-p65 detected in these cells (Figure 1b).

Therefore, the expression of a catalytically inactive CYLD in PDVC57 cells resulted in a diminished deubiquitination function and subsequent elevated activation of the classical NF- κ B pathway.

CYLD^{C/S} enhances the proliferation of tumorigenic epidermal cells

We examined a number of growth properties of C57-CYLD^{C/S} cells in monolayer cultures. Growth curves show that after 48 h of culture the growth profile of the CYLD^{C/S} cells experience a rapid increase in cell number (Figure 2a) that is accompanied by a significantly enhanced proliferation (Figure 2b). When the colony-forming efficiency was examined, we found that both types of cells formed a similar number of colonies. However, significant differences were found in colony size, that is, while most of the colonies in control cultures had <1 mm of diameter, the majority of the C57-CYLD^{C/S} colonies were of greater size (2–4 mm), indicating their increased long-term proliferation (Figure 2c). This result is in agreement with the

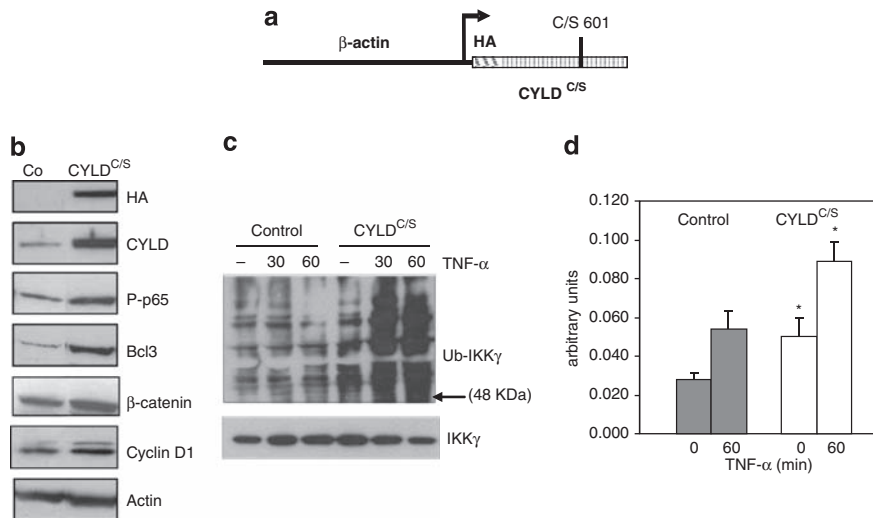


Figure 1 Functional and biochemical analysis of C57-CYLD^{C/S} cells. **(a)** Schematic representation of the CYLD^{C/S} construct. The CYLD^{C/S} complementary DNA (cDNA) tagged in 5' with a hemagglutinin A (HA) epitope is expressed under the β-actin promoter. **(b)** Molecular characterization by western blot of the C57-CYLD^{C/S} cells. Total protein extracts (40 μg) from C57-Control and CYLD^{C/S} cells (72 h of culture) were immunoblotted using the antibodies indicated. Actin was used as loading control. **(c)** Deubiquitination of IKK^γ/NEMO by CYLD. Endogenous ubiquitination of IKK^γ in C57-Control and CYLD^{C/S} cells in absence (–) or presence of TNF-α stimulation (30' and 60'). Top panel shows immunoprecipitation with an antibody directed against IKK^γ (300 μg of lysate). Immunoprecipitates were resolved on a sodium dodecyl sulfate (SDS) gel and probed with an anti-ubiquitin antibody, then stripped, and reprobed with an antibody against IKK^γ (showing that equal amounts of IKK^γ were used for immunoprecipitation). Observe that deubiquitination is less efficient when the CYLD^{C/S} mutant is expressed. **(d)** Effect of CYLD^{C/S} on NF-κB activation. Results of the p65-DNA-binding assay are shown. C57-CYLD^{C/S} cells showed increased NF-κB activity both in basal state and after TNF-α stimulation. **P* < 0.05, significant increase in NF-κB activity of CYLD^{C/S} cells respect to C57-Control cells in unstimulated cells and 60' post-TNF-α stimulation.

increased rate of BrdU incorporation detected in the C57-CYLD^{C/S} cells (Figure 2b). As a measure of cell proliferation we also compared cyclin D1 expression in cells of both genotypes (72 h of culture), finding that it was increased in the C57-CYLD^{C/S} cells (Figure 1b).

CYLD^{C/S} promotes a mesenchymal phenotype and enhances the migration of the C57-CYLD^{C/S} cells

Although C57-Control cells displayed an epithelial morphology, with abundant cell-to-cell interactions, C57-CYLD^{C/S} cells were more scattered and exhibited a mesenchymal spindle-shaped phenotype with limited intercellular contacts (Figure 2d). Accordingly, we found changes in E-cadherin distribution. In C57-Control cells, it was predominantly detected as a continuous line at cell–cell contacts. However, it was irregularly distributed in a pattern of dots or aggregates in most C57-CYLD^{C/S} cells (Figure 2d). The effect of the expression of CYLD^{C/S} on C57 cell motility was therefore evaluated by an *in vitro* wound healing assay. Cells growing in monolayer cultures were subjected to a 'scratch' wound. On scratching, C57-CYLD^{C/S} cells formed large and abundant foci of migration while C57-Control cells formed scarce and small foci along the 'scratch' wound (Figure 2e).

CYLD^{C/S} enhances the survival of malignant epidermal cells

In addition to increased cell proliferation and migration, another marker of malignant progression of tumoral

cells is their anchorage-independent growth (Evan and Littlewood, 1998; Hanahan and Weinberg, 2000; Green and Evan, 2002). The effect of the expression of CYLD^{C/S} on the anchorage-independent growth of C57 cells was examined in suspension cultures. We found that CYLD^{C/S} leads to a significant survival of C57 cells after 24-h growing in suspension (Figure 3a).

We next studied the effect of the expression of CYLD^{C/S} on the survival of C57 cells maintained in serum-deprived medium. The number of cells that survive in serum-free cultures was higher in C57-CYLD^{C/S} than in C57-Control cultures (Figure 3b). Cleaved caspase3 immunostaining showed a significantly larger percentage of cells that undergo apoptosis in the C57-Control cultures grown in absence of serum than in C57-CYLD^{C/S} cells (Figure 3c). Similarly, western blot analysis showed a diminished expression of cleaved caspase-3 in the C57-CYLD^{C/S} cells (Figure 3d). The expression of other pro-apoptotic molecule, Bax, was also reduced in the C57-CYLD^{C/S} cells (Figure 3d). It is intriguing that the expression of Bax does not precede that of caspase 3 as it happens in the intrinsic apoptosis pathway. However, it has been recently shown that apoptosis may occur in a Bax-dependent–caspase 3-independent manner as well as in Bax-independent–caspase-dependent pathway (Li *et al.*, 2009; Scharstuhl *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Overall, our results indicate that the expression of CYLD^{C/S} in PDVC57 cells turns the cells more resistant to apoptosis under stress conditions, probably through inhibition of the expression of pro-apoptotic genes.

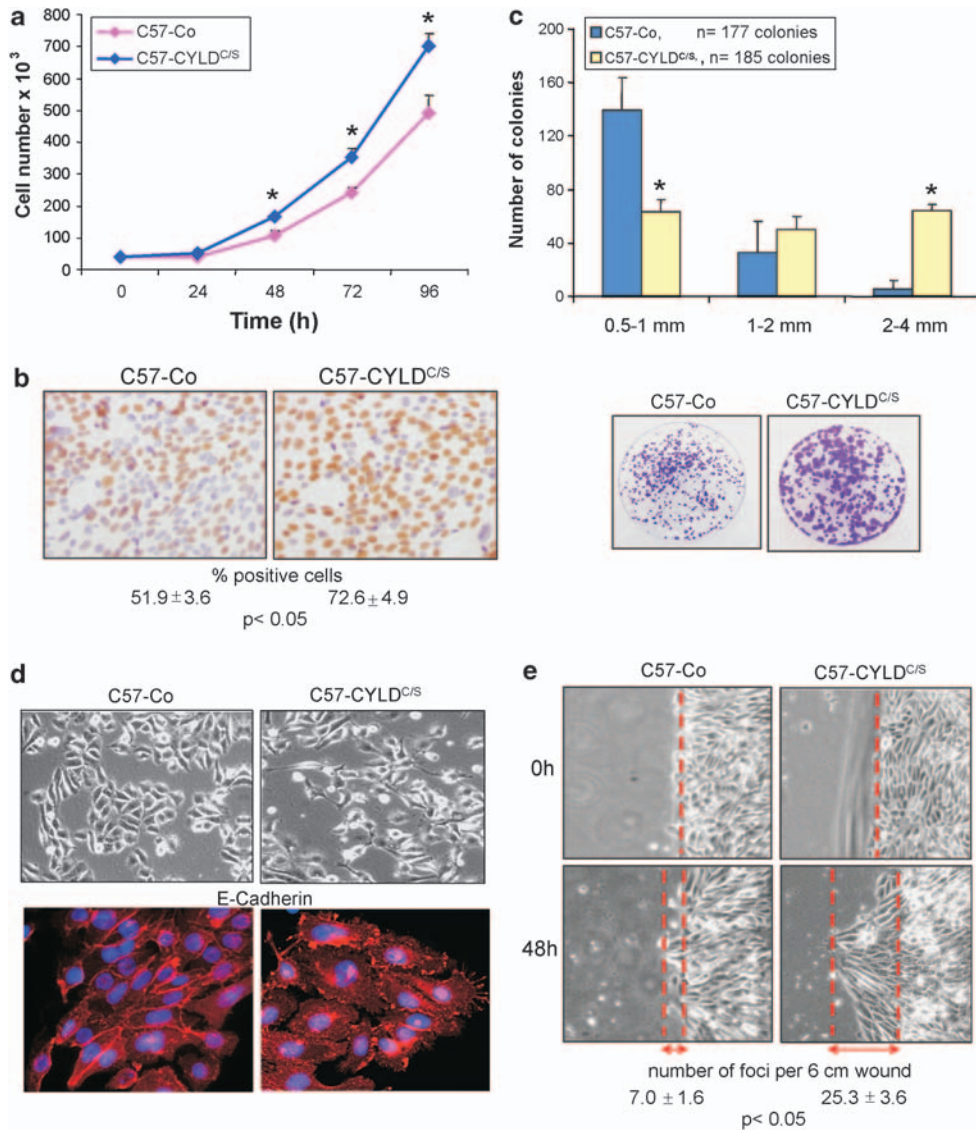


Figure 2 Enhanced cell proliferation and migration of C57-CYLD^{C/S} cells. (a) Growth curves of C57-Control and C57-CYLD^{C/S} cells. 5×10^4 cells were seeded at day 0. At the indicated times, cells were counted. Note the increased number of cells found in C57-CYLD^{C/S} cells since 48 h of culture. * $P < 0.05$, significant increase in CYLD^{C/S} cell number respect to that of C57-Control cells at the indicated time points. (b) BrdU incorporation by C57-Control and mutant cells after 72 h of culture in coverslides (cells were incubated with $10 \mu\text{M}$ BrdU for 1 h). (c) Clonogenic assay. Up, size diameter distribution of colonies coming from three different clonogenic experiments stained 2 weeks after seeding. * $P < 0.05$; down, representative image of colonies formed by C57-Control and C57-CYLD^{C/S} cells 14 days after seeding (stained with crystal violet). Colony size was measured using a magnifier. Colonies of diameter > 0.5 mm were counted and classified according to their diameter. (d) Up, scattered phenotype of C57-CYLD^{C/S} cells observed by phase contrast microscopy. Only fields containing similar number of cells in 48 h cultures were considered for the study. Down, immunofluorescence showing the presence of E-cadherin located at the intercellular contacts in the C57-Control cells and delocalized punctual staining of E-cadherin in the mutant cells. (e) Wound healing assay: note the large foci of migration formed by the C57-CYLD^{C/S} cells 48 h after the 'scratch' wound. Discontinued red lines indicate the migration distance. Those cellular formations with triangular shape constituted by enlarged and actively migrating cells were considered as foci of migration and scored in a blind manner by two persons.

CYLD^{C/S} induces the expression of angiogenic factors and oncogenic proteins in tumoral epidermal cells

One of the factors that determine an increased survival of cells in suspension is the expression of VEGF-A (Solovey *et al.*, 1999). We found that C57-CYLD^{C/S} cells secrete higher levels of VEGF-A than C57-Control cells (Figure 3e). To analyze whether this is a specific property of the C57 cells or, on the contrary, whether CYLD^{C/S} also enhances the VEGF-A expression in

other epidermal cells of different condition (tumoral or non-tumoral) and species, we transfected the non-tumorigenic human keratinocyte HaCaT cell line, and the murine PB transformed epidermal cells with the β -actin-CYLD^{C/S} construct. Pools of colonies constitutively expressing the CYLD^{C/S} were isolated and the expression level of angiogenic factors analyzed by northern blot (Figure 3f and Table 1). It was observed that VEGF-A expression was enhanced in all cell lines

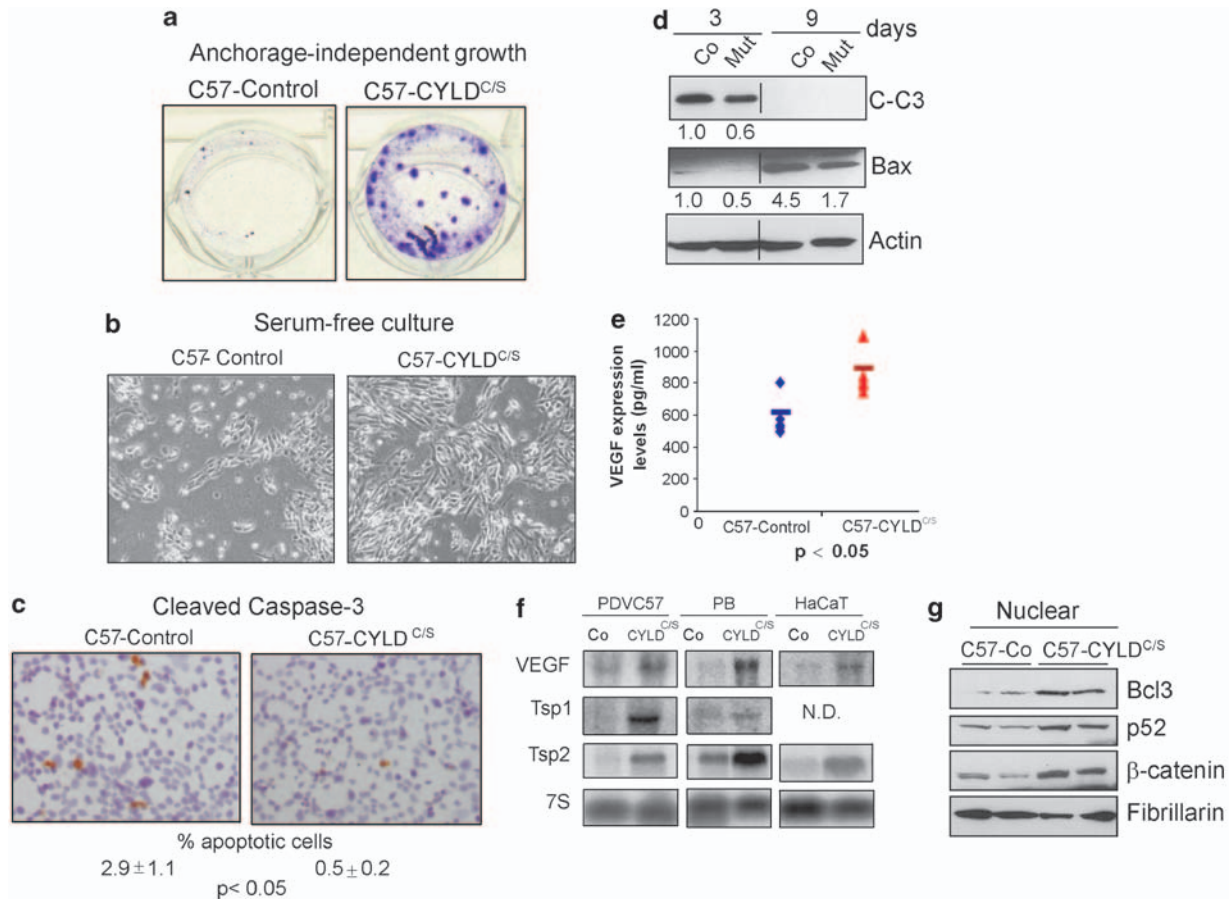


Figure 3 Increased survival of PDVC57 tumoral epidermal cells expressing the mutant CYLD^{C/S} complementary DNA (cDNA). **(a)** Anchorage-independent growth assay showing the increased capability of CYLD^{C/S} cells to survive after 24 h in suspension. Cells were fixed and stained with crystal violet. Experiments were performed three times per duplicate. **(b)** Representative images of C57-Control and C57-CYLD^{C/S} cells growing during 6 days in serum-deprived medium. Phase contrast microscopic images show an increased number of CYLD^{C/S} cells that survive in absence of serum. **(c)** Cleaved-caspase 3 immunostaining of C57-Control and C57-CYLD^{C/S} cells growing in absence of serum for 6 days. **(d)** Total protein extracts from C57-Control and CYLD^{C/S} cells grown in absence of serum for the indicated days were immunoblotted for cleaved-caspase-3 (C-C3) and Bax. Actin was used as loading control. **(e)** Quantification of VEGF-A in supernatants of C57-Control and CYLD^{C/S} cultures at near confluence, measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); $P < 0.05$, the difference in level of expression is statistically significant. **(f)** Representative northern blot showing the VEGF-A, Tsp-1 and Tsp-2 mRNA expression in Control and CYLD^{C/S}-transfected PDVC57, PB and HaCaT cell lines. 7S hybridization was used to control loading. **(g)** Western blot analysis of nuclear protein extracts from C57-Control and C57-CYLD^{C/S} cells. Fibrillarin was used as loading control.

expressing the CYLD^{C/S} construct (Table 1) irrespective of its origin (human or mouse) or its state (tumoral or non-tumoral). Other angiogenic factors, such as thrombospondins TSP-1 and TSP-2 were also induced in cells expressing the mutated form of CYLD (Figure 3f; see the quantification in Table 1).

As increased VEGF-A expression promotes tumoral angiogenesis and subsequent oncogenicity (Ferrara, 2002; Carmeliet, 2003; Ferrara *et al.*, 2003), we analyzed the expression of oncogenic molecules such as Bcl3 and β-catenin, which has been found to be oncogenic when located in the nucleus (Cogswell *et al.*, 2000; Thornburg *et al.*, 2003; Moon *et al.*, 2004; Clevers, 2006). Our results show an important increase in the total amount of both proteins (Figure 1b) and their preferential nuclear localization in the C57-CYLD^{C/S} cells (Figure 3g). The increase in nuclear Bcl3 and β-catenin

Table 1 Relative mRNA expression of angiogenic factors in different Control and CYLD^{C/S} murine and human epidermal cell lines

Cell line	VEGF	TSP1	TSP2
PDVC57-Co	1	1	1
PDVC57-CYLD ^{C/S}	2.1	9.5	8.4
PB-Co	1	1	1
PB-CYLD ^{C/S}	7.8	2.7	11.7
HaCaT-Co	1	ND	1
HaCaT-CYLD ^{C/S}	6.1	ND	4.1

Abbreviations: ND, not detected; TSP, thrombospondin; VEGF, vascular endothelial growth factor.

expression was accompanied by an increase in nuclear p52 in the mutant cells as it has been previously reported (Massoumi *et al.*, 2006).

The expression of CYLD^{C/S} in tumoral epidermal cells increases the malignancy of skin carcinomas

To determine whether the expression of the mutated CYLD^{C/S} in tumor epidermal cells also enhances tumorigenicity *in vivo*, we used a xenograft model of PDVC57 cells injected subcutaneously into immunodeficient mice.

The latency of macroscopic tumor appearance was approximately 1 week in the C57-CYLD^{C/S} tumors and 2 weeks in C57-Control tumors. Mutant tumors exhibited a very fast growth (Figure 4a). Tumors were harvested 17 days after injection. At this time C57-Control cells gave rise to relatively small and pale tumors. In contrast, C57-CYLD^{C/S} cells developed into larger tumor masses with a distinctive red appearance suggestive of a robust vascularization (Figure 4b); the size of the mutant tumors was on average ~6-fold greater than that of the controls (Figures 4a and b). We verified by western blot the expression of the transgene in tumors originated by C57-CYLD^{C/S} cells (Figure 5d).

Histopathological examination of tumors showed that while Control tumors were differentiated SCCs with frequent appearance of keratin pearls (Figure 4c), tumors originated from C57-CYLD^{C/S} cells were poorly differentiated SCCs (Figure 4c). Immunohistochemical analysis of the expression pattern of distinct differentiation markers further corroborated this diagnosis. Thus, C57-Control tumors expressed elevated levels of keratins K1 and K10—reliable markers of well-differentiated tumors. By contrast, in accordance with their poorly differentiated phenotype, C57-CYLD^{C/S} SCCs showed scarce expression of K1 and K10, limited to isolated cells (Figure 5a and data not shown). On the contrary, keratin K8, a marker of malignancy in skin tumors (Casanova *et al.*, 2004) showed extensive staining in the C57-CYLD^{C/S} carcinomas and weak expression in the C57-Control tumors (Figure 5a). K13, a keratin characteristic of internal stratified squamous epithelia, which is aberrantly expressed in skin tumors and is also considered a marker of tumor progression (Winter *et al.*, 1990; Moreno-Maldonado *et al.*, 2008) was also highly expressed in the C57-CYLD^{C/S} tumors and it was hardly detected in the C57-Control SCCs (Figure 5a). These data confirm that the tumors arising from C57-CYLD^{C/S} cells are more aggressive than those from control cells.

CYLD^{C/S} enhances the proliferation rate and survival of skin tumors

The increased size of C57-CYLD^{C/S} tumors could be due to increased cell proliferation and/or survival. To analyze apoptosis in C57-CYLD^{C/S} and C57-Control tumors, we performed TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) staining and immunoblot of the pro-apoptotic protein Bax. TUNEL assay revealed a ~6-fold reduction in the number of apoptotic keratinocytes in the C57-CYLD^{C/S} tumors, indicating that the expression of the catalytically inactive CYLD^{C/S} increases survival of tumoral cells (Figure 5b). In agreement with this result, expression of Bax was detected in control tumors but not in the CYLD^{C/S}

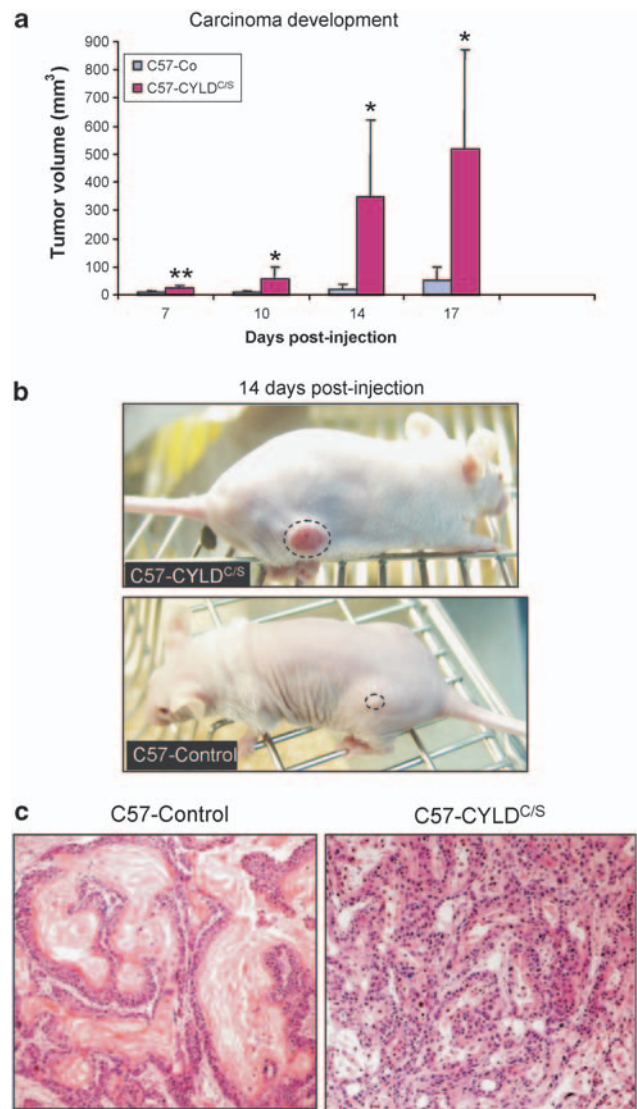


Figure 4 The reduction of the CYLD function enhances skin tumor growth and malignancy *in vivo*. (a) Tumor growth was followed for 17 days and measured with an external caliper. The volume was calculated as $(4\pi/3) \times (\text{width}/2)^2 \times (\text{length}/2)$. The number of tumors for each experimental group was 18 or 20. The asterisks denotes statistically significant difference from control mice * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (b) Example of subcutaneous tumors in the flanks of mice at 14 days post-injection. Each cell type was injected into six mice per experiment; the experiments were repeated twice. Note the larger size and reddish appearance of C57-CYLD^{C/S} tumors. (c) Hematoxylin and eosin (H&E) histological analysis of C57-Control and C57-CYLD^{C/S} tumors. Observe the differentiated SCC phenotype of C57-Control-derived SCCs, formed by nests and strands of epithelial cells with frequent horny areas. By contrast, C57-CYLD^{C/S} tumors are poorly differentiated.

tumors (Figure 5d). To analyze cell proliferation, we compared BrdU incorporation and cyclin D1 expression between control and mutant tumors. The number of cells incorporating BrdU in the CYLD^{C/S} tumors was twofold that of positive cells in C57-Control tumors (Figure 5c). In accordance with this result, C57-CYLD^{C/S} carcinomas showed increased expression of cyclin D1

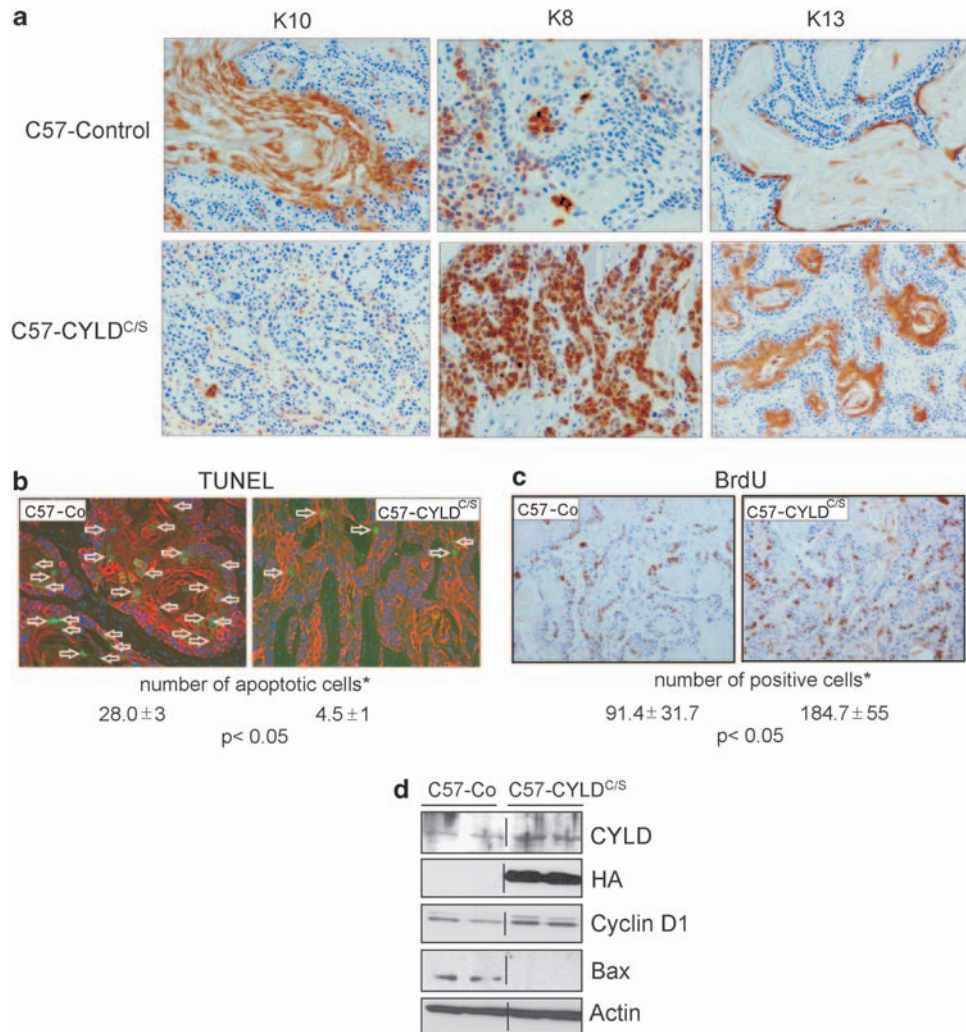


Figure 5 Characterization of C57-Control and C57-CYLD^{C/S} tumors by immunohistochemical analysis and western blot. **(a)** Analysis of the expression of keratins K8, K10 and K13 as markers of tumor progression. The widespread expression of K8 and K13 and the lack of K10 expression in C57-CYLD^{C/S} SCCs are indicative of enhanced aggressiveness of these tumors. **(b)** Analysis of apoptosis in C57-Control and C57-CYLD^{C/S} tumors by TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) assay. Observe the reduced number of apoptotic cells in the CYLD^{C/S} tumors (green, apoptotic cells; red, anti-K5 staining and blue, 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)). *Number of positive cells per field at magnification $\times 20$. **(c)** Analysis of proliferation in C57-Control and C57-CYLD^{C/S} tumors. Mice received an intraperitoneal injection of BrdU (120 mg/kg body weight) 1 h before tumor harvesting. Observe the increased number of BrdU-positive cells in the CYLD^{C/S} tumors. *Number of proliferating cells per field at magnification $\times 10$. **(d)** Western blots showing the expression of the transgene and the increased levels of total CYLD in the C57-CYLD^{C/S} tumors. CYLD^{C/S} tumors expressed high levels of Cyclin D1 and reduced levels of the proapoptotic protein Bax compared with C57-Control tumors.

(Figure 5d). Together, these results suggest that the expression of CYLD increases epidermal tumor promotion by enhancing both tumor cell proliferation and survival.

CYLD^{C/S} enhances angiogenesis in skin carcinomas

The red appearance of the C57-CYLD^{C/S} SCCs pointed to a strong blood supply that could also explain the enhanced growth of these carcinomas. We therefore analyzed at the cellular and molecular levels the changes in vascularization produced by the expression of the mutant CYLD in skin tumors derived from C57-CYLD^{C/S} and C57-Control cells. Northern blot analysis

showed that the expression of VEGF-A, TSP-1 and TSP-2 was enhanced in the CYLD^{C/S} tumors (Figure 6b; see the quantification in Table 2). Immunostaining of CD31, a marker of endothelial cells showed in control tumors a blood vessels pattern characterized predominantly by narrow and small capillaries; by contrast, CYLD^{C/S} carcinomas showed a network of large and lacunar vessels (Figure 6a). We next examined whether these changes in tumor vascularization led to substantial differences in vascular functionality. Tumor-bearing animals were anesthetized and a dye (Evans blue) was injected into the tail vein. We found that dye accessibility to the tumors was much higher in C57-CYLD^{C/S} carcinomas than in C57-Control tumors (Figure 6c).

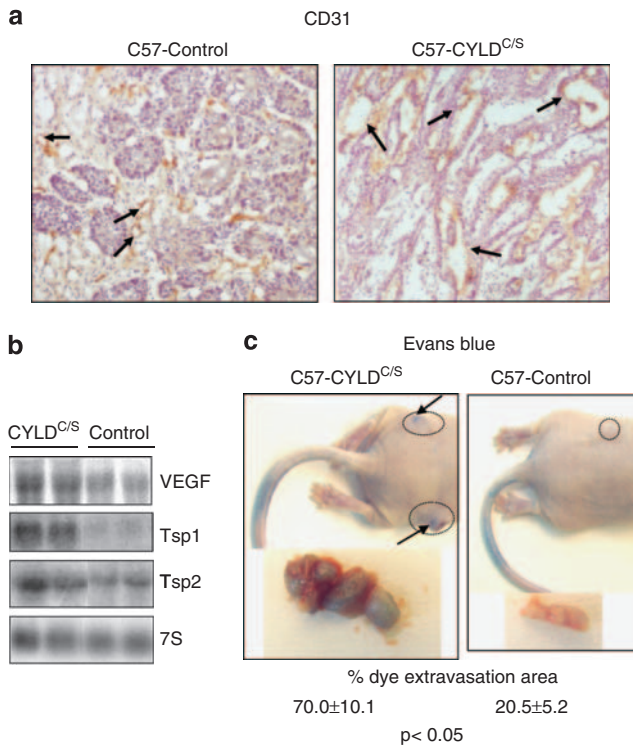


Figure 6 CYLD^{C/S} enhances angiogenesis in skin tumors. (a) CD31 immunostaining of blood vessels. Note that CYLD^{C/S} carcinomas show dilated blood vessels, whereas vessels of Control tumors are narrow. (b) Representative northern blot showing the VEGF-A, Tsp-1 and Tsp-2 mRNA expression in Control and CYLD^{C/S} tumors. 7S probe was used to control loading. (c) Examples of subcutaneous tumors *in situ* after systemic Evans blue injection (30 mg/kg) into the tail vein of mice and allowed to circulate for 5 min. Injections were made in three Control and three CYLD^{C/S} tumor-bearing mice. Note the blue color reflecting the dye accessibility of C57-CYLD^{C/S} tumors.

Table 2 Relative mRNA expression of angiogenic factors in C57-Control and C57-CYLD^{C/S} tumors

	No. of tumors ^a	VEGF	TSP1	TSP2
C57-Co	7	1	1	1
C57-CYLD ^{C/S}	7	1.7	3.9	1.5

Abbreviations: TSP, thrombospondin; VEGF, vascular endothelial growth factor.

^aTumors were analyzed 17 days post-inoculation.

These observations indicate that the vascular network of actively growing C57-CYLD^{C/S} carcinomas is large, plastic and leaky whereas that of the slowly growing C57-Control tumors is smaller and impermeable.

Discussion

Our studies indicate that a decrease in CYLD function results in an increase in the malignant behavior of the tumor epidermal cells and in the progression of skin

carcinomas, as seen by an enhancement in proliferation and survival of the cells expressing the mutant CYLD^{C/S}. This could be explained by the higher NF-κB activity found in the C57-CYLD^{C/S} cells, in line with the findings indicating that malignant epidermal cells have accumulated molecular alterations that enable a 'switch' of NF-κB function from being a tumor suppressor in normal murine and human keratinocytes (Seitz *et al.*, 1998; van Hogerlinden *et al.*, 1999; Dajee *et al.*, 2003) to being a tumor promoter (Ren *et al.*, 2006). Tumor epidermal cells expressing CYLD^{C/S} also show an important increase in the nuclear localization of Bcl3, p52 and β-catenin. We also find an increase in cyclin D1 expression, likely because of the increase in nuclear Bcl3/p52. This could also explain the increased proliferation and enhanced aggressiveness of C57-CYLD^{C/S} cells, as activated nuclear Bcl3/p50/p52 expression has been shown to promote cell proliferation and oncogenesis through the activation of the cyclin D1 gene in breast and nasopharyngeal human tumors (Cogswell *et al.*, 2000; Thornburg *et al.*, 2003). Increased nuclear localization of p50/p52 and Bcl3 was also found in advanced stages of mouse skin carcinomas (Budunova *et al.*, 1999). Nuclear Bcl3 has been detected in cylindroma cells, whereas normal skin keratinocytes retain Bcl3 in the cytoplasm (Massoumi *et al.*, 2006). An increase in nuclear Bcl3 accumulation and transcription of cyclin D1 was also observed in CYLD-deficient keratinocytes (Massoumi *et al.*, 2006). Our results show that CYLD^{C/S} may also favor the malignancy of the epithelial cells by promoting mesenchymal features, such as the fibroblast-like morphology, delocalized E-cadherin expression and increased migration. In addition, we have corroborated *in vivo* the enhanced malignancy of C57-CYLD^{C/S} cells, in a xenograft model of skin carcinogenesis and we checked that in another tumor epidermal cell line (PB cells), CYLD^{C/S} also increases the aggressiveness of both cells and tumors originated in xenograft assays (Alameda *et al.*, unpublished results).

Notably, our findings reveal a yet unknown link between VEGF-A and CYLD in epidermal cells and skin tumors. We have demonstrated that a decrease in CYLD catalytic activity results in a striking induction of VEGF-A expression both in tumoral and non-tumoral keratinocytes, as well as in skin carcinomas. It is well established that VEGF-A is the main angiogenic factor involved in physiologic and pathologic skin processes including wound healing, ultraviolet response, psoriasis and tumorigenesis (Ferrara, 2000; Detmar, 2000a, b). In the case of skin cancer, VEGF-A overexpression in murine epidermis predisposes mice to tumor development (Larcher *et al.*, 1998; Detmar, 2000b), and very recently it has been reported that VEGF-A has a relevant role not only in the first stage of neoangiogenesis establishment but also in the advanced stages of tumor progression of several malignancies, including TMSC (Mirones *et al.*, 2009).

Our data indicate that besides the high proliferation rate and reduced apoptosis, enhanced growth of C57-CYLD^{C/S} tumors may also be due to the induction of angiogenesis, as in addition to their increased VEGF-A

expression, C57-CYLD^{C/S} tumors also develop large and lacunar blood vessels, a prominent feature of skin tumor progression (Bolontrade *et al.*, 1998). It will be interesting to test whether the induction of VEGF-A expression also takes place in human neoplasias associated with a reduced expression of CYLD (such as colon, lung, kidney, cervical and hepatocellular carcinomas).

Our results show an increase in nuclear accumulation and then activation of β -catenin when the function of CYLD is diminished in C57-CYLD^{C/S} cells. This finding has been very recently corroborated by a work, which describes that loss of CYLD impairs K63-deubiquitination of Dvl enhancing Wnt-induced accumulation of nuclear β -catenin (Tauriello *et al.*, 2010). Constitutive β -catenin activation has been documented in several human cancers. In the case of human colon carcinomas, activating mutations have been described (Kinzler and Vogelstein, 1996). However, in multiple myeloma and other hematologic malignancies, no mutations have been identified in the Wnt/ β -catenin pathway, indicating alternative mechanisms for β -catenin activation (Derksen *et al.*, 2004; Qiang *et al.*, 2005; Sukhdeo *et al.*, 2007). Interestingly CYLD expression is downregulated in multiple myeloma (Annunziata *et al.*, 2007), suggesting that similarly to our model, reduced CYLD activity could cause activation of β -catenin in this type of cancer.

Our results showing the increased malignancy of skin tumors by a reduction in CYLD function are in agreement with observations indicating that CYLD expression is reduced in benign basal cell carcinomas and absent in malignant SCCs (Massoumi *et al.*, 2006). However, in contrast with our findings, *cyld*^{-/-} mice exhibit increased susceptibility to the development of skin cancer, although no signs of malignancy were found in those tumors developed (Massoumi *et al.*, 2009). The reason could be that in our model, the acquired mutation in CYLD is posterior to a preexisting ras-mutation in the epidermal cells, instead of constituting the only mutagenic event, as in the *cyld*^{-/-} mice model. In the case of melanoma, in which it has been described that reduced levels of CYLD promote the aggressiveness of the tumors, the reduction in CYLD expression also takes place after previous mutation/s have caused the tumor development (Massoumi *et al.*, 2006). This could explain why malignization of cylindromas in patients of FC occurs with very low frequency (Durani *et al.*, 2001; De Francesco *et al.*, 2005); it could be due to the early age of outcome of the disease (from childhood to the second decade of the life) when previous mutations have not had time to occur in these patients.

Therefore, on the basis of our observations, we propose a model wherein the diminished function of CYLD confers aggressive characteristics to already tumorigenic epidermal cells, enhancing cell proliferation, migration, survival and angiogenesis. Moreover, in addition to the role of CYLD in the regulation of the canonical NF- κ B signaling pathway and the p52-Bcl3-dependent activation, we have established that CYLD has an important role in tumor progression by regulating the expression of angiogenic factors and β -catenin nuclear localization.

Materials and methods

Cell lines and culture conditions

PDVC57, HaCaT and PB cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-10% fetal calf serum; transfected using the calcium phosphate method and selected using G418 (0.45 mg/ml).

DNA constructs

CYLD^{C/S} complementary DNA was kindly provided by Dr R Bernards and subcloned under the β -actin promoter. β -actin-control construct has been described (Frederickson *et al.*, 1989).

Cell proliferation assay

5×10^4 cells per p60 were seeded in complete medium. At 24, 48, 72 and 96 h cells were trypsinized and counted in a Neubauer chamber. Experiments were repeated three times.

Cell suspension growth

Multiwell plates were covered with 0.9% agarose in DMEM. After 1 h, 3×10^5 cells were added. After 24 h, multiwells were seeded with 600 μ l aliquots of the cellular suspension and feeded with DMEM-10% fetal bovine serum for 48 h.

Growth in serum-free medium

Cells were seeded into p60-plates in complete medium. After 24 h, the medium was replaced by serum-free DMEM. Cells were observed daily during 6 days.

Immunoblots and immunoprecipitation

Membranes were probed with antibodies against hemagglutinin-A epitope (Covance, San Diego, CA, USA); CYLD, Bcl3, bax, actin, fibrillarin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., London, UK); phospho-NF- κ B p65, ubiquitin, cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); IKK β , IKK γ /NEMO (IMGENEX, San Diego, CA, USA); β -catenin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); cyclin D1 (NeoMarkers, Fremont, CA, USA); p52 (Abcam, Cambridge, UK) and tubulin (Sigma, St Louis, MO, USA). For immunoprecipitation, total lysates were obtained from untreated or human TNF α -treated (50 ng/ml; Sigma) C57 cells. See Supplementary Information for additional details.

Immunohistochemical and immunofluorescence staining

Cells were fixed in methanol/acetone (1/1). Murine tumors were fixed in 70% ethanol and embedded in paraffin. Cells and tumor sections were stained with antibodies against keratins K1, K5 (Covance); K10 (Sigma); keratin K13 (Abcam); keratin K8 (TROMA 1); CD31, E-cadherin (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and BrdU (Roche, Mannheim, Germany).

NF- κ B activity assay

Activation of the NF- κ B pathway was determined by the NF- κ B p50/p65 EZ-TFA Transcription Factor Assay that measures the active form of NF- κ B in protein extracts by using a double-stranded biotinylated oligonucleotide containing the consensus sequence for NF- κ B binding (Millipore, MA, USA). We have followed manufacturer's instructions. See further description in the Supplementary Information section.

Wound healing assay

Cells growing in monolayer cultures were incubated 2 h in DMEM plus 5 µg/ml of mitomycin C, and then washed with PBS. After 1 h, a 'scratch' wound was created *in vitro* by scraping the cell monolayer with a sterile pipette tip.

Colony-forming assay

A total of 3 and 6 × 10² cells were seeded per duplicate in DMEM-10% fetal bovine serum in p100 plates. Media were replaced every 4 days.

Northern blotting

Total RNA was isolated using TRIzol (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) following manufacturer's instructions. In all, 20 µg/lane of RNA were probed for the expression of VEGF-A, Tsp-1 and Tsp-2 (Casanova *et al.*, 2002).

Enzyme-linked immunosorbent assay

Secreted VEGF-A isoform was measured in culture medium by enzyme-linked immunosorbent assay using a commercial kit, following manufacturer's instructions (Quantikine Mouse VEGF Immunoassay; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Xenograft model of skin carcinogenesis

Tumors were induced in nude mice (Hsd-Athymic Nude, Harlan, Barcelona, Spain) by subcutaneous flank inoculation of 10⁶ PDVC57 Control or -CYLD^{C/S} cells. Experimental procedures were performed according to European and Spanish laws.

References

Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F *et al.* (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* **12**: 115–130.

Bignell GR, Warren W, Seal S, Takahashi M, Rapley E, Barfoot R *et al.* (2000). Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet* **25**: 160–165.

Bolontrade MF, Stern MC, Binder RL, Zenklusen JC, Gimenez-Conti IB, Conti CJ. (1998). Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors. *Carcinogenesis* **19**: 2107–2113.

Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, Bernards R. (2003). Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* **424**: 797–801.

Budunova IV, Perez P, Vaden VR, Spiegelman VS, Slaga TJ, Jorcano JL. (1999). Increased expression of p50-NF-kappaB and constitutive activation of NF-kappaB transcription factors during mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* **18**: 7423–7431.

Carmeliet P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**: 653–660.

Casanova ML, Bravo A, Martinez-Palacio J, Fernandez-Acenero MJ, Villanueva C, Larcher F *et al.* (2004). Epidermal abnormalities and increased malignancy of skin tumors in human epidermal keratin 8-expressing transgenic mice. *Faseb J* **18**: 1556–1558.

Casanova ML, Larcher F, Casanova B, Murillas R, Fernandez-Acenero MJ, Villanueva C *et al.* (2002). A critical role for ras-mediated, epidermal growth factor receptor-dependent angiogenesis in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* **62**: 3402–3407.

Clevers H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**: 469–480.

Cogswell PC, Guttridge DC, Funkhouser WK, Baldwin Jr AS. (2000). Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast

Vascular permeability assay

Plasma leakage was determined using Evans blue dye as previously described (Thurston *et al.*, 1998).

Abbreviations

NMSC, non-melanoma skin cancer; HA, hemagglutinin-A.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Dr R Bernards for providing the CYLD^{C/S} cDNA; M Isabel de los Santos and Federico Sánchez-Sierra for invaluable assistance in the histological and immunohistochemical analyses; Juan Manuel Luque and Soledad Moreno for technical assistance; and Jesús Martínez, Edilia Almeida and the personnel of the CIEMAT Animal Unit for care of the mice used. This work was funded by grant from the *Ministerio de Sanidad* (PI061233, PI060655) to MLC and AR respectively and a grant from the Ministerio de Educación y Ciencia (PSE-010000-2008-7).

cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene* **19**: 1123–1131.

Costello CM, Mah N, Hasler R, Rosenstiel P, Waetzig GH, Hahn A *et al.* (2005). Dissection of the inflammatory bowel disease transcriptome using genome-wide cDNA microarrays. *PLoS Med* **2**: e199.

Dajee M, Lazarov M, Zhang JY, Cai T, Green CL, Russell AJ *et al.* (2003). NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. *Nature* **421**: 639–643.

De Francesco V, Frattasio A, Pillon B, Stinco G, Scott CA, Trotter D *et al.* (2005). Carcinosarcoma arising in a patient with multiple cylindromas. *Am J Dermatopathol* **27**: 21–26.

Derksen PW, Tjin E, Meijer HP, Klok MD, MacGillavry HD, van Oers MH *et al.* (2004). Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 6122–6127.

Detmar M. (2000a). The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. *J Dermatol Sci* **24**(Suppl 1): S78–S84.

Detmar M. (2000b). Tumor angiogenesis. *J Invest Dermatol Symp Proc* **5**: 20–23.

Durani BK, Kurzen H, Jaeckel A, Kuner N, Naehar H, Hartschuh W. (2001). Malignant transformation of multiple dermal cylindromas. *Br J Dermatol* **145**: 653–656.

Evan G, Littlewood T. (1998). A matter of life and cell death. *Science* **281**: 1317–1322.

Ferrara N. (2000). VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 617–624.

Ferrara N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* **2**: 795–803.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**: 669–676.

Frederickson RM, Micheau MR, Iwamoto A, Miyamoto NG. (1989). 5' Flanking and first intron sequences of the human beta-actin gene required for efficient promoter activity. *Nucleic Acids Res* **17**: 253–270.

- Green DR, Evan GI. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell* **1**: 19–30.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57–70.
- Hashimoto K, Mori N, Tamesa T, Okada T, Kawauchi S, Oga A *et al.* (2004). Analysis of DNA copy number aberrations in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinomas by conventional CGH and array CGH. *Mod Pathol* **17**: 617–622.
- Hellerbrand C, Bumes E, Bataille F, Dietmaier W, Massoumi R, Bosserhoff AK. (2007). Reduced expression of CYLD in human colon and hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* **28**: 21–27.
- Hirai Y, Kawamata Y, Takeshima N, Furuta R, Kitagawa T, Kawaguchi T *et al.* (2004). Conventional and array-based comparative genomic hybridization analyses of novel cell lines harboring HPV18 from glassy cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Oncol* **24**: 977–986.
- Jenner MW, Leone PE, Walker BA, Ross FM, Johnson DC, Gonzalez D *et al.* (2007). Gene mapping and expression analysis of 16q loss of heterozygosity identifies WWOX and CYLD as being important in determining clinical outcome in multiple myeloma. *Blood* **110**: 3291–3300.
- Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ *et al.* (2007). Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* **12**: 131–144.
- Kinzler KW, Vogelstein B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**: 159–170.
- Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israel A, Wallach D, Courtois G. (2003). The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* **424**: 801–805.
- Larcher F, Murillas R, Bolontrade M, Conti CJ, Jorcano JL. (1998). VEGF/VPF overexpression in skin of transgenic mice induces angiogenesis, vascular hyperpermeability and accelerated tumor development. *Oncogene* **17**: 303–311.
- Larcher F, Robles AI, Duran H, Murillas R, Quintanilla M, Cano A *et al.* (1996). Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels. *Cancer Res* **56**: 5391–5396.
- Li H, Zhu X, Zhang Y, Xiang J, Chen H. (2009). Arsenic trioxide exerts synergistic effects with cisplatin on non-small cell lung cancer cells via apoptosis induction. *J Exp Clin Cancer Res* **28**: 110.
- Limmer BL. (2001). Nonmelanoma skin cancer: today's epidemic. *Tex Med* **97**: 56–58.
- Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, Pfeifer A, Fassler R. (2006). Cylid inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell* **125**: 665–677.
- Massoumi R, Kuphal S, Hellerbrand C, Haas B, Wild P, Spruss T *et al.* (2009). Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma. *J Exp Med* **206**: 221–232.
- Massoumi R, Paus R. (2007). Cyldromatosis and the CYLD gene: new lessons on the molecular principles of epithelial growth control. *Bioessays* **29**: 1203–1214.
- Mirones I, Conti CJ, Martinez J, Garcia M, Larcher F. (2009). Complexity of VEGF responses in skin carcinogenesis revealed through *ex vivo* assays based on a VEGF-A null mouse keratinocyte cell line. *J Invest Dermatol* **129**: 730–741.
- Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* **5**: 691–701.
- Moreno-Maldonado R, Ramirez A, Navarro M, Fernandez-Acenero MJ, Villanueva C, Page A *et al.* (2008). IKKalpha enhances human keratinocyte differentiation and determines the histological variant of epidermal squamous cell carcinomas. *Cell Cycle* **7**: 2021–2029.
- Pierceall WE, Goldberg LH, Tainsky MA, Mukhopadhyay T, Ananthaswamy HN. (1991). Ras gene mutation and amplification in human nonmelanoma skin cancers. *Mol Carcinog* **4**: 196–202.
- Qiang YW, Walsh K, Yao L, Kedei N, Blumberg PM, Rubin JS *et al.* (2005). Wnts induce migration and invasion of myeloma plasma cells. *Blood* **106**: 1786–1793.
- Regamey A, Hohl D, Liu JW, Roger T, Kogerman P, Toftgard R *et al.* (2003). The tumor suppressor CYLD interacts with TRIP and regulates negatively nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor. *J Exp Med* **198**: 1959–1964.
- Ren Q, Kari C, Quadros MR, Burd R, McCue P, Dicker AP *et al.* (2006). Malignant transformation of immortalized HaCaT keratinocytes through deregulated nuclear factor kappaB signaling. *Cancer Res* **66**: 5209–5215.
- Scharstuhl A, Mutsaers HA, Pennings SW, Russel FG, Wagener FA. (2009). Involvement of VDAC, Bax and ceramides in the efflux of AIF from mitochondria during curcumin-induced apoptosis. *PLoS One* **4**: e6688.
- Seitz CS, Lin Q, Deng H, Khavari PA. (1998). Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2307–2312.
- Solovey A, Gui L, Ramakrishnan S, Steinberg MH, Heibel RP. (1999). Sick cell anemia as a possible state of enhanced anti-apoptotic tone: survival effect of vascular endothelial growth factor on circulating and unanchored endothelial cells. *Blood* **93**: 3824–3830.
- Spencer JM, Kahn SM, Jiang W, DeLeo VA, Weinstein IB. (1995). Activated ras genes occur in human actinic keratoses, premalignant precursors to squamous cell carcinomas. *Arch Dermatol* **131**: 796–800.
- Strobel P, Zettl A, Ren Z, Starostik P, Riedmiller H, Storkel S *et al.* (2002). Spiradenocylindroma of the kidney: clinical and genetic findings suggesting a role of somatic mutation of the CYLD1 gene in the oncogenesis of an unusual renal neoplasm. *Am J Surg Pathol* **26**: 119–124.
- Sukhdeo K, Mani M, Zhang Y, Dutta J, Yasui H, Rooney MD *et al.* (2007). Targeting the beta-catenin/TCF transcriptional complex in the treatment of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 7516–7521.
- Tauriello DV, Haegebarth A, Kuper I, Edelmann MJ, Henraat M, Canninga-van Dijk MR *et al.* (2010). Loss of the tumor suppressor CYLD enhances Wnt/beta-catenin signaling through K63-linked ubiquitination of Dvl. *Mol Cell* **37**: 607–619.
- Thornburg NJ, Pathmanathan R, Raab-Traub N. (2003). Activation of nuclear factor-kappaB p50 homodimer/Bcl-3 complexes in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* **63**: 8293–8301.
- Thurston G, Murphy TJ, Baluk P, Lindsey JR, McDonald DM. (1998). Angiogenesis in mice with chronic airway inflammation: strain-dependent differences. *Am J Pathol* **153**: 1099–1112.
- Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschirritzis T, Farmer H, Ashworth A, Mosialos G. (2003). CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* **424**: 793–796.
- van Hogerlinden M, Rozell BL, Ahrlund-Richter L, Toftgard R. (1999). Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res* **59**: 3299–3303.
- Winter H, Rentrop M, Nischt R, Schweizer J. (1990). Tissue-specific expression of murine keratin K13 in internal stratified squamous epithelia and its aberrant expression during two-stage mouse skin carcinogenesis is associated with the methylation state of a distinct CpG site in the remote 5'-flanking region of the gene. *Differentiation* **43**: 105–114.
- Zhang W, Wang Z, Chen T. (2010). Curcumin induces apoptosis via caspases-independent mitochondrial pathway in human lung adenocarcinoma ASTC-a-1 cells. *Med Oncol* **37**: 607–619.
- Zhong S, Fields CR, Su N, Pan YX, Robertson KD. (2007). Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA methylation and histone deacetylation in lung cancer. *Oncogene* **26**: 2621–2634.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Artículo 2

Resumen del trabajo “CYLD regulates keratinocyte differentiation and skin cancer progression in humans”. Cell Death Dis. 2011 Sep 8;2:e208. doi: 10.1038/cddis.2011.82.

La piel es el órgano que presenta más enfermedades, entre ellas enfermedades inflamatorias y cáncer de piel. La capa más externa de la piel es la epidermis, que constituye la barrera más importante del cuerpo frente al ambiente externo hostil. La epidermis es un epitelio estratificado, cornificado y polarizado. Está compuesta por capas de queratinocitos que proliferan en su base (queratinocitos basales) y diferencian progresivamente a medida que ascienden a capas superiores más externas, de modo que cuando están terminalmente diferenciados, pierden su núcleo dando lugar a escamas cornificadas. Para que los queratinocitos ejerzan su función correctamente es necesario que mantengan un perfecto equilibrio entre su tasa de proliferación, diferenciación y apoptosis; también deben conservar su polaridad. Las alteraciones en estas propiedades dan lugar al desarrollo de enfermedades, incluido el cáncer de piel no melanoma (CPNM). Anteriormente nuestro grupo había descrito la importante función que CYLD desempeña como supresor del CPNM en ratón, en concreto hemos explicado su acción supresora tumoral de la forma más agresiva del CPNM, los carcinomas escamosos cutáneos, cSCC. Sin embargo, aunque se había descrito que CYLD se expresaba en la piel, se desconocía qué función desempeñaba en ella; tampoco se había estudiado si CYLD actúa como supresor tumoral de los cSCC humanos. En este trabajo hemos abordado estas dos cuestiones. En los estudios sobre la función de CYLD en la piel hemos utilizado la línea de queratinocitos humanos no tumorales HaCaT. Estas células tienen la propiedad de diferenciar *in vitro*, cuando se cultivan en ausencia de suero, formando focos de estratificación que expresan la queratina de diferenciación temprana K10. Además, son capaces de crecer en cultivos organotípicos 3D (también llamados equivalentes de piel) que imitan una piel humana, y están formados por un componente epidérmico de queratinocitos y un componente dérmico de fibroblastos. Se transfectaron las células HaCaT de forma estable con el cDNA de la forma salvaje de CYLD (CYLD^{wt}), la forma mutada CYLD^{C/S} (comentada en el artículo anterior), o con el vector vacío. Se eligieron pools de clones (para minimizar cualquier efecto potencial de la selección clonal) transfectados con cada una de estas construcciones (las denominamos H-CYLD^{wt}, H-CYLD^{C/S} y H-Control) y realizamos con ellos experimentos de diferenciación. Encontramos que CYLD actuaba como un regulador de la diferenciación epidérmica a través de la vía de señalización de JNK: la expresión de CYLD^{C/S}, activaba la vía de JNK e impedía la diferenciación epidérmica en los equivalentes de piel H-CYLD^{C/S}. Por el contrario, la sobreexpresión de CYLD^{wt} inhibía la activación de JNK y aumentaba la diferenciación.

Observamos además que los queratinocitos de los equivalentes de piel H-CYLD^{C/S} perdían la polaridad (por deslocalización de β -catenina) e invadían el componente dérmico de los cultivos organotípicos. También comprobamos que CYLD^{wt} favorecía la apoptosis de los queratinocitos por inducir la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax, mientras que los queratinocitos deficientes en la actividad catalítica de CYLD eran resistentes a apoptosis (inhibían la expresión de Bax). Se ha descubierto también el importante papel que desempeña CYLD en el control de la progresión del cáncer de piel no melanoma humano. Para la realización de estos estudios se transfectaron las células epidérmicas tumorales humanas A431 con las construcciones CYLD^{wt} y CYLD^{C/S} y se realizaron experimentos de *xenoinjerto* por inoculación subcutánea de las células A-CYLD^{wt}, A-CYLD^{C/S} y A-Control en ratones inmunosuprimidos. Se comprobó que las células A-Control originaban cSCC sólidos y poco diferenciados, de elevada malignidad; sin embargo, la expresión de niveles aumentados de CYLD^{wt} en los cSCC humanos era capaz de revertir la malignidad tumoral, ya que frente a los cSCC poco diferenciados que originaban las células A-Control, los tumores A-CYLD^{wt} consistían en quistes benignos o en cSCC que habían regresado y estaban necrosados. En todos los casos los tumores A-CYLD^{wt} eran más diferenciados, presentaban menor angiogénesis (con vasos sanguíneos estrechos y maduros) y mayor índice de apoptosis que los tumores A-Control. Por el contrario, la inhibición funcional de CYLD aumentaba la agresividad tumoral, dando lugar a la aparición de carcinomas de células fusiformes, caracterizados por ser muy indiferenciados, presentar una angiogénesis muy incrementada (con vasos sanguíneos grandes y permeables) y ser resistentes a apoptosis. Por tanto nuestros resultados indican que CYLD es un supresor primordial del desarrollo y la progresión de los cSCC humanos, ya que su expresión es capaz de hacer regresar cSCC muy agresivos. Los mecanismos a través de los cuales CYLD ejerce esta función son su acción anti-angiogénica, pro-apoptótica y promotora de la diferenciación epidérmica. Estos hallazgos sobre la influencia de CYLD en el pronóstico del cáncer de piel humana hacen que nuestros resultados sean relevantes desde un punto de vista terapéutico, y abren nuevas vías para explorar terapias contra los cSCC más agresivos.

Aportación personal al trabajo

Parte experimental:

Mantenimiento de las líneas celulares en cultivo para la obtención de los equivalentes de piel. Caracterización bioquímica de diferentes vías de señalización en situación basal o tras estimular las células en monocapa de diferentes maneras (TNF-

α y radiación UV). Estudio de los equivalentes de piel por técnicas de inmunohistoquímica y de *Western Blot*. Estudios de la funcionalidad del transgén (por inmunoprecipitación y *Western Blot*). Realización de experimentos de carcinogénesis por *xenoinjerto* de las células A431 epidérmicas tumorales humanas de los tres genotipos (Control, CYLD^{wt} y CYLD^{C/S}) en ratones inmunodeficientes. Seguimiento de la aparición de tumores (observación y medición de su evolución en días alternos). Sacrificio de animales para recogida de muestras y conservación en formol y/o N₂ líquido para su posterior evaluación. Análisis de los tumores de las células A431 por inmunohistoquímica y *Western Blot*.

Elaboración del artículo:

Discusión de resultados y elaboración de figuras incluidas en el artículo.

CYLD regulates keratinocyte differentiation and skin cancer progression in humans

JP Alameda¹, MJ Fernández-Aceñero², R Moreno-Maldonado¹, M Navarro¹, R Quintana¹, A Page¹, A Ramírez¹, A Bravo³ and ML Casanova^{*1}

CYLD is a gene mutated in familial cylindromatosis and related diseases, leading to the development of skin appendages tumors. Although the deubiquitinase CYLD is a skin tumor suppressor, its role in skin physiology is unknown. Using skin organotypic cultures as experimental model to mimic human skin, we have found that CYLD acts as a regulator of epidermal differentiation in humans through the JNK signaling pathway. We have determined the requirement of CYLD for the maintenance of epidermal polarity, keratinocyte differentiation and apoptosis. We show that CYLD overexpression increases keratinocyte differentiation while CYLD loss of function impairs epidermal differentiation. In addition, we describe the important role of CYLD in the control of human non-melanoma skin cancer progression. Our results show the reversion of the malignancy of human squamous cell carcinomas that express increased levels of CYLD, while its functional inhibition enhances the aggressiveness of these tumors which progress toward spindle cell carcinomas. We have found that the mechanisms through which CYLD regulates skin cancer progression include the control of tumor differentiation, angiogenesis and cell survival. These findings of the role of CYLD in human skin cancer prognosis make our results relevant from a therapeutic point of view, and open new avenues for exploring novel cancer therapies.

Cell Death and Disease (2011) 2, e208; doi:10.1038/cddis.2011.82; published online 8 September 2011

Subject Category: Cancer

The epidermis is a stratified squamous epithelium composed mainly of keratinocytes. Basal keratinocytes proliferate and give rise to differentiated cells, which, upon full maturation, undergo enucleation and generate the squamous cornified layer.¹ Several molecules have been found to develop important roles in this differentiation process. Among them, the c-Jun-NH₂-terminal kinase (JNK) signaling pathway has an emergent role,^{2,3} as the inhibition of JNK activity in keratinocyte induces epidermal differentiation (stratification and production of cornified envelopes), while augmented JNK activity delays or inhibits keratinocyte differentiation.² To be functional, keratinocytes must also maintain an apico-basal polarization, β -catenin being an important molecule to the generation of a polarized epithelial phenotype;^{4,5} that is, perturbed β -catenin location (cytoplasmic localization and reduced membranous expression) is associated to lack of differentiation, invasive potential and aggressive behaviour⁶ in tumors. Disturbances of the balance proliferation/differentiation/apoptosis of the epidermis result in epidermal disorders, such as hyperplasia, psoriasis and skin cancer. Non-melanoma skin cancers (NMSC): basal cell carcinomas (BCC) and squamous cell carcinomas (SCC) are the most common human malignancies.

CYLD is a tumor suppressor gene that was originally identified as a gene mutated in familial cylindromatosis, a genetic condition that predisposes patients for the develop-

ment of skin appendages tumors.⁷ CYLD deubiquitinating activity removes lysine-63 polyubiquitin chains.⁷ Most of the mutations within the CYLD locus are located toward the carboxyl terminus of the protein, the position of the catalytic residues of ubiquitin hydrolase.^{8,9} Depending on the cellular context CYLD negatively regulates NF- κ B and/or JNK-signaling pathways, resulting in suppression of cell proliferation.^{10–13} In keratinocytes, JNK activation promotes cell proliferation and inhibits differentiation,² whereas NF- κ B appears uninvolved in epidermal differentiation.^{14,15}

Besides its role in the familial cylindromatosis, additional studies have associated CYLD downregulation with the development of other types of human cancer including tumors of colon, lung and kidney, as well as melanomas and cervical and hepatocellular carcinomas.^{16–20} Recently, we have demonstrated a relationship between the inhibition of CYLD function and an increase in aggressiveness of mouse NMSC.²¹ However, although CYLD is ubiquitously expressed and its function as tumor suppressor is being actively investigated, little is known about its role in the homeostasis of the different tissues; particularly in the skin.

In this study we have analyzed the role of CYLD in the homeostasis and carcinogenesis of human skin. We have used skin organotypic cultures (also named skin equivalents) as experimental model to mimic human skin *in vitro*. Similar to the epidermis, the epithelium of the skin organotypic culture

¹Division of Epithelial Biomedicine, CIEMAT, Madrid, Spain; ²Department of Pathology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain and ³Department of Veterinary Clinical Sciences, Veterinary Faculty, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain

*Corresponding author: ML Casanova, Division of Epithelial Biomedicine, CIEMAT, Avenida Complutense 22, Madrid 28040, Spain. Tel: +34 91 346 0882; Fax: +34 91 346 6484; E-mail: llanos.casanova@ciemat.es

Keywords: CYLD; keratinocyte differentiation; skin cancer; skin equivalents

Abbreviations: NMSC, non-melanoma skin cancer; BCC, basal cell carcinoma; SCC, squamous cell carcinoma

Received 27.5.11; accepted 20.7.11; Edited by V De Laurenzi

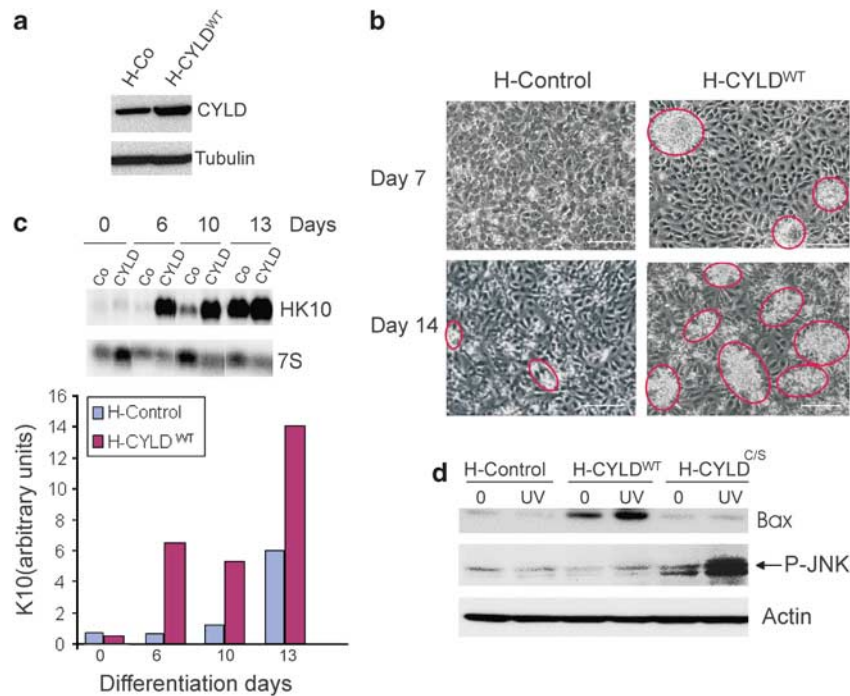


Figure 1 Properties of transfected HaCaT CYLD cells. (a) Western blot showing CYLD overexpression in one of the H-CYLD^{WT} pools (H-Co, H-Control cells). Tubulin was used as loading control. (b) H-control and H-CYLD^{WT} cells differentiation cultures. Red circles: stratification domes (c) (top) keratin K10 RNA levels in H-control and H-CYLD^{WT} cells detected by northern blotting at the stated times (days); 7S, loading control. (bottom) Graphical representation of the northern blotting signals relative to those of loading controls (arbitrary units). The difference in K10 content between cells of both genotypes is statistically significant at 6, 10 and 13 days of differentiation. (d) Western blot of proteins from H-control, H-CYLD^{WT} and H-CYLD^{C/S} cells in the basal state or after UV stimulation showing an increase in JNK activation in the H-CYLD^{C/S} cells and a reduction in the H-CYLD^{WT}. Analysis of Bax expression. Actin was used as loading control. Western blots were performed 3–4 times

stratifies and differentiates. This model has allowed us to increase the expression or to inhibit the function of CYLD in a human-like context. As a result, we have found that forced expression of wild-type CYLD (CYLD^{WT}) both in HaCaT keratinocytes and in the skin equivalents enhances keratinocyte differentiation, while the inhibition of CYLD function by expression of a catalytically inactive form of CYLD impairs epidermal differentiation. CYLD^{WT} overexpression is also able to induce the differentiation of human A431 squamous carcinoma (SCC) cell line. Our results show that CYLD controls skin differentiation through the JNK signaling pathway. In addition, using an *in vivo* xenograft model of skin carcinogenesis, we describe the important role of CYLD in the control of human NMSC progression.

Results

Forced expression of CYLD^{WT} in human keratinocytes. The HaCaT cell line, a non-tumoral immortalized human epidermal cell line commonly used in epidermal biology studies,²² was employed. HaCaT cells maintain full epidermal differentiation capacity: when cultured in the absence of serum, they form stratification domes and express the early differentiation marker keratin K10.²² Moreover, they are able to grow in organotypic cultures.²³ HaCaT cells were stably transfected with the CYLD^{WT} cDNA under the control of the β -actin promoter (β -actin-CYLD^{WT}) or with the empty vector. Pooled stable transfectants carrying either construct were used to minimize any potential effect of clonal selection. They were designated as

H-CYLD^{WT} and H-control cells (expressing the CYLD^{WT} transgene and the empty vector, respectively). Western blotting against CYLD showed that H-CYLD^{WT} cells had increased levels of CYLD (Figure 1a) compared with the endogenous levels of CYLD in the H-control cells.

Increased CYLD^{WT} expression enhances the differentiation of human keratinocytes in culture. We analyzed the differentiation properties of H-control and H-CYLD^{WT} cells. By day 7 of growth in absence of serum all the H-CYLD^{WT} pools of cells showed well-formed stratification domes, while in H-control cells the first (still rudimentary) domes were detected at day 14 (Figure 1b). The analysis of the early differentiation marker keratin K10, not expressed in undifferentiated cells, shows that at day 6 of differentiation the H-CYLD^{WT} cells showed very high levels of K10, while the H-control cells did not show these levels of K10 expression until day 13 of differentiation (Figure 1c). Abundant cell death was observed in the supernatants of both, differentiated and conventional H-CYLD^{WT} monolayer cultures; the analysis of the pro-apoptotic protein Bax showed that it was highly expressed in the H-CYLD^{WT} cells compared with the low levels of expression found in the H-control cells (Figure 1d). Moreover, after UV light stimulation (an inducer of apoptosis in keratinocytes),²⁴ Bax was highly induced in the H-CYLD^{WT} cells (Figure 1d). Therefore, our results indicate that H-CYLD^{WT} cells are prone to differentiation in addition to presenting a high rate of apoptosis.

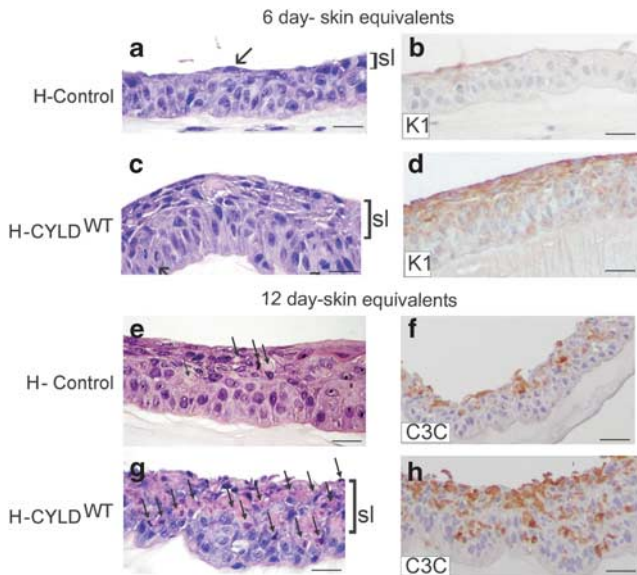


Figure 2 Increased differentiation and apoptosis in H-CYLD^{WT} skin equivalents. (a–d) Skin (6-day) equivalents showing increased differentiation of H-CYLD^{WT} organotypic cultures by histological examination (a and c) and by K1 staining (b and d). Arrow in (a): example of stratified cell; sl, suprabasal layers. (e–h) Skin (12-day) equivalents showing increased apoptosis in the H-CYLD^{WT} skin equivalents by histological observation (e and g) and by anticlaved caspase 3 staining (C3C) (f and h). Arrows in e and g: apoptotic nuclei

Increased CYLD expression enhances the differentiation of keratinocytes in human skin equivalents. Organotypic skin cultures were established with both H-control and H-CYLD^{WT} cells. H-control skin (6-day) equivalents were composed by 3–4 layers of keratinocytes distributed in well distinguishable strata: a basal layer with cylindrical cells of large nuclei; 1–2 layers of suprabasal cells of small nuclei and a superficial stratum containing flattened cells with the nuclei parallel to the basal membrane (Figure 2a). More engrossed epithelium was found in the H-CYLD^{WT} skin equivalents that contain 6–7 layers of keratinocytes, including higher number of flattened suprabasal cells (3–4 layers), which suggested an increased differentiation (Figure 2c). According to these histological characteristics, the differentiation marker keratin K1 was widely expressed in the 6-day H-CYLD^{WT} skin equivalents, (Figure 2d) whereas there was scarce K1 expression in 6-day-H-control organotypic cultures (Figure 2b). By 12 days of growth in air–liquid interface, H-control skin equivalents showed increased stratification (with respect to that observed at 6 days of culture), showing a higher number of suprabasal cells containing abundant cytoplasm and some apoptotic cells (Figure 2e). By this time point, CYLD^{WT} organotypic cultures also have increased their number of suprabasal cells, and strikingly, there were very high number of apoptotic cells (Figure 2g). Cleaved caspase 3 staining confirmed the abnormally high number of apoptotic cells present in the suprabasal and the intermediate cell layers of H-CYLD^{WT} skin equivalents (Figures 2f and h).

The decreased JNK pathway activation in the H-CYLD^{WT} cells appears as a plausible mechanism for CYLD induction of keratinocytes differentiation. JNK signaling is a relevant pathway for keratinocyte differentiation and it is negatively regulated by CYLD.¹³ The analysis of JNK phosphorylation (activation) in H-CYLD^{WT} cells showed decreased activation of JNK with respect to that of H-control cells in the non-stimulated state (Figure 1d, middle row). No differences were found between H-control and H-CYLD^{WT} cells in response to UV stimulation (Figure 1d). Our results showing increased differentiation of the H-CYLD^{WT} cells that present a diminished JNK activation, are in agreement with the previous studies reporting increased keratinocyte differentiation as a consequence of JNK activity inhibition.²

The inhibition of CYLD function in keratinocytes enhances the activation of the JNK pathway. To further confirm the CYLD function as regulator of keratinocyte differentiation and the relevance of the JNK pathway activation as a mechanism through which it may exerts its function, we generated HaCaT cells expressing a catalytically deficient CYLD mutant (CYLD^{C/S}) that carries the 601^{C/S} point mutation in the cysteine box of the deubiquitinase.¹⁰ The expression of this transgene results in a catalytically inactive protein that competes with the endogenous CYLD.^{10,12,20,21,25} HaCaT cells were stably transfected with CYLD^{C/S} cDNA under the control of the β -actin promoter or with the empty vector, and different pooled stable transfectants were collected (designated as H-CYLD^{C/S} and H-control cells). Western blot analysis showed increased levels of CYLD in the H-CYLD^{C/S} cells (Figure 3a).

We proved the lack of deubiquitination function of CYLD in the H-CYLD^{C/S} cells (Figure 3b). We then studied the JNK activation pathway in the H-CYLD^{C/S} cells. Both H-control and H-CYLD^{C/S} cells were UV-irradiated and JNK activation in response to irradiation was analyzed. We found that JNK was highly activated after UV stimulation in the H-CYLD^{C/S} cells (Figure 1d). Therefore, our results show that in human keratinocytes the activation of JNK pathway was increased by the functional inhibition of CYLD while, consistently, it was diminished by the overexpression of CYLD^{WT} (Figure 1d).

The diminished function of CYLD impairs the differentiation of keratinocytes in human HaCaT skin equivalents. H-CYLD^{C/S} skin equivalents were established. By 10 days of air-phase growth, H-control organotypic cultures formed a well-arranged tissue structure (Figure 3c) with a basal layer formed by cylindrical cells of large nuclei and 4–6 layers of suprabasal cells, being the most superficial flattened cells with small nuclei in parallel to the basal membrane (Figure 3c). In contrast, 10-days H-CYLD^{C/S} skin-equivalents showed a higher number of cell layers than the H-control skin equivalents, presenting heterogeneity in size, shape and orientation of the nuclei, resembling a disorganized epidermis with loss of cell polarity (Figure 3d). Cells invading the subjacent matrix were also frequently seen in the H-CYLD^{C/S} skin equivalents (Figures 3e and j). To ascertain the possible cause of the loss of cell polarity observed in the CYLD^{C/S} keratinocytes, we analyzed the

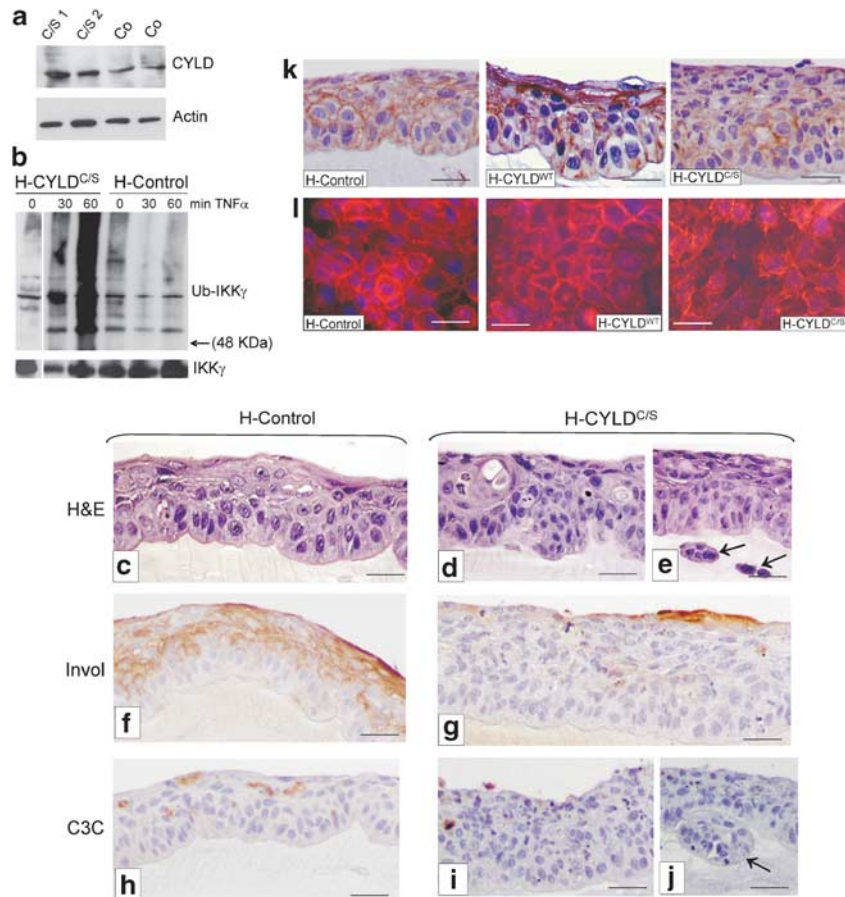


Figure 3 Functional analysis of H-CYLD^{C/S} cells. (a) Western blot showing CYLD overexpression in two H-CYLD^{C/S} pools (C/S 1 and C/S 2). (b) Deubiquitination of IKK_γ/NEMO (by CYLD) in H-control and H-CYLD^{C/S} cells before (0) or after (30' and 60') TNF- α stimulation. IKK_γ-immunoprecipitated samples were probed with an antiubiquitin antibody (upper panel) then reprobed with an antibody against IKK_γ (lower panel). Observe that TNF- α stimulation failed to increase the polyubiquitination of IKK_γ in the H-control cells. By contrast, TNF- α stimulation resulted in significant polyubiquitination of IKK_γ in the H-CYLD^{C/S} cells. (c–e) Hematoxylin/eosin staining of 10-day skin equivalents showing the altered morphology of H-CYLD^{C/S} skin equivalents (d and e) versus H-control organotypic cultures (c); arrows in (e and j); foci of invasion. (g) Impaired differentiation of H-CYLD^{C/S} organotypic cultures as studied by involucrin (invol) staining compared with the differentiated H-control skin equivalents (f). (i–j) Cleaved caspase 3 (C3C) immunostaining showing the resistance to apoptosis of the H-CYLD^{C/S} skin equivalents compared with H-control organotypic cultures (h). (k and l) β -catenin expression in H-control, H-CYLD^{WT} and H-CYLD^{C/S} keratinocytes growing as monolayers (l) or in the skin equivalents (k)

expression of β -catenin, as this is a relevant protein for the generation of a polarized epithelial phenotype.^{4,5} We found a normal, membranous localization of β -catenin at the cell–cell contacts of almost all the cell layers in both H-control and H-CYLD^{WT} skin equivalents (Figure 3k); by contrast, H-CYLD^{C/S} skin equivalents showed a disorganized β -catenin location, that even was absent in most of the suprabasal cells (Figure 3k). Even more, we also found that in H-CYLD^{C/S} monolayer cultures, β -catenin appeared forming dots or diffusely distributed in the cytoplasm of most of the cells (Figure 3l), in sharp contrast with the membranous pattern of β -catenin staining at the cell–cell contacts found in both H-control and H-CYLD^{WT} cells.

To analyze the differentiation of both the H-CYLD^{C/S} and H-control skin-equivalents, we studied the expression of involucrin, a marker of early differentiation. We found an extensive staining in the suprabasal layers of H-control organotypic cultures (Figure 3f). However, H-CYLD^{C/S} skin equivalents only showed a very scarce involucrin staining, indicating their lack of differentiation (Figure 3g).

Cleaved caspase 3 immunostaining showed an important reduction in the number of apoptotic cells in H-CYLD^{C/S} organotypic cultures (Figures 3i and j), compared with H-control skin equivalents (Figure 3h), suggesting that CYLD^{C/S} confers protection against cell death by apoptosis in human keratinocytes. Remarkably, these features found in H-CYLD^{C/S} skin equivalents, that is, loss of cell polarity, altered β -catenin distribution, lack of differentiation, presence of invasion foci and cell resistance to apoptosis, are alterations that could evolve to epithelial dysplasia and pre-malignant changes.

Generation of human A431 squamous carcinoma cells expressing increased levels of CYLD^{WT} or the catalytically inactive CYLD^{C/S} mutant. To investigate the role of CYLD in the progression of human skin cancer, we generated A431 cells expressing the β -actin-CYLD^{WT} and β -actin-CYLD^{C/S} constructs (Figure 4a; Supplementary Information SI-1a). They were designated as A-CYLD^{WT}, A-CYLD^{C/S} and A-control cells. We checked that the

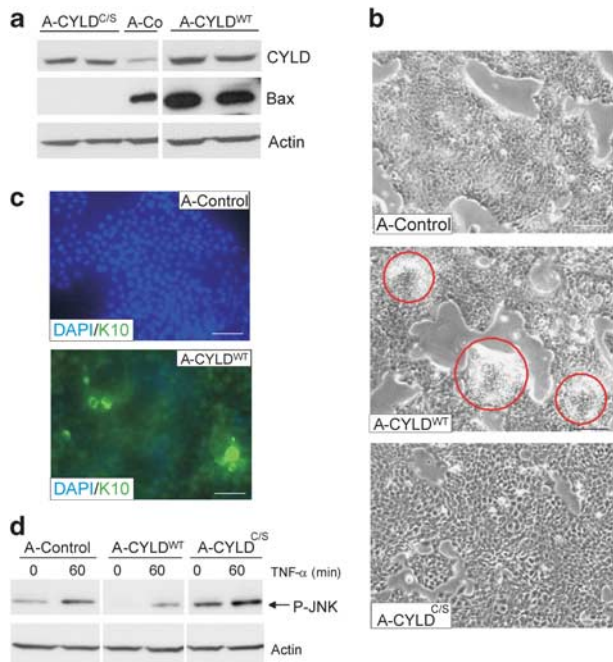


Figure 4 Characterization of A-CYLD^{WT} and A-CYLD^{C/S} cells. (a) Western blot analysis of CYLD and Bax expression in total protein extracts from A431 cells of the three genotypes. (b) Monolayer culture of A-control, A-CYLD^{WT} and A-CYLD^{C/S} cells. Red circles: foci of spontaneous differentiation. Note the scattered phenotype of A-CYLD^{C/S} cells and its loose growth in culture. (c) Immunofluorescence showing expression of K10 in A-CYLD^{WT} cells. (d) Western blot of protein extracts from A-control, A-CYLD^{WT} and A-CYLD^{C/S} cells in unstimulated or after UV stimulation. Note the increase in JNK activation in A-CYLD^{C/S} cells and the reduction in the A-CYLD^{WT} cells

A431-CYLD^{C/S} cells have impaired the CYLD deubiquitination activity (Supplementary Figure SI-1b).

Increased CYLD^{WT} expression in the A431 human squamous carcinoma cells induces a differentiated phenotype of the cells *in vitro* and an increase in cell death by apoptosis. Stratification domes were formed in conventional cultures of A-CYLD^{WT} cells (Figure 4b), suggesting the spontaneous differentiation of the A-CYLD^{WT} cells. The presence of K10 staining in the A-CYLD^{WT} cells and its absence in both, A-control and A-CYLD^{C/S} cultures, confirmed their more differentiated phenotype (Figure 4c). Additionally, abundant dead cells were found in the supernatants of A-CYLD^{WT} cells coincident with elevated levels of expression of the pro-apoptotic protein Bax, while low expression or absence of Bax were detected in A-control and A-CYLD^{C/S} cells, respectively (Figure 4a).

JNK activity is enhanced in A-CYLD^{C/S} cells and inhibited in A-CYLD^{WT} cells. We analyzed the JNK pathway and found that in the non-stimulated state, the A-CYLD^{C/S} cells presented an enhanced JNK activity (Figure 4d). In addition, A-CYLD^{C/S} cells also showed increased levels of P-JNK upon TNF- α stimulation. On the contrary, CYLD^{WT} overexpression leads to a diminished JNK activation both in non-stimulated and in TNF- α -stimulated

A-CYLD^{WT} cells (Figure 4d). The fact that the overexpression of CYLD in A431 cells and its functional inactivation lead to opposite effects in JNK activation, reinforces the relevance of this signaling pathway as mediator of CYLD functions in the A431 cells and is in agreement with the results found in the HaCaT keratinocytes.

Increased CYLD^{WT} expression in human squamous carcinoma cells improves the malignant phenotype of the SCCs while CYLD^{C/S} enhances their aggressiveness. We performed xenograft carcinogenesis assays of the A431 cells. A-control, A-CYLD^{WT} and A-CYLD^{C/S} cells were injected into nude mice. The latency of macroscopic tumor appearance was similar, approximately 1 week, in the three cases (data not shown). Histologically, A-control tumors were solid SCCs and poorly differentiated (Figures 5a–c). By contrast, tumors originated from A-CYLD^{WT} were of better prognosis as in addition to poorly differentiated areas, they exhibit extensive regions of necrosis in the core of the tumor (Figures 5d–f); moreover, we also found A-CYLD^{WT} tumors consisting of benign cysts (Figures 5g–i). These features are compatible with the regression of the tumor. On the other hand, A-CYLD^{C/S} tumors showed worse prognosis than A-control tumors, as they were anaplastic SCCs with high grade of cellular atypia and fusocellular morphology, resembling sarcomas or spindle-cell carcinomas (Figures 5j–k).

The immunohistochemical analysis showed increased expression of CYLD in both A-CYLD^{WT} and A-CYLD^{C/S} tumors compared with the expression in A-control SCCs (Figure 6). Low levels of expression of keratins K10 and K1 – reliable markers of well-differentiated tumors – were noted in A-control and A-CYLD^{WT} SCCs, and they were not detected in A-CYLD^{C/S} carcinomas (Figure 6 and data not shown). Keratin K8, a marker of malignancy in skin tumors²⁶ showed extensive staining in both A-control and A-CYLD^{C/S} carcinomas, while it was scarcely expressed in A-CYLD^{WT} tumors (Figure 6). K5 is a keratin typical of stratified epithelial tissues, expressed by normal skin and skin tumors that are lost in the later stages of tumor progression, that is, in spindle cell carcinomas. In agreement to their spindle-like phenotype, A-CYLD^{C/S} tumors exhibited areas lacking K5 expression (Figure 6). CD31 staining analysis of tumor blood vessels showed a network of large and lacunar vessels in A-CYLD^{C/S} tumors while those found in A-CYLD^{WT} were predominantly small and narrow; blood vessels developed in A-control carcinomas had an intermediate lumen diameter (Figures 7a–c). The analysis of α -smooth muscle actin (SMA), a marker of smooth muscle cells and pericytes, showed a discontinuous expression in the A-CYLD^{C/S} tumors indicating the immature and leaky nature of the blood vessels (Figure 7f). By contrast, the vessels of the A-CYLD^{WT} tumors were strongly stained demonstrating a mature and impermeable vascular phenotype (Figure 7d). A-control tumors presented weak SMA staining although predominantly in a continuous way (Figure 7e). Therefore, the vasculature analysis indicates an increased angiogenesis in A-CYLD^{C/S} SCCs and consequently, poor prognosis. Finally we also check that A-CYLD^{WT} tumors were prone to undergo apoptosis (SI-2).

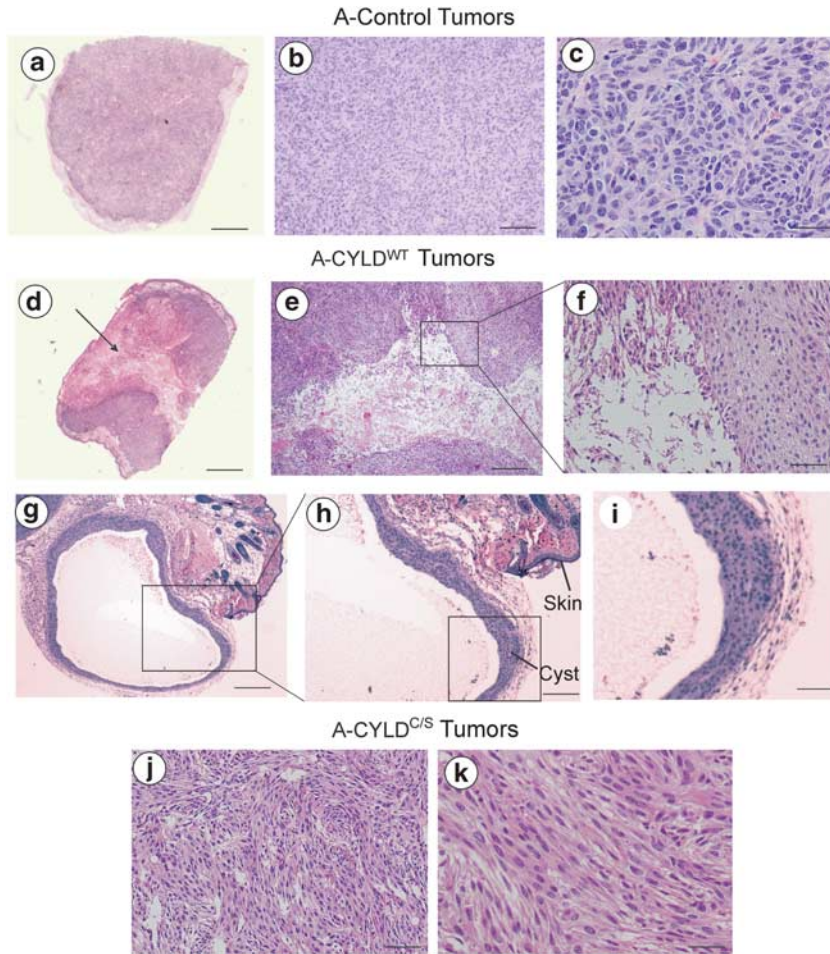


Figure 5 Hematoxylin/eosin staining of A-control, A-CYLD^{WT} and CYLD^{C/S} tumors. (a–c) A-control tumors are solid undifferentiated SCCs. (d–f) A-CYLD^{WT} tumors contain large cavities as a result of tumor degeneration (arrow in d) (g–i); often they also form cystic, differentiated structures. (j–k) A-CYLD^{C/S} SCCs are spindle-shape tumors. Compare the cords of fibroblasts-like cells forming the mutant tumors with the keratinocytes of the A-control SCCs (c). Tumors (10–12) of each type were analyzed

Discussion

Here we describe that CYLD acts as regulator of epidermal differentiation in humans. Our data demonstrate that alterations in CYLD expression in keratinocytes disrupt normal epidermal homeostasis: the forced expression of CYLD^{WT} in human HaCaT keratinocytes and the skin equivalents enhance keratinocyte differentiation. By contrast, the expression of a mutant CYLD^{C/S} that inhibits the endogenous CYLD-deubiquitination function impairs keratinocyte differentiation. We have found that JNK signaling pathway could be mediating the effects of CYLD in epidermal differentiation. In fact, it was previously reported that the inhibition of JNK activation in keratinocyte cultures *in vitro* induces almost all aspects of epidermal differentiation *in vivo*, including stratification and even production of cornified envelopes.² By contrast, augmented JNK activity delays or inhibits keratinocyte differentiation.² In line with these results, we have found diminished JNK activation in keratinocytes expressing CYLD^{WT}, concomitant with an enhanced epidermal differentiation of the CYLD^{WT} skin equivalents; additionally, we have found increased JNK activation in the CYLD^{C/S} keratinocytes associated to an impaired epidermal differentia-

tion of the CYLD^{C/S} skin equivalents. This finding is relevant for our understanding of both the normal epidermal differentiation and its perturbations during pathological conditions.

Importantly, we have discovered that CYLD^{WT} also promotes the differentiation of A431 tumoral keratinocytes through inhibition of JNK activation. It may be significant clinically, because attenuating JNK activity could become a differentiation therapy-based approach for skin cancer in general and for tumors developed by familial cylindromatosis patients in particular.

Another finding of this study is the increased rate of apoptosis induced by CYLD^{WT} both in tumoral and non-tumoral human keratinocytes. This effect could be the consequence of the lack of JNK-mediated cell survival signaling due to the diminished JNK activation in these cells.²⁷ Our present results showing increased apoptosis in cells, and importantly, in skin tumors overexpressing CYLD^{WT}, constitute an important finding for the identification of the mechanisms through which CYLD exerts its role as a tumor suppressor.

In addition to the impairment of keratinocyte differentiation, we have found that CYLD^{C/S} expression provokes other alterations in skin equivalents such as the loss of cell polarity,

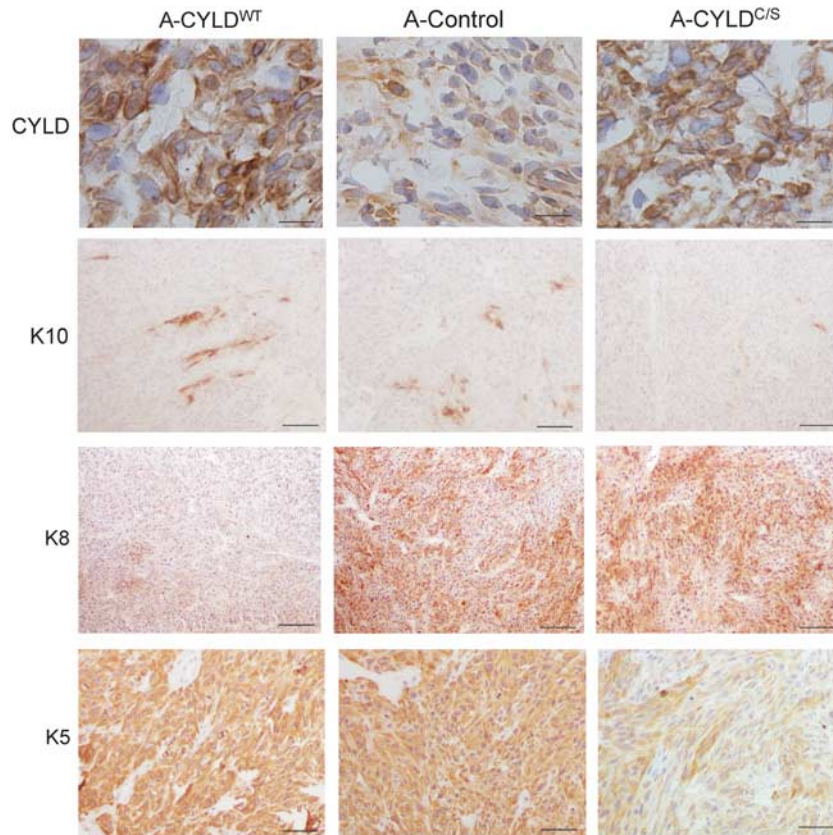


Figure 6 Immunohistochemistry of A-control, A-CYLD^{WT} and A-CYLD^{C/S} tumors. Staining with specific antibodies against CYLD, K10, K8 and K5. The increased K8 expression in the A-CYLD^{C/S} tumors, together with lack of K5 and K10 staining are indicative of an aggressive phenotype. Tumors (10–12) of each type were analyzed

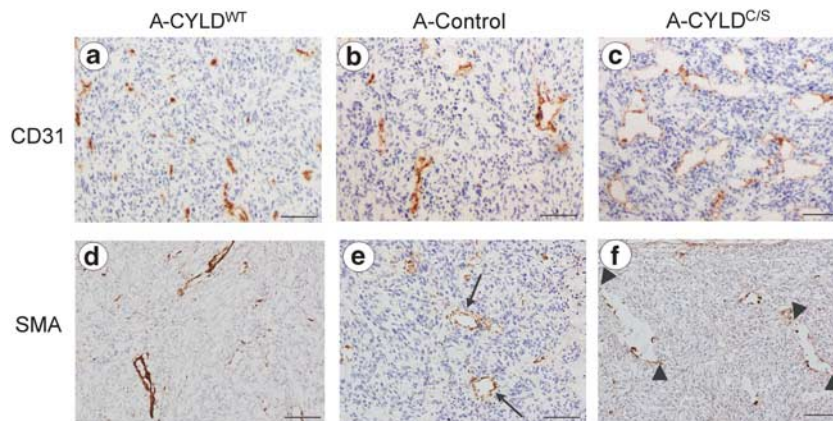


Figure 7 CYLD^{WT} expression decreases tumor angiogenesis, while loss of CYLD function enhances the vascularization of skin tumors. (a–c) CD31 staining of blood vessels. Note the smaller size of the vessels in the A-CYLD^{WT} tumors compared with that of A-CYLD^{C/S} SCCs. (d–f) SMA staining. Representative tumors are shown in each panel. Similar data were obtained in five tumors of each genotype. Arrows in (e) indicate the blood vessels. Arrowheads in (f) mark the extremes of the blood vessels. Six tumors of each type were analyzed

likely due to the loss of β -catenin membranous distribution and its cytoplasmic accumulation. Maintenance of cell polarity is an essential requirement for the functionality and homeostasis of epithelial tissues, being β -catenin a key molecule in the maintenance of epithelial architecture as it regulates the polarity of cells and tissues.²⁸ Other features of the H-CYLD^{C/S} skin equivalents are the formation of foci of

basal invasion and resistance to apoptosis. Altogether, these changes could lead to epithelial dysplasia and reflect pre-malignant modifications, such as loss of epithelial differentiation and cell polarity, and the acquisition of invasive properties are frequently observed in malignant transformation. According to these pathological alterations found in H-CYLD^{C/S} skin equivalents, CYLD^{C/S} expression in A431 squamous carcinoma cells

induces an enhancement of their malignancy in carcinogenesis assays.

Several mechanisms have been proposed through which loss of CYLD may exert a role in tumor promotion. One of them is the hyperactivation of antiapoptotic signals in absence of functional CYLD in tumoral cells;²⁹ previously we described that CYLD^{C/S} induced resistance to apoptosis in mouse skin tumors;²¹ here we also extend this property to human skin cancer. We have also showed that CYLD^{C/S} expression enhances angiogenesis in mouse skin carcinomas,²¹ what constitutes a prominent feature of skin tumor progression.³⁰ Here we have also confirmed that in human SCCs CYLD^{C/S} expression leads to a strong angiogenesis, increasing the size and permeability of blood vessels. Importantly, we have found as well that CYLD^{WT} overexpression in SCCs reduces the diameter of the blood vessels and augments its maturity, which possibly make them unable to supply the nutrients needed for tumor progression.

Therefore our study is relevant because it established the role that CYLD has in normal skin physiology. The use of our skin equivalent model has allowed us to determine the importance of CYLD for the maintenance of epidermal polarity, keratinocyte differentiation and apoptosis. In addition, our results show the reversion of the malignancy of the SCCs that express increased levels of CYLD^{WT}. The increase in apoptotic cell death of the A-CYLD^{WT} tumors, together with the reduced angiogenesis could be responsible of the A-CYLD^{WT} tumor regression observed in the carcinogenesis assays. Accordingly, SCCs defective in CYLD function are very aggressive as revealed by their progression toward spindle cell carcinomas, resistance to apoptosis and increased angiogenesis. These findings of the *in vivo* influence of CYLD in cancer prognosis make our results relevant from a therapeutic point of view, and open new avenues for exploring novel cancer therapies.

Materials and Methods

DNA constructs. CYLD^{C/S} cDNA was kindly provided by Dr. R Bernards and subcloned under the control of β -actin promoter.²¹ β -actin-control construct has been described.²¹

Cells and culture conditions. HaCaT and A431 cells were cultured in DMEM and 10% FCS. Cells were permanently transfected using the calcium phosphate method. In all transfections, the corresponding empty vectors were used as controls. Resistant colonies were selected using G418 and pooled (each pool was formed from approximately 20 different colonies). To allow HaCaT *in vitro* differentiation, cells were seeded and after reaching 60–80% confluence were grown in culture medium without FCS for different days.²² Experiments were performed with 2–3 different pools of transfected cells of each genotype.

TNF- α and UV stimulation. When required, cells were treated with human TNF α (50 ng/ml; Sigma, Saint-Louis, Missouri, USA) or irradiated with UVB for the indicated times. For UVB irradiation, a Waldmann lamp (UV236B, TECNOSA, Nuevas Tecnologías SA, Barcelona, Spain) was used. The light emitted was within the UVB range (280–320 nm), with a peak emission at 312 nm. HaCaT cells in PBS were irradiated with 800 mJ/cm² dose of UVB for 2 min. After irradiation, the cells were put in pre-warmed medium (37°C) and collected 3 hs after irradiation.

Immunoblots. Antibodies used were: Actin, Bax, P-JNK, CYLD, tubulin (Sigma); ubiquitin (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); IKK γ /NEMO (IMGEX, San Diego, CA, USA). For immunoprecipitation, total lysates were obtained from untreated or TNF α -treated (50 ng/ml; Sigma) HaCaT and A431 cells. A total of 300 μ g of lysate were immunoprecipitated with and the anti-IKK γ antibody

and resolved on an SDS gel; probed with an antiubiquitin antibody, then stripped and reprobed with an antibody against IKK γ (to show the amounts of IKK γ immunoprecipitated).

Skin equivalents preparation. Human dermal fibroblasts were obtained according to Meana *et al.*³¹ To generate skin equivalents, 1.5 ml of fibrinogen solution (from cryoprecipitated pig blood) was added to 5 ml of keratinocyte growth medium containing 2.5×10^5 dermal fibroblasts. Immediately after that, 0.5 ml of 0.025 mM Cl₂Ca, with 5.5 IU of bovine thrombin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) was added. The mixture was then placed on polycarbonate inserts (4 μ M porous) in a six-well culture plate (Corning Costar Corp., Cambridge, MA, USA) and allowed to solidify at 37°C for 2 h; 10⁶ HaCaT cells were seeded on the fibrin matrix and grown to confluence. After 48 h of seeding, organotypic cultures were raised to the air–liquid interface for 6–12 days to achieve epidermal stratification.

Northern blotting. Total RNA was isolated by Trizol extraction (Gibco-BRL, San Francisco, CA, USA) following the manufacturer's instructions; 10 μ g/lane RNA were probed for the expression of keratin K10.²² A ribosomal 7S RNA probe was used as a loading control.

Xenograft model of carcinogenesis. Tumors were induced in nude mice (Hsd-Athymic Nude, Harlan Europe, Barcelona, Spain) by subcutaneous flank inoculation of 10⁶ A431 control, CYLD^{WT} or CYLD^{C/S} cells. In all, 6–8 mice were inoculated in both flanks with each type of cells. Tumors were harvested 18 days post-cell injection. Experimental procedures were performed according to European and Spanish laws.

Histology and immunohistochemistry. Skin equivalents were fixed in formalin and embedded in paraffin. A431 tumors were fixed in methanol/acetone (1/1); in 70% ethanol or in formalin. Sections were stained with H&E for histopathological evaluation. Cells and tissue sections were stained with antibodies against keratins K1 (Covance, San Diego, CA, USA); K8, K10, involucrin and SMA (Sigma-Aldrich); β -catenin, CD31 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and cleaved caspase 3 (Cell Signaling Technology).

Immunofluorescence. Cells were fixed in methanol/acetone (1/1). Alexa Fluor-594 goat antimouse IgG(H + L) (Life Technologies SA, Paisley, UK) was used as fluorochrome.

Statistics. Statistical significance of data was assessed using the *t*-test and the Mann–Whitney (Wilcoxon) *W* test.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We thank Dr. R Bernards for providing the CYLD^{C/S} cDNA; I Santos and F Sánchez-Sierra for histological and immunohistochemical analyses; F Larcher for helpful discussion of the skin equivalents results; A Holguín and M García for advice in skin equivalents preparation; and CIEMAT Animal Unit for care of mice. This work was funded by grants from the *Ministerio de Ciencia e Innovación* PI06/1233 and PI10/01480 to MLC, and SAF2010-22156 to AR.

- Fuchs E. Skin stem cells: rising to the surface. *J Cell Biol* 2008; **180**: 273–284.
- Gazel A, Banno T, Walsh R, Blumenberg M. Inhibition of JNK promotes differentiation of epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 2006; **281**: 20530–20541.
- Weston CR, Wong A, Hall JP, Goad ME, Flavell RA, Davis RJ. The c-Jun NH2-terminal kinase is essential for epidermal growth factor expression during epidermal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 14114–14119.
- Whelock MJ, Jensen PJ. Regulation of keratinocyte intercellular junction organization and epidermal morphogenesis by E-cadherin. *J Cell Biol* 1992; **117**: 415–425.
- Gumbiner B, Stevenson B, Grimaldi A. The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol* 1988; **107**: 1575–1587.
- Chandrashekar C, Angadi PV, Krishnapillai R. β -catenin expression in benign and malignant salivary gland tumors. *Int J Surg Pathol* 2009; **24**: 24.
- Bignell GR, Warren W, Seal S, Takahashi M, Rapley E, Barfoot R *et al*. Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet* 2000; **25**: 160–165.

8. Massoumi R, Paus R. Cylindromatosis and the CYLD gene: new lessons on the molecular principles of epithelial growth control. *Bioessays* 2007; **29**: 1203–1214.
9. Almeida S, Maillard C, Itin P, Hohl D, Huber M. Five new CYLD mutations in skin appendage tumors and evidence that aspartic acid 681 in CYLD is essential for deubiquitinase activity. *J Invest Dermatol* 2008; **128**: 587–593.
10. Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, Bernards R. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* 2003; **424**: 797–801.
11. Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israël A, Wallach D, Courtois G. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 2003; **424**: 801–805.
12. Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschirritzis T, Farmer H, Ashworth A, Mosialos G. CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* 2003; **424**: 793–796.
13. Reiley W, Zhang M, Sun SC. Negative regulation of JNK signaling by the tumor suppressor CYLD. *J Biol Chem* 2004; **279**: 55161–55167.
14. Hu Y, Baud V, Oga T, Kim KI, Yoshida K, Karin M. IKKalpha controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB. *Nature* 2001; **410**: 710–714.
15. Seitz CS, Lin Q, Deng H, Khavari PA. Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 2307–2312.
16. Hirai Y, Kawamata Y, Takeshima N, Furuta R, Kitagawa T, Kawaguchi T *et al*. Conventional and array-based comparative genomic hybridization analyses of novel cell lines harboring HPV18 from glassy cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Oncol* 2004; **24**: 977–986.
17. Hellerbrand C, Bumes E, Bataille F, Dietmaier W, Massoumi R, Bosserhoff AK. Reduced expression of CYLD in human colon and hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 2007; **28**: 21–27.
18. Zhong S, Fields CR, Su N, Pan YX, Robertson KD. Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA methylation and histone deacetylation in lung cancer. *Oncogene* 2007; **26**: 2621–2634.
19. Hashimoto K, Mori N, Tamesa T, Okada T, Kawauchi S, Oga A *et al*. Analysis of DNA copy number aberrations in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinomas by conventional CGH and array CGH. *Mod Pathol* 2004; **17**: 617–622.
20. Massoumi R, Kuphal S, Hellerbrand C, Haas B, Wild P, Spruss T *et al*. Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma. *J Exp Med* 2009; **206**: 221–232.
21. Alameda JP, Moreno-Maldonado R, Navarro M, Bravo A, Ramirez A, Page A *et al*. An inactivating CYLD mutation promotes skin tumor progression by conferring enhanced proliferative, survival and angiogenic properties to epidermal cancer cells. *Oncogene* 2010; **29**: 6522–6532.
22. Moreno-Maldonado R, Ramirez A, Navarro M, Fernández-Aceñero MJ, Villanueva C, Page A *et al*. IKKalpha enhances human keratinocyte differentiation and determines the histological variant of epidermal squamous cell carcinomas. *Cell Cycle* 2008; **7**: 2021–2029.
23. Carretero M, Del Rio M, Garcia M, Escámez MJ, Mirones I, Rivas L *et al*. A cutaneous gene therapy approach to treat infection through keratinocyte-targeted overexpression of antimicrobial peptides. *Faseb J* 2004; **18**: 1931–1933.
24. Young AR. The sunburn cell. *Photodermatol* 1987; **4**: 127–134.
25. Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, Pfeifer A, Fassler R. Cylid inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell* 2006; **125**: 665–677.
26. Casanova ML, Bravo A, Martinez-Palacio J, Fernández-Aceñero MJ, Villanueva C, Larcher F *et al*. Epidermal abnormalities and increased malignancy of skin tumors in human epidermal keratin 8-expressing transgenic mice. *Faseb J* 2004; **18**: 1556–1558.
27. Singh N, Khanna N, Sharma H, Kundu S, Azmi S. Insights into the molecular mechanism of apoptosis induced by TNF-alpha in mouse epidermal JB6-derived RT-101 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **295**: 24–30.
28. Kajino Y, Yamaguchi A, Hashimoto N, Matsuura A, Sato N, Kikuchi K. beta-Catenin gene mutation in human hair follicle-related tumors. *Pathol Int* 2001; **51**: 543–548.
29. Urbanik T, Kohler BC, Boger RJ, Wörms MA, Heeger S, Otto G *et al*. Down-regulation of CYLD as a trigger for NF-kappaB activation and a mechanism of apoptotic resistance in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol* 2010; **38**: 121–131.
30. Bolontrade MF, Stern MC, Binder RL, Zenklusen JC, Gimenez-Conti IB, Conti CJ. Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors. *Carcinogenesis* 1998; **19**: 2107–2113.
31. Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF *et al*. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns* 1998; **24**: 621–630.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by **Nature Publishing Group**. This work is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License**. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)

Supplementary Information

SI-1 Generation of human A431 tumor epidermal cells expressing increased levels of CYLD^{WT} or the catalytically inactive CYLD^{C/S} mutant. The A431 human tumor epidermal cells were transfected with the β -actin-CYLD^{WT} and β -actin-CYLD^{C/S} constructs described above. Pooled transfected cells resistant to G418 from approximately 40 different colonies carrying either construct were selected and assayed for transgene expression. They were designated as A-CYLD^{WT}, A-CYLD^{C/S} and A-Control cells (expressing the CYLD^{WT} and the CYLD^{C/S} transgenes and the empty vector respectively). Experiments were performed with 2 different pools of each genotype. Western blotting analysis showed that A-CYLD^{WT} and A-CYLD^{C/S} cells had increased levels of CYLD compared to endogenous CYLD in the A-Control cells (Figure SI a and 5c). Similarly to the previously described effect in other cells types (PDVC57-CYLD^{C/S} and HaCaT-CYLD^{C/S} cells), the expression of the catalytically inactive CYLD^{C/S} in A431-CYLD^{C/S} cells impairs CYLD endogenous deubiquitination activity in these tumor epidermal cells, resulting in significant polyubiquitination of IKK γ in A-CYLD^{C/S} cells after TNF- α stimulation (Figure SI b) (34).

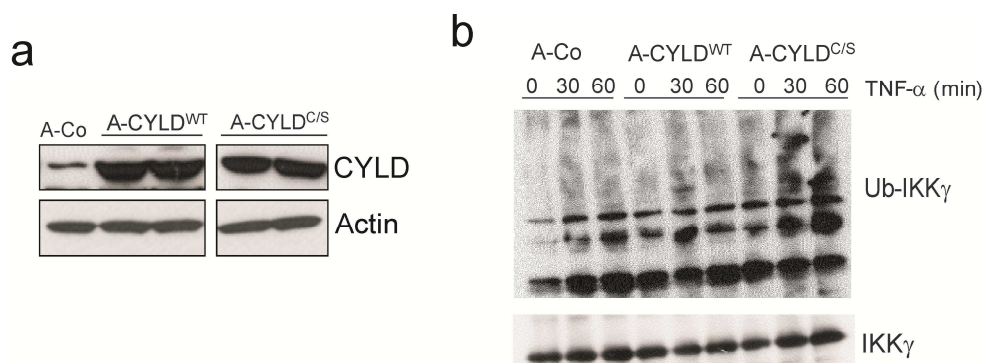


Figure SI-1

(a) Western blot showing representative examples of the increased levels of total CYLD expression in two different pools of A-CYLD^{WT} and A-CYLD^{C/S} cells. **(b)** Deubiquitination of IKK γ /NEMO by CYLD. Endogenous ubiquitination of IKK γ in A-Control, A-CYLD^{WT} and A-CYLD^{C/S} cells before (0) or after 30' and 60' of TNF- α stimulation. Top panel: immunoprecipitation with an antibody directed against IKK γ (300 μ g of lysate) probed with an anti-ubiquitin antibody; bottom panel: IKK γ blotting showing the amounts of IKK γ used for immunoprecipitation. The assay shows that the deubiquitination is less efficient when the CYLD^{C/S} mutant is expressed.

SI-2 A-CYLD^{WT} tumors show increased rate of apoptosis. Cleaved Caspase 3 staining showed that most of the A-CYLD^{WT} tumors undergo apoptosis while A-CYLD^{C/S} tumors were rather resistant (83.3% of the A-CYLD^{WT} tumors analyzed were cleaved Caspase 3 positive, versus 66.6% of the A-Control SCCs, and the 33.0% of the A-CYLD^{C/S} tumors). 6 to 8 tumors of each type were analyzed. These results are in agreement with those in A431 cell cultures showing that the overexpression of CYLD^{WT} sensitizes the cells to apoptosis, while the expression of the CYLD^{C/S} makes them more resistant (Figure 4a).

Artículo 3

Resumen del trabajo “Functional inactivation of CYLD promotes the metastatic potential of tumor epidermal cells”. J Invest Dermatol. 2013 Jul;133(7):1870-8. doi: 10.1038/jid.2013.76. Epub 2013 Feb 20.

El cáncer de piel no melanoma (CPNM) es el cáncer más común y su incidencia ha aumentado notoriamente en todo el mundo. El 20% de los cánceres de piel diagnosticados son cSCC, y a pesar de los diversos métodos disponibles de tratamiento de este tipo de cáncer, ninguno asegura una curación completa. Se estima que una media del 8% de los cSCC se reproducen y el 5% de ellos metastatizan en 5 años. Los cSCC metastásicos tienen un comportamiento a largo plazo muy agresivo, con una tasa de supervivencia a los 10 años menor del 20%. De estos datos se concluye que la mortalidad en el cSCC es un problema importante, teniendo en cuenta su gran prevalencia en el mundo. El 70% de pacientes con cSCC metastásico presentan una o más de las características establecidas como factores de riesgo de metastatizar (tumores más indiferenciados, su localización anatómica, la activación de EGFR, etc.), sin embargo el 30% restante de pacientes de cSCC metastásico no presentan ninguno de los factores de riesgo, lo que sugiere la existencia de otras variables todavía no conocidas que desempeñen un papel importante en su metástasis. El objetivo que nos hemos planteado en este trabajo ha sido la identificación de factores que puedan ser considerados predictivos de los cSCC muy agresivos y con alto riesgo de metastatizar y de los mecanismos por los que ese tipo de cSCC metastatiza. En los trabajos previamente comentados hemos concluido que el supresor tumoral de tumores de los apéndices de la piel, CYLD, desempeña también una función relevante como supresor tumoral de los cSCC: nuestros datos indican que la inhibición de la función desubiquitinasa de CYLD en las células epidérmicas de los cSCC les confiere características más agresivas, aumentando la proliferación celular, migración, supervivencia y angiogénesis tumoral, lo que finalmente conduce a un aumento de la progresión maligna de los cSCC. En este trabajo hemos estudiado si CYLD desempeña también un papel importante en la metástasis de los cSCC. Para la realización de estos estudios se han utilizado las células epidérmicas tumorales de SCC PDVC57 que expresan la forma mutada CYLD^{C/S} (células C57-CYLD^{C/S}), que como se ha comentado en los artículos anteriores carece de actividad catalítica y actúa como dominante negativo, inhibiendo la función de CYLD endógeno, y las células C57-Control (que contienen el plásmido vacío). Se han realizado experimentos de metástasis *in vivo*, mediante la inyección de las células C57- CYLD^{C/S} y las C57-Control por la vena de la cola de ratones inmunodeficientes. 18 días después de la inyección se extrajeron los pulmones y se comprobó la

presencia de abundantes focos de metástasis en los ratones inyectados con las células C57-CYLD^{C/S}, frente a los escasos focos metastásicos observados en los pulmones de los ratones inyectados con las células C57-Control. Las metástasis C57-CYLD^{C/S} presentaban además gran vascularización, elevada tasa de proliferación y expresaban marcadores de progresión maligna como son K8, K13 y Snail (proteína esta última que desempeña un papel relevante en la progresión e invasión del CPNM). A continuación se analizó en las metástasis la expresión de Maspin, por tratarse de una proteína que actúa como supresor tumoral y de metástasis en ciertos tipos de cáncer en humanos (principalmente en cáncer de próstata y mama) y de la que nuestro grupo ha encontrado recientemente que puede desempeñar un papel importante en la progresión maligna de los cSCC. Comprobamos que en las metástasis C57-CYLD^{C/S} la expresión de Maspin estaba inhibida y determinamos mediante ensayos de co-inmunoprecipitación que existía una interacción física entre CYLD y Maspin. El análisis de la expresión de Maspin en líneas celulares epidérmicas mostró que existía una relación inversa entre los niveles de expresión de Maspin y el grado de malignidad de células humanas y murinas, de modo que las más agresivas presentaban una expresión muy reducida de Maspin. Estos resultados se corroboraron mediante el estudio de la expresión de Maspin en otras líneas celulares de cSCC (las células A431 y las PB) que confirmaron que la inhibición funcional de CYLD reprimía Maspin, mientras que la sobreexpresión de CYLD^{wt} (funcional) la aumentaba. Por último, y dado que nuestros resultados indicaban que los niveles de expresión de Maspin, regulado por CYLD, podían ser un potencial marcador de malignidad de los cSCC, analizamos si existía una relación causa-efecto entre la inhibición de Maspin en las células C57-CYLD^{C/S} y el incremento de su potencial metastásico. Para ello, restauramos la expresión de Maspin en las células C57-CYLD^{C/S} (por transfección estable de una construcción con cDNA de Maspin) y realizamos con ellas ensayos de metástasis. Estos estudios mostraron que la expresión ectópica de Maspin en las células C57-CYLD^{C/S} inhibía la metástasis de los cSCC. Por tanto, concluimos que la inhibición funcional de CYLD en las células cSCC promueve la metástasis tumoral a través de diferentes mecanismos como son la inducción de Snail, el incremento de la angiogénesis tumoral y la reducción de la expresión de Maspin.

Aportación personal al trabajo

Parte experimental:

Cultivo de las líneas celulares utilizadas en los diferentes estudios. Clonaje de la construcción β -actina-Maspin. Desarrollo del procedimiento experimental del ensayo

de metástasis en ratones inmunodeficientes, seguimiento de los animales inyectados, realización de las necropsias y recogida de muestras de diferentes órganos en formol y N₂ líquido. Extracción de proteínas y RNA de muestras de pulmón y de las diferentes líneas celulares empleadas. Estudio inmunohistoquímico y por inmunoblot para la caracterización de las metástasis pulmonares. Realización de PCRs cuantitativas para el análisis de la expresión de Snail en las células C57-Control y C57-CYLD^{C/S}. Caracterización en muestras humanas de piel normal y de tumores de apéndices de la piel (cilindromas, espiradenomas y tricoepiteliomas) de la expresión de Maspin.

Elaboración del artículo:

Discusión de resultados y realización de figuras presentadas en el artículo.

Functional Inactivation of CYLD Promotes the Metastatic Potential of Tumor Epidermal Cells

Josefa P. Alameda¹, M. Jesús Fernández-Aceñero², Rita M. Quintana¹, Angustias Page¹, Ángel Ramírez¹, Manuel Navarro¹ and M. Llanos Casanova¹

CYLD is a tumor-suppressor gene mutated in the skin appendage tumors cylindromas, trichoepitheliomas, and spiradenomas. We have performed *in vivo* metastasis assays in nude mice and found that the loss of the deubiquitinase function of *CYLD* in squamous cell carcinoma (SCC) cells greatly enhances the lung metastatic capability of these cells. These metastases showed several characteristics that make them distinguishable from those carrying a functional *CYLD*, such as robust angiogenesis, increased expression of tumor malignancy markers of SCCs, and a decrease in the expression of the suppressor of metastasis Maspin. Restoration of Maspin expression in the epidermal SCC cells defective in *CYLD* deubiquitination function significantly reduces their ability to form metastases, thereby suggesting that the decrease in the levels of Maspin expression plays an important role in the acquisition of metastatic potential of these cells. In addition, we have characterized Maspin downregulation in cylindromas, trichoepitheliomas, and spiradenomas carrying functional inactivating mutations of *CYLD*, also providing an evidence of the correlation between impaired *CYLD* function and Maspin decreased expression *in vivo* in human tumors.

Journal of Investigative Dermatology (2013) **133**, 1870–1878; doi:10.1038/jid.2013.76; published online 21 March 2013

INTRODUCTION

CYLD is a tumor-suppressor gene mutated in hereditary syndromes that predisposes patients for the development of skin appendage tumors such as cylindromas, trichoepitheliomas, and spiradenomas (Gerretsen *et al.*, 1995; Bignell *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2006). Here we refer to all of these tumoral manifestations with the generic name of cylindromatosis. In addition to inherited tumors, these types of neoplasias are also found as sporadic tumors. *CYLD* functions as a deubiquitinase that removes the lysine-63 polyubiquitin chains from an array of target proteins involved in signal transduction and gene regulation (Brummelkamp *et al.*, 2003; Kovalenko *et al.*, 2003; Trompouki *et al.*, 2003). Most of the mutations within the *CYLD* locus are found in the catalytic residues of ubiquitin hydrolase (Massoumi and Paus, 2007; Saggari *et al.*, 2008).

We have recently reported on the role of *CYLD* in the homeostasis of the skin: it develops an important function in the maintenance of epidermal polarity, keratinocyte differentiation, and apoptosis (Alameda *et al.*, 2011a).

Nonmelanoma skin cancer (NMSC), i.e., basal cell carcinomas and cutaneous squamous cell carcinomas (SCCs), is the most common form of cancer in the Caucasian population (Christenson *et al.*, 2005). SCCs account for ~20% of all cutaneous malignancies, and may be very aggressive and invasive (Moller *et al.*, 1979). Among the factors considered to play a role as SCC promoters, we have recently shown that the diminished function of *CYLD* in tumor epidermal cells worsens the prognosis of malignant skin tumors through enhancement of the expression of angiogenic factors and increase in the nuclear localization of Bcl3, p52, and β -catenin (Alameda *et al.*, 2010, 2011a). In addition, we have shown that wild-type *CYLD* overexpression in human SCC cells reverts the malignant phenotype of the tumors (Alameda *et al.*, 2011a). It has also been reported that mice lacking *Cyld* are highly susceptible to development of chemically induced benign skin tumors (Massoumi *et al.*, 2006), and transgenic mice expressing a catalytically inactive mutant *CYLD* develop tumors of increased malignancy relative to nontransgenic mice (De Marval *et al.*, 2011). Here we have analyzed whether *CYLD* may also function as an inhibitor of metastasis of SCCs. To this aim, we have performed *in vivo* metastasis assays in nude mice and found that the expression in SCC cells of a mutant *CYLD* lacking the deubiquitinase function (and acting as a dominant negative interfering with the endogenous *CYLD* function) greatly enhances the lung metastatic capability of these cells. These metastases showed a strong angiogenesis and the induction of markers of high aggressiveness of SCCs such as Snail and keratins K8 and K13. In addition, they also exhibit a

¹Department of Molecular Oncology, CIEMAT, Madrid, Spain and

²Department of Pathology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

Correspondence: M. Llanos Casanova, Department of Molecular Oncology, CIEMAT, Avenida Complutense 40, Madrid 28040, Spain.

E-mail: llanos.casanova@ciemat.es

Abbreviations: NMSC, nonmelanoma skin cancer; SCC, squamous cell carcinoma

Received 5 December 2011; revised 8 January 2013; accepted 23 January 2013; accepted article preview online 20 February 2013; published online 21 March 2013

downregulation of the inhibitor of metastasis Maspin, and we provide evidences suggesting that this decreased expression of Maspin is, at least in part, responsible for the enhancement of the metastatic capacity of the SCC cells lacking the deubiquitinase function of CYLD.

Maspin is a protein of the Serpin family that acts as a tumor suppressor inhibiting cellular motility, invasiveness, and angiogenesis, and providing sensitivity to apoptosis in tumor cells (Bailey *et al.*, 2006; Khalkhali-Ellis, 2006). Maspin expression predicts a better prognosis in different types of cancers: breast, prostate, colon, oral squamous cell carcinoma, lung, larynx, malignant melanoma, and ovarian cancer (Shi *et al.*, 2001; Futscher *et al.*, 2004). Maspin also acts as suppressor of metastasis in different types of cancer such as prostate, liver, and breast (Luo *et al.*, 2007; Stark *et al.*, 2010). Little is known about the expression of Maspin in skin and skin cancer. We have recently found that the diminished expression of Maspin in mouse skin tumors is a potential cause for NMSC progression (Alameda *et al.*, 2011b).

Our present data show an inverse relationship between the grade of malignancy of tumor epidermal cells and the level of expression of Maspin. We have also found a correlation between forced CYLD functional inactivation in epidermal SCC cells and a decreased Maspin expression. This correlation is also found *in vivo* in cylindromatosis tumors carrying a mutated *CYLD* gene. In addition, we have found a physical interaction between CYLD and Maspin.

RESULTS

The inhibition of CYLD function in tumor epidermal cells enhances its capacity to generate lung metastases

Previously, we introduced the mutant *CYLD*^{C/S} complementary DNA in the PDVC57 cell line. This mutant carries the 601^{C/S} point mutation in the cysteine box of the deubiquitinase domain, resulting in a catalytically inactive protein that is able to compete with the endogenous CYLD. We found that the expression of the *CYLD*^{C/S} mutant makes the squamous cancer PDVC57 cells (SCC cells) very aggressive, conferring them properties such as capacity of growing in suspension and increased angiogenesis that finally leads to a rapid tumor development in carcinogenesis assays (Alameda *et al.*, 2010, 2011a). Now we have performed *in vivo* metastasis assays to ascertain whether CYLD has a role in the metastatic behavior of SCC epidermal cells. We injected the C57-Control cell (expressing the empty vector) and C57-CYLD^{C/S} cells (expressing the *CYLD*^{C/S} transgene) in the tail vein of immunodeficient mice. Soon after injection (18 days), 33% of the C57-CYLD^{C/S}-injected mice showed cachexia, being extremely thin and displaying evident breathing difficulties. The autopsy of the animals showed enlarged lungs of brownish-red color, with a dried appearance and hard consistency (Figure 1a); moreover, lungs injected with the C57-CYLD^{C/S} cells appeared full of metastases that covered almost all its surface (Figure 1b). The appearance of these lungs was in sharp contrast with the whitish, spongy, and moist appearance of the lungs injected with the C57-Control cells (Figure 1a).

The histological analysis of the lungs of the injected mice showed that the C57-Control cells also led to the development

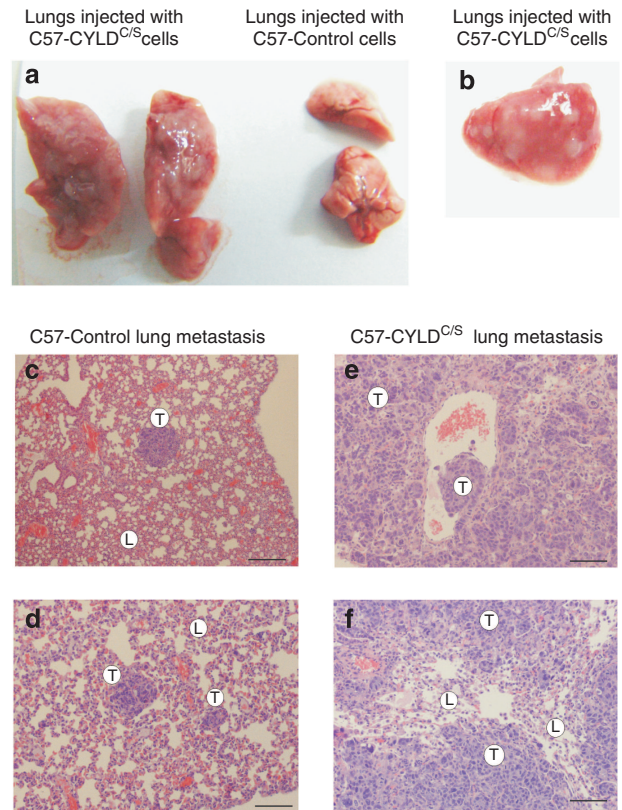


Figure 1. Histological characterization of lungs injected with C57-CYLD^{C/S} and C57-Control cells. (a) Representative image of the macroscopic appearance of lungs injected with C57-CYLD^{C/S} or C57-Control cells collected 18 days after injection of the corresponding C57 cells. Note that each lung injected with the C57-CYLD^{C/S} cells doubles the size of the lungs injected with the C57-Control cells. (b) Detail of the abundant metastasis (white nodules) present in the lungs injected with the C57-CYLD^{C/S} cells. (c–f) Hematoxylin-eosin staining of sections corresponding to (c, d) C57-Control metastasis and (e, f) C57-CYLD^{C/S} metastasis. (e) Note the C57-CYLD^{C/S} tumor cells breaking through a blood vessel wall. Observe the scarce normal lung tissue remaining in the lungs injected with the C57-CYLD^{C/S} cells. L, lung tissue; T, tumor mass. Bars = 300 μ m.

of metastasis (C57-Control-metastases). However, the area occupied by the C57-CYLD^{C/S}-metastases (metastasis originated by the injection of the C57-CYLD^{C/S} cells) was nearly 90% versus 10% of the area occupied by the C57-Control-metastases (Supplementary Table S1 online). The C57-CYLD^{C/S} cells invading the lungs formed pleomorphic, poorly differentiated SCCs (Figure 1e and f). In contrast, the C57-Control cells formed moderate to well-differentiated SCCs (Figure 1c and d). To further confirm that the metastatic masses observed in the lungs were epidermal cells, we performed immunostaining with keratin K5, characteristic of basal keratinocytes of stratified epithelia such as skin and also expressed in SCCs, but not present in the lungs. C57-CYLD^{C/S}-metastasis showed extensive staining of K5 (Figure 2c), similar to that found in C57-SCCs (Figure 2a), demonstrating a massive colonization of the lung tissue by epidermal-origin C57-CYLD^{C/S} cells. In contrast, C57-Control-metastasis only showed small colonies of epidermal cells positive for K5 (Figure 2e). K6, a keratin expressed by epidermal cells subjected to stress or proliferative

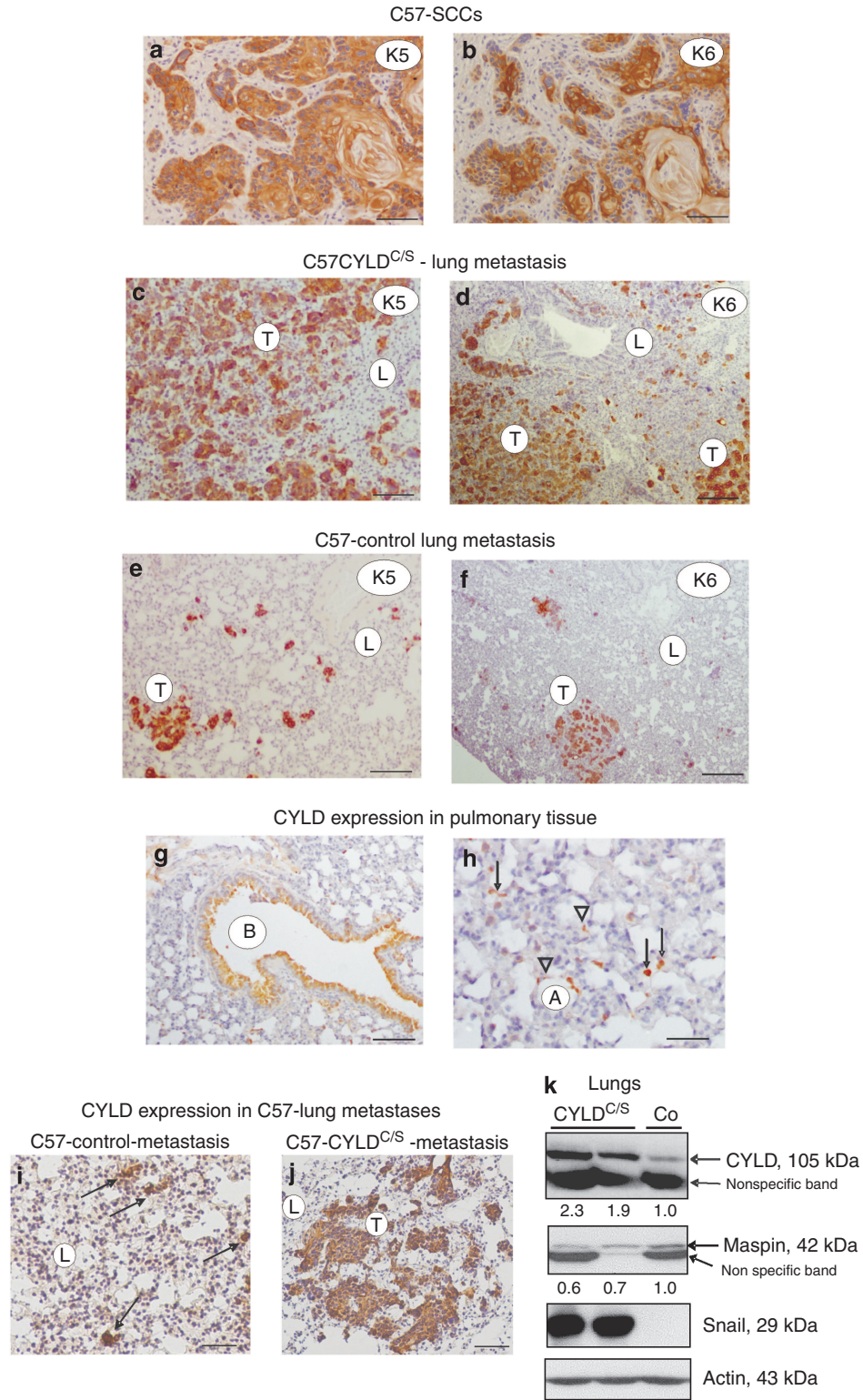


Figure 2. CYLD expression in normal lungs and lung metastasis; characterization of lung metastasis. (a, b) Keratin 5 and 6 (K5 and K6) staining of the squamous cell carcinomas (SCCs) obtained by subcutaneous inoculation of C57 cells in nude mice. (c–f) K5 and K6 staining showing the epidermal nature of the metastasis. (g, h) CYLD expression in normal lungs. It is detected in the apical epithelium of the bronchioles (B), pneumocytes type I of the alveoli (A, arrowheads), and in macrophages (arrows). (i, j) CYLD expression in the (i) Control-metastasis and (j) CYLD^{C/S}-metastasis. (k) Immunoblot comparing CYLD, Snail, and Maspin expression in lungs containing both C57-Control and CYLD^{C/S}-metastases (collected 26 days after injection). L, lung tissue; T, tumor mass. Bars: (a–f) = 350 μm; (g, h) = 200 μm; (i, j) = 300 μm.

conditions and skin SCCs (Figure 2b), was also detected in the metastases invading the lungs (Figures 2d and f), further confirming the epidermal origin of the tumoral masses.

We next analyzed by immunohistochemistry the expression of CYLD in normal lungs as well as in C57-Control-metastases and C57-CYLD^{C/S}-metastases. In the normal lungs, we found that CYLD was expressed in the epithelium of the bronchioles (in particular in the apical region; Figure 2g) as well as in the type I pneumocytes of the alveoli and in macrophages (Figure 2h). This pattern of expression was also detected in lungs carrying C57-Control-metastasis (Supplementary Figure 1a online); however, endogenous CYLD was weakly detected in lungs carrying C57-CYLD^{C/S}-metastasis (Supplementary Figure 1b online). We found elevated expression of CYLD in the epidermal cancer cells forming the C57-CYLD^{C/S}-metastasis (Figure 2j), whereas in the C57-Control-metastasis only small aggregates of tumor cells positive for CYLD staining were found (Figure 2i) Figure 2k shows a western blot also indicating the increased CYLD expression in the C57-CYLD^{C/S}-metastasis.

In addition to lung, other tissues were analyzed (kidney and brain) and no metastases were found (data not shown).

C57-CYLD^{C/S}-metastases show markers distinctive of highly aggressive epidermal tumors such as increased angiogenesis, induction of Snail and keratins K8/K13, and decreased expression of Maspin

We analyzed the expression of markers of malignancy of SCCs such as keratins K8 and K13 in the lung metastases. K8 is characteristic of simple epithelia (Moll *et al.*, 1982); although it is not expressed in epidermis, it is frequently detected in skin tumors, with this aberrant expression being considered a marker of malignancy (Casanova *et al.*, 2004). In lung tissue, K8 was detected in the respiratory epithelium that lines the bronchi, bronchioles, and alveoli, as expected (Casanova *et al.*, 1995). K8 was not detected in the C57-Control epidermal cells invading the lungs (Figure 3a); however, it was strongly expressed in the tumor cells of the C57-CYLD^{C/S}-metastasis, indicating its high grade of malignancy (Figure 3b). K13 are a keratin characteristic of internal stratified squamous epithelia that is aberrantly expressed in skin tumors and are also considered a marker of tumor progression (Winter *et al.*, 1990; Moreno-Maldonado *et al.*, 2008). We found K13-positive cells in the C57-CYLD^{C/S}-tumoral masses invading the lungs (Figure 3d), whereas it was not detected in the C57-Control-metastasis (Figure 3c). We also found that C57-CYLD^{C/S}-metastasis were highly proliferative as indicated by the elevated number of positive cells for Ki67 (Figure 3f) compared with that detected in the C57-Control-metastasis (Figure 3e).

Another factor that contributes to increase the aggressiveness of SCCs is the presence of a strong vascularization (Bolontrade *et al.*, 1998). We have analyzed by smooth muscle actin immunostaining the pattern of blood vessels in both C57-Control-metastasis and CYLD^{C/S}-metastasis and found that C57-CYLD^{C/S}-metastases were highly vascularized (Figure 3h), whereas we hardly detected smooth muscle actin-positive staining in the C57-Control-metastasis (Figure 3g).

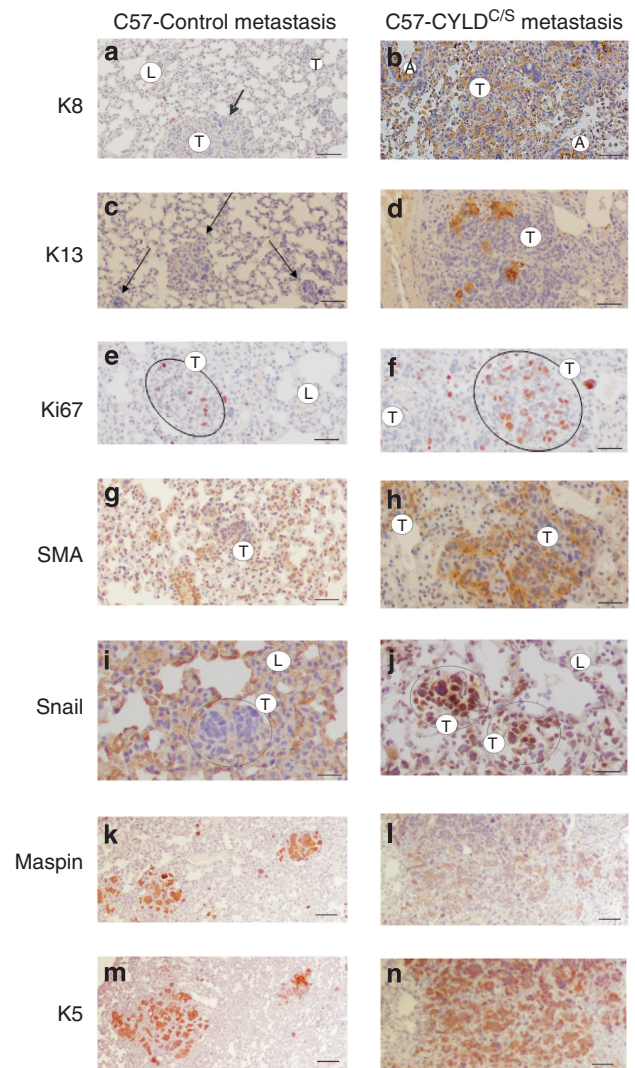


Figure 3. Analysis of markers of malignancy in C57-Control and C57-CYLD^{C/S} metastases. (a, b) Keratin 8 (K8) immunostaining. (c, d) Keratin 13 (K13) staining. (e, f) Ki67 staining showing the proliferation rate of the C57-control and C57-CYLD^{C/S}-metastasis. (g, h) Smooth muscle actin (SMA) staining of the blood vessels of C57-Control-metastasis and CYLD^{C/S}-metastasis is used as indicative of the tumor angiogenesis. Note the strong vascularization of the metastasis expressing the mutant CYLD^{C/S}. Snail expression was detected in the (j) C57-CYLD^{C/S}-metastasis but not in the (i) C57-Control-metastasis. (l) Observe the diminished expression of Maspin in the CYLD^{C/S} squamous cell carcinomas (SCCs). (m, n) K5 staining shows the extension of the C57-Control-metastasis and CYLD^{C/S}-metastasis. A, alveoli; L, lung tissue; T, tumor mass. Bars: (a–d) = 350 μ m; (e, f) = 250 μ m; (g–j) = 200 μ m; (k–n) = 300 μ m.

This result is in agreement with our previous finding showing an enhanced angiogenesis in the skin tumors obtained by subcutaneous inoculation of both the murine C57 and human A431 SCC cells expressing the CYLD^{C/S} mutant (Alameda *et al.*, 2010, 2011a).

As it has been described that Snail develops an important role in mouse skin tumor progression and invasion (Peinado *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2004; Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005), we analyzed by both immunohistochemistry and western blot whether Snail was expressed in the metastasis.

We found elevated expression of Snail in the C57-CYLD^{C/S}-metastasis, whereas it was not detected in the C57-Control-metastasis, therefore suggesting a more aggressive phenotype of the C57-CYLD^{C/S}-metastasis (Figures 2k and 3i and j).

We have recently found a correlation between decreased levels of Maspin and increased malignancy of epidermal tumors in mice (Alameda *et al.*, 2011a). We then checked the expression of Maspin in the metastasis and found that it was strongly expressed in the C57-Control-metastasis (Figure 3k), almost in the whole tumor mass (denoted by the K5 expression area, Figure 3m); in contrast, it showed a weak expression in the tumor cells of C57-CYLD^{C/S}-metastasis (Figure 3l), in spite of the large size of the SCCs (indicated by K5 expression, Figure 3n). Western blot analysis also showed decreased levels of Maspin in C57-CYLD^{C/S}-metastasis (Figure 2k).

CYLD lack of function directly correlates with Maspin decreased expression in epidermal SCC cells

The above analysis shows striking differences between C57-Control and C57-CYLD^{C/S} metastasis for expression of two important proteins for metastasis progression, i.e., Snail and Maspin. We have then examined whether the changes in the expression of both Snail and Maspin have previously taken place in the C57-CYLD^{C/S} cells growing in monolayer cultures. qPCR analysis showed a 4-fold increase in the expression of Snail in the C57-CYLD^{C/S} cells with respect to that in the C57-Control cells (Figure 4a). However, we could not detect Snail protein by western blot in C57-Control cells nor in C57-CYLD^{C/S} cells (Figure 4b) growing in monolayer cultures. The analysis of Maspin expression by qPCR showed that levels were not significantly different between C57-control or C57-CYLD^{C/S} cells (data not shown). However, the analysis of Maspin protein showed that the C57-CYLD^{C/S} cells express lower levels of Maspin than the C57-Control cells (Figure 4c). To discard a cell type-specific effect, we studied whether the mutant CYLD isoform affected the expression of Maspin in two other cell lines: the A431 SCC cells and the murine PB cells (these cell lines were transfected with the CYLD^{C/S} construct and A431-CYLD^{C/S} and PB-CYLD^{C/S} clones isolated). We found that effectively, both A431-CYLD^{C/S} and PB-CYLD^{C/S} cells exhibited lower levels of Maspin expression than their respective controls (A431-Control and PB-Control cells; Figures 4d and e). These results indicate a correlation between the loss of the catalytic function of CYLD and the diminished expression of Maspin in tumor SCC cells. We then analyzed whether the overexpression of exogenous wild-type CYLD in SCC cells has the opposite effect. For this purpose, we studied the expression of Maspin in A431-CYLD^{WT} cells (A431 cells overexpressing the CYLD wild-type complementary DNA) (described in Alameda *et al.*, 2011a) and observed higher levels of Maspin expression in these cells as compared with A431-Control cells (Figure 4d). Therefore, our results show that the impairment of the deubiquitination function of CYLD in SCC cells as a result of CYLD^{C/S} expression is accompanied by a decrease in the expression of Maspin protein in these tumor cells and, conversely, the exogenously increased CYLD wild-type expression correlates with an

increased expression of Maspin. According to these results, we have performed immunoprecipitation experiments that suggest a possible physical interaction between CYLD and Maspin (Supplementary Figure S2 online).

In order to analyze whether the reduction in the expression of Maspin in the C57-CYLD^{C/S} cells could be a reason for their highly malignancy, we have transfected them with a complementary DNA of Maspin. Double transfectants, C57-CYLD^{C/S}-Maspin cells, were selected (Figure 4g). A reduction in the proliferation rate of the double transfectants was observed in monolayer cultures of C57-CYLD^{C/S}-Maspin cells compared with both C57-Control and C57-CYLD^{C/S} cells (Figure 4h). The metastasis assays in nude mice showed that whereas the C57-CYLD^{C/S} cells developed abundant foci of metastasis by day 5 after injection (Figure 4j and Supplementary Table S2 online), the C57-CYLD^{C/S}-Maspin cells only originate few small metastases per lung (Figure 4k, Supplementary Table S2 online). At this time, C57-Control cells also develop metastases, although less numerous and smaller in size than the C57-CYLD^{C/S} cells (Figure 4i, Supplementary Table S2 online). K5 staining confirmed the epidermal nature of the metastases (Figure 4i-k). We have also detected a diminished vascularization of the C57-CYLD^{C/S}-Maspin metastasis with respect to that of the C57-CYLD^{C/S} metastasis (Supplementary Figure S3 online).

An inverse relationship between levels of Maspin expression and the grade of malignancy of epidermal cells is detected in different cell lines

As the expression of Maspin in epidermal cells has not been explored yet, we studied whether a relationship exists between Maspin expression and the grade of malignancy of epidermal tumor cells. We found that both murine (MCA3D) and human (HaCaT) nontumoral cells expressed higher levels of Maspin than the tumoral cells. The tumor SCC13 human cells, which are less aggressive than the A431 cells, express higher levels of Maspin (Figure 4f). We also found that C57 murine tumor cells expressed lower levels of Maspin than normal mouse skin and MCA3D cells; and the very aggressive HaCa4 SCC cells express low levels of Maspin (Figure 4f). Overall, our results establish a decreased expression of Maspin with increasing tumor epidermal cell malignancy, suggesting that the low levels of Maspin expression results in a more invasive phenotype.

Maspin expression is decreased in human cylindromas, trichoepitheliomas, and spiradenomas defective in CYLD function

In order to analyze whether there is a correlation *in vivo* between CYLD lack of function and a decrease in Maspin expression, we studied the expression of Maspin in cylindromas, spiradenomas, and trichoepitheliomas (lacking CYLD deubiquitinase function). Skin from healthy donors showed that Maspin was mainly expressed in the suprabasal, differentiated layers of the epidermis, and in the inner root sheath of hair follicles (Figure 5a; compare with the K14 basal staining and the suprabasal K10 expression, Figure 5b and c). Staining of the cylindromatosis tumors showed that Maspin was

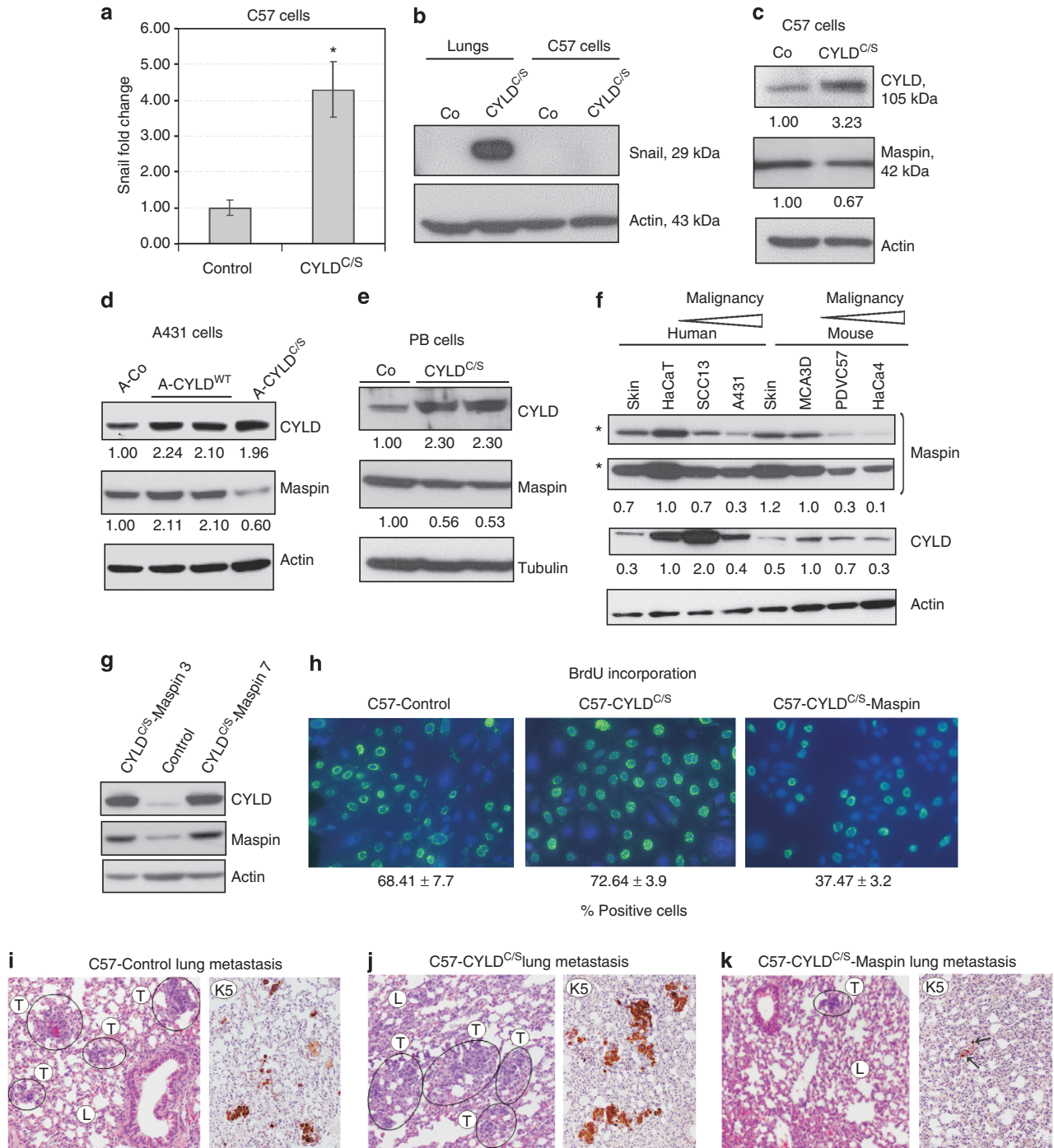


Figure 4. Snail and Maspin expression in human and murine cells. (a) qPCR showing significant increase in Snail expression in C57-CYLD^{C/S} cells (**P*<0.05). (b) Snail protein is not detected in the C57-Control not in the C57-CYLD^{C/S} cells. Lungs containing C57-CYLD^{C/S}-metastasis (positive for Snail expression) and C57-Control-metastasis (negative for Snail protein) were used as controls. (c–e) Downregulation of Maspin in three types of CYLD^{C/S} cells. (d) A431-CYLD^{WT} cells show enhanced Maspin expression. (f) Observe a correlation between decreased Maspin expression and increasing malignancy. CYLD expression levels are shown. Asterisks indicate different exposition times. (g) Increased Maspin expression in the C57-CYLD^{C/S}-Maspin cells (clones 3 and 7). (h) C57-CYLD^{C/S}-Maspin cells show decreased proliferation rate (36-h culture). (i–k) Hematoxylin/eosin and keratin 5 (K5) staining showing the reduced number and size of metastasis in the C57-CYLD^{C/S}-Maspin lungs. Co, control; L, lung tissue; T, tumor mass.

strongly expressed in the adjacent healthy epidermis, whereas it was weakly expressed in the tumoral cells of the three types of neoplasias (Figure 5g–l). In cylindromas and trichoepitheliomas, Maspin was only located in the inner parts of the

tumor islands that are the more differentiated regions (Figure 5g, j, h, and k). In spiradenomas, scarce Maspin expression was detected in sporadic cells of the tumor compared with the high and continuous expression seen in

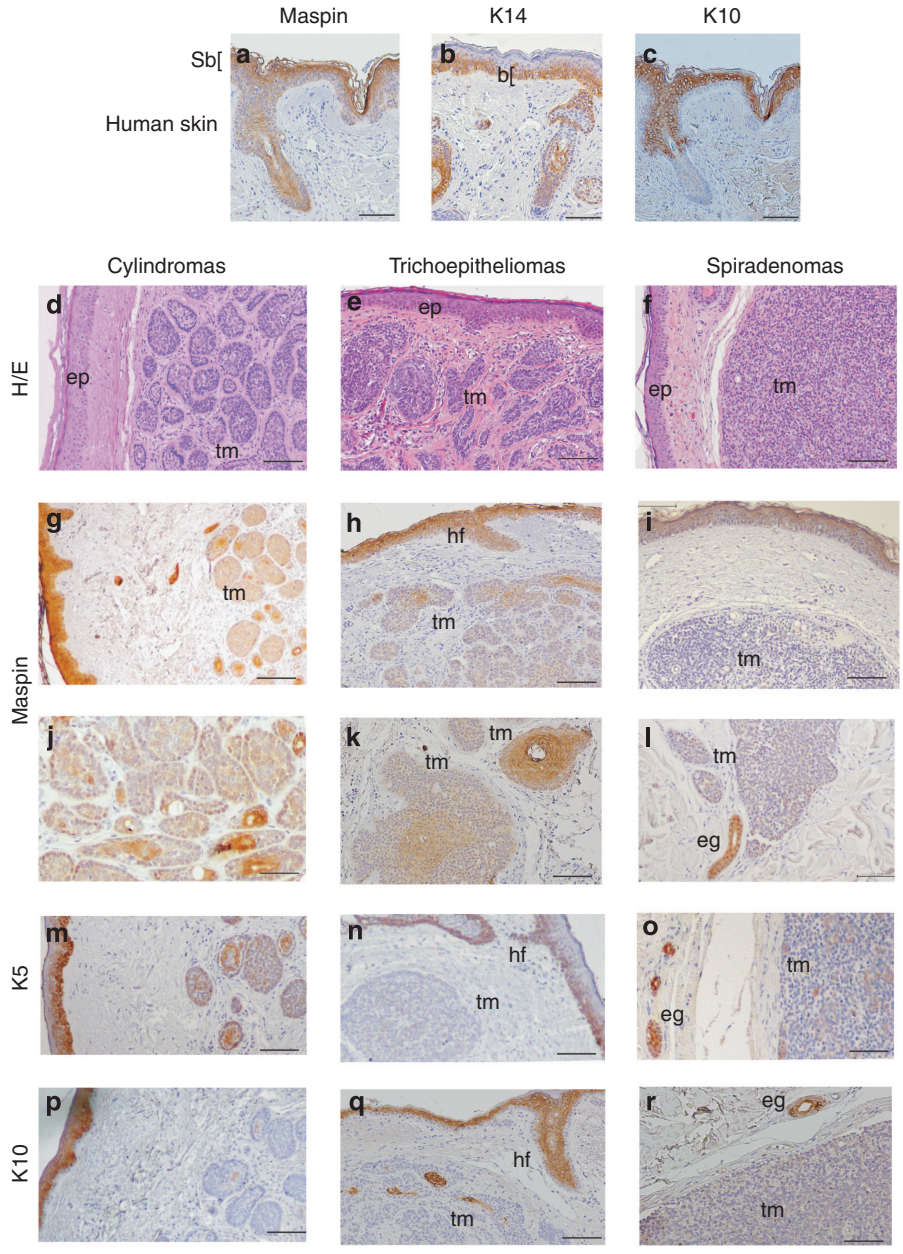


Figure 5. Maspin, keratin 5 (K5), and keratin 10 (K10) expression in human skin, cylindromas, trichoepitheliomas, and spiradenomas. (a–c) Expression of Maspin in the suprabasal layers of the skin and the outer root sheath of the hair follicles. K14 and K10 staining mark the basal and suprabasal cell layers of the epidermis, respectively. (d–f) Hematoxylin/eosin (H/E) staining. (g–l) Maspin expression in the three types of tumors. (m–o) K5 immunostaining. (p–r) K10 expression. b, basal; eg, eccrine gland; ep, epidermis; hf, hair follicle; tm, tumor mass. Observe the decreased expression of K5, K10, and Maspin in the tumor masses compared with the elevated expression in epidermis, hair follicles, and eccrine glands. An average of five samples of each case was analyzed. Bars: (a–c) = 500 μ m; (d–i) = 400 μ m; (j–r) = 350 μ m.

the epidermis and the eccrine glands (Figure 5i and l). We observed that keratin K5 and K10 expression was also down-regulated in most of the tumor islets of the three types of familial cylindromatosis tumors (Figure 5m–r). These results show that, as occurs in *CYLD*^{CS} tumor cells, where the lack of the deubiquitination function of CYLD was accompanied by diminished expression of Maspin, in tumor cells of cylindromatosis patients carrying a functionally similar inactivating mutation in the *CYLD* gene (Rajan *et al.*, 2009), a decreased expression of Maspin was also observed.

DISCUSSION

Here we describe that in *in vivo* metastasis experiments in nude mice, the epidermal C57-CYLD^{CS} cells lacking the deubiquitinase function of CYLD leads to very aggressive metastasis in lung. Previously, we had found that lack of CYLD function in epidermal cells leads to an increase in several angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor; it also makes the cells resistant to apoptosis, increases their proliferation, and induces the delocalization of adhesion proteins (E-cadherin and β -catenin) (Alameda *et al.*, 2010,

2011a). Altogether, the combination of all these alterations could be responsible for the great increase in the metastatic potential of the C57-CYLD^{C/S} cells. In addition, we have now found decreased expression of Maspin in the C57-CYLD^{C/S} cells, which appears as an important factor for the increased malignancy of the C57-CYLD^{C/S} cells, as restoration of Maspin expression in C57-CYLD^{C/S} cells results in reduction in the number and extension of metastases in the lung.

We have found evidences indicating a direct correlation between the lack of CYLD function as a consequence of the expression of the mutant CYLD^{C/S} in SCC cells and the diminished expression of Maspin (Figure 4c–e). Moreover, our results also show that the exogenous overexpression of CYLD^{WT} in SCC cells correlates with increased levels of Maspin (Figure 4d). Remarkably, we have found loss of Maspin expression in the CYLD-deficient tumors (cylindromas, trichoepitheliomas, and spiradenomas) compared with the expression in normal human skin, indicating a correlation *in vivo* between the deficient CYLD function and the decrease in Maspin expression as well. The fact that most of the hereditary cylindromatosis patients do not develop metastasis may be likely because of the lack of additional mutations (besides CYLD mutation) in this kind of tumors.

It had been reported that Maspin is an important inhibitor of human tumor progression and metastasis in different types of cancers such as breast, liver, and prostate carcinomas (Luo *et al.*, 2007; Stark *et al.*, 2010). However, until now, there is little information about the relation of Maspin and skin cancer. Recently, we have reported a possible relationship between Maspin downregulation and NMSC progression *in vivo* in mouse skin carcinogenesis assays (Alameda *et al.*, 2011b). Here we have found a correlation between decreased expression of Maspin and increased malignancy of mouse and human tumor epidermal cells. These results suggest that the levels of Maspin expression could be an important predictive tool in the course of the NMSC progression and metastasis.

We have found that a relationship exists between lack of CYLD function in epidermal SCCs and increased lung metastatic capacity of the tumor cells. Our results contribute to the understanding of the molecular biology of SCC epidermal metastasis, assigning a role for CYLD as suppressor of lung metastasis in addition to its implication in the familial cylindromatosis disease. Our data suggest that the reduction in the levels of Maspin expression in the C57-CYLD^{C/S} cells—along with the other changes previously described to occur in the C57 cells as a consequence of CYLD^{C/S} expression—plays an important role in the acquisition of high metastatic potential of these cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture conditions

C57, A431, and PB cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum. Transfected cells were grown in the presence of 0.4 mg of G418 per ml for single transfection or 0.4 mg of G418 per ml plus 0.1 mg of Hygromycin B per ml for double transfection (C57-CYLD^{C/S}-Maspin cells). C57-Control, C57-CYLD^{C/S}, A431-Control,

A431-CYLD^{C/S}, and A431-CYLD^{WT} cells have been already described (Alameda *et al.*, 2010, 2011a).

DNA constructs

Constructs employed have been previously described (Alameda *et al.*, 2010, 2011a). Maspin complementary DNA of rat origin (Tokuyama *et al.*, 2007) was subcloned into the pcDNA3-hygromycin (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Metastasis assays

First time, 5×10^5 C57-Control and C57-CYLD^{C/S} cells were resuspended in 100 μ l of phosphate-buffered saline and injected intravenously into the tail vein. A total of 10 nude mice (Hsd-Athymic Nude, Harlan Europe, Barcelona, Spain) were injected with cells of each phenotype. For metastasis experiments with C57-Control, C57-CYLD^{C/S}, and C57-CYLD^{C/S}-Maspin cells (Figure 4i–k), 5×10^5 cells of each genotype were resuspended in 100 μ l of phosphate-buffered saline and injected intravenously into the eye vein. Then, 7 nude mice were injected with cells of each phenotype and samples were recovered 5 and 10 days after injection. All experimental procedures were performed according to European and Spanish laws.

Histology and immunohistochemistry

Formalin-fixed lungs were stained with hematoxylin and eosin for histopathological evaluation and immunohistochemistry was performed with the following antibodies: K5, K6, K10 (Covance, San Diego, CA); CYLD (Sigma-Aldrich, St Louis, MO); K8, smooth muscle actin (Sigma-Aldrich); K13, Snail (Abcam, Cambridge, UK); Ki67, K14 (NeoMarkers, Fremont, CA); and Maspin (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Stainings with CYLD and Snail antibodies were performed in cryosections fixed in methanol/acetone.

Western blot analysis

Antibodies used were: Actin, Maspin, Snail, rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Europe); CYLD (SAB4200060, SAB4200061); and tubulin (Sigma-Aldrich). A total of 40–50 μ g of total lysate was used. Total protein extracts (300 μ g) were immunoprecipitated with an antibody specific for CYLD (SAB4200060 or SAB4200061) or Maspin. These three antibodies were produced in rabbit. Proteins were resolved on an SDS gel; probed with anti-Maspin and CYLD SAB4200060 or CYLD (sc-25779, Santa Cruz Biotechnology) antibodies. As control of specificity, samples (300 μ g) were immunoprecipitated with rabbit IgG.

Quantitative PCR

RNA was extracted from cells using trizol followed by purification by RNeasy columns. RNA was reverse transcribed using the ABI High-Capacity Kit (ABI, Foster City, CA). Real-Time PCR was performed using predesigned Taqman assays in an ABI 7500Fast instrument, using the conditions indicated by ABI.

Human tissue samples

For formalin-fixed, paraffin-embedded skin and tumor samples, archival paraffin blocks were obtained from the biobank of the Fundación Jiménez Díaz (Madrid, Spain). All experimentation was approved by the Research Committee of the Hospital Fundación Jiménez Díaz, and this study has been designed and performed following Declaration of Helsinki Principles for human research in their revised form.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr R Bernards for providing the CYLD^{C5} cDNA; Federico Sánchez-Sierra for invaluable assistance in the histological techniques; Cristina Mera for immunohistochemical support; CIEMAT Animal Unit for care of the mice; and Dr Satomura and Dr Asamoto for providing the Maspin cDNA. This work was funded by grants from the *Ministerio de Ciencia e Innovación* PI10/01480 to MLC, and SAF2010-22156 to AR.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/jid>

REFERENCES

- Alameda JP, Fernandez-Acenero MJ, Moreno-Maldonado R *et al.* (2011a) CYLD regulates keratinocyte differentiation and skin cancer progression in humans. *Cell Death Dis* 2:e208
- Alameda JP, Moreno-Maldonado R, Fernandez-Acenero MJ *et al.* (2011b) Increased IKKalpha expression in the basal layer of the epidermis of transgenic mice enhances the malignant potential of skin tumors. *PLoS One* 6:e21984
- Alameda JP, Moreno-Maldonado R, Navarro M *et al.* (2010) An inactivating CYLD mutation promotes skin tumor progression by conferring enhanced proliferative, survival and angiogenic properties to epidermal cancer cells. *Oncogene* 29:6522–32
- Bailey CM, Khalkhali-Ellis Z, Seftor EA *et al.* (2006) Biological functions of maspin. *J Cell Physiol* 209:617–24
- Barrallo-Gimeno A, Nieto MA (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132:3151–61
- Bignell GR, Warren W, Seal S *et al.* (2000) Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet* 25:160–5
- Bolontrade MF, Stern MC, Binder RL *et al.* (1998) Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors. *Carcinogenesis* 19:2107–13
- Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM *et al.* (2003) Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* 424:797–801
- Casanova L, Bravo A, Were F *et al.* (1995) Tissue-specific and efficient expression of the human simple epithelial keratin 8 gene in transgenic mice. *J Cell Sci* 108:811–20
- Casanova ML, Bravo A, Martinez-Palacio J *et al.* (2004) Epidermal abnormalities and increased malignancy of skin tumors in human epidermal keratin 8-expressing transgenic mice. *FASEB J* 18:1556–8
- Christenson LJ, Borrowman TA, Vachon CM *et al.* (2005) Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. *JAMA* 294:681–90
- De Marval PM, Lutfeali S, Jin JY *et al.* (2011) CYLD inhibits tumorigenesis and metastasis by blocking JNK/AP1 signaling at multiple levels. *Cancer Prev Res (Phila)* 4:851–9
- Futscher BW, O'Meara MM, Kim CJ *et al.* (2004) Aberrant methylation of the maspin promoter is an early event in human breast cancer. *Neoplasia* 6:380–9
- Gerretsen AL, Beemer FA, Deenstra W *et al.* (1995) Familial cutaneous cylindromas: investigations in five generations of a family. *J Am Acad Dermatol* 33:199–206
- Khalkhali-Ellis Z (2006) Maspin: the new frontier. *Clin Cancer Res* 12:7279–83
- Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G *et al.* (2003) The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 424:801–5
- Lee DA, Grossman ME, Schneiderman P *et al.* (2005) Genetics of skin appendage neoplasms and related syndromes. *J Med Genet* 42:811–9
- Luo JL, Tan W, Ricono JM *et al.* (2007) Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature* 446:690–4
- Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K *et al.* (2006) Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell* 125:665–77
- Massoumi R, Paus R (2007) Cylindromatosis and the CYLD gene: new lessons on the molecular principles of epithelial growth control. *Bioessays* 29:1203–14
- Moll R, Franke WW, Schiller DL *et al.* (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11–24
- Moller R, Reymann F, Hou-Jensen K (1979) Metastases in dermatological patients with squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol* 115:703–5
- Moreno-Maldonado R, Ramirez A, Navarro M *et al.* (2008) IKKalpha enhances human keratinocyte differentiation and determines the histological variant of epidermal squamous cell carcinomas. *Cell Cycle* 7:2021–9
- Peinado H, Marin F, Cubillo E *et al.* (2004) Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci* 117:2827–39
- Rajan N, Langtry JA, Ashworth A *et al.* (2009) Tumor mapping in 2 large multigenerational families with CYLD mutations: implications for disease management and tumor induction. *Arch Dermatol* 145:1277–84
- Roy HK, Iversen P, Hart J *et al.* (2004) Down-regulation of SNAIL suppresses MIN mouse tumorigenesis: modulation of apoptosis, proliferation, and fractal dimension. *Mol Cancer Ther* 3:1159–65
- Saggari S, Chernoff KA, Lodha S *et al.* (2008) CYLD mutations in familial skin appendage tumours. *J Med Genet* 45:298–302
- Shi HY, Zhang W, Liang R *et al.* (2001) Blocking tumor growth, invasion, and metastasis by maspin in a syngeneic breast cancer model. *Cancer Res* 61:6945–51
- Stark AM, Schem C, Maass N *et al.* (2010) Expression of metastasis suppressor gene maspin is reduced in breast cancer brain metastases and correlates with the estrogen receptor status. *Neurol Res* 32:303–8
- Tokuyama R, Satomura K, Maeda E *et al.* (2007) Maspin is involved in bone matrix maturation by enhancing the accumulation of latent TGF-beta. *J Bone Miner Res* 22:1581–91
- Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschirritzis T *et al.* (2003) CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* 424:793–6
- Winter H, Rentrop M, Nischt R *et al.* (1990) Tissue-specific expression of murine keratin K13 in internal stratified squamous epithelia and its aberrant expression during two-stage mouse skin carcinogenesis is associated with the methylation state of a distinct CpG site in the remote 5'-flanking region of the gene. *Differentiation* 43:105–14
- Young AL, Kellermayer R, Szigeti R *et al.* (2006) CYLD mutations underlie Brooke-Spiegler, familial cylindromatosis, and multiple familial trichoe-pithelioma syndromes. *Clin Genet* 70:246–9

Supplementary Information.

SI-1. CYLD immunohistochemical expression in lungs carrying C57-Control or

CYLD^{C/S} metastasis. (a) CYLD is strongly expressed in the apical epithelium of the bronchioles of lungs carrying C57-Control metastasis. By contrast it is weakly detected in the lungs carrying C57-CYLD^{C/S} metastasis (b). B: bronchioles. Scale: a-b, 200 μ m.

SI-2. Physical interaction between CYLD and Maspin.

(a) and Maspin (b) immunoprecipitated samples were probed with anti-Maspin and anti-CYLD antibodies. No bands were obtained when instead of Maspin or CYLD antibodies, rabbit IgG were employed in the immunoprecipitation, indicating the specificity of the interaction CYLD-Maspin. Asterisks in (b) indicate the bands of CYLD and Maspin. (c) In addition to the co-immunoprecipitation of CYLD and Maspin in the PB cells, this blot shows the hybridization of total protein extracts from PB cells with both CYLD, and Maspin antibodies. The first lane is a control lane confirming the correct identity of the bands detected in the co-immunoprecipitation blots. The asterisk indicates two different exposition times of the same CYLD hybridization.

SI-3. Analysis of angiogenesis of C57-Control, C57-CYLD^{C/S} and C57-CYLD^{C/S}-

Maspin metastasis. Sma staining of the blood vessels is used as indicative of tumor angiogenesis. Immunostaining of lungs harvested 10 days post-injection of the cells of the three genotypes in the vein eye is showed. Metastases of similar size are tried to be showed. Note the strong vascularization of the C57-CYLD^{C/S} metastases (a) in contrast with the weaker angiogenesis detected in the C57-CYLD^{C/S}-Maspin metastases when Maspin expression is restored to the C57-CYLD^{C/S} cells (c). Weak angiogenesis is also detected in the C57-Control metastasis (b). T: tumor mass; L: lung tissue. Scale bar: 200 μ m.

Endogenous CYLD expression in lungs

Lungs carrying C57-Control metastasis

Lungs carrying C57-CYLD^{CG} metastasis

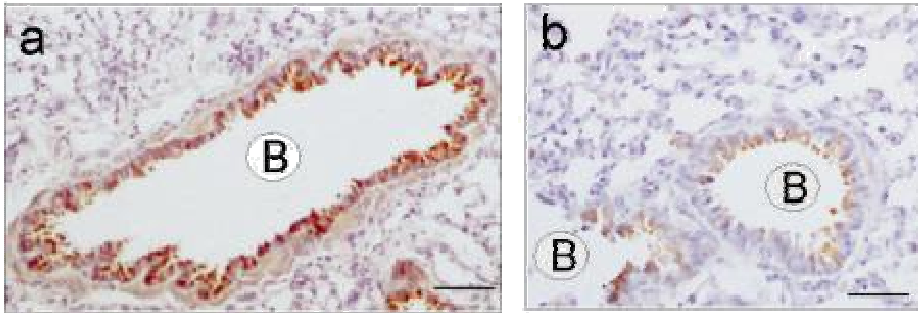


Figure SI-1

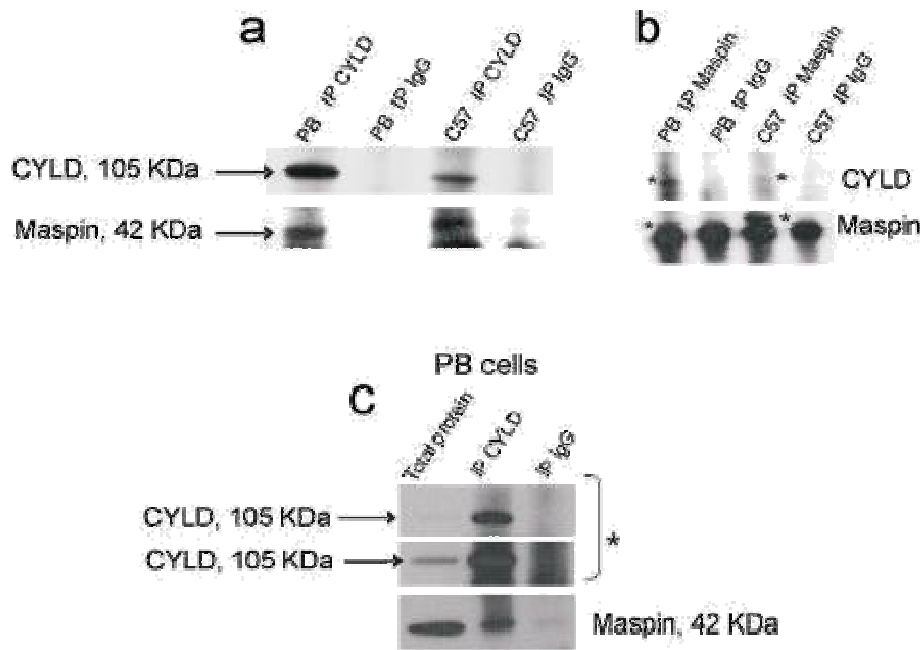
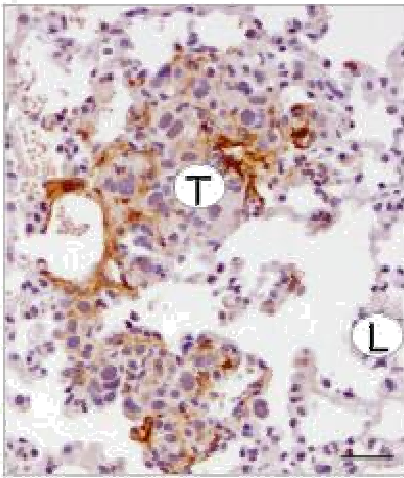


Figure SI-2

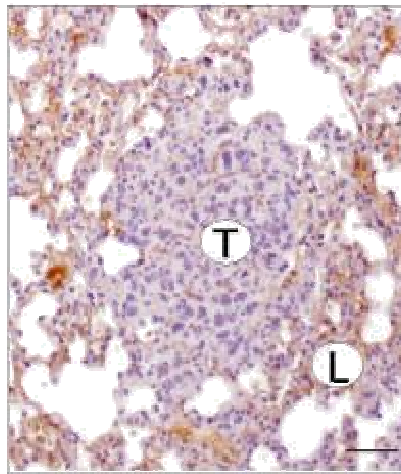
a

C57-CYLD^{CS} lung metastasis



b

C57-Control lung metastasis



c

C57-CYLD^{CS}-Maspin lung metastasis

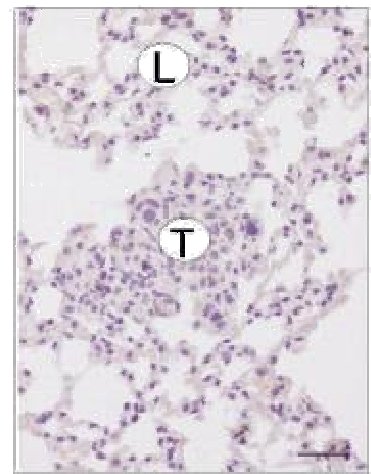


Figure SI-3

Supplementary Information

SI-Table 1. Area occupied by both C57-Control lung metastasis and C57-CYLD^{C/S} lung metastasis 14 days after injection of the cells into the tail vein of nude mice.

	None ^a	=10% ^a	10-40% ^a	40-90% ^a
Control lung metastasis	1/10	7/10	2/10	
CYLD ^{C/S} lung metastasis	0/10			10/10

None: number of mice that do not develop metastases

a: percentage of the lung area occupied by metastases

n:10

Supplementary Information

SI-Table 2. Area occupied by C57-Control lung metastasis, C57-CYLD^{C/S} lung metastasis and C57-CYLD^{C/S}-Maspin lung metastasis 10 days after injection of the cells into the eye vein of nude mice.

	None ^a	=10% ^a	10-40% ^a	40-90% ^a
Control lung metastasis	0/6		6/6	
CYLD ^{C/S} lung metastasis	0/6		2/6	4/6
CYLD ^{C/S} -Maspin lung metastasis	2/8	6/8		

None: number of mice that do not develop metastases a:

percentage of the lung area occupied by metastases

6 mice were injected with the C57-Control and the C57-CYLD^{C/S} cells; 8 mice were injected with the C57-CYLD^{C/S}-Maspin cells

Datos inéditos

Materiales y Métodos

Los datos que se muestran a continuación hacen referencia al trabajo que está en fase de escritura.

1. Construcción utilizada en la generación de los ratones transgénicos K5-CYLD^{C/S}.

El plásmido K5-CYLD^{C/S} que contiene el cDNA del gen CYLD^{C/S} humano (proporcionado por el Dr. R. Bernards) fue subclonado en el vector de expresión pBSK-K5, bajo el promotor de la queratina 5 bovina. Este cDNA lleva una mutación puntual en el aminoácido 601 (cisteína) y asemeja las que presentan algunos de los pacientes de cilindromatosis hereditaria. La construcción contiene además el epítipo HA (Figura 10).

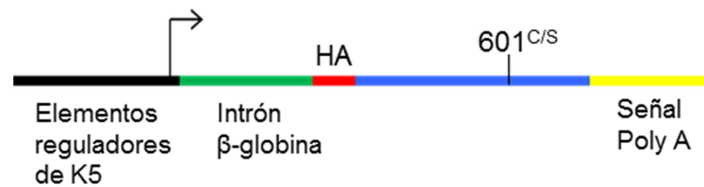


Figura 10. Esquema de la construcción microinyectada en los embriones de ratón.

2. Generación de ratones transgénicos.

Se indujo la superovulación de hembras B6D2F1, de 3 semanas de edad, por medio de una inyección de gonadotropina de suero de yegua preñada (Folligon, Intervet); 48h más tarde se realizó una 2ª inyección de gonadotropina coriónica humana (Choluron, Intervet). Las hembras así hormonadas se cruzaron con machos fértiles B6D2F1. Al día siguiente se seleccionaron las hembras que presentaban tapón vaginal, se aislaron los oviductos y se recogieron los oocitos fecundados en medio M2 (Sigma). Posteriormente, se incubaron con hialuronidasa (Sigma) y se mantuvieron a 37°C hasta su microinyección. Los embriones que sobrevivieron a la microinyección fueron transferidos al oviducto de hembras B6D2F1 pseudopreñadas. Los dos animales transgénicos fundadores obtenidos se cruzaron con ratones B6D2F1 y se establecieron las líneas transgénicas: K5-CYLD^{C/S}-X y K5-CYLD^{C/S}-A.

3. Animales de experimentación.

Los ratones utilizados fueron criados en el servicio del animalario del CIEMAT (Centro Usuario de Animales de Experimentación 28079-21ª), bajo condiciones estándar, temperatura de 20 ± 2°C, y ciclos de luz/oscuridad de 12h. Todos los

procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las leyes y regulaciones Europeas y Españolas (Convenio Europeo ETS 123 sobre la protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales u otros fines científicos; RD53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia), y fueron aprobados por el Comité Ético del CIEMAT (OEBA-CIEMAT), por el Órgano Habilitado y por la autoridad competente (Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, Comunidad de Madrid; Proex 182-15). Los ratones fueron eutanasiados en cámara de CO₂, siguiendo las regulaciones de Felasa y del OEBA-CIEMAT.

4. Análisis genotípico de los ratones.

El análisis se llevó a cabo a partir del DNA genómico obtenido de biopsias de cola de ratones de aproximadamente 10 días de edad. La digestión de las biopsias se realizó con una solución compuesta por: Tris-HCl (50mM, pH 8.0), EDTA (100mM), NaCl (100mM), SDS (1%) y proteinasa K, durante toda la noche a 55°C en agitación. A continuación, se tratan con RNAasa A+T1 (60µg/ml) durante 15 min a RT, se añadió 700µl de isopropanol obteniéndose un ovillo de DNA, que fue lavado con etanol y resuspendido en Tris-EDTA (1X).

Para el genotipado de los animales por PCR se usó la siguiente reacción: 1µl DNA, 0.5µl oligonucleótidos (10µM), 5µl Kit Promega y 3µl agua. Se amplifica la secuencia del intrón de la β-globina de conejo, con los siguientes cebadores:

5'-TTC AGG GTG TTG TTT AGA ATG G-3'

5'-CAA TAA GAA TAT TTC CAC GCC A-3'

5. Ensayo del ciclo de crecimiento del pelo

Se realizó este estudio en ratones de 7 semanas de edad. Los animales fueron anestesiados con 16µl de avertina al 2.5% por cada gramo de peso del animal. Se depilaron al final del primer telogén e inicio del segundo anagén, con crema depilatoria Veet. Se realizó un seguimiento diario de los ratones y a los 16 días post-depilación se sacrificaron y se recogieron muestras de piel de lomo de ratones control y transgénicos para los estudios posteriores.

6. Análisis histológico e inmunohistoquímico.

Las muestras procedentes de la necropsia de los diferentes ratones fueron fijadas en formol o etanol, procesadas y embebidas en parafina. Se realizaron cortes de 4 μm en el microtomo. El estudio histológico se realizó en muestras de formol teñidas con hematoxilina/eosina. El análisis inmunohistoquímico se llevó a cabo con los anticuerpos primarios mostrados en la Tabla 1. Los anticuerpos secundarios anti-IgG estaban conjugados con biotina y presentaban especificidad para conejo y ratón (Amersham). El marcaje se detectó con biotina-avidina-peroxidasa (kit ABC, Vectastain, Vector Laboratorios) y el sustrato DAB (Vector Laboratorios).

Anticuerpo	Dilución	Casa Comercial
BrdU	1:10	Roche 11170376001
CYLD	1:100	Sigma SAB4200061
Filagrina	1:200	Covance PRB-417P
HA	1:100	Cell Signaling 3724
Involucrina	1:300	Sigma I-9018
K5	1:500	Covance PRB-160P
K10	1:500	Covance PRB-159P
Loricrina	1:300	Covance PRB-145P
Sma	1:400	Sigma C-6198
B220	1:100	BioLegend 1103206
CD3	1:6	Dako N1580

Tabla1. Anticuerpos primarios utilizados en los análisis inmunohistoquímicos.

7. Extracción de proteínas

- Extracción de proteína total a partir de piel de lomo: la muestra se trituró en un mortero y se resuspendió en un tampón de lisis que contiene: Hepes (40mM), Tritón (2%), NaCl (200mM), MgCl_2 (40mM), EGTA (20mM), β -glicerofosfato (80mM), inhibidores de proteasas y fosfatasa (1X) (Roche). Se realizaron varios ciclos de congelación/descongelación y posteriormente se centrifugó a 13000rpm durante 15 min.
- Extracción de proteína total de epidermis: ratones de 3 días fueron sacrificados, se extrajo la piel y se incubó con tripsina al 0.25% (Trypsin 1-300, ICN Biomedicals) en PBS (1X) durante 4h a 37°C. Posteriormente se procedió a la separación de la

epidermis de la dermis de forma mecánica. La extracción de las proteínas de la epidermis se realizó siguiendo el protocolo citado anteriormente.

Una vez que las proteínas fueron extraídas se cuantificaron mediante el análisis colorimétrico de Bradford (BioRad).

8. Análisis por *Western Blot*

Las proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS con un porcentaje entre 4-12% (BioRad); posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas separadas a una membrana de nitrocelulosa (diámetro de poro de 0.45µm, BioRad). Los anticuerpos primarios utilizados se muestran en la Tabla 2. Los anticuerpos secundarios anti-IgG están conjugados con peroxidasa, con especificidad para conejo, ratón y cabra (Amersham). Para la detección de los anticuerpos se utilizó el Kit West-PicoSignal (Pierce Biotechnology) y ChemiDocTMMP Imaging System (BioRad).

Anticuerpo	Dilución	Casa Comercial
Actina	1:1000	Santa Cruz 1616
Bcl-3	1:200	Santa cruz 185
CYLD	1:500	Sigma SAB4200061
c-Myc	1:500	Biologend 626802
GAPDH	1:500	Santa Cruz 25778
HA	1:100	Cell Signaling 3724
IKK γ	1:500	Imgenex 5480-2
I κ B α	1:200	Santa Cruz 371
IL-6	1:500	Abcam 9324
p65	1:200	Santa Cruz 8008
TNF- α	1:200	Calbiochem 654250
Ubiquitina	1:500	Cell signalling 3936
p-Akt	1:500	Cell signaling 4068
P-c-Myc	1:200	Santa cruz 8000
P-I κ B α	1:500	Cell signalling 2859
P-JNK	1:500	Cell signalling 4668
P-p65	1:500	Cell signalling 3033

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en el análisis de *Western Blot*.

9. Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación se llevó a cabo según las indicaciones del protocolo de Santa Cruz de Protein A/G PLUS-Agarose. Posteriormente se realizó el *Western Blot* de los extractos proteicos inmunoprecipitados.

10. Tratamiento *in vivo* de ratones con BrdU

Se inyectó BrdU (Roche) intraperitonealmente (100µg por gramo de peso del animal) en ratones de 1 mes de edad. 1h después fueron sacrificados y se recogieron muestras de diferentes órganos. La cuantificación del número de células positivas en la tinción inmunohistoquímica de BrdU se llevó a cabo por dos experimentadores diferentes en muestras de distintos animales.

11. Estimulación *in vivo* de ratones con TNF-α

Se inyectó subcutáneamente en el lomo en ratones de 3 días de edad PBS (1X) o TNF-α humano (Sigma; 20µg por kilogramo de peso). 15, 30 o 40 min después los animales fueron sacrificados. Se recogieron muestras de piel para la extracción de proteínas.

Datos inéditos

1. Generación de ratones transgénicos, K5-CYLD^{C/S}, que expresan una forma mutada de CYLD, catalíticamente inactiva

Hemos generado ratones transgénicos que expresan la forma mutada CYLD^{C/S}, deficiente en su función desubiquitinasa, bajo el control de los elementos reguladores del promotor de la queratina 5 (K5) (Figura 11A). El promotor K5, dirige en la piel la expresión del transgén a los queratinocitos de la capa basal de la epidermis, la vaina radicular externa (VRE) del folículo piloso y células inmaduras que rodean a las glándulas sebáceas²⁰¹ (Figura 11B). Además, el promotor K5 dirige la expresión del transgén a células de otros órganos, entre ellas a las células epiteliales de la lengua, paladar, estómago; también se detecta expresión en timo, bazo, etc. Se obtuvieron 2 líneas de ratones transgénicos que denominamos K5-CYLD^{C/S}-A y K5-CYLD^{C/S}-X y por análisis de *Western Blot* mediante dos anticuerpos diferentes que reconocen CYLD y HA, se comprobó que ambas líneas expresaban el transgén, aunque a distinto nivel, ya que los ratones K5-CYLD^{C/S}-X expresaban niveles más elevados de la proteína mutada que los K5-CYLD^{C/S}-A (Figura 11C). Mediante tinción inmunohistoquímica (INHQ) confirmamos, *in situ*, que la proteína transgénica se expresaba en diferentes tejidos de ambas líneas de ratones siguiendo, como era esperable el patrón de expresión de K5 (Figura 11D-E).

Para confirmar que la proteína CYLD^{C/S}, catalíticamente inactiva, se comporta como un dominante negativo, inhibiendo la función desubiquitinasa de CYLD endógeno, inmunoprecipitamos un sustrato de CYLD, la proteína IKK γ /NEMO, a partir de lisados de proteína de piel de lomo de ratones, Control y K5-CYLD^{C/S}, tratados y no tratados con TNF- α . A continuación determinamos la ubiquitinación de IKK γ mediante hibridación con un anticuerpo específico de IKK γ . Comprobamos que en ausencia de estímulo, es decir, en pieles no tratadas, la poliubiquitinación de IKK γ era débil y no muy diferente en la piel de los ratones Control y en la de los transgénicos. Tras estimulación con TNF- α en los ratones Control no se detectó incremento en ubiquitinación de IKK γ , mientras que en los K5-CYLD^{C/S} se observó una fuerte poliubiquitinación de IKK γ (Figura 11F) debido a que la forma catalíticamente inactiva CYLD^{C/S} compite con la forma endógena de CYLD e impide su función catalítica de desubiquitinación. Cuando el ensayo de funcionalidad de CYLD se realizó con otros sustratos como Bcl-3, se obtuvieron resultados similares (Figura 11G), es decir, tras estimulación con TNF- α , Bcl-3 no era desubiquitinado en los ratones transgénicos. En este caso se observó mayor ubiquitinación de Bcl-3 en la piel de los ratones

transgénicos incluso a tiempo 0, sin estimulación. También se comprobó la funcionalidad de CYLD^{C/S} en los ratones K5-CYLD^{C/S}-A, usando como sustrato Bcl-3, y se encontró que a pesar de expresar niveles menores del transgén, éste también actúa como dominante negativo, inhibiendo la función de CYLD endógeno en estos transgénicos (Figura 11G).

La mayor parte de los resultados que se muestran se realizaron en ambas líneas, y los resultados obtenidos fueron similares.

2. CYLD controla el ciclo de crecimiento del folículo piloso

Los ratones transgénicos jóvenes tienen una apariencia normal y saludable, aunque desde una edad temprana, 2 meses, muestran un pelaje desorganizado y una alopecia parcial (en la Figura 12A se muestra la imagen de ratones de 7 meses de edad con alopecia). Además, el análisis histológico de la piel muestra que mientras que los folículos pilosos (FP) de la piel del dorso de ratones Control de 4 semanas se encuentran en la fase de anagén del segundo ciclo del pelo (como se ha descrito que ocurre en los ratones control de esa edad), los FP de los ratones transgénicos de la misma edad se encuentran en la fase de telogén del primer ciclo del pelo (comparar Figura 14A y B). Estos datos sugieren que los ratones K5-CYLD^{C/S} pueden tener alterado el ciclo de crecimiento del pelo y que CYLD podría tener un papel importante en la homeostasis del FP y/o en el ciclo del pelo. Para comprobarlo depilamos la piel del lomo (dorso) de ratones de 7 semanas de edad (en los que el FP se encuentra en telogén), para sincronizar así la entrada en anagén, y observamos el recrecimiento del pelo (en ningún momento del experimento el peso corporal de los animales Control y transgénicos fue significativamente diferente). A los 16 días post-depilación, el pelo de los ratones Control era ya observable macroscópicamente, había crecido de forma homogénea en toda la superficie del dorso de los ratones, aunque presentaba una corta longitud; de acuerdo a este aspecto externo, las histologías mostraron que los FP se encontraban en fase de anagén-catagén I (Figura 12B-D). Por el contrario, en este tiempo (16 días), el pelo de los ratones transgénicos había crecido de forma desigual en el lomo de los ratones (Figura 12J) o no era apreciable todavía (Figura 12G). Los FP de los ratones transgénicos permanecían todavía en la fase de telogén (Figura 12I) o estaban comenzando a entrar en anagén (Figura 12F). Estas diferencias histológicas también se reflejaban en el distinto grosor de la piel, que era más gruesa en los ratones Control y más degada en los transgénicos (Figura 12C,F,H) y datos nos mostrados. Por tanto, estos resultados indican que CYLD es un estimulador positivo

del crecimiento del pelo y que la función DUB de CYLD es esencial para inducir la fase de anagén del segundo ciclo del pelo.

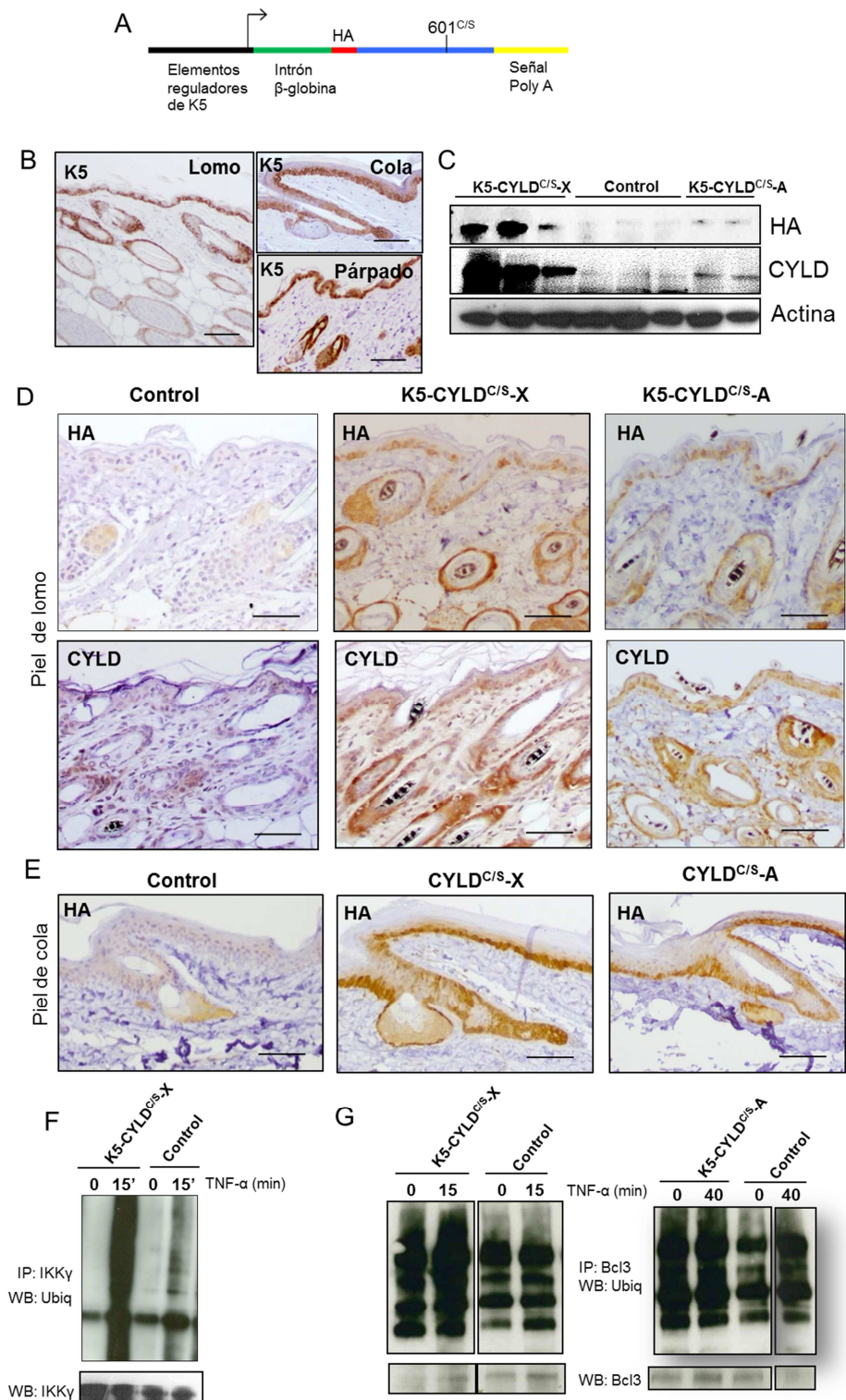


Figura 11. Análisis de la expresión y función del transgén en los ratones transgénicos K5-CYLD^{C/S}. (A) Esquema de la construcción utilizada en la obtención de los ratones transgénicos K5-CYLD^{C/S}. (B) Imagen representativa de la expresión de K5 en lomo, cola y párpado de animales Control de 30 días de

edad. **(C)** Análisis por WB de la expresión de HA y de CYLD en extractos de proteína total de la piel de lomo de ratones Control y transgénicos de 30 días de edad. Se observa que ambas líneas de ratones K5-CYLD^{C/S} expresan niveles más elevados de CYLD que los controles. **(D)** Imágenes representativas de inmunohistoquímica en las que se muestra la expresión de HA y CYLD en piel de lomo de ratones control y transgénicos. En los ratones Control no hay expresión de HA y la expresión de CYLD endógeno es más abundante en los folículos pilosos que en la piel interfolicular. En los ratones CYLD^{C/S} de ambas líneas la expresión del transgén se detecta en la capa basal de la piel interfolicular, en la vaina radicular externa de los folículos y en las células epiteliales que rodean las glándulas sebáceas, siguiendo el patrón de expresión de K5. **(E)** Detección de la expresión del transgén mediante un anticuerpo específico de HA en la piel de la cola de animales Control y transgénicos. **(F)** Análisis funcional del transgén CYLD^{C/S}, por IP en presencia y ausencia de TNF- α con un anticuerpo específico de IKK γ . **(G)** IP de Bcl-3 y posterior hibridación con un anticuerpo de ubiquitina. Se utilizaron extractos de proteína total de piel de ratones (K5-CYLD^{C/S}-X y K5-CYLD^{C/S}-A) inyectados con PBS o con TNF- α durante los tiempos indicados. Barras de escala: 250 μ m (B); 150 μ m (D,E).

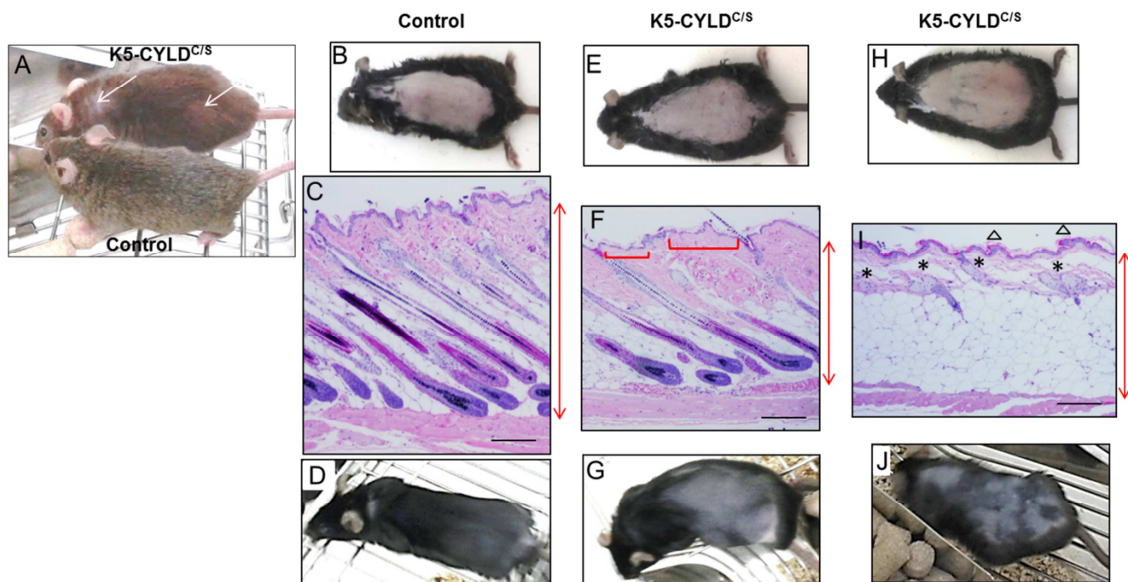


Figura 12. Análisis del ciclo del pelo en ratones Control y K5-CYLD^{C/S}. **(A)** Imagen representativa de la alopecia que se observa en los animales transgénicos (7 meses de edad). **(B-J)** Experimento representativo de recrecimiento del pelo en ratones Control y transgénicos depilados a las 7 semanas de edad. **(B-D)** Ciclo del pelo en ratones Control. **(E-J)** Ciclo de crecimiento del pelo en ratones y K5-CYLD^{C/S}. **(B, E, H)** imagen de la piel recién depilada de los ratones. **(C, D)** Imagen histológica **(C)** y macroscópica **(D)** de la piel y el pelo de los ratones Control en el día 16 post-depilación. **(F, G)**, Histología **(F)** de la piel de un ratón transgénico en la que se muestran FP que 16 días post-depilación están iniciando la fase de transición a anagén **(G)** aspecto macroscópico del pelo de este ratón. **(I-J)** Imagen histológica **(I)** y macroscópica **(J)** de un ratón transgénico en el que 16 días post-depilación los FP permanecen todavía en fase de descanso, telogén. La flecha roja muestra la diferencia de grosor de la piel de los ratones Control y transgénicos. Asteriscos, glándulas sebáceas hiperplásicas. Triángulos, picos de queratinocitos. Barras de escala: 250 μ m.

3. Los ratones K5-CYLD^{C/S} presentan un envejecimiento prematuro de la piel

A medida que los ratones transgénicos envejecían iban mostrando otras alteraciones físicas además de la alopecia, por ejemplo, presentaban una postura anómala caracterizada por el arqueamiento de la columna vertebral, cifosis (Figura 13). Estas características hacían pensar que los ratones K5-CYLD^{C/S} podían tener un envejecimiento prematuro. Para comprobar si esto era así, se analizó la existencia de otros posibles signos de envejecimiento en los animales K5-CYLD^{C/S}. Se estudió por análisis histológico la piel de ratones Control y transgénicos a distintas edades, al ser este órgano uno de los primeros en los que se manifiestan los síntomas de envejecimiento. Al mes de edad, además del retraso en la entrada en la segunda telogén de los FP (Figura 14A, B), los ratones K5-CYLD^{C/S} presentaban otras alteraciones, por ejemplo, frente a las glándulas sebáceas pequeñas formadas por 3-4 adipocitos maduros que mostraban los ratones Control, los transgénicos exhibían hiperplasia de las glándulas sebáceas, con 6-8 adipocitos maduros. Además la epidermis interfolicular de los ratones K5-CYLD^{C/S} tendía a ser más delgada y se observaban en ella regiones de picos de queratinocitos (Figura 14B-E). A los 3 meses de edad, el fenotipo de los ratones K5-CYLD^{C/S} es más evidente, los picos epidérmicos eran más frecuentes y más acusado el adelgazamiento de la epidermis interfolicular; mostraban también mayor número de glándulas sebáceas hiperplásicas y huérfanas (Figura 14G-I). A continuación se analizó la piel del lomo y de la cola de ratones más viejos de ambos genotipos y se comprobó que el fenotipo cutáneo iba empeorando con el envejecimiento. A los 8 meses de edad, los ratones K5-CYLD^{C/S} mostraban glándulas sebáceas huérfanas más abundantes y con mayor número de células grasas maduras (entre 8 y 12); la epidermis era más delgada que la de los ratones transgénicos más jóvenes (comparar Figura 14B-C con Figura 15B-C) y la alopecia más aparente. A los 20 meses los ratones K5-CYLD^{C/S} presentaban un fenotipo muy prominente, con extensas áreas de epidermis interfolicular atrófica, formadas por una sola capa de queratinocitos (Figura 15I-K), en marcado contraste con la piel de los ratones Control de su misma edad, cuya epidermis estaba formada por una capa de queratinocitos basales y 1 o 2 capas de queratinocitos suprabasales (Figura 15H). También se encontró en estos ratones transgénicos más viejos una importante reducción en el número de FP, lo que daba lugar a una alopecia más generalizada y a la aparición de más abundantes glándulas sebáceas hiperplásicas y huérfanas, que aparecían agrupadas en la dermis (Figura 15K). Por el contrario, los FP de los ratones Control se disponían de forma homogénea a lo largo de la epidermis, asociados a una glándula sebácea discreta, formada por 4-6 células grasas (Figura 15H). Entre las

alteraciones más llamativas de la piel de los ratones K5-CYLD^{C/S} envejecidos cabe destacar la hiperplasia papilomatosa, caracterizada por picos de epidermis gruesa y valles de epidermis muy adelgazada (en ocasiones se distinguía una sola capa de queratinocitos basales), lo que daba la apariencia de una piel delgada y arrugada (Figura 15J). Además, se observó que los queratinocitos de las regiones de atrofia epidérmica de los ratones transgénicos mostraban alteraciones morfológicas importantes, ya que frente a los queratinocitos basales de la epidermis de los ratones Control, de forma cúbica y polarizados, los queratinocitos basales de los ratones K5-CYLD^{C/S} habían perdido su polaridad y mostraban una morfología aplanada y con núcleos paralelos a la capa basal (comparar los insertos de las figuras 15H, J). La falta de polaridad de la epidermis por ausencia de la actividad catalítica de CYLD la habíamos descrito previamente en los equivalentes de piel humanos HaCat-CYLD^{C/S202}. Otra alteración que detectamos en los ratones transgénicos viejos fue el escaso tejido adiposo que había en la hipodermis, y que junto con la atrofia epidérmica contribuía a la apariencia de piel muy delgada característica de estos ratones. También se observaron cambios cualitativos en la dermis de los ratones transgénicos, que aparecía más densa y con fibras de colágeno más anchas, paralelas entre sí (Figura 15K). La piel de la cola de los ratones transgénicos presentaba alteraciones histológicas similares a las descritas en la piel del lomo (Figura 15D-G, L-O). Se detectaron igualmente signos de envejecimiento prematuro en otros epitelios estratificados de los ratones K5-CYLD^{C/S}, por ejemplo, presentaban atrofia del epitelio que recubre la lengua (Figura 16A-B); y en menor medida, también atrofia del paladar (Figura 15C-D). En la piel de los párpados (Figura 16E-F) y del hocico (Figura 16G-H) se apreciaba frecuentemente la presencia de glándulas sebáceas hiperplásicas; en la piel plantar de los ratones transgénicos se detectaron áreas con atrofia de la epidermis e hipoplasia de las glándulas ecrinas (Figura 16I-J). En conjunto todas las alteraciones encontradas en estos órganos de los ratones transgénicos son propias del envejecimiento y no se manifestaban en los ratones Control de la misma edad, lo que indicaba que los ratones K5-CYLD^{C/S} mostraban un envejecimiento prematuro.

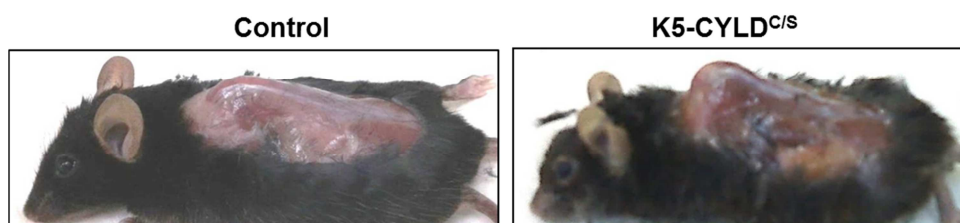


Figura 13. Alteraciones macroscópicas en los ratones K5-CYLD^{C/S}. Imagen representativa de la cifosis presentada por los animales transgénicos K5-CYLD^{C/S} y no observada en los controles de su misma edad.

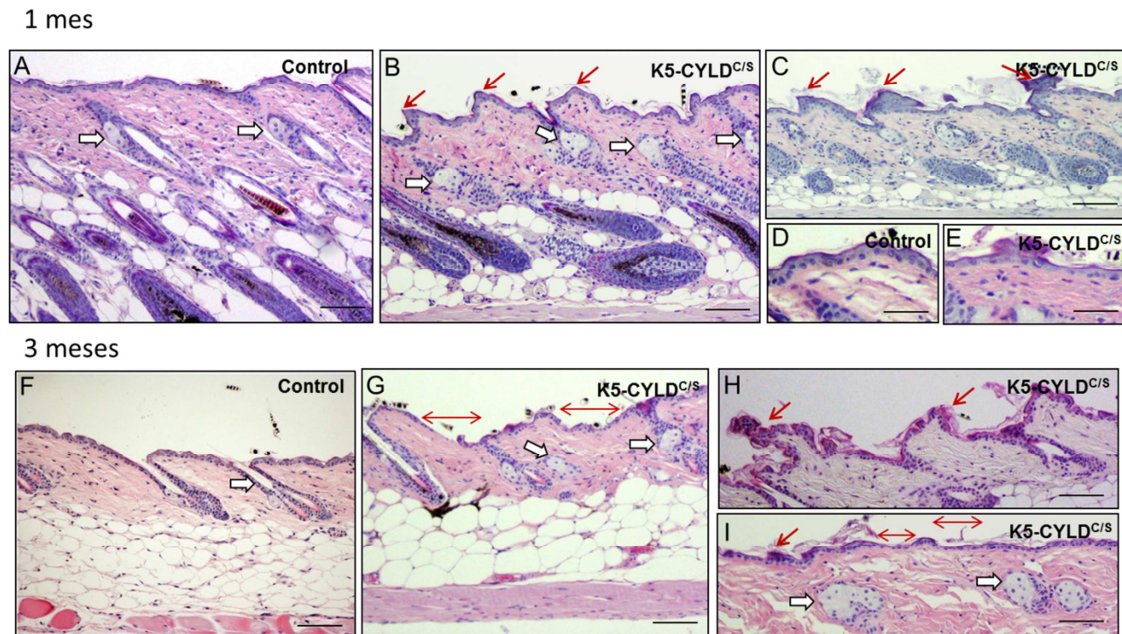


Figura 14. Histología de la piel de lomo de ratones control y transgénicos de 1 y 3 meses de edad. (A) Imagen representativa de la piel del lomo de un animal Control de 1 mes de edad. Las flechas señalan las glándulas sebáceas que acompañan a los FP; éstos están en anagén. (B-C) Piel de ratones K5-CYLD^{C/S} de 1 mes de edad. (B,C) muestran la presencia de glándulas sebáceas hiperplásicas (flechas blancas) y de picos epidérmicos (flechas rojas). Los FP no han iniciado la fase de anagén del segundo ciclo del pelo. (D, E) Detalle de la piel de un ratón Control (D) y un transgénico (E) donde se aprecia el ligero adelgazamiento de la epidermis de los ratones K5-CYLD^{C/S}. (F) Imagen representativa de la piel de lomo de un ratón Control de 3 meses de edad. (G-I) Agravamiento de las alteraciones cutáneas observadas en los ratones transgénicos de 1 mes. Flechas blancas: glándulas sebáceas; flechas rojas verticales: picos epidérmicos; flechas rojas horizontales: áreas de atrofia epidérmica. Barras de escala: 250 µm (C, F-I); 200 µm (A, B); 150 µm (D, E).

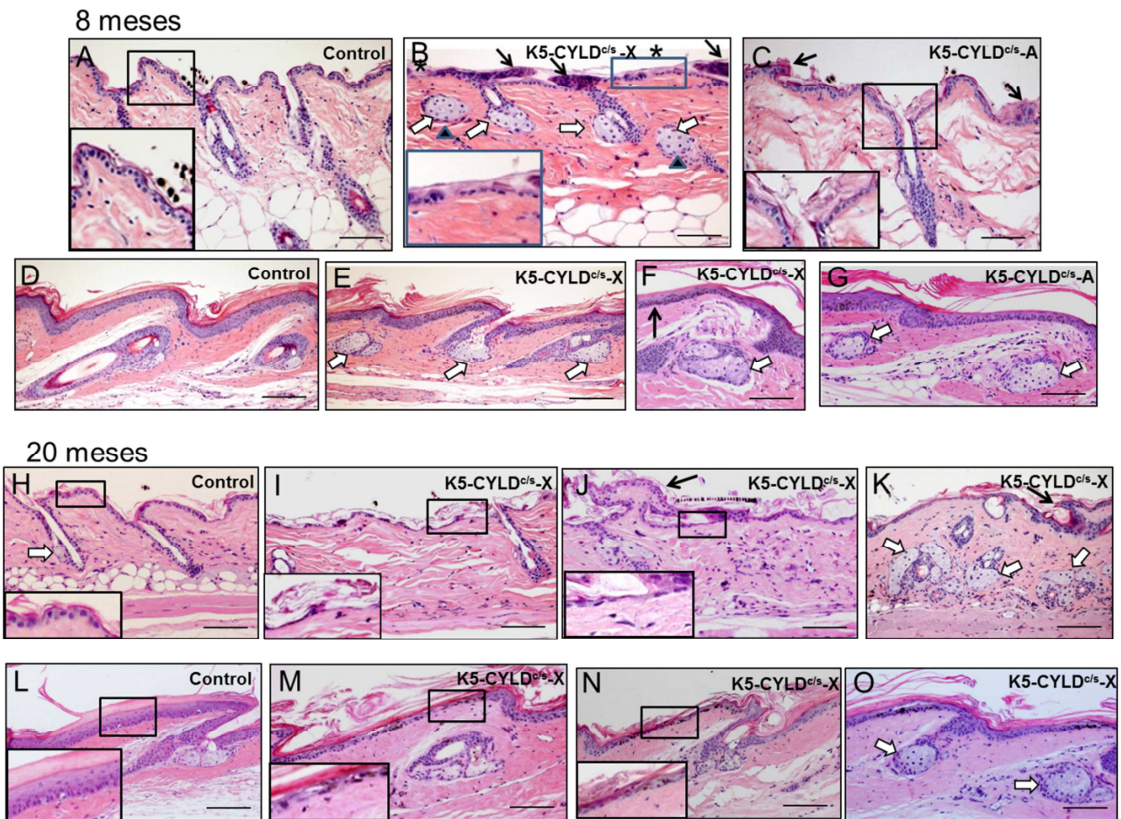


Figura 15. Análisis histopatológico de la piel de lomo y cola de ratones Control y transgénicos. (A-G) Adultos jóvenes (8 meses de edad); (H-O) Ratones viejos (20 meses de edad). A Imagen representativa de la piel del lomo de un ratón Control. **(B, C)** Piel de lomo de ratones transgénicos. Las flechas negras señalan las regiones de hiperplasia papilomatosa. Las flechas blancas señalan glándulas sebáceas hiperplásicas; los asteriscos y los insertos a mayor aumento muestran áreas de atrofia epidérmica. **(D)** Imagen representativa de la piel de cola de un ratón Control de 8 meses de edad. **(E-G)** Piel de cola de ratones transgénicos. Flechas blancas: glándulas sebáceas hiperplásicas; flechas negras: zonas de hiperplasia. **(H)** Imagen representativa de la piel de lomo de un ratón Control de 20 meses de edad. **(I-K)** Piel de lomo de ratones transgénicos de 20 meses de edad en los que se observa que las alteraciones de la piel se hacen más acusadas a medida que los ratones envejecen: zonas más extensas de atrofia epidérmica (detalle a mayor aumento en I y J); Las flechas negras en J y K señalan zonas de hiperplasia papilomatosa y picos epidérmicos. Las flechas blancas muestran numerosas glándulas hiperplásicas, huérfanas y agrupadas en la dermis. **(L)** Imagen representativa de la piel de la cola de un ratón de 20 meses de edad. En el inserto se aprecia la piel interfolicular, formada por una capa basal y 12-18 capas suprabasales de queratinocitos diferenciados. **(M-O)** Piel de cola de ratones transgénicos en los que se aprecia la atrofia de la piel interfolicular formada por 2-3 capas de queratinocitos con defectos en maduración y diferenciación (ver inserto a mayor aumento en M, N). Las flechas blancas en (O) muestran glándulas hiperplásicas. Barras de escala: 250 μ m (D-O); 200 μ m (A-C).

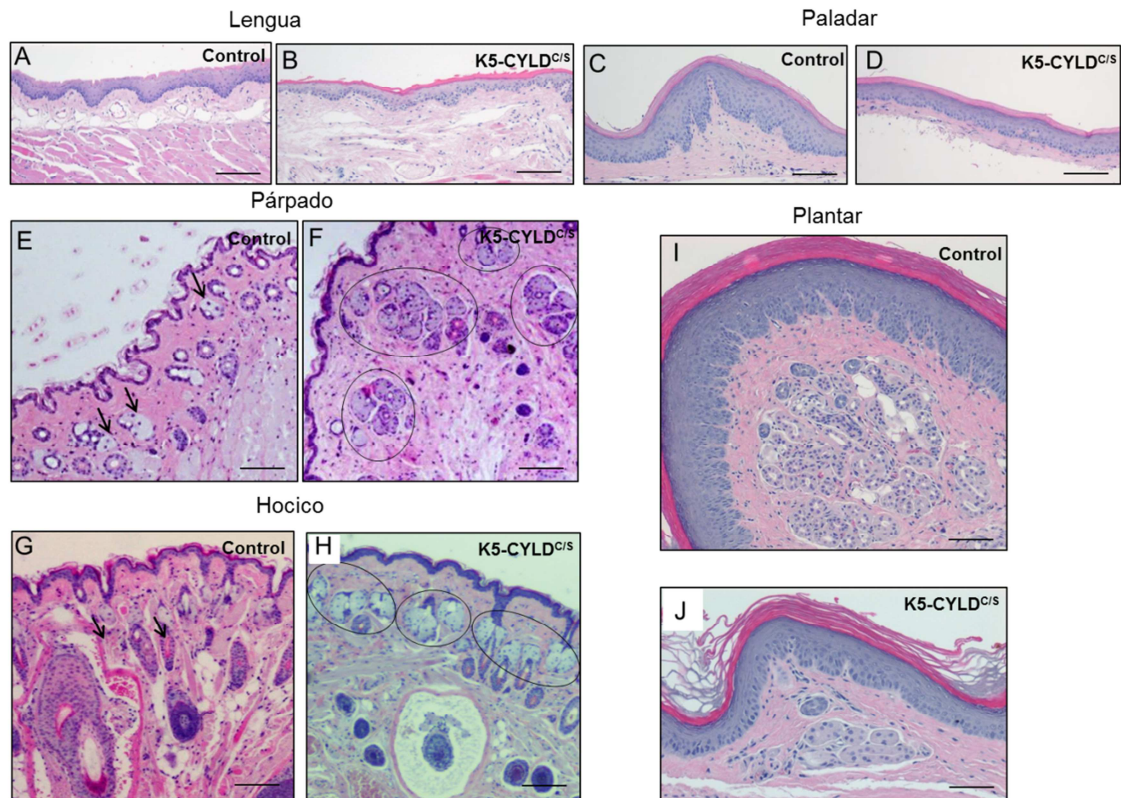


Figura 16. Análisis histológico de la lengua, paladar, párpado, hocico y piel plantar de ratones Control y transgénicos de 20 medes de edad. (A, B) Epitelio estratificado de la lengua, donde se observa la atrofia del epitelio de los ratones transgénicos (B), frente al de los ratones Control (A). (C, D) Atrofia del epitelio del paladar de los ratones transgénicos (D) frente al de los ratones Control (C). (E, F) Imagen representativa de la piel del párpado de ratones Control (E) y transgénicos (F). Nótese las glándulas sebáceas hiperplásicas y muy numerosas en los ratones transgénicos (englobadas en círculos) en claro contraste con las de ratones Control (flechas negras). (G, H) Histología en la que se observa la presencia de glándulas sebáceas hiperplásicas y muy abundantes en la piel de hocico de los ratones K5-CYLD^{C/S} (H) (englobadas en círculos), frente a las de los ratones Control, pequeñas y menos numerosas (G). (I, J) Imagen representativa de la piel plantar de ratones Control (I) y transgénicos (J), en la que se aprecia la presencia de escasas glándulas ecrinas en la planta de las patas de los ratones transgénicos. Barras de escala: 400 μ m (A-D); 250 μ m (I, J); 200 μ m (E-H).

4. Aumento de la proliferación de las glándulas sebáceas y diferenciación epidérmica impedida en los ratones K5-CYLD^{C/S}

Para caracterizar en más detalle las propiedades de la piel de los ratones transgénicos, analizamos las tasas de proliferación y apoptosis de la piel del lomo de animales Control y K5-CYLD^{C/S} y no encontramos diferencias significativas entre el índice de proliferación (medido como incorporación de BrdU) de la epidermis ni de los FP de ambos tipos de ratones. Sin embargo, en concordancia con la hiperplasia comentada de las glándulas sebáceas de los ratones transgénicos, se detectó un

incremento en la tasa de proliferación de las glándulas sebáceas de los ratones K5-CYLD^{C/S} (Figura 17A). La apoptosis, analizada mediante INHQ con el anticuerpo específico de Caspasa 3 activada, era poco frecuente en las pieles de los ratones jóvenes examinados (de 1 a 3 meses de edad) y no mostró diferencias entre las pieles del lomo de ambos tipos de ratones. Tampoco se detectaron diferencias en el número de células apoptóticas en los análisis histológicos realizados a edades más tardías (8-20 meses) (no mostrado). A continuación estudiamos si la atrofia de la piel de los ratones transgénicos afectaba a la diferenciación de la epidermis mediante el análisis de la expresión de marcadores de diferenciación temprana (K10 e involucrina) y terminal (loricrina y filagrina). Se comprobó que estas proteínas se expresaban de forma intensa y continua en las capas suprabasales de la epidermis de los ratones Control (Figura 17B, D, F, H); por el contrario, los ratones transgénicos mostraban una tinción escasa y discontinua de estos marcadores de diferenciación epidérmica (Figura 17C, E, G, I). Además, la tinción con el anticuerpo específico de K5 (queratina de los queratinocitos proliferativos, no diferenciados de la capa basal), puso de manifiesto la presencia, en la piel interfolicular de los ratones transgénicos, de áreas de gran atrofia epidérmica en las que la tinción de K5 era discontinua y débil (Figura 17K), lo que contrastaba con la expresión continua de K5 en la capa basal de la piel de los ratones Control, en los que también se aprecia la expresión de K5 en la VRE de los folículos pilosos (Figura 17J).

5. La piel de los ratones K5-CYLD^{C/S} muestra activación crónica de las vías NF-κB, JNK, c-Myc y Akt implicadas en el envejecimiento

Para conocer los posibles mecanismos responsables del fenotipo de envejecimiento prematuro de los ratones K5-CYLD^{C/S}, analizamos en primer lugar la vía de señalización de NF-κB, ya que se ha descrito que la activación constitutiva de NF-κB es la principal causante (impulsor) del envejecimiento; además, una de las funciones principales de CYLD es regular negativamente la activación de NF-κB. El análisis por *Western Blot* de pieles de animales de 3 días mostró que los ratones transgénicos en estado basal, sin estimular con TNF-α, presentaban una activación incrementada de NF-κB (medido como fosforilación de p65, P-p65) en la piel. Tras 15 min de estimulación en presencia de TNF-α los niveles de activación de NF-κB se elevan considerablemente en ambos grupos de ratones. Sin embargo, mientras que 40 min después de la estimulación en los ratones Control, la activación de NF-κB disminuye hasta los niveles observados en la piel no estimulada, en los ratones transgénicos persiste la sobreactivación de NF-κB (Figura 18A). De igual modo,

también observamos un incremento de la fosforilación del inhibidor de NF- κ B, p-I κ B α , en la piel de los ratones transgénicos; como es sabido, la fosforilación de I κ B α promueve su propia degradación y consecuentemente la liberación de p65 que puede pasar al núcleo y activar la transcripción de sus genes diana, por lo que el incremento en P-I κ B α en los ratones transgénicos provocaría a su vez la activación de NF- κ B. Los niveles de p65 e I κ B α estaban ligeramente incrementados en la piel de los ratones K5-CYLD^{C/S} (Figura 18A). Con el fin de conocer si la hiperactivación de NF- κ B en la piel de los ratones K5-CYLD^{C/S} solo se producía en los ratones neonatos, cuando tienen un crecimiento más rápido, se analizó la activación de NF- κ B en ratones viejos (21 meses) en situación basal, sin estimular, y se encontraron resultados similares a los obtenidos en los ratones recién nacidos, es decir, los niveles de P-p65 y de P-I κ B α estaban aumentados; también los niveles de p65 e I κ B α (Figura 18B). Por tanto nuestros resultados indican que en la piel de los ratones transgénicos, la vía canónica de NF- κ B se encuentra activada de manera constitutiva, desde el nacimiento hasta edades avanzadas.

Aunque la activación de NF- κ B es el principal regulador del envejecimiento, sin embargo, se ha descrito que la activación de otras vías (como las de JNK, Akt y c-Myc) también favorecen el envejecimiento, aunque la mayoría de estas otras rutas de señalización convergen finalmente en la activación de NF- κ B. El análisis por *Western blot* de la activación de estas otras vías mostró un incremento de la activación de JNK (P-JNK) en la piel de los ratones K5-CYLD^{C/S}, lo que está de acuerdo con la función descrita de CYLD como regulador negativo de la activación de JNK²⁰³; en consonancia también con la regulación negativa de la expresión de c-Myc por CYLD que ha sido reportada⁷¹, se detectó sobreexpresión de c-Myc y mayor activación de c-Myc (P-c-Myc) en las pieles de los ratones K5-CYLD^{C/S}. La activación de Akt (P-Akt) está también activada en la piel de los ratones transgénicos (Figura 18C-E).

Un requerimiento importante a través del cual la activación de NF- κ B promueve el envejecimiento es por medio de la inducción de la expresión de citoquinas inflamatorias. Por lo que se analizó por *Western Blot* la expresión de IL-6 y TNF- α y encontramos que ambas citoquinas estaban sobreexpresadas tanto en la piel de los animales K5-CYLD^{C/S} como en la epidermis (Figura 18F-G).

Por tanto, nuestros resultados sugieren que el principal mecanismo responsable del fenotipo de envejecimiento cutáneo de los ratones K5-CYLD^{C/S} sería la activación crónica de la vías de NF- κ B, que a su vez activaría la señalización de las vías de JNK, c-Myc y Akt y aumentaría la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α .

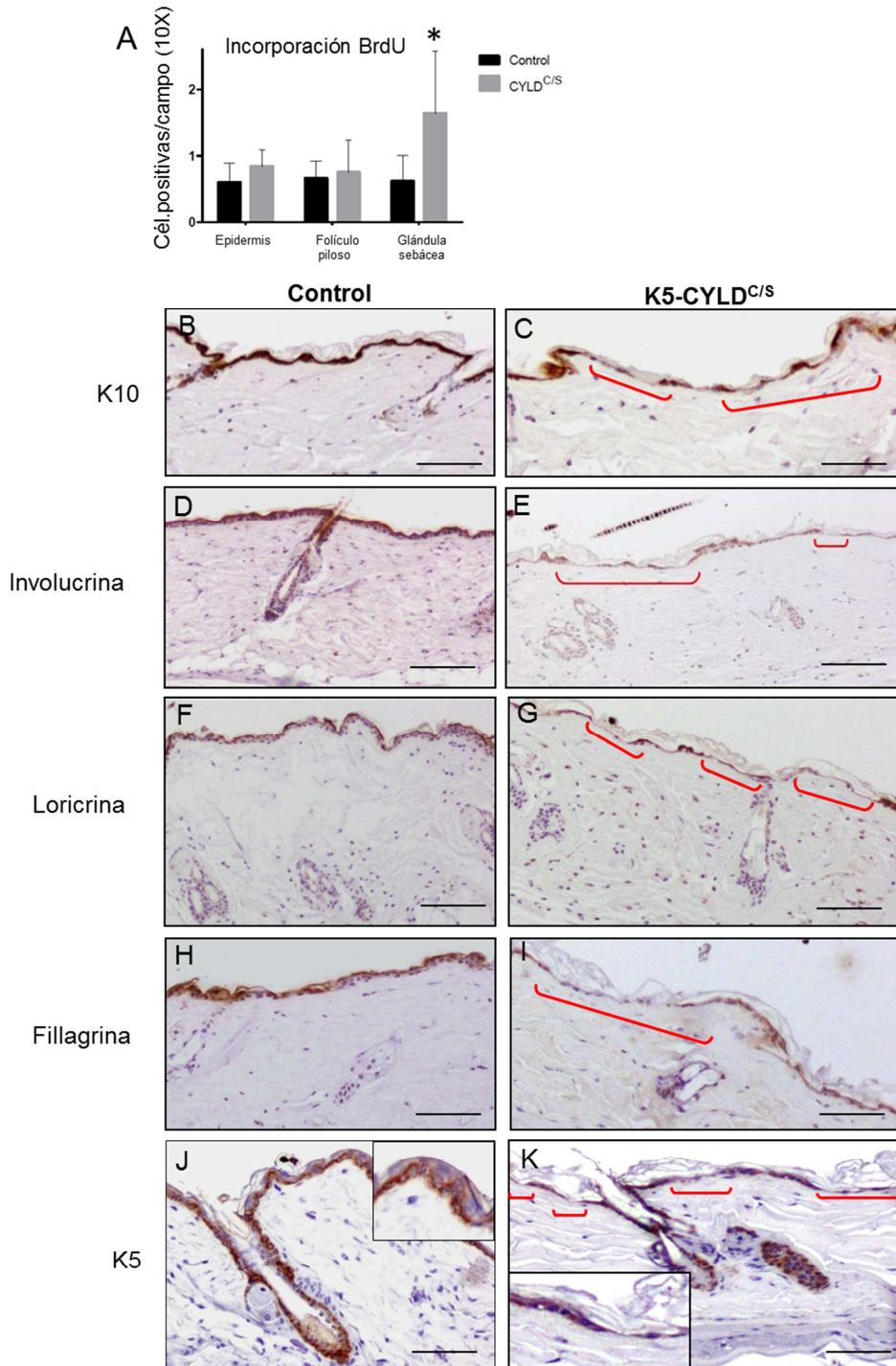


Figura 17. Análisis de la proliferación y diferenciación epidérmica. **(A)** Gráfica de incorporación de BrdU en la piel del lomo de ratones de 1 mes de edad. Nótese la mayor proliferación de las glándulas sebáceas en los ratones transgénicos. **(B-I)** Análisis mediante tinción INHQ de la expresión de proteínas de diferenciación epidérmica en ratones de 21 meses de edad. **(B, D, F, H)** Imágenes representativas de la expresión de K10, involucrina, loricrina y filagrina en la piel de ratones Control. **(C, E, G, I)** En los ratones transgénicos la expresión de las proteínas K10, involucrina, loricrina y filagrina es discontinua e incluso no se detecta en la zonas de atrofia epidérmica (corchetes). **(J, K)** Inmuntinción de la queratina K5 en piel de lomo de ratones Control **(J)** y K5-CYLD^{C/S} **(K)** de 21 meses de edad. **(J).** Nótese la expresión débil y discontinua en los ratones transgénicos. Barras de escala: 150 μ m (B-I); 100 μ m (J, K).

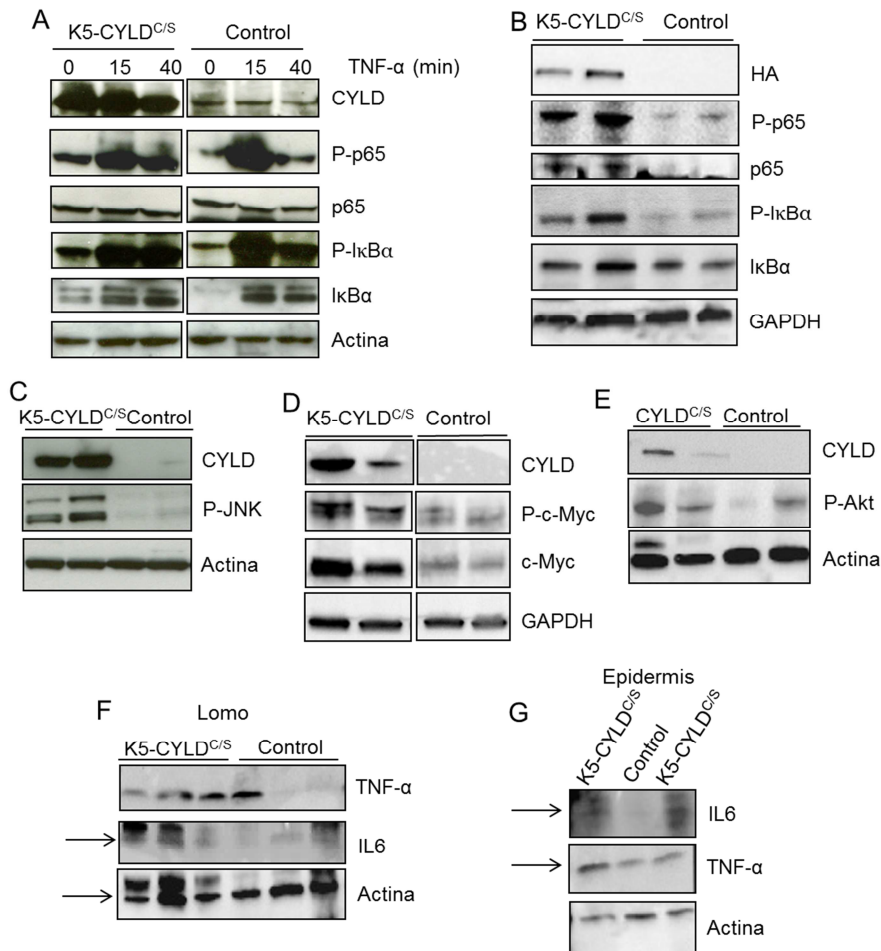


Figura 18. Análisis bioquímico de las vías de señalización alteradas por la expresión de CYLD^{C/S} en los ratones transgénicos. (A) Activación de la vía de NF-κB en la piel de lomo de ratones de 3 días tras la estimulación con TNF-α a distintos tiempos. **(B)** Análisis de los componentes de la vía NF-κB y de su activación (fosforilación) en situación basal (sin estimular). **(C)** *Western blot* representativo en el que se observa la activación (fosforilación) de la vía JNK en piel de lomo de los ratones transgénicos. **(D)** Inmunoblot en el que se muestra el incremento de la expresión de c-Myc así como de su activación en los K5- CYLD^{C/S}. **(E)** Análisis de la activación de Akt donde se observa el incremento de activación de Akt en la piel de los ratones transgénicos. **(F, G)** Análisis de la expresión de las citoquinas inflamatorias TNF-α e IL-6 en piel total de ratones viejos **(F)** y en la epidermis de ratones de 3 días de edad **(G)**. En ambos casos se observa un aumento de expresión de ambas citoquinas en los ratones transgénicos. Los extractos proteicos de los *Western Blot*. B-F corresponden a ratones Control y transgénicos de 21 meses de edad.

6. Los ratones K5-CYLD^{C/S} muestran un envejecimiento prematuro del timo y el bazo

Junto con la piel, el bazo y el timo son órganos especialmente susceptibles de experimentar envejecimiento prematuro, como además el promotor de K5 dirige la

expresión del transgén a estos órganos, realizamos un estudio histológico de los mismos. El análisis del bazo de los ratones K5-CYLD^{C/S} a diferentes edades, desde los 3 hasta los 16 meses, mostró importantes alteraciones morfológicas: a los 3 meses de edad, los defectos consistían en una microestructura anormal del parénquima esplénico, en donde se observaba que a diferencia del bazo de los ratones Control, en los que los folículos de células B y T que forma la pulpa blanca están densamente empaquetados, el bazo de los ratones transgénicos mostraba folículos de células B escasamente definidos, con hiperplasia marginal (Figura 19A-B). En los ratones K5-CYLD^{C/S} viejos, de 16 meses de edad en adelante, se detectó una hiperplasia de la pulpa blanca que velaba la pulpa roja (comparar Figura 18C- D) así como áreas de atrofia de los folículos esplénicos (Figura 19F), con abundantes macrófagos e histiocitos. Estas alteraciones se producen en el envejecimiento fisiológico y no se observaron en ratones Control de la misma edad. Por tanto, el hecho de que estos cambios en el bazo se manifiesten en los ratones transgénicos desde los 3 meses de edad está indicando una senescencia prematura, ya que no se detectaron en los ratones Control hasta los 24 meses de edad. Estas alteraciones fenotípicas del bazo se encontraron en ambas líneas de ratones transgénicos (K5-CYLD^{C/S}-X y K5-CYLD^{C/S}-A). El análisis por INHQ con el anticuerpo específico de CYLD mostró que el transgén se expresaba en el bazo de los ratones transgénicos siguiendo el patrón de expresión de K5 en este órgano, es decir, se detectaba en las trabéculas del músculo liso y en las células reticulares (Figura 19G-I), tal como se había descrito anteriormente que era la expresión de K5 en bazo²⁰⁴. El análisis por WB con anticuerpos específicos de CYLD y de HA, confirmó la expresión del transgén en el bazo de los animales K5-CYLD^{C/S} (Figura 19J). Posteriormente analizamos la vía de NF-κB por ver si al igual que ocurría en la piel, también se encontraba sobreactivada en los bazos de los ratones transgénicos y encontramos que efectivamente, presentaban mayores niveles de P-p65, lo que sugiere que éste es también el mecanismo más probable del envejecimiento acelerado del bazo en los ratones K5-CYLD^{C/S}. El análisis por INHQ con los anticuerpos específicos de B220 (Figura 19A, B) y CD3 (Figura 20C, D), que reconocen linfocitos B y T respectivamente, en el bazo de ratones Control y transgénicos, mostró la hiperplasia y la desorganización de los folículos linfoides en los transgénicos, mientras que en los ratones Control de la misma edad se mantenía la estructura.

A continuación, analizamos el timo de ratones Control y transgénicos a diferentes edades y encontramos que a partir de los 2,5 meses de edad los ratones K5-CYLD^{C/S} mostraban importantes alteraciones histológicas, que consistían principalmente en una expansión del área cortical y una reducción de la región medular (comparar Figura 21A, B); a los de 3,5 meses de edad los ratones K5-CYLD^{C/S} mostraron signos de involución del timo, con atrofia e infiltración de células adiposas a expensas del tejido tímico (Figura 21D). Esta es una involución prematura, ya que no se detectó en ratones Control de la misma edad. El análisis por INHQ y por *Western blot* mostró que el transgén se expresaba en la médula del timo de los ratones K5-CYLD^{C/S}, coincidiendo con el patrón de expresión de K5 (Figura 21E-G, H). Además comprobamos que al igual que ocurría en la piel y en el bazo, en el timo de los ratones K5-CYLD^{C/S} la vía de NF-κB estaba sobreactivada (Figura 21H), lo que podría explicar el envejecimiento acelerado de este órgano en los ratones transgénicos.

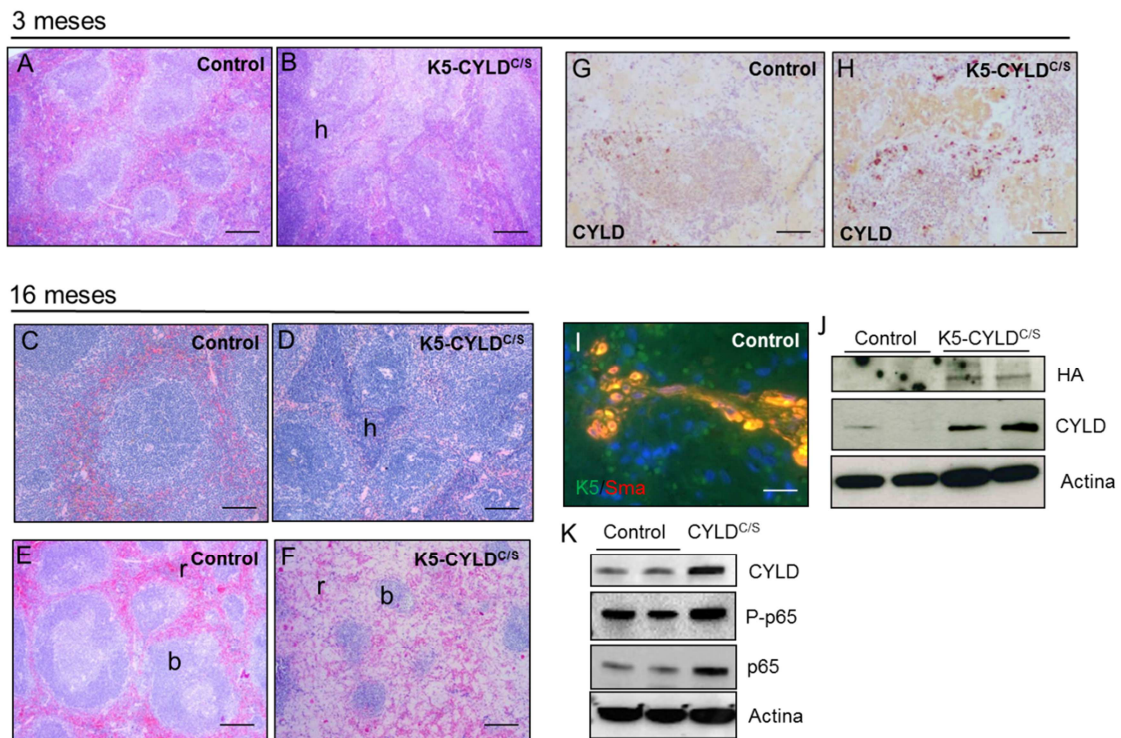


Figura 19. Caracterización histológica y bioquímica del bazo de ratones Control y transgénicos. (A-F) Imágenes histológicas representativas del bazo de ratones Control (A, C, E) y transgénicos (B, D, F) de 3 y 16 meses de edad. h: hiperplasia de la pulpa blanca (B, D). (G, H) Análisis por INHQ de la expresión de CYLD en ratones Control y transgénicos. (I) Inmuntinción con K5 y Sma (actina de músculo liso) en los ratones Control. (J) Análisis por WB del transgén en extractos proteicos de bazo. HA no se expresa en los ratones Control. (K) Sobreactivación de NF-κB (P-p65) en los ratones K5-CYLD^{C/S}. b, pulpa blanca. r, pulpa roja. Barras de escala: 400 μm (A, B); 300 μm (E, F); 250μm (C, D); 200 μm (G, H); 50 μm (I).

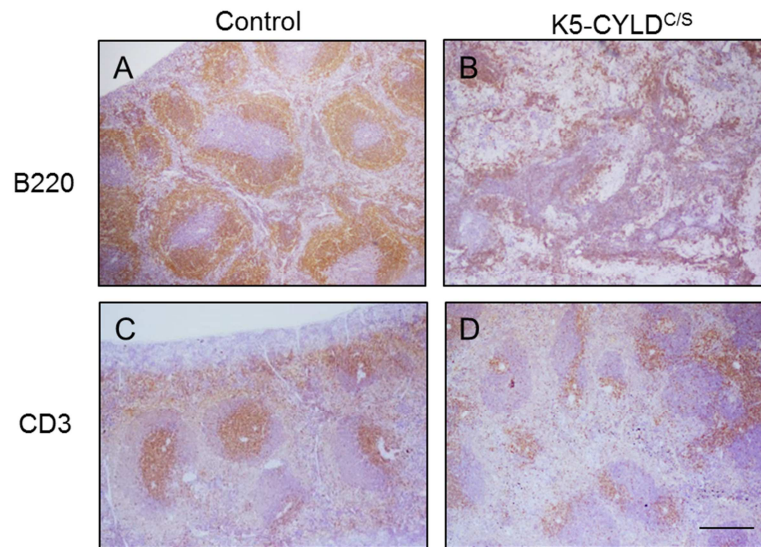


Figura 20. Análisis de la expresión de marcadores linfocitarios en el bazo de ratones Control y transgénicos. (A, B) Tinción específica con B220 específica de linfocitos **(C, D)** Tinción específica con CD3 para el reconocimiento de los linfocitos T. Barra de escala: 200 μ m.

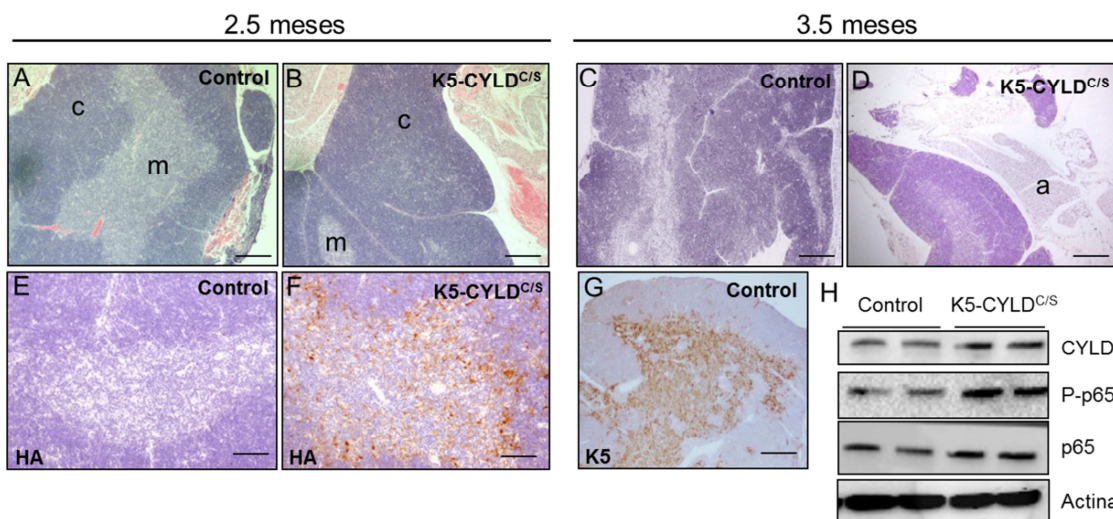


Figura 21. Caracterización histológica y bioquímica del timo de ratones Control y transgénicos. (A, B) A los 2,5 meses de edad el timo de los ratones transgénicos muestra expansión de la zona cortical y reducción de la medular. **(C, D)** Imagen representativa de la atrofia del timo e infiltración de tejido adiposo blanco en ratones transgénicos de 3,5 meses de edad. **(E-G)** Análisis de la expresión del transgén mediante INHQ con el anticuerpo específico del tag HA. Se observa la expresión del transgén en la médula del timo de los animales K5-CYLD^{C/S} **(F)**, siguiendo el patrón de expresión de K5 **(G)**, mientras que no se detecta en los controles **(E)**. **(H)** Análisis por WB de la expresión del transgén en extractos proteicos de timo. Nótese la sobreactivación de NF- κ B (niveles incrementados de P-p65) en los ratones transgénicos. m, médula. c, corteza. a, tejido adiposo. Barras de escala: 500 μ m (D); 350 μ m (G); 300 μ m (A-C); 200 μ m (E, F).

7. Los ratones K5-CYLD^{C/S} presentan inflamación y envejecimiento prematuro en otros órganos

El análisis histológico de otros órganos de los ratones transgénicos mostró que además del envejecimiento acelerado en piel, bazo y timo, presentaban signos de envejecimiento prematuro en otros numerosos órganos, es decir, se observó un envejecimiento sistémico en los ratones K5-CYLD^{C/S}; además mostraban una considerable inflamación. Entre los órganos de los ratones K5-CYLD^{C/S} más afectados por el aceleramiento del envejecimiento se encontraba el páncreas, en el que se observó que los Islotes de Langerhans eran muy grandes en comparación con los de los ratones Control (comparar Figura 22A-B con 22C-D), e incluso se encontraron Islotes en localizaciones extrapancreáticas, por ejemplo en la grasa peripancreática (Figura 22E). También se detectó una moderada inflamación en el páncreas de los ratones transgénicos, aún a edades muy tempranas (3 meses de edad) (Figura 22F). La hiperplasia de los Islotes de Langerhans y la inflamación son características del envejecimiento del páncreas y no se observaron en los páncreas de ratones Control de edad similar. El hígado de los ratones transgénicos también presentaba importantes lesiones relacionadas con el envejecimiento, como son anisocariosis (Figura 23A), anisocitosis, cariomegalia e inclusiones eosinófilas intracitoplásmicas e intranucleares (6/6) (Figura 23B-C), que son típicamente encontrados en los hígados envejecidos. Al igual que ocurría en el páncreas, en el hígado de los ratones transgénicos, también se detectó una moderada inflamación, en forma de hepatitis crónica multifocal (3/6). Estas patologías no se encontraron en el hígado de los animales Control, exceptuando algunas células inflamatorias que se detectaron ocasionalmente, aunque en menor número que las del hígado de los ratones K5-CYLD^{C/S}. Los pulmones de los ratones transgénicos mostraron una moderada inflamación (Figura 23E), consistente en hiperplasia de tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT), mientras que los ratones Control mostraban una inflamación discreta. Otro órgano de los ratones K5-CYLD^{C/S} que mostró infiltración linfocitaria evidente fue el estómago (Figura 23F). Por tanto de todos estos datos mencionados, podemos concluir que los ratones K5-CYLD^{C/S} presentan un fenotipo de envejecimiento prematuro generalizado, ya que hay numerosos órganos afectados, al menos la piel, el bazo, timo, páncreas, hígado y estómago.

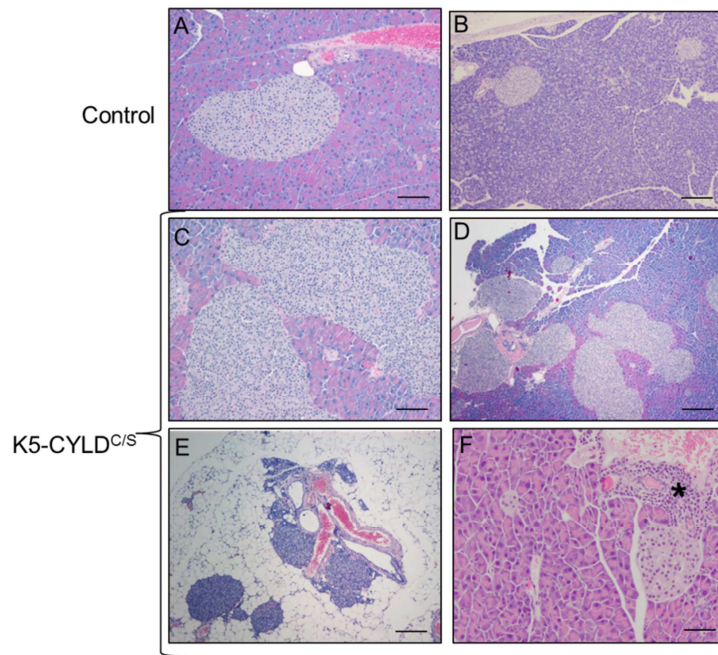


Figura 22. Análisis histopatológico del páncreas. (A-F) Histologías representativas del páncreas de ratones de Control y K5-CYLD^{C/S} de 12 meses de edad. (A, B) Histología representativa del páncreas de animales Control en las que se observa la presencia de Islotes de Langerhans de tamaño heterogéneo, pero moderado. (C, D) Histología representativa del páncreas de ratones transgénicos. Obsérvese la hiperplasia de los Islotes de Langerhans. (E) Localización extrapancreática de los Islotes de Langerhans, entre la grasa peripancreática. (F) Focos de inflamación (asterisco) en el páncreas de los ratones K5-CYLD^{C/S}. Barras de escala: 500 μm (E); 350μm (B, D, F); 200 μm (A, C).

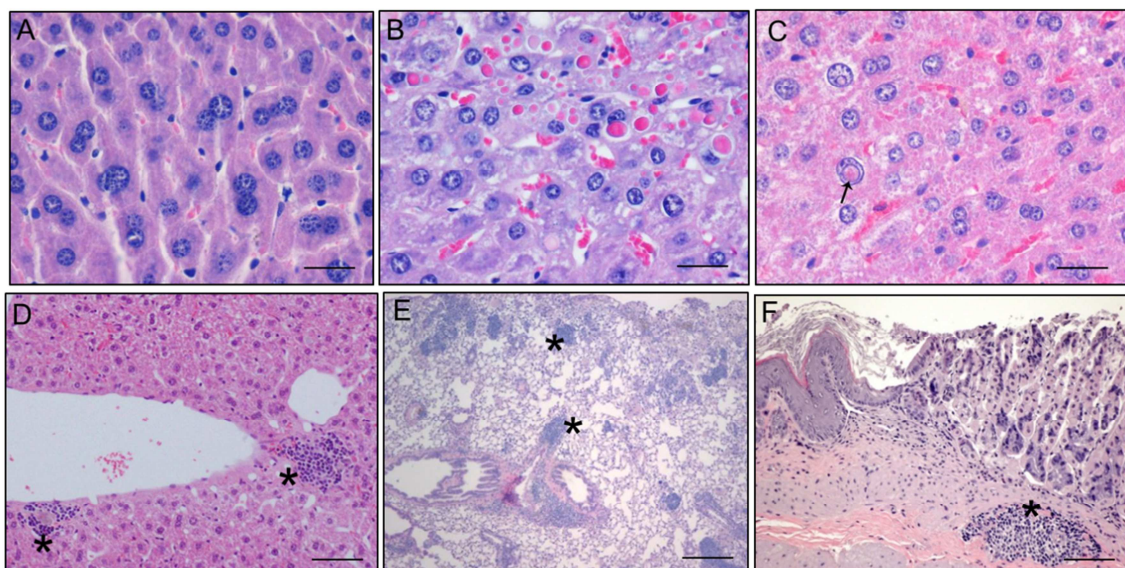


Figura 23. Tinción de H/E de diferentes órganos de los ratones K5-CYLD^{C/S} que muestran signos de envejecimiento prematuro. (A-D) Imágenes de hígado en el que observa la presencia de anisocariosis (A); inclusiones eosinófilas intracitoplásmicas (B); inclusiones eosinófilas intranucleares (C), y focos de inflamación (D). (E) Pulmón con focos de inflamación. (F) Estómago con focos de inflamación. Se muestran imágenes de ratones de ambos genotipos de 20 meses de edad. Asteriscos: Inflamación. Barras de escala: 250 μm (E, F); 150 μm (D); 40 μm (A-C).

8. Los ratones viejos K5-CYLD^{C/S} desarrollan tumores en diferentes órganos

El análisis histopatológico de diferentes órganos de los ratones K5-CYLD^{C/S} de 20 meses de edad, mostró que desarrollaban tumores de diferente origen (Tabla 3), mientras que en los ratones Control de edad similar no se detectó ningún tumor. Entre los tumores espontáneos que se originaban en los ratones transgénicos se encontraron adenocarcinomas pulmonares (Figura 24A): acinares (Figura 24B,C) y papilares (Figura 24D); adenocarcinomas gástricos (Figura 24E-F), un carcinoma hepatocelular diferenciado y un adenoma hepatocelular (Figura 24G-H); se observó además un adenoepitelioma mamario (Figura 24I); un adenoma de las glándulas de Meibomio (Figura 23J) y un tricofoliculoma (tumor derivado del folículo) (Figura 24K). A continuación analizamos mediante INHQ si el transgén se expresaba en estos tumores (Figuras 25 y 26). El análisis con el anticuerpo específico de HA mostró que en la mayor parte de los tipos tumorales se expresaba el transgén. En la figura 25 se muestra la detección del transgén en los adenocarcinomas pulmonares (Figura 25B-D); el transgén se detectó no solo en el tejido tumoral sino también en el tejido pulmonar no tumoral, así como en los pulmones de ratones K5-CYLD^{C/S} que no habían desarrollado tumores. Concretamente el transgén se expresaba en las células basales de los bronquios (Figura 25C) y en los neumocitos tipo II (Figura 25B); siendo los neumocitos tipo II las células de las que se ha descrito que se originan los adenocarcinomas de pulmón. No se observó expresión del transgén en el pulmón de ratones Control (Figura 25A). También se detectó expresión del transgén en el tricofoliculoma que se había desarrollado en el hocico de un ratón K5-CYLD^{C/S} (Figura 26C), así como en el tejido no tumoral del hocico, es decir en la epidermis interfolicular, en los FP y en las glándulas inmaduras de las glándulas sebáceas (siguiendo el patrón de expresión de K5 en este órgano, no mostrado) (Figura 26B). No se encontró expresión del transgén en el hocico de los ratones Control (Figura 26A). En el adenoma de las glándulas de Meibomio y en la piel del párpado de los ratones transgénicos también se expresaba el transgén (Figuras 26E, F), mientras que, como era esperable, no se detectó señal de HA en el párpado ni en las glándulas Meibomio de los ratones Control (Figura 26D y datos no mostrados). En el adenoma de mama se detectó también expresión del transgén (Figura 26G). El análisis de los tumores gástricos que se desarrollaban en los ratones K5-CYLD^{C/S} mostró que expresaban el transgén; éste se expresaba también en el epitelio estratificado, no tumoral, del estómago (Figura 26I); en cambio, no se detectó la expresión de HA en el estómago de los ratones Control (26H). Sin embargo, observamos que en los

hepatocarcinomas no se expresaba el transgén, tan solo se expresaba en los conductos biliares, no tumorales (Figura 26K).

Por tanto, nuestros datos indican que la falta de la función DUB de CYLD en diferentes tejidos de los ratones transgénicos conduce al desarrollo espontáneo de tumores, confirmando *in vivo* el papel de CYLD como gen supresor de diferentes tipos tumorales. En la mayoría de los tumores se expresa el transgén, lo que sugiere que la causa del desarrollo tumoral es por las alteraciones que causa el transgén al expresarse en el órgano en el que se origina el tumor, es decir, en el estómago, pulmón etc; sin embargo, en el caso de los hepatocarcinomas, la causa por la que se han originado los tumores parece deberse a algún efecto de la expresión del transgén en otros tipos celulares, ya que no hay expresión de la proteína transgénica en los hepatocitos.

Genotipo	ADC pulmonar	ADC gástrico	HCC	ADE de mama	A. gl de Meibomio	T. derivados de folículos
Control	0/6	0/7	0/6	0/1	0/5	0/6
K5-CYLD^{C/S}	4/6	4/8	2/6	1/2	1/5	1/4

Tabla 3. Tumores desarrollados por los ratones K5-CYLD^{C/S}. ADC: adenocarcinoma. HCC: carcinoma hepatocelular. ADE: adenoepitelioma. A: adenoma. T.tumor

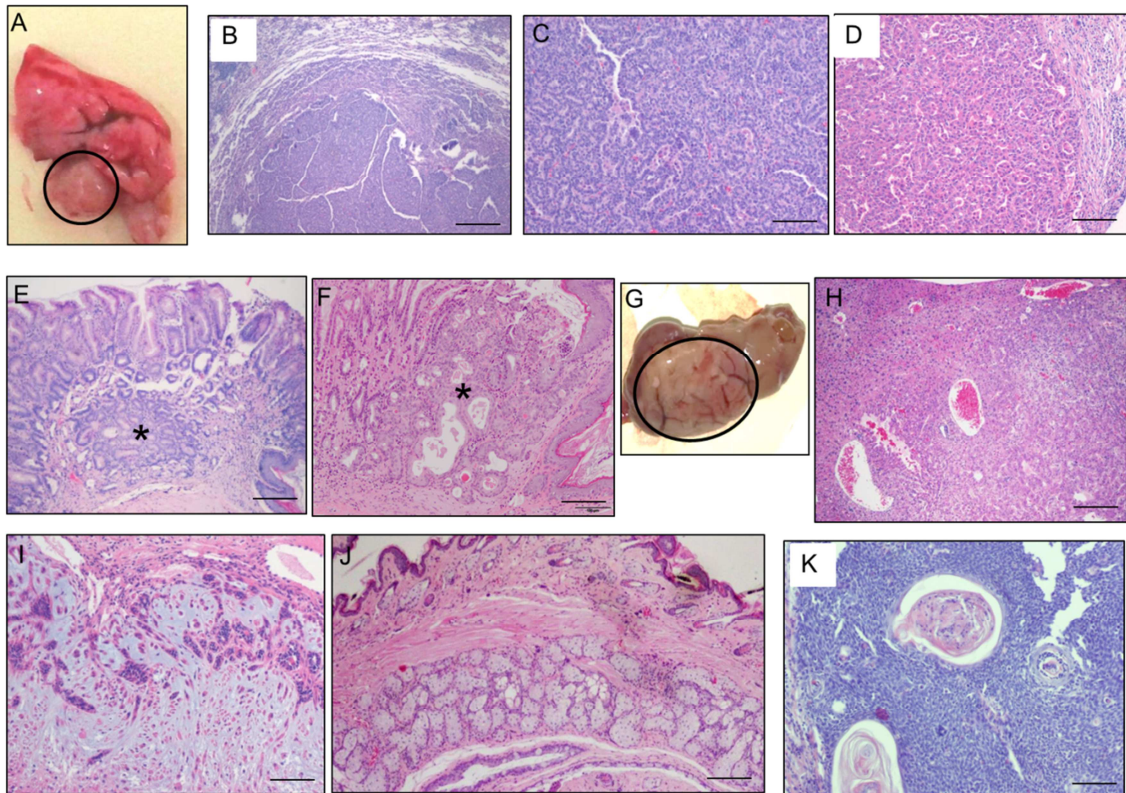


Figura 24. Tumores espontáneos desarrollados por los ratones transgénicos K5-CYLD^{C/S}. (A-D) Adenocarcinomas pulmonares. (A) aspecto macroscópico del tumor pulmonar encontrado en un ratón transgénico. (B, C) adenocarcinomas acinares (D) adenocarcinoma papilar. (E-F) Adenocarcinomas gástricos. Bien diferenciado (E); Adenocarcinoma gástrico *in situ* (F). (G-H) Tumores en el hígado. (G) Imagen macroscópica de HCC. (H) Adenoma hepatocelular. (I) Adenocarcinoma mamario. (J) Adenocarcinoma en las glándulas de Meibomio. (K) Tumor derivado de folículo piloso (tricofolliculoma). Barras de escala: 500 μ m (B); 400 μ m (E, F, H, K); 350 μ m (C, D); 250 μ m (I, J).

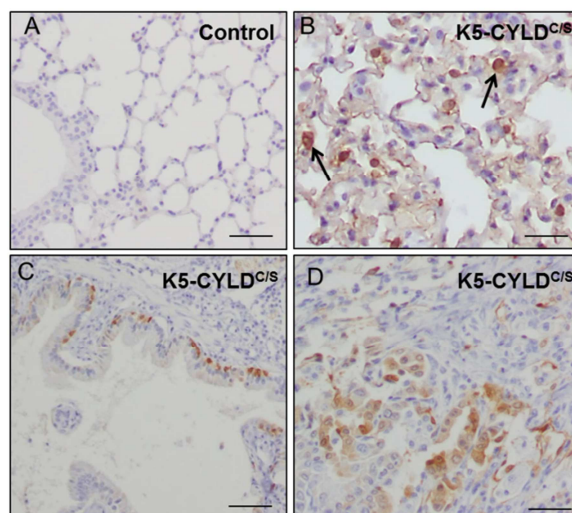


Figura 25. Análisis de la expresión del transgén en el pulmón y en los adenocarcinomas pulmonares con el anticuerpo específico de HA. (A) Tejido pulmonar no tumoral de ratón Control. (B-C) Secciones del pulmones de ratones K5-CYLD^{C/S}. El transgén se expresa en neumocitos tipo II (B) y en las células basales de los bronquios (C). (D) Expresión del transgén en los adenocarcinomas pulmonares. Barras de escala: 200 μ m (A, C); 150 μ m (B, D).

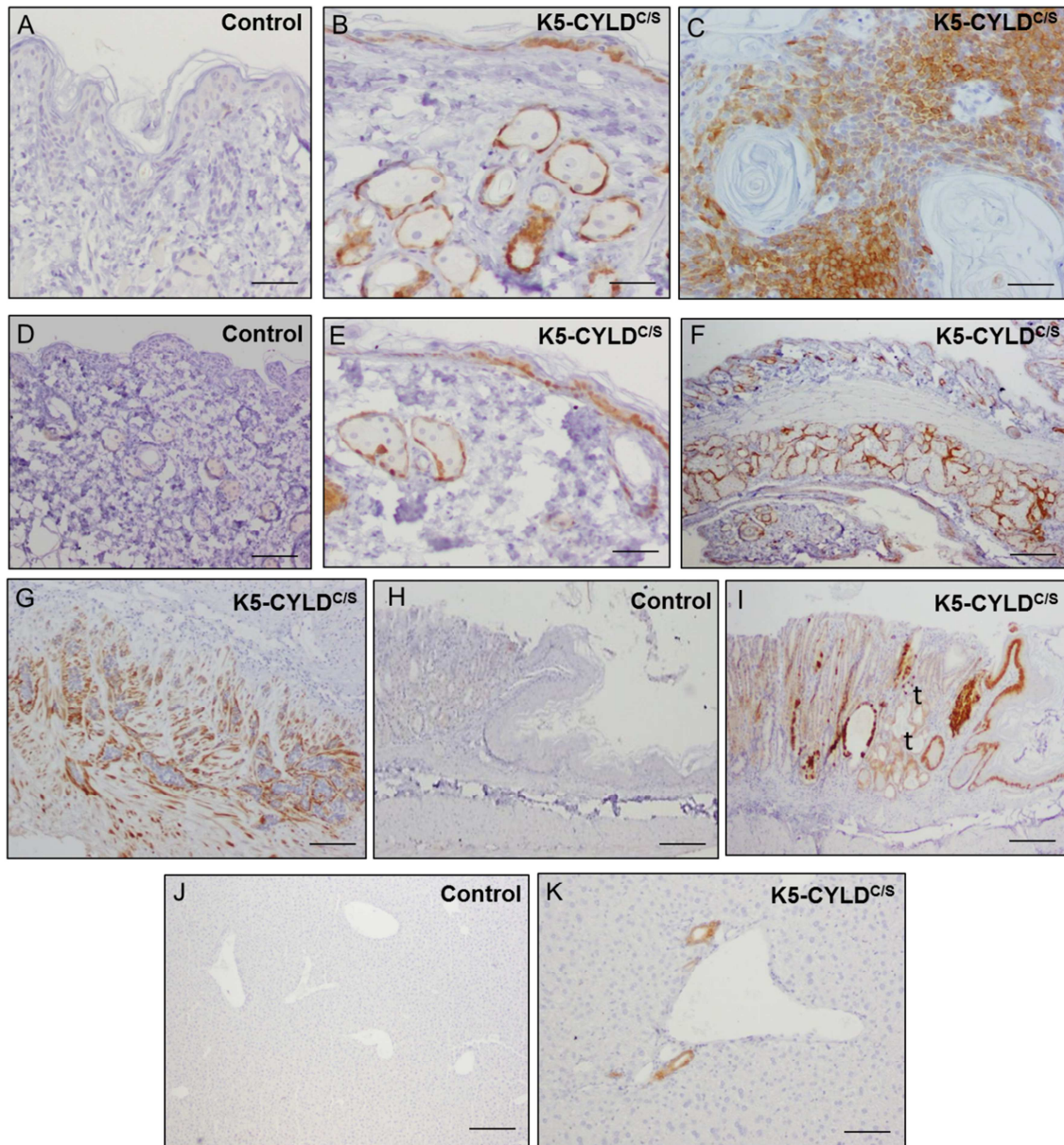


Figura 26. Análisis de la expresión del transgén en los tumores de los ratones K5-CYLD^{C/S} y en los tejidos de procedencia del tumor. (A-K) Tinciones con el anticuerpo específico del tag HA. **(A)** El transgén no se expresan en el hocico de ratones control. **(B)** Imagen representativa de la expresión del transgén en el hocico de los ratones transgénicos. **(C)** Expresión de la proteína transgénica en el tumor derivado de los folículos pilosos (tricrofolliculoma) de un ratón K5-CYLD^{C/S}. **(D)** Imagen representativa de la ausencia de expresión del transgén en el epitelio del párpado de los ratones Control. **(E)** Expresión del transgén en los queratinocitos basales del párpado y de las células inmaduras de las glándulas sebáceas. **(F)** Expresión del transgén en el adenocarcinoma de las glándulas de Meibomio de un ratón K5-CYLD^{C/S}. **(G)** Expresión del transgén en el adenocarcinoma de mama de un ratón transgénico. **(H)** El estómago de los ratones Control no expresa HA. **(I)** Imagen representativa de la expresión del transgén en el estómago de ratones transgénicos. **(J)** HA no se expresan en el hígado de ratones Control. **(K)** En el hígado de los animales transgénicos se detecta HA en los conductos biliares. Barras de escala: 300 μ m (H, I); 250 μ m (F, G, J); 180 μ m (A, C, D, K); 150 μ m (B, E).

Discusión

Discusión

La piel es el órgano que presenta más enfermedades. Las alteraciones en la proliferación, diferenciación, apoptosis y polaridad de los queratinocitos provocan daños que dan lugar al desarrollo de distintas patologías, incluido el cáncer de piel no melanoma (CPNM), que es la neoplasia más frecuente. Es por ello imprescindible caracterizar los mecanismos moleculares que mantienen la homeostasis epidérmica, así como los que originan el desarrollo del CPNM; especialmente de los cSCC, por ser el tipo de CPNM más agresivo. CYLD es una proteína que se expresa en la piel y que actúa como supresor tumoral de los cánceres de los anejos cutáneos y de los carcinomas de piel más benignos, los BCCs. Sin embargo, se desconoce la función que CYLD desempeña en la fisiología de la piel y si está implicado en el desarrollo de los cSCC. Nuestros resultados han mostrado que CYLD desempeña funciones esenciales en la homeostasis cutánea y que actúa como supresor tumoral del desarrollo, progresión y metástasis de los cSCC; además hemos encontrado que CYLD protege del envejecimiento, y proponemos que éste es un nuevo mecanismo por el cual CYLD ejerce su acción protectora contra el cáncer.

1. Función de CYLD en la fisiología cutánea

El gen *Cyld* fue originalmente identificado como un gen supresor tumoral mutado en la cilindromatosis familiar, lo que origina el desarrollo de tumores, la mayor parte de las veces benignos, derivados de anejos de la piel (cilindromas, tricoepiteliomas y espiradenomas)¹⁰². Sin embargo, hasta la fecha no se conocía la función que CYLD desempeñaba en la piel ni en sus apéndices. Nuestros resultados han mostrado que CYLD desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de la piel, ya que, entre otras funciones, CYLD regula la diferenciación epidérmica: la expresión forzada de CYLD^{wt} en los queratinocitos HaCaT en monocapa, en los equivalentes de piel humana y en las células epidérmicas tumorales A431, promueve la diferenciación. Por el contrario, la falta de CYLD funcional por expresión de la forma mutada CYLD^{C/S} (que simula las mutaciones presentes en los pacientes de cilindromatosis hereditaria), impide la diferenciación de los queratinocitos, tanto en los equivalentes de piel de las células HaCaT-CYLD^{C/S}, como en la piel de los ratones transgénicos. La vía de señalización de JNK podría estar mediando los efectos de CYLD en la diferenciación epidérmica, puesto que los queratinocitos (tumorales o no) que sobreexpresan CYLD^{wt} muestran una disminución de la activación de JNK, habiéndose descrito previamente que la inhibición de la activación de JNK en cultivos

de queratinocitos *in vitro* inducía la estratificación e incluso la producción de envuelta cornea; por el contrario, en los equivalentes de piel H-CYLD^{C/S} y en la piel de los ratones K5-CYLD^{C/S} se observa una mayor activación de JNK, lo que concuerda con los datos que muestran que la actividad aumentada de JNK retrasa o inhibe la diferenciación⁸. La regulación de la activación de JNK tendría también repercusión en la apoptosis de los queratinocitos, tumorales o no, de modo que la inhibición de JNK por la sobreexpresión de CYLD^{wt} explicaría el aumento de la tasa de apoptosis, por la falta de la señal de supervivencia celular dependiente de JNK²⁰⁵. Por el contrario, la inhibición catalítica de CYLD por la forma mutada CYLD^{C/S} promovería en los queratinocitos (tumorales y no tumorales) resistencia a apoptosis como resultado de la sobreactivación de JNK. Estos resultados coinciden con los reportados en pacientes de cilindromatosis, en los que se observa el desarrollo de tumores resistentes a apoptosis y en los que se detecta activación de JNK. Sin embargo, en la piel de los ratones transgénicos, que también muestra activación de JNK, no se observan diferencias en la tasa de apoptosis respecto a los niveles detectados en la piel de los ratones Control. Pensamos que esto puede ser debido a que, aunque la apoptosis es parte del programa normal de los queratinocitos de la epidermis y de la vaina radicular de los folículos pilosos²⁰⁶, sin embargo, el índice de apoptosis que se observa en la piel es bajo y puede que ello impida ver si hay una disminución. También, podría ocurrir que *in vivo*, en el ratón, existan otros genes reguladores, factores de crecimiento u otros estímulos que impidan que JNK activada induzca apoptosis; mientras que en los equivalentes de piel y en los queratinocitos en cultivo, al ser un sistema más simple y controlado que un organismo completo, se pongan de manifiesto propiedades que quedan contrarrestadas *in vivo*. Es un tema que estamos investigando y para resolverlo someteremos la piel a estímulos o tratamientos que induzcan apoptosis, por ejemplo, radiación UV, y compararemos cómo es la respuesta de la piel de los ratones transgénicos y la de los controles.

Otra función que hemos descubierto que desempeña CYLD en la epidermis es el mantenimiento de la polaridad de los queratinocitos: la expresión de CYLD^{C/S} provoca la pérdida de polaridad celular, siendo ésta esencial para el sostenimiento de la funcionalidad y la homeostasis de la epidermis. Entre las moléculas responsables del mantenimiento de la arquitectura epitelial y de la regulación de la polaridad de las células y tejidos epiteliales está β -catenina²⁰⁷, que se encuentra deslocalizada en los queratinocitos y en los equivalentes de piel CYLD^{C/S}, ya que ha perdido la localización en membrana que se observa en las células y en los equivalentes de piel Control. Por tanto, la deslocalización de β -catenina aparece como un mecanismo responsable, al menos en parte, de la pérdida de polaridad de los queratinocitos deficientes en la

actividad catalítica de CYLD. Tanto el impedimento de la diferenciación (con la remodelación del citoesqueleto que conlleva), como la pérdida de la polaridad celular en los queratinocitos CYLD^{C/S} podrían contribuir a la formación de los focos de invasión que se han detectado en el componente dérmico de los equivalentes de piel CYLD^{C/S}. En conjunto, podemos concluir que las alteraciones encontradas en los queratinocitos no tumorales que carecen de la función desubiquitinasa de CYLD, son cambios que podrían conducir a la displasia epitelial y representar modificaciones premalignas, ya que la pérdida de diferenciación epitelial y de polaridad celular, la resistencia a apoptosis y la adquisición de propiedades invasivas son frecuentemente observadas en la transformación maligna.

A pesar de que en los primeros estudios realizados sobre CYLD se describió que el síndrome de cilindromatosis hereditaria de CYLD se caracterizaba principalmente por la formación de tumores de los apéndices de la piel, como son los folículos pilosos y las glándulas sebáceas, ecrinas y apocrinas; sin embargo, hasta ahora el papel que desempeña CYLD en estas estructuras no había sido estudiado. Los ratones K5-CYLD^{C/S} presentan alteraciones en el pelo y en los folículos pilosos, además de hiperplasia de las glándulas sebáceas, lo que demuestra que el mantenimiento de la homeostasis de los anexos cutáneos se ve obstaculizado por la falta de la función desubiquitinasa de CYLD. El fenotipo del pelo de los ratones K5-CYLD^{C/S} es similar al descrito en los ratones transgénicos *Cyld*^{EΔ9/Δ9}, que expresan una forma mutada de CYLD que carece del exón 9 y son también deficientes en la función desubiquitinasa⁴². Sin embargo, los ratones K5-CYLD^{C/S} presentan alteraciones adicionales, como son una alopecia progresiva y retraso en la progresión del segundo ciclo de crecimiento del pelo, lo que sugiere que la función catalítica de CYLD es esencial para la inducción de esta fase de los FP. En cuanto a las alteraciones en otros anexos de la piel de los ratones K5-CYLD^{C/S}, se han observado cambios importantes en las glándulas ecrinas de las patas, que se encuentran reducidas en tamaño; y en las glándulas sebáceas. Estas últimas aparecen huérfanas en la piel de lomo, cola, hocico etc, sin asociarse a ningún FP, y son además hiperplásicas y muy abundantes. Este fenotipo podría deberse a los mayores niveles de expresión y de activación de c-Myc, ya que se ha caracterizado anteriormente a c-Myc como un regulador dominante que promueve la diferenciación de las células madre hacia glándulas sebáceas a expensas de la diferenciación hacia folículos pilosos²⁰⁸, lo que explicaría también, al menos en parte, la alopecia detectada en los ratones K5-CYLD^{C/S}. Otra alteración molecular fundamental de la piel de los ratones K5-CYLD^{C/S} es la activación constitutiva de la vía canónica de NF-κB a lo largo de la vida de estos animales, junto con la expresión aumentada de la citoquinas pro-inflamatorias (dianas de NF-κB), TNF-α e IL-6. Tanto

la inflamación como la activación crónica de NF- κ B están ligadas o son la base del desarrollo de la forma más frecuente de alopecia en humanos, la alopecia androgenética, por lo que ésta podría ser otro mecanismo que originase la pérdida de pelo en los ratones transgénicos. A favor de la intervención de NF- κ B, TNF- α e IL-6 en el desarrollo de este fenotipo de calvicie, se encuentran los datos obtenidos del estudio de los ratones transgénicos que sobreexpresan otros reguladores de NF- κ B como son IKK α e IKK β , y que presentan también activación crónica de NF- κ B, inflamación en la piel y alopecia²⁰⁹.

La alopecia, también podría estar relacionada con la pérdida de células madre del folículo piloso, ya que la expresión de CYLD en células madre ha sido descrita en algunos casos, por ejemplo, en el sistema hematopoyético, CYLD se expresa abundantemente en las células madre hematopoyéticas quiescentes (CMHq) y se ha comprobado que la eliminación condicional mediada por Cre del dominio catalítico de CYLD inducía a las CMHq a salir de la quiescencia y anular su potencial de repoblación y auto-renovación²¹⁰. También se ha descrito la expresión de CYLD en células madre de las glándulas salivales que son capaces de diferenciarse a lo largo de diferentes líneas celulares, lo que da lugar en algunos pacientes de cilindromatosis hereditaria al desarrollo simultáneo de múltiples tumores cutáneos y de adenoma membranoso basocelulares de la glándula parótida²¹¹. Por tanto, podría ocurrir que CYLD se expresase en las células madre de los folículos pilosos y la falta de la función desubiquitinasa por expresión de CYLD^{C/S} indujese en los ratones K5-CYLD^{C/S} su salida de la quiescencia y su incapacidad para formar nuevos folículos pilosos, conduciendo a la alopecia. Esta posibilidad será analizada en estudios posteriores.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la disminución de la función de CYLD en piel provoca alteraciones importantes en la morfología de la piel y sus anejos, lo que se podría traducir en alteraciones funcionales y en el desarrollo de enfermedades de la piel. Para comprobar esta posibilidad sería interesante analizar biopsias de pacientes de diferentes lesiones cutáneas para comprobar la posible implicación de la falta de función de CYLD en su patogenia.

2. CYLD como supresor del desarrollo y la progresión de los carcinomas escamosos cutáneos

Las diferentes aproximaciones de carcinogénesis que hemos realizado sugieren que CYLD inhibe el desarrollo y la malignización de los cSCC. En los experimentos realizados en queratinocitos no tumorales, comentados anteriormente, ya se observaba que la pérdida funcional de CYLD inducía comportamientos premalignos en

situaciones fisiológicas, en ausencia de promotores tumorales ni de ningún otro estímulo que indujese la transformación celular, lo que ha quedado confirmado posteriormente mediante los experimentos de *xenoinjertos* de células epidérmicas tumorales (células de cSCC) en ratones inmunodeficientes, que mostraron que la sobreexpresión de CYLD^{wt} hacía regresar cSCC humanos de elevada agresividad, mientras que la disminución de la función de CYLD aumentaba la progresión maligna de los mismos.

Entre los mecanismos responsables de la progresión maligna inducida por la falta de función catalítica de CYLD, tanto en las células epidérmicas tumorales, como en los cSCC, hemos encontrado la sobreactivación de NF-κB. El papel de NF-κB en el desarrollo de tumores es complejo, ya que exhibe tanto propiedades de supresor como de promotor tumoral en diferentes tipos celulares⁹⁸. Durante un tiempo se ha sugerido que la señalización de NF-κB ejercía en la piel, en los queratinocitos, funciones principalmente supresoras del desarrollo de tumores⁶². Sin embargo, los estudios más recientes muestran que la activación de NF-κB en la piel promueve el desarrollo de cáncer, por ejemplo, en la cilindromatosis hereditaria la mutación de CYLD activa NF-κB y promueve el desarrollo de cilindromas¹¹⁶⁻¹¹⁸. También se ha descrito que en queratinocitos, la desdiferenciación inducida por la proteína Ras oncogénica y la expresión de genes pro-inflamatorios, son en gran medida dependientes de la activación de NF-κB²¹²; en el caso del modelo de carcinogénesis química en dos pasos, DMBA/TPA, se ha referido que la señalización de NF-κB dependiente de p65 promueve la formación de tumores de piel, demostrando además que la inhibición de NF-κB impide tanto la iniciación como la promoción tumoral y la inducción de inflamación⁶³. Otra observación a favor de la acción pro-tumoral de NF-κB en los cSCC son los resultados que muestran que la actividad de NF-κB aumenta con la progresión tumoral¹⁰⁰. Además de estos ejemplos en los que la activación de la vía clásica de NF-κB en queratinocitos favorece la tumorigénesis de los cSCC, se ha descrito que la ausencia de CYLD en los queratinocitos de los ratones deficientes en CYLD (ratones CYLD^{-/-}) promueve la proliferación y el crecimiento tumoral por aumentar la expresión de Bcl-3 y su localización nuclear (CYLD funcional desubiquitina a Bcl-3, provocando su retención en el citoplasma), lo que origina la activación de las subunidades de NF-κB p50 y p52, su translocación nuclear e inducción de la expresión de genes diana de NF-κB, como Ciclina D1⁸³; la consecuencia final del incremento en Bcl-3 es el aumento de la susceptibilidad de los ratones deficientes en CYLD al desarrollo de tumores de piel (benignos, papilomas). En el caso de las células tumorales de cSCC que expresan CYLD^{C/S} hemos observado también un aumento de la localización nuclear de Bcl-3 y de p52, y un incremento en los niveles de expresión de Ciclina D1,

lo que podría explicar la mayor tasa de proliferación (a corto y largo plazo) y los signos de mayor agresividad detectada en las células C57-CYLD^{C/S}, lo que está de acuerdo con el incremento de Bcl-3 y p52 encontrado en los carcinomas cutáneos de ratón de estadios avanzados¹⁰⁰. El papel relevante que desempeñan estas moléculas en cáncer ha sido también demostrada en humanos, por ejemplo, en tumores de mama y nasofaríngeos la expresión nuclear activada de Bcl-3/p50/p52 promueve la proliferación celular y la oncogénesis^{213,214} y en los cilindromas humanos Bcl-3 presenta localización nuclear al contrario que los queratinocitos normales, que retienen a Bcl-3 en el citoplasma⁸³. En los ratones K5-CYLD^{C/S} se han detectado niveles incrementados de Bcl-3 en piel- y en otros órganos, como en bazo y timo (no mostrado)-, lo que, independientemente de su localización subcelular, es considerado un evento pro-oncogénico en diversos tipos de cáncer, por ejemplo, en melanoma, cáncer cervical, colorrectal, hepatocarcinomas y otros²¹⁵⁻²¹⁷. Sería interesante analizar si Bcl-3, además de sobreexpresarse en los queratinocitos, timocitos etc de los ratones K5-CYLD^{C/S}, se localiza en el núcleo. Asimismo, se analizará la expresión y localización de Bcl-3 y p52 en los tumores espontáneos que desarrollan los ratones transgénicos.

La caracterización de las células C57-CYLD^{C/S} ha mostrado también un aumento de la expresión de β -catenina y su localización nuclear (activada). Este resultado ha sido corroborado por un grupo que describe que la pérdida de CYLD impide la desubiquitinación en K63 de Dvl, lo que aumenta la acumulación de β -catenina nuclear inducida por Wnt¹²¹. La activación de β -catenina genera una activación permanente de esta vía de señalización que desencadena la expresión de genes que codifican proteínas que participan en proliferación celular, diferenciación y mantenimiento de células madre; también en la adhesión célula-célula, mediando la interacción entre cadherinas y actina, por lo que la activación de β -catenina o su deslocalización subcelular lleva a la pérdida de la adhesión y de polaridad celular, pudiendo todas estas alteraciones desencadenar un proceso oncogénico. La pérdida de adhesión conlleva además un incremento en la capacidad invasiva de las células, mecanismo asociado con la capacidad de metástasis de las células tumorales, lo que hace que la alteración de β -catenina sea un evento trascendental en el proceso tumoral. Diferentes estudios han documentado la activación de β -catenina nuclear en varios cánceres humanos y se ha considerado tanto la acumulación de β -catenina como su localización nuclear están relacionadas con un peor pronóstico del cáncer. En el caso de carcinomas de colon, se han descrito mutaciones activadoras de β -catenina²¹⁸; sin embargo, en otros, como en el mieloma múltiple y en otras neoplasias hematológicas, no se han encontrado mutaciones en la vía Wnt/ β -catenina, lo que indica que deben

existir mecanismos alternativos para la activación de la β -catenina²¹⁹⁻²²¹. Curiosamente, la expresión de CYLD está inhibida en el mieloma múltiple²²², lo que sugiere que de forma similar a lo que ocurre en nuestro modelo, la actividad reducida de CYLD podría causar la activación de β -catenina en este tipo de cáncer.

Otra modificación muy relevante que induce la ausencia de CYLD funcional en las células tumorales de cSCC y que puede incrementar su malignidad, es la adquisición de características mesenquimales, ya que pierden su aspecto epitelial y presentan una morfología fibroblastoide. Este cambio puede estar provocado por la deslocalización de Cadherina-E y de β -catenina en las células que expresan el mutante CYLD^{C/S}, lo que favorecería la pérdida de polaridad de los queratinocitos y la disminución de la adhesión, haciendo que las uniones intercelulares fuesen menos fuertes y propiciando así la migración celular^{223,224}, ya que la desunión del complejo Cadherina-E/ β -catenina es un requisito necesario en la transición epitelio-mesénquima (TEM), en procesos de diferenciación celular y de migración²²⁵, lo que explicaría la mayor capacidad de migración de las células C57-CYLD^{C/S} en los experimentos de cicatrización en placa. En conjunto, las características comentadas de las células que carecen de la función catalítica de CYLD (mayor capacidad de proliferación y de migración así como la sobreexpresión de las proteínas pro-oncogénicas Bcl-3, p52 y β -catenina) son indicadores de un incremento de malignidad de estas células, respecto a las células tumorales C57-Control (con CYLD endógeno catalíticamente activo). Estos efectos de la expresión de CYLD^{C/S} en las células de cSCC C57, los hemos encontrado también al analizar otras línea de células epidérmicas tumorales, las células PB, que muestran que la falta de función catalítica de CYLD origina también en ellas la sobreactivación de la vía clásica de NF- κ B, el incremento de la proliferación celular, y de la expresión de Ciclina D1; aumento de supervivencia celular, la disminución de expresión de Bax (resistencia a apoptosis) y la localización nuclear de Bcl-3, p52 y β -catenina. Estos resultados indican que los cambios provocados por CYLD^{C/S} no ocurren específicamente en las células C57, sino que son una consecuencia general de la falta de CYLD funcional, al menos en las células epidérmicas tumorales (resultados no publicados).

Los modelos de *xenoinjerto* en ratones inmunodeficientes confirman *in vivo* la malignidad aumentada de las células cSCC humanas y murinas que carecen de la función desubiquitinasa de CYLD: los tumores CYLD^{C/S} presentan un rápido crecimiento, debido a la proliferación aumentada de los queratinocitos y a su resistencia a apoptosis; son más indiferenciados y poseen una angiogénesis incrementada. Un resultado relevante de nuestro trabajo es el hallazgo de la regulación de VEGF-A por CYLD: la disminución de la actividad catalítica de CYLD da

como resultado una inducción de la expresión de VEGF-A (y otros factores angiogénicos) en queratinocitos tumorales (células PB y PDVC57) y no tumorales (HaCaT), así como en los cSCC. El VEGF-A es el principal factor angiogénico y está involucrado en procesos cutáneos fisiológicos y patológicos, incluida la cicatrización de heridas, respuesta a radiación ultravioleta, psoriasis y tumorigénesis²²⁶⁻²²⁸.

En el caso del cáncer de piel, la sobreexpresión de VEGF-A en la epidermis murina predispone a los ratones al desarrollo tumoral^{227,229}; además desempeña un papel relevante no solo en la primera etapa de la neo-angiogénesis sino también en las etapas avanzadas de la progresión tumoral²³⁰. Por ello el aumento de la expresión de VEGF-A en los cSCC-CYLD^{C/S} podría estar propiciando el incremento de la malignidad tumoral observada en estos tumores; también podría estimular el crecimiento tumoral, ya que VEGF-A favorece la permeabilidad vascular y con ello el aporte de los nutrientes necesarios para crecer²³¹.

De modo que de acuerdo con esta función pro-angiogénica de VEGF-A, se observa que los cSCC murinos (derivados de las células C57-CYLD^{C/S}) y los humanos (de las células A-CYLD^{C/S}) forman vasos sanguíneos grandes, lacunares e inmaduros (permeables), una característica prominente de la progresión de los tumores de piel²³². Por el contrario, la sobreexpresión de CYLD silvestre en los cSCC A-CYLD^{wt} reduce el diámetro de los vasos sanguíneos y aumenta su madurez, por lo que el suministro de los nutrientes requeridos se puede ver impedido y como consecuencia verse comprometida la viabilidad del tumor, constituyendo por tanto la inhibición de la angiogénesis un mecanismo por el cual, al menos en parte, los tumores que sobreexpresan CYLD^{wt} regresan. La apoptosis y la diferenciación incrementada en las células y tumores que sobreexpresan CYLD silvestre también pueden estar colaborando en la reducción tumoral de los cSCC-A-CYLD^{wt}.

Estos resultados obtenidos *in vivo* tienen gran importancia desde un punto de vista clínico, ya que sugieren que CYLD puede ser potencialmente una diana terapéutica para el tratamiento de los cSCC más agresivos, ya que con tan solo la sobreexpresión de CYLD silvestre se ha conseguido reducir un carcinoma escamoso de elevada agresividad a un quiste benigno.

3. CYLD como supresor tumoral de la metástasis de los carcinomas escamosos cutáneos

Los cambios comentados anteriormente que produce la falta de función de CYLD en las células epidérmicas tumorales, entre ellos el aspecto fibroblastoide, la deslocalización de proteínas de adhesión, la pérdida de polaridad y el aumento de

capacidad de migración celular, son alteraciones, que, en conjunto, indican que las células C57-CYLD^{C/S} tienen un potencial metastásico aumentado. Además, estas células tienen inducida la expresión de Snail1, uno de los factores de transcripción importantes para promover la transición epitelio-mesénquima (TEM)²³³ y favorecer la metástasis. Un mecanismo probable que puede provocar la inducción de Snail1 en las células C57-CYLD^{C/S}, es la activación permanente de NF-κB²³⁴. Estos resultados sugieren que un mecanismo por el que CYLD inhibe la progresión de los cSCC es por inhibir la TEM en células epidérmicas tumorales, lo que representa un tema de gran interés y proponemos el estudio de otros factores de transcripción (Snail2; ZEB1, ZEB2, KLF8, Twist, etc) importantes en el proceso de TEM para confirmarlo.

Los experimentos *in vivo* en ratones inmunodeficientes han confirmado la capacidad aumentada de metástasis de las células de cSCC que carecen de CYLD funcional. Han mostrado además que CYLD actúa como inhibidor de metástasis de los cSCC, ya que la deficiencia en la actividad catalítica de CYLD en las células C57-CYLD^{C/S} da lugar al desarrollo de metástasis muy agresivas en pulmón, que se caracterizan por una fuerte vascularización, elevada tasa de proliferación e inhibición de la expresión de la proteína supresora tumoral y de metástasis, Maspin. Previamente, se había descrito que en los ratones K14-CYLDmut el tratamiento de la piel con DMBA/TPA origina cSCC que metastatizan a nódulos linfáticos como consecuencia de la activación de JNK /AP1¹³⁵, aunque en otros modelos de ratones transgénicos la aplicación de DMBA/TPA en la piel de ratones carentes de actividad DUB de CYLD (o deficientes en *Cyld*) no producía cSCC sino tumores basaloideos o papilomas que no metastatizaban^{42,83}.

Un resultado fundamental de nuestros estudios ha sido descubrir que la disminución de la expresión de Maspin, conocida fundamentalmente por ser supresor de metástasis, en distintos tipos de cáncer, entre ellos en el cáncer de mama y de próstata, confiere a las células C57-CYLD^{C/S} gran capacidad de metastatizar. Esto lo demuestra el hecho de que la restauración de la expresión de Maspin en las células C57-CYLD^{C/S} resulta en la reducción, casi completa, del número y la extensión de las metástasis de estas células. Hemos encontrado además una interacción física directa entre CYLD y Maspin y que la sobreexpresión de CYLD induce la expresión de Maspin. El análisis de líneas celulares epidérmicas, humanas y murinas, ha mostrado que existe una relación inversamente proporcional entre los niveles de expresión de Maspin y el grado de malignidad celular, de modo que las células no tumorales expresan niveles altos de Maspin, mientras que las más agresivas presentan una expresión muy baja. De acuerdo con estos resultados, el estudio de la expresión de Maspin en biopsias humanas de los tumores desarrollados por los pacientes de

cilindromatosis hereditaria, pone de manifiesto una pérdida de expresión de Maspin en los tumores deficientes en CYLD (cilindromas, tricoepiteliomas y espiradenomas) en comparación con la expresión en la piel normal. Estos datos indican que existe también una correlación directa *in vivo*, en humanos, entre la expresión de CYLD y la de Maspin. Sin embargo, aunque los cilindromas pierden la expresión de Maspin, rara vez metastatizan, lo que sugiere que hacen falta otras mutaciones adicionales, además de la mutación de CYLD, para que se produzca la malignización de los cilindromas. Hay que señalar que a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los cánceres, que se desarrollan en edades avanzadas, los tumores en los pacientes de CH se originan en edades muy tempranas (en la segunda década de la vida), cuando todavía no se han acumulado otras mutaciones.

Nuestro grupo ha descrito previamente que existe una correlación entre la disminución de los niveles de Maspin en piel y el aumento del potencial de malignidad de los tumores epidérmicos⁶⁵. Más recientemente hemos encontrado en muestras de ratón, y otros investigadores, en muestras humanas, que los cSCC más agresivos y con mayor riesgo de metastatizar son los que expresan niveles más bajos de Maspin⁸¹. Por tanto, estos resultados, junto con los obtenidos en este trabajo, sugieren que los niveles de expresión de CYLD y de Maspin pueden ser predictivos de la progresión de los carcinomas escamosos cutáneos y podrían ser útiles como biomarcadores para identificar los cSCC más agresivos y con más alto riesgo de metastatizar.

4. CYLD protege del envejecimiento

Los resultados obtenidos en el modelo de ratón K5-CYLD^{C/S} ponen de manifiesto una nueva función de CYLD como supresor del envejecimiento. Aunque CYLD se expresa de forma ubicua en muchos órganos, sin embargo, el papel que desempeña en la fisiología de los diferentes tejidos es bastante desconocido. El estudio de los ratones K5-CYLD^{C/S} nos ha permitido determinar que CYLD es necesario para mantener la homeostasis de la piel y de muchos otros órganos (bazo, timo, páncreas, hígado, pulmones, etc), protegiéndolos del envejecimiento prematuro. Recientemente se ha descrito la función anti-envejecimiento de algunos de los genes supresores tumorales mejor conocidos, por ejemplo, se ha encontrado que el locus Ink4/Arf tiene un efecto anti-envejecimiento global, probablemente favoreciendo la quiescencia y previniendo la proliferación innecesaria²³⁵. Se ha referido también que los efectos combinados de la función de PTEN sobre el cáncer (contrarresta la actividad de PI3K

y de esta manera disminuye la transformación neoplásica) y sobre el metabolismo (efecto “*anti-Warburg*”) puede contribuir al aumento de la longevidad¹⁶⁴.

Respecto al papel de CYLD como protector de envejecimiento es una función no descrita hasta ahora, aunque se había observado en *Drosophila melanogaster* que la deficiencia de CYLD acortaba la esperanza de vida²⁰³. Ahora nuestros ratones transgénicos muestran que la deficiencia en CYLD funcional promueve el envejecimiento acelerado.

Unas de las primeras manifestaciones del envejecimiento precoz de los ratones K5-CYLD^{C/S} son la cifosis y una alopecia parcial. Esta última se manifiesta a edades muy tempranas, desde los 3 meses y va progresando con la edad. La pérdida de cabello es reconocido como un síntoma de envejecimiento en mamíferos, también ocurre en humanos, donde, por ejemplo, la forma más común de pérdida del cabello, la alopecia androgenética, muestra una clara progresión relacionada con la edad²³⁶. También en algunas enfermedades humanas con síntomas de progeria (envejecimiento brusco y prematuro), como el síndrome de Werner y la progeria de Hutchinson-Gilford, se observa la pérdida prematura del cabello²³⁷.

Existen asimismo diversos modelos de ratón con fenotipo de envejecimiento prematuro que, entre otras alteraciones, muestran pérdida progresiva del pelo^{166,238,239}.

El análisis histológico de la piel de los ratones transgénicos K5-CYLD^{C/S} muestra alteraciones sugerentes de envejecimiento desde edades muy tempranas, desde el primer mes de edad. Estas modificaciones consisten principalmente en la aparición de áreas de atrofia epidérmica, debida al menor número de capas de queratinocitos, en la piel interfolicular. Es un fenotipo progresivo que va haciéndose más evidente con el transcurso de la edad, a los 3 meses de edad la atrofia se detecta en regiones más extensas, pudiéndose apreciar que en estas áreas los queratinocitos de la capa basal de la epidermis se hacen planos y pierden su polaridad, aunque en este caso no se encuentran alteraciones importantes en la distribución de β -catenina, como se apreciaba en las células HaCaT, si no que parece deberse a una adaptación a la falta de estratos superiores de queratinocitos. Estas zonas de atrofia epidérmica se alternan con otras de engrosamiento epitelial, formando “picos epidérmicos” con mayor o menor grado de hiperplasia papilomatosa. Se observa además la aparición de glándulas sebáceas hiperplásicas, que se hace más acusado a partir de los 8 meses de edad. En humanos se ha descrito también la hiperplasia de glándulas sebáceas en el envejecimiento, principalmente en la cara, aunque en este caso va ligado a la formación de quistes sebáceos²⁴⁰. Sería interesante analizar si estos cambios histológicos en la piel de los ratones K5-CYLD^{C/S} se acompañan de alteraciones funcionales, por ejemplo, si se ve afectada la función barrera, al igual que ocurre en

humanos con el envejecimiento, donde se han observado cambios en la integridad y estructura de las barreras anatómicas (piel y mucosas)²⁴¹. También podrían verse afectados o dificultados algunos procesos como la cicatrización de heridas. Son comprobaciones que vamos a abordar en el futuro.

Se ha demostrado que el principal mecanismo responsable del envejecimiento, tanto fisiológico como patológico (por ejemplo en los síndromes de progeria), es la activación de NF-κB, siendo necesaria esta activación tanto para que se establezca el envejecimiento, como para el mantenimiento del fenotipo envejecido²⁴². Así, los ratones transgénicos *Nfkb1*^{-/-} deficientes en la subunidad p50 NF-κB muestran hiperactivación de la vía clásica de señalización de NF-κB, siendo esta alteración suficiente para inducir el envejecimiento acelerado¹⁹¹. Además, lo que es fundamental, está bien demostrado que bloqueando la actividad de NF-κB se puede lograr el rejuvenecimiento y la reversión de patologías en organismos envejecidos que muestran hiperactivación de NF-κB, incluso cuando las estrategias de intervención se aplican en edades tardías. Algunos de estos ejemplos son la mejora conseguida del síndrome progeroide en ratones deficientes en *Sirt-6* mediante la inhibición genética de NF-κB¹⁸⁷; la mejora y prolongación de la salud y de varias manifestaciones del envejecimiento en dos modelos murinos diferentes del síndrome progeroide de XFE (ratones deficientes en *Ercc1* y *Ercc1*^{-Δ}) por la reducción genética o farmacológica de NF-κB¹⁸⁸. En otros ratones modelo de progeria, los *Zmpste24*^{-/-} y los *Lamna*^{G609G/G609G}, el bloqueo NF-κB evitó completamente en la piel las alteraciones asociadas con la edad avanzada que manifestaban estos ratones en edades tempranas¹⁸⁹; en el modelo de ratón de dermatitis de radiación aguda *p16INK4a*, los cambios en la piel asociados con el envejecimiento prematuro también fueron impedidos por la atenuación de la expresión de genes dependientes de NF-κB¹⁹⁰.

Es importante señalar que aunque otras vías de señalización han sido también implicadas en los procesos de envejecimiento, sin embargo, todas ellos convergen en la activación de NF-κB, por lo que el modelo que se propone como más probable de ser últimamente responsable del proceso de envejecimiento es aquel en el que NF-κB constituye una fuerza impulsora del envejecimiento, actuando como un integrador de todas las alteraciones específicas de tipo celular y sistémicas de senectud. Así, la activación de la vía de señalización NF-κB induce alteraciones celulares relacionadas con la reprogramación epigenética, la producción de ROS y la inestabilidad de telómeros, lo que resulta en la parada replicativa y la senescencia celular. Otro efecto de la activación de NF-κB es la estimulación de la secreción de citoquinas proinflamatorias, entre ellas TNF-α e IL-6, que afecta a órganos distantes causando inflamación sistémica, que compromete la homeostasis del tejido y promueve a su vez

el envejecimiento acelerado. En el modelo de ratones K5-CYLD^{C/S} se ha comprobado que existe una sobreexpresión TNF- α e IL-6 en piel (también en los queratinocitos HaCaT-CYLD^{C/S}), y un incremento de linfocitos T en sangre periférica. Estos cambios se han descrito también en el envejecimiento fisiológico humano²⁴¹ e igualmente la sobreactivación de NF- κ B induce la expresión de TNF- α e IL-6 en enfermedades de progeria²⁴³.

Asimismo, los ratones transgénicos muestran inflamación en numerosos órganos, entre ellos en pulmón, hígado, estómago y páncreas. Esta inflamación puede ser debida a un efecto sistémico de la inducción de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 que se ha observado en la piel, o podría deberse a la expresión del transgén en los órganos inflamados que produzca a su vez la activación de NF- κ B y la secreción de citoquinas proinflamatorias. Estas posibilidades se analizarán próximamente. Dado que la inflamación crónica desempeña un papel fundamental en el deterioro de los tejidos, pensamos que la inflamación es la principal causante del envejecimiento de estos órganos en los ratones transgénicos. Es interesante señalar que una de las alteraciones más relevantes que se han encontrado en el páncreas de los ratones K5-CYLD^{C/S}, la hiperplasia de los islotes pancreáticos, ha sido también descrita en los ratones mutantes que carecen del gen p16INK4a y, en los que se ha determinado que está incrementada la proliferación de las células beta del páncreas²⁴⁴. De modo que en este caso los dos supresores tumorales, CYLD y p16INK4a desempeñan un papel determinante en el mantenimiento de la homeostasis de los islotes pancreáticos, lo que puede ser importante para su funcionalidad.

Además de las alteraciones propias de pieles envejecidas que se observan en la piel de los ratones K5-CYLD^{C/S} jóvenes, que indican que estos ratones tienen un envejecimiento cutáneo prematuro, hay otros órganos en los que también se detecta un envejecimiento acelerado muy marcado, como por ejemplo en el bazo y el timo. En humanos el envejecimiento del timo, comienza a atrofiarse e involuciona después de la adolescencia, infiltrándose grasa y conteniendo menos células útiles, de modo que a los 50-60 años presenta un 5-10% de su masa original. En el envejecimiento del timo se ha descrito que la activación de NF- κ B está críticamente implicada^{189,245}, siendo considerada además la involución tímica como uno de los principales reguladores del envejecimiento fisiológico²⁴⁶, así, en el caso humano, se ha sugerido que la involución tímica está ligada al acortamiento de vida, ya que hay estudios que indican que aquellos ancianos que retienen algo de función tímica poseen una mayor esperanza de vida.

Los ratones K5-CYLD^{C/S} muestran además envejecimiento de otros órganos, como el páncreas y el hígado, por lo que podemos decir que la falta de CYLD funcional provoca un envejecimiento sistémico en los ratones K5-CYLD^{C/S}.

Junto a la activación crónica de NF-κB, los ratones K5-CYLD^{C/S} muestran hiperactivación de otras moléculas que favorecen el envejecimiento, tales como JNK, Akt y c-Myc. Así, se ha observado que con el envejecimiento fisiológico se produce un aumento de la actividad JNK²⁴⁷; y que la inhibición de la vía PI3K/Akt previene el envejecimiento²⁴⁸. El mecanismo por el que se ha propuesto que la activación de estas y otras vías causa el envejecimiento es en última instancia por activar a NF-κB; mientras que las vías que promueven la longevidad (como las proteínas SIRT, FOXO, la restricción calórica, etc) inhiben la señalización de NF-κB¹⁷⁶. Hay múltiples evidencias que muestran la implicación de c-Myc en la aceleración del envejecimiento; por ejemplo, la reducción de la expresión de c-Myc en ratones haploinsuficientes (Myc^{+/-}) mejora los fenotipos de envejecimiento en múltiples órganos a la vez que alarga la vida²⁴⁹. Por el contrario, la sobreexpresión de c-Myc da como resultado un aumento de las especies de oxígeno reactivo (ROS) y de daño al DNA²⁵⁰, lo que contribuye al proceso de envejecimiento²⁵¹; la expresión ectópica de c-Myc agota además las poblaciones de células madre, lo que ocurre, se ha observado también en el envejecimiento fisiológico²⁵². Se ha descrito que c-Myc contribuye al aumento de la inflamación que acompaña al envejecimiento, ya que regula directamente la expresión de algunas citoquinas pro-inflamatorias²⁵³. De modo que en los ratones K5-CYLD^{C/S}, que presentan activación crónica de c-Myc (P-c-Myc) en piel, c-Myc podría colaborar con NF-κB en promover la inflamación crónica detectada en diferentes órganos de estos animales, favoreciendo el envejecimiento. Existen dos modelos de ratones transgénicos que, al igual que los K5-CYLD^{C/S}, expresan una forma mutada de CYLD que provoca la falta de actividad desubiquitinasa en la epidermis y otros tejidos (aunque las mutaciones son diferentes en los tres modelos de ratón); son los ratones CYLD-Mut¹³⁵ y los CYLD^{EΔ9/Δ942}. En ellos no se han observado signos de envejecimiento acelerado, aunque los CYLD-Mut presentan activación de JNK en los queratinocitos y los CYLD^{EΔ9/Δ9} tienen activación de c-Myc en la epidermis. Esta diferencia podría deberse a que no hubiesen sido analizados ratones de edad avanzada, aunque en los ratones K5-CYLD^{C/S} las señales de envejecimiento son aparentes desde los 3 meses de edad. Otra posible explicación a la falta de envejecimiento prematuro en estos otros dos modelos de ratones es que no tengan sobreactivación de NF-κB, por lo que envejecen normalmente.

Recientemente se ha descrito el papel regulador relevante del envejecimiento del hipotálamo medio-basal a través de la activación de señales inflamatorias²⁵⁴. En este

caso, NF- κ B también aparece como un importante regulador del envejecimiento, ya que su bloqueo específico en esta región retrasa la aparición de las alteraciones asociadas a la edad. La posible expresión del transgén en el hipotálamo será abordada próximamente.

Dado el fenotipo tan acusado de envejecimiento prematuro de los ratones K5-CYLD^{C/S}, nos proponemos analizar muestras de distintos tipos tisulares de pacientes de edad avanzada para comprobar si en el envejecimiento fisiológico se produce una disminución de la expresión de CYLD.

Los ratones K5-CYLD^{C/S} desarrollan tumores de diverso origen de forma espontánea, desde el primer año de edad, sin someterlos a ningún tratamiento experimental de carcinogénesis, mientras que en sus hermanos control de la misma edad no se ha observado que se formen esos tumores.

Los ratones transgénicos muestran en piel alteraciones moleculares, como consecuencia de la expresión del transgén, que podrían explicar el desarrollo de cáncer, entre ellas, la sobreactivación de NF- κ B, y el incremento en la expresión y/o activación de diferentes proteínas relacionadas con el desarrollo tumoral, o incluso consideradas oncogenes, por ejemplo Akt, c-Myc, Bcl-3. Sin embargo, los tumores mayoritarios que desarrollan los ratones transgénicos no son de piel. Por ejemplo, nuestro grupo ha descrito que la activación constitutiva de Akt en la capa basal de los queratinocitos de los ratones transgénicos K5-myrAkt promueve el desarrollo y la malignidad de los cSCC⁷⁴; la sobreexpresión (y activación) de c-Myc, en la piel de los ratones K5-CYLD^{C/S} puede ser consecuencia de la activación de NF- κ B, ya que NF- κ B regula positivamente la expresión de c-Myc²⁵⁵. Se ha encontrado que la amplificación o la desregulación de c-Myc desarrolla un papel causal en la génesis y la promoción tumoral de diversos tipos de tumores humanos, incluidos los cSCC, tumores de pulmón y mama²⁵⁶⁻²⁶⁰. Además, se ha encontrado amplificación de c-Myc en el 50% de los tumores de pacientes transplantados que desarrollan cSCC. Recientemente nuestro grupo también ha descrito el incremento de malignidad de los cSCC que sobreexpresan c-Myc²⁶¹. Estas alteraciones podrían explicar el desarrollo del tumor de piel encontrado en los ratones K5-CYLD^{C/S}. El hecho de que no se hayan detectado más tumores cutáneos en estos ratones puede deberse a que requiera más tiempo (los tumores de piel se desarrollan bastante tiempo después al momento en que se producen las mutaciones génicas) o que se necesite algún evento oncogénico más.

Como hemos comentado, los elementos reguladores de K5 dirigen la expresión del transgén a otros tipos celulares que expresan K5²⁰¹, entre ellos al bazo, timo, estómago, mama, hocico y pulmón. Los ratones K5-CYLD^{C/S} muestran una elevada frecuencia de desarrollo tumoral en algunos de estos órganos, como es el caso del

pulmón y el estómago. La formación de estos tumores podría ser la consecuencia directa de la expresión del transgén, y los mecanismos moleculares por los que se originan podrían ser por la alteración de las mismas vías de señalización que en los queratinocitos o podrían ser distintos. Se van a realizar estudios encaminados a conocer este punto. Pero además los ratones K5-CYLD^{C/S} forman otros tumores derivados de células que no expresan el transgén, como son hepatocarcinomas, por lo que los tumores deben ser la consecuencia indirecta de las alteraciones que produce la expresión del transgén en otros tipos celulares. Se han reportado previamente otros casos de ratones transgénicos que expresan el gen exógeno dirigido por los elementos reguladores de K5 o K14 y desarrollan también fenotipo en hígado; por ejemplo, en los ratones K14-LacZ se forman hígados poliquísticos²⁶², y los ratones K14-ACBP (Acetil-CoA-binding protein) deficientes en la proteína ACBP (implicada en la síntesis de ceramidas esfingolípidos, etc), desarrollan un fenotipo importante en hígado, como consecuencia de la alteración de la función barrera de la piel, que provoca cambios en la termoregulación y en el almacenamiento de grasa en el hígado²⁶³. En nuestros ratones, además de esta posible causa de fenotipo hepático, que será investigada, otro factor que pueden provocar o colaborar en el desarrollo tumoral en hígado y en el resto de tipos tumorales, son el envejecimiento prematuro. También es importante resaltar que en muchos casos los tumores se encuentran asociados a una inflamación elevada, es el caso de los tumores gástricos, de los adenocarcinomas pulmonares y de los hepatocarcinomas. La relación entre inflamación crónica, activación de NF- κ B y desarrollo tumoral está bien establecida²⁶⁴, por lo que ésta es otra posible causa del desarrollo de los diferentes tipos de cáncer en los ratones K5-CYLD^{C/S}.

En conjunto, nuestros resultados indican que otro mecanismo por el que CYLD puede actuar como supresor tumoral es por proteger del envejecimiento. Los dos modelos de ratones transgénicos comentados anteriormente que carecen también de función desubiquitinasa de CYLD (los ratones CYLD-Mut y CYLD^{E Δ 9/ Δ 9}) no desarrollan tumores de forma espontánea; sería interesante comparar la expresión génica o modificaciones en la actividad de proteínas en muestras tisulares de los tres tipos de ratones para encontrar a qué es debida esta diferencia tan significativa. Sin embargo, lo que si han mostrado estos otros dos modelos de ratones deficientes en CYLD funcional es una mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores de piel en experimentos de carcinogénesis química o por radiación UV^{42,83,135}; sería interesante realizar estos experimentos en nuestros ratones K5-CYLD^{C/S}.

En conjunto, nuestros resultados indican que CYLD es un supresor tumoral importante del desarrollo y la progresión de los carcinomas escamosos cutáneos, el

tipo de CPNM más agresivo. La ausencia de CYLD funcional confiere cambios premalignos a los queratinocitos e incrementa considerablemente la malignidad de los queratinocitos transformados, favoreciendo su desdiferenciación, proliferación y capacidad invasiva. La pérdida de la función catalítica de CYLD en los cSCC los convierte en carcinomas de alto riesgo de metastatizar, ya que favorece la formación de metástasis de crecimiento rápido. Un resultado fundamental de nuestros estudios es el haber comprobado *in vivo*, que la sobreexpresión de CYLD es capaz de revertir el fenotipo maligno de los cSCC más agresivos, transformándolos en quistes benignos. Hemos encontrado además dos moléculas potencialmente útiles como biomarcadores de los cSCC más agresivos y con mayor riesgo de metastatizar, como son la disminución de la función de CYLD y los bajos niveles de expresión de Maspin. Nuestro modelo de ratones transgénicos K5-CYLD^{C/S} nos ha permitido descubrir otra función de CYLD desconocida hasta el momento, como es su capacidad de proteger frente al envejecimiento, ya que la deficiencia en la función desubiquitinasa de CYLD provoca el envejecimiento prematuro de numerosos órganos, entre ellos de la piel, bazo, timo, páncreas e hígado y una inflamación sistémica. Finalmente se produce el desarrollo de diversos tipos de cáncer, principalmente gástricos y pulmonares, y en menor frecuencia, hepatocarcinomas, tricufolículos y cáncer de mama. Por tanto nuestros datos ponen de manifiesto una relación directa entre el envejecimiento y el desarrollo de cáncer y que la supresión del envejecimiento podría ser un mecanismo importante por el que CYLD actúa como supresor tumoral.

Los ratones K5-CYLD^{C/S} representan un buen modelo de envejecimiento prematuro en los que llevar a cabo estudios sobre los mecanismos implicados en el desarrollo de los síntomas de los síndromes de progeria así como del envejecimiento fisiológico y el desarrollo de distintos tipos de cáncer. Además, han revelado una nueva posible diana para el desarrollo de estrategias dirigidas a mejorar los efectos de enfermedades asociadas al envejecimiento, lo que resulta esenciales en nuestros días donde la longevidad del ser humano es mayor y las enfermedades asociadas al envejecimiento son frecuentes y a menudo crónicas.

Hemos generado unos ratones transgénicos que sobreexpresan CYLD^{wt}, los ratones wt que nos proponemos cruzar con ratones con síndrome de progeria para comprobar si la sobreexpresión de CYLD sería capaz de revertir este fenotipo, al actuar como protector del envejecimiento. También nos proponemos el análisis de biopsias de piel no tumoral, o de piel adyacente a la de tumores de pacientes de cilindromatosis, para comprobar si existen signos de envejecimiento acelerado. Aunque la cilindromatosis familiar es una enfermedad rara, analizaremos bases de datos para comprobar si hay información sobre pacientes que hayan desarrollado

alguna otra complicación como algún tipo de inflamación (gastritis, hepatitis...), incremento del número de linfocitos a edades tempranas, etc que puedan ser indicio de envejecimiento acelerado.

Conclusiones

Conclusiones

- 1- CYLD desempeña una función esencial en la homeostasis epidérmica: regula la diferenciación de los queratinocitos, su polaridad y la muerte por apoptosis.
- 2- En los equivalentes de piel humana CYLD^{C/S} y en la piel de los ratones transgénicos, la ausencia de la actividad desubiquitinasa de CYLD activa la vía de señalización de JNK, lo que impide, al menos en gran parte, la diferenciación epidérmica. La activación de esta vía sería también responsable de la activación de señales antiapoptóticas (de supervivencia celular). La sobreexpresión de CYLD^{wt} induce la diferenciación de queratinocitos tumorales y no tumorales y promueve apoptosis.
- 3- CYLD desempeña una función importante en la fisiología de los apéndices de la piel: regula la progresión del ciclo de crecimiento del pelo y la homeostasis de las glándulas sebáceas.
- 4- CYLD actúa como supresor tumoral y de la progresión maligna de los carcinomas escamosos cutáneos: la sobreexpresión de CYLD promueve la regresión de cSCC humanos de elevada agresividad y la ausencia de la actividad desubiquitinasa de CYLD aumenta su malignidad tumoral.
- 5- Entre los principales mecanismos por los que la falta de función catalítica de CYLD promueve la progresión de los cSCC, se encuentra la activación en los queratinocitos de las vías de señalización de NF-κB y de JNK; la sobreexpresión nuclear de Bcl-3, β-catenina y p52; el incremento de la angiogénesis por inducción de la expresión de VEGF; la inhibición de apoptosis y el aumento de la proliferación celular. La sobreexpresión de CYLD^{wt} hace regresar los cSCC y revierte su malignidad, por inducción de diferenciación celular, de apoptosis y por su acción anti-angiogénica.
- 6- CYLD actúa como inhibidor de metástasis de los carcinomas escamosos cutáneos: la inactivación funcional de CYLD en las células de cSCC promueve la metástasis de los carcinomas derivados de ellas por inhibición de la expresión del supresor tumoral y de metástasis Maspin y la inducción de Snail.
- 7- Hemos encontrado una correlación entre el aumento de la malignidad de las células epidérmicas tumorales de ratón y humanos, y la disminución de la expresión de Maspin. Proponemos que los niveles bajos de expresión de CYLD y de Maspin en los

carcinomas escamosos cutáneos puede ser una herramienta predictiva de la progresión de los cSCC y para identificar los cSCC de más alto riesgo de metastatizar.

- 8- CYLD actúa como protector del envejecimiento. La falta de CYLD funcional por inactivación de su actividad desubiquitinasa en los ratones K5-CYLD^{C/S} promueve el envejecimiento prematuro de diversos órganos, entre los que cabe destacar la piel, bazo, timo, hígado y páncreas.
- 9- El mecanismo a través del cual la inactivación de CYLD promueve el envejecimiento es principalmente la activación crónica de la vía de NF-κB. También puede contribuir la sobreactivación de c-Myc, JNK y Akt, junto con la expresión aumentada de la citoquinas inflamatorias TNF-α e IL-6, y la inflamación crónica.
- 10- Los ratones K5-CYLD^{C/S} desarrollan tumores espontáneos de distinto origen, principalmente de pulmón, estómago, hígado y derivados del folículo piloso. La función protectora de envejecimiento de CYLD aparece como otro mecanismo por el que CYLD actúa como supresor tumoral de diversos tipos de cáncer.

Bibliografía

Bibliografía

1. Fuchs, E. The Bare Essentials Epidermal Differentiation : *J. Cell Biol.* **111**, 2807–2814 (1990).
2. Fuchs, E. & Green, H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* **19**, 1033–1042 (1980).
3. Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. & Krepler, R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**, 11–24 (1982).
4. Rice, R. H. & Green, H. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: Activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell* **18**, 681–694 (1979).
5. Dale, B. A. Filaggrin, the matrix protein of keratin. *Am. J. Dermatopathol.* **7**, 65–8 (1985).
6. Mehrel, T. *et al.* Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell* **61**, 1103–1112 (1990).
7. Weston, C. R. *et al.* The c-Jun NH₂-terminal kinase is essential for epidermal growth factor expression during epidermal morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14114–9 (2004).
8. Gazel, A., Banno, T., Walsh, R. & Blumenberg, M. Inhibition of JNK promotes differentiation of epidermal keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **281**, 20530–41 (2006).
9. Fuchs, E. & Raghavan, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 199–209 (2002).
10. Tsukita, S. & Furuse, M. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 531–6 (2002).
11. Perez-Moreno, M., Jamora, C. & Fuchs, E. Sticky Business: Orchestrating Cellular Signals at Adherens Junctions. *Cell* **112**, 535–548 (2003).
12. Getsios, S., Huen, A. C. & Green, K. J. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 271–281 (2004).
13. Yap, A. S., Brieher, W. M. & Gumbiner, B. M. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 119–146 (1997).
14. Jamora, C. & Fuchs, E. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* **4**, E101–E108 (2002).
15. Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J. & Kemler, R. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

- 91**, 8263–7 (1994).
16. Jensen, P. J., Telegan, B., Lavker, R. M. & Wheelock, M. J. E-cadherin and P-cadherin have partially redundant roles in human epidermal stratification. *Cell Tissue Res.* **288**, 307–16 (1997).
 17. Young, P. *et al.* E-cadherin controls adherens junctions in the epidermis and the renewal of hair follicles. *EMBO J.* **22**, 5723–33 (2003).
 18. Tunggal, J. A. *et al.* E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO J.* **24**, 1146–56 (2005).
 19. Tinkle, C. L., Lechler, T., Pasolli, H. A. & Fuchs, E. Conditional targeting of E-cadherin in skin: insights into hyperproliferative and degenerative responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 552–7 (2004).
 20. Birchmeier, W. & Behrens, J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta* **1198**, 11–26 (1994).
 21. Berx, G., Becker, K.-F., Höfler, H. & van Roy, F. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum. Mutat.* **12**, 226–237 (1998).
 22. Vleminckx, K., Vakaet, L., Mareel, M., Fiers, W. & Van Roy, F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* **66**, 107–119 (1991).
 23. Battle, E. *et al.* The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **2**, 84–9 (2000).
 24. Cano, A. *et al.* The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* **2**, 76–83 (2000).
 25. Christofori, G. & Semb, H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 73–76 (1999).
 26. Bolós, V. *et al.* The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J. Cell Sci.* **116**, (2002).
 27. Grootclaes, M. L. & Frisch, S. M. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene* **19**, 3823–3828 (2000).
 28. Comijn, J. *et al.* The Two-Handed E Box Binding Zinc Finger Protein SIP1 Downregulates E-Cadherin and Induces Invasion. *Mol. Cell* **7**, 1267–1278 (2001).
 29. Huelsken, J. & Behrens, J. The Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* **115**, (2002).
 30. Huelsken, J., Vogel, R., Erdmann, B., Cotsarelis, G. & Birchmeier, W. β -Catenin Controls Hair Follicle Morphogenesis and Stem Cell Differentiation in the Skin. *Cell* **105**, 533–545 (2001).

31. Fuchs, E. Scratching the surface of skin development. *Nature* **445**, 834–42 (2007).
32. Millar, S. E. Molecular Mechanisms Regulating Hair Follicle Development. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 216–225 (2002).
33. Yang, C.-C. & Cotsarelis, G. Review of hair follicle dermal cells. *J. Dermatol. Sci.* **57**, 2–11 (2010).
34. Sennett, R. & Rendl, M. Mesenchymal–epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 917–927 (2012).
35. Cotsarelis, G., Sun, T.-T. & Lavker, R. M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* **61**, 1329–1337 (1990).
36. Taylor, G., Lehrer, M. S., Jensen, P. J., Sun, T.-T. & Lavker, R. M. Involvement of Follicular Stem Cells in Forming Not Only the Follicle but Also the Epidermis. *Cell* **102**, 451–461 (2000).
37. Hardy, M. H. The secret life of the hair follicle. *Trends Genet.* **8**, 55–61 (1992).
38. Fuchs, E., Merrill, B. J., Jamora, C. & DasGupta, R. At the Roots of a Never-Ending Cycle. *Dev. Cell* **1**, 13–25 (2001).
39. Alonso, L. & Fuchs, E. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev.* **17**, 1189–200 (2003).
40. Hansen, L. A. & Tennant, R. W. Follicular origin of epidermal papillomas in v-Ha-ras transgenic TG.AC mouse skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7822–6 (1994).
41. Sundberg, J. P. *Handbook of mouse mutations with skin and hair abnormalities : animal models and biomedical tools*. (CRC Press, 1994).
42. Jin, Y. J. *et al.* Epidermal CYLD inactivation sensitizes mice to the development of sebaceous and basaloid skin tumors. *JCI Insight* **1**, (2016).
43. Miller, D. L. & Weinstock, M. A. Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. *J. Am. Acad. Dermatol.* **30**, 774–8 (1994).
44. de Grujil, F. R. Skin cancer and solar UV radiation. *Eur. J. Cancer* **35**, 2003–9 (1999).
45. Diffey, B. L. Analysis of the risk of skin cancer from sunlight and solarium in subjects living in northern Europe. *Photodermatol.* **4**, 118–26 (1987).
46. Diffey, B. L. Ozone depletion and skin cancer. *BMJ* **304**, 1176–7 (1992).
47. Christenson, L. J. *et al.* Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. *JAMA* **294**, 681–90 (2005).
48. Bäckvall, H. *et al.* Genetic tumor archeology: microdissection and genetic heterogeneity in squamous and basal cell carcinoma. *Mutat. Res.* **571**, 65–79

- (2005).
49. Neagu, M. *et al.* Chemically induced skin carcinogenesis: Updates in experimental models (Review). *Oncol. Rep.* **35**, 2516–28 (2016).
 50. Ruiz i Altaba, A., Sánchez, P. & Dahmane, N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 361–372 (2002).
 51. Daya-Grosjean, L. & Couvé-Privat, S. Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett.* **225**, 181–92 (2005).
 52. Tilli, C. M. L. J., Van Steensel, M. A. M., Krekels, G. A. M., Neumann, H. A. M. & Ramaekers, F. C. S. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* **152**, 1108–24 (2005).
 53. Tsai, K. Y. & Tsao, H. The genetics of skin cancer. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* **131C**, 82–92 (2004).
 54. Murga, M. *et al.* A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat. Genet.* **41**, 891–898 (2009).
 55. Voiculescu, V. *et al.* From Normal Skin to Squamous Cell Carcinoma: A Quest for Novel Biomarkers. *Dis. Markers* **2016**, 1–14 (2016).
 56. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436–44 (2008).
 57. Maru, G. B., Gandhi, K., Ramchandani, A. & Kumar, G. The role of inflammation in skin cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **816**, 437–69 (2014).
 58. Sur, I., Ulvmar, M. & Toftgård, R. The two-faced NF-kappaB in the skin. *Int. Rev. Immunol.* **27**, 205–23 (2008).
 59. Hoesel, B. & Schmid, J. A. The complexity of NF-kB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* **12**, 86 (2013).
 60. Dong, G. *et al.* Molecular profiling of transformed and metastatic murine squamous carcinoma cells by differential display and cDNA microarray reveals altered expression of multiple genes related to growth, apoptosis, angiogenesis, and the NF-kappaB signal pathway. *Cancer Res.* **61**, 4797–808 (2001).
 61. Seitz, C. S., Lin, Q., Deng, H. & Khavari, P. A. Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2307–12 (1998).
 62. Hogerlinden, M. van, Rozell, B. L., Ährlund-Richter, L. & Toftgård, R. Squamous Cell Carcinomas and Increased Apoptosis in Skin with Inhibited Rel/Nuclear Factor-kB Signaling. *Cancer Res.* **59**, (1999).
 63. Kim, C. & Pasparakis, M. Epidermal p65/NF-kB signalling is essential for skin carcinogenesis. *EMBO Mol. Med.* **6**, 970–83 (2014).
 64. Moreno-Maldonado, R. *et al.* IKK α ; enhances human keratinocyte

- differentiation and determines the histological variant of epidermal squamous cell carcinomas. *Cell Cycle* **7**, 2021–2029 (2008).
65. Alameda, J. P. *et al.* Increased IKK α expression in the basal layer of the epidermis of transgenic mice enhances the malignant potential of skin tumors. *PLoS One* **6**, e21984 (2011).
 66. Casanova, M. L. *et al.* A critical role for ras-mediated, epidermal growth factor receptor-dependent angiogenesis in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* **62**, 3402–7 (2002).
 67. de Gruijl, F. R., van Kranen, H. J. & Mullenders, L. H. . UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **63**, 19–27 (2001).
 68. Hess, J., Angel, P. & Schorpp-Kistner, M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell Sci.* **117**, 5965–73 (2004).
 69. Cooper, S. J. *et al.* Expression of dominant negative c-jun inhibits ultraviolet B-induced squamous cell carcinoma number and size in an SKH-1 hairless mouse model. *Mol. Cancer Res.* **1**, 848–54 (2003).
 70. Ke, H. *et al.* The c-Jun NH₂-terminal kinase 2 plays a dominant role in human epidermal neoplasia. *Cancer Res.* **70**, 3080–8 (2010).
 71. Pannem, R. R. *et al.* CYLD controls c-MYC expression through the JNK-dependent signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **35**, 461–468 (2014).
 72. Rounbehler, R. J., Schneider-Broussard, R., Conti, C. J. & Johnson, D. G. Myc lacks E2F1's ability to suppress skin carcinogenesis. *Oncogene* **20**, 5341–9 (2001).
 73. Kim, R. H. & Armstrong, A. W. Nonmelanoma skin cancer. *Dermatol. Clin.* **30**, 125–39, ix (2012).
 74. Segrelles, C. *et al.* Akt Signaling Leads to Stem Cell Activation and Promotes Tumor Development in Epidermis. *Stem Cells* **32**, 1917–1928 (2014).
 75. Segrelles, C. *et al.* Deregulated Activity of Akt in Epithelial Basal Cells Induces Spontaneous Tumors and Heightened Sensitivity to Skin Carcinogenesis. *Cancer Res.* **67**, 10879–10888 (2007).
 76. Alam, M. & Ratner, D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **344**, 975–83 (2001).
 77. Dinehart, S. M. & Pollack, S. V. Metastases from squamous cell carcinoma of the skin and lip. An analysis of twenty-seven cases. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**, 241–8 (1989).
 78. Weinberg, A. S., Ogle, C. A. & Shim, E. K. Metastatic cutaneous squamous cell

- carcinoma: An update. *Dermatologic Surg.* **33**, 885–899 (2007).
79. Veness, M. J. Treatment recommendations in patients diagnosed with high-risk cutaneous squamous cell carcinoma. *Australas. Radiol.* **49**, 365–76 (2005).
80. Maubec, E., Duvillard, P., Velasco, V., Crickx, B. & Avril, M.-F. Immunohistochemical analysis of EGFR and HER-2 in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the skin. *Anticancer Res.* **25**, 1205–10
81. Toll, A. *et al.* Active nuclear IKK correlates with metastatic risk in cutaneous squamous cell carcinoma. *Arch. Dermatol. Res.* **307**, 721–9 (2015).
82. Shih, V. F.-S., Tsui, R., Caldwell, A. & Hoffmann, A. A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res.* **21**, 86–102 (2011).
83. Massoumi, R., Chmielarska, K., Hennecke, K., Pfeifer, A. & Fässler, R. Cxcl12 inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF- κ B signaling. *Cell* **125**, 665–77 (2006).
84. Ghosh, S. & Karin, M. Missing Pieces in the NF- κ B Puzzle. *Cell* **109**, S81–S96 (2002).
85. Park, M. H. & Hong, J. T. Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells* **5**, (2016).
86. Bonizzi, G. & Karin, M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**, 280–288 (2004).
87. Mitchell, S., Vargas, J. & Hoffmann, A. Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **8**, 227–41 (2016).
88. Aggarwal, B. B. Nuclear factor- κ B: The enemy within. *Cancer Cell* **6**, 203–208 (2004).
89. Bassères, D. S. & Baldwin, A. S. Nuclear factor- κ B and inhibitor of κ B kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* **25**, 6817–6830 (2006).
90. Madrid, L. V, Mayo, M. W., Reuther, J. Y. & Baldwin, A. S. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF- κ B through utilization of the I κ B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J. Biol. Chem.* **276**, 18934–40 (2001).
91. Li, Q., Withoff, S. & Verma, I. M. Inflammation-associated cancer: NF- κ B is the lynchpin. *Trends Immunol.* **26**, 318–325 (2005).
92. Greten, F. R. *et al.* IKK β Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell* **118**, 285–296 (2004).
93. Luo, J.-L., Maeda, S., Hsu, L.-C., Yagita, H. & Karin, M. Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF α to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* **6**, 297–305 (2004).

94. Pikarsky, E. *et al.* NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* **431**, 461–466 (2004).
95. Ramesh, V. *et al.* NF κ B activation demarcates a subset of hepatocellular carcinoma patients for targeted therapy. *Cell. Oncol. (Dordr)*. **39**, 523–536 (2016).
96. Akca, H., Demiray, A., Tokgun, O. & Yokota, J. Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through the PI3K/AKT/NF κ B pathway in lung cancer cells. *Lung Cancer* **73**, 302–309 (2011).
97. Chen, Y. *et al.* The NFKB1 polymorphism (rs4648068) is associated with the cell proliferation and motility in gastric cancer. *BMC Gastroenterol*. **15**, 21 (2015).
98. Perkins, N. D. NF- κ B: Tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol*. **14**, 64–69 (2004).
99. Seitz, C. S., Deng, H., Hinata, K., Lin, Q. & Khavari, P. A. Nuclear factor kappaB subunits induce epithelial cell growth arrest. *Cancer Res*. **60**, 4085–92 (2000).
100. Budunova, I. V. *et al.* Increased expression of p50-NF- κ B and constitutive activation of NF- κ B transcription factors during mouse skin carcinogenesis. 1–9 (1999).
101. Massoumi, R. & Paus, R. Cylindromatosis and the CYLD gene: new lessons on the molecular principles of epithelial growth control. *Bioessays* **29**, 1203–14 (2007).
102. Bignell, G. R. *et al.* Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat. Genet*. **25**, 160–165 (2000).
103. Saito, K. *et al.* The CAP-Gly domain of CYLD associates with the proline-rich sequence in NEMO/IKK γ . *Structure* **12**, 1719–28 (2004).
104. Komander, D. *et al.* The Structure of the CYLD USP Domain Explains Its Specificity for Lys63-Linked Polyubiquitin and Reveals a B Box Module. *Mol. Cell* **29**, 451–464 (2008).
105. Massoumi, R. Ubiquitin chain cleavage: CYLD at work. *Trends Biochem. Sci*. **35**, 392–399 (2010).
106. Reiley, W., Zhang, M., Wu, X., Granger, E. & Sun, S.-C. Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by I κ B kinase γ -dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Biol*. **25**, 3886–95 (2005).
107. Hoeller, D., Hecker, C.-M. & Dikic, I. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 776–88 (2006).
108. Blake, P. W. & Toro, J. R. Update of cylindromatosis gene (CYLD) mutations in Brooke-Spiegler syndrome: Novel insights into the role of deubiquitination in cell signaling. *Hum. Mutat*. **30**, 1025–1036 (2009).

109. Fernández-Majada, V. *et al.* The tumour suppressor CYLD regulates the p53 DNA damage response. *Nat. Commun.* **7**, 12508 (2016).
110. Sato, Y. *et al.* Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 222–9 (2015).
111. Wei, R. *et al.* Deubiquitinases in cancer. *Oncotarget* **6**, 12872–89 (2015).
112. Nagy, N., Farkas, K., Kemény, L. & Széll, M. Phenotype–genotype correlations for clinical variants caused by CYLD mutations. *Eur. J. Med. Genet.* **58**, 271–278 (2015).
113. Poblete Gutiérrez, P. *et al.* Phenotype diversity in familial cylindromatosis: a frameshift mutation in the tumor suppressor gene CYLD underlies different tumors of skin appendages. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 527–31 (2002).
114. Biggs, P. J. *et al.* Familial cylindromatosis (turban tumour syndrome) gene localised to chromosome 16q12-q13: evidence for its role as a tumour suppressor gene. *Nat. Genet.* **11**, 441–3 (1995).
115. Gerretsen, A. L., Beemer, F. A., Deenstra, W., Hennekam, F. A. & van Vloten, W. A. Familial cutaneous cylindromas: investigations in five generations of a family. *J. Am. Acad. Dermatol.* **33**, 199–206 (1995).
116. Trompouki, E. *et al.* CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* **424**, 793–6 (2003).
117. Brummelkamp, T. R., Nijman, S. M. B., Dirac, A. M. G. & Bernards, R. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* **424**, 797–801 (2003).
118. Kovalenko, A. *et al.* The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* **424**, 801–5 (2003).
119. Regamey, A. *et al.* The tumor suppressor CYLD interacts with TRIP and regulates negatively nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **198**, 1959–1964 (2003).
120. Reiley, W., Zhang, M. & Sun, S.-C. Negative regulation of JNK signaling by the tumor suppressor CYLD. *J. Biol. Chem.* **279**, 55161–7 (2004).
121. Tauriello, D. V. F. *et al.* Loss of the Tumor Suppressor CYLD Enhances Wnt/ β -Catenin Signaling through K63-Linked Ubiquitination of Dvl. *Mol. Cell* **37**, 607–619 (2010).
122. Zhao, Y. *et al.* The deubiquitinase CYLD targets Smad7 protein to regulate transforming growth factor β (TGF- β) signaling and the development of regulatory T cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 40520–40530 (2011).
123. Lim, J. H. *et al.* CYLD negatively regulates transforming growth factor- β signalling via deubiquitinating Akt. *Nat. Commun.* **3**, 771 (2012).

124. Chen, Y. *et al.* CYLD negatively regulates Hippo signaling by limiting Hpo phosphorylation in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452**, 808–12 (2014).
125. Rajan, N. *et al.* The cylindromatosis gene product, CYLD, interacts with MIB2 to regulate notch signalling. *Oncotarget* **5**, 12126–40 (2014).
126. Massoumi, R. *et al.* Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma. *J. Exp. Med.* **206**, 221–32 (2009).
127. Espinosa, L. *et al.* The Notch/Hes1 pathway sustains NF- κ B activation through CYLD repression in T cell leukemia. *Cancer Cell* **18**, 268–81 (2010).
128. Mathis, B. J., Lai, Y., Qu, C., Janicki, J. S. & Cui, T. CYLD-mediated signaling and diseases. *Curr. Drug Targets* **16**, 284–94 (2015).
129. Wang, L. *et al.* The BRG1- and hBRM-associated factor BAF57 induces apoptosis by stimulating expression of the cylindromatosis tumor suppressor gene. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7953–65 (2005).
130. Hutti, J. E. *et al.* Phosphorylation of the tumor suppressor CYLD by the breast cancer oncogene IKKepsilon promotes cell transformation. *Mol. Cell* **34**, 461–72 (2009).
131. Liang, G., Ahlqvist, K., Pannem, R., Posern, G. & Massoumi, R. Serum response factor controls CYLD expression via MAPK signaling pathway. *PLoS One* **6**, e19613 (2011).
132. O'Donnell, M. A. *et al.* Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1437–42 (2011).
133. Iliopoulos, D., Jaeger, S. A., Hirsch, H. A., Bulyk, M. L. & Struhl, K. STAT3 Activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD Are Part of the Epigenetic Switch Linking Inflammation to Cancer. *Mol. Cell* **39**, 493–506 (2010).
134. An, J. *et al.* Inactivation of the CYLD Deubiquitinase by HPV E6 Mediates Hypoxia-Induced NF- κ B Activation. *Cancer Cell* **14**, 394–407 (2008).
135. Miliani de Marval, P. *et al.* CYLD inhibits tumorigenesis and metastasis by blocking JNK/AP1 signaling at multiple levels. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **4**, 851–9 (2011).
136. Wickström, S. A., Masoumi, K. C., Khochbin, S., Fässler, R. & Massoumi, R. CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin. *EMBO J.* **29**, 131–144 (2010).
137. Gao, J. *et al.* The tumor suppressor CYLD regulates microtubule dynamics and plays a role in cell migration. *J. Biol. Chem.* **283**, 8802–8809 (2008).
138. Stegmeier, F. *et al.* The tumor suppressor CYLD regulates entry into mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 8869–74 (2007).

139. Hövelmeyer, N. *et al.* Regulation of B cell homeostasis and activation by the tumor suppressor gene CYLD. *J. Exp. Med.* **204**, 2615–27 (2007).
140. Reiley, W. W. *et al.* Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses. *J. Exp. Med.* **204**, 1475–85 (2007).
141. Thuille, N. *et al.* PKC θ / β and CYLD are antagonistic partners in the NF κ B and NFAT transactivation pathways in primary mouse CD3⁺ T lymphocytes. *PLoS One* **8**, e53709 (2013).
142. Friedman, C. S. *et al.* The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response. *EMBO Rep.* **9**, 930–936 (2008).
143. Zhang, M. *et al.* Regulation of IkappaB kinase-related kinases and antiviral responses by tumor suppressor CYLD. *J. Biol. Chem.* **283**, 18621–6 (2008).
144. Wright, A. *et al.* Regulation of early wave of germ cell apoptosis and spermatogenesis by deubiquitinating enzyme CYLD. *Dev. Cell* **13**, 705–16 (2007).
145. Yang, Y. *et al.* CYLD mediates ciliogenesis in multiple organs by deubiquitinating Cep70 and inactivating HDAC6. *Cell Res.* **24**, 1342–53 (2014).
146. Massoumi, R. CYLD: a deubiquitination enzyme with multiple roles in cancer. *Future Oncol.* **7**, 285–97 (2011).
147. Masoumi, K. C., Shaw-Hallgren, G. & Massoumi, R. Tumor Suppressor Function of CYLD in Nonmelanoma Skin Cancer. *J. Skin Cancer* **2011**, 614097 (2011).
148. Hellerbrand, C. & Massoumi, R. Cylindromatosis-A Protective Molecule against Liver Diseases. *Med. Res. Rev.* **36**, 342–59 (2016).
149. Hellerbrand, C. *et al.* Reduced expression of CYLD in human colon and hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* **28**, 21–27 (2007).
150. Zhong, S., Fields, C. R., Su, N., Pan, Y.-X. & Robertson, K. D. Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA methylation and histone deacetylation in lung cancer. *Oncogene* **26**, 2621–34 (2007).
151. Lin, X., Chen, Q., Huang, C. & Xu, X. CYLD Promotes TNF- α -Induced Cell Necrosis Mediated by RIP-1 in Human Lung Cancer Cells. *Mediators Inflamm.* **2016**, 1–11 (2016).
152. Kikuno, N. *et al.* Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells. *Int. J. cancer* **123**, 552–60 (2008).
153. Roberta Verhoeft, K., Lam Ngan, H. & Wai Yan Lui, V. The cylindromatosis (CYLD) gene and head and neck tumorigenesis. doi:10.1186/s41199-016-0012-

y

154. Kuphal, S. *et al.* GLI1-dependent transcriptional repression of CYLD in basal cell carcinoma. *Oncogene* **30**, 4523–30 (2011).
155. Wang, C. *et al.* DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* **8**, 311–23 (2009).
156. Hamilton, M. L. *et al.* Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10469–74 (2001).
157. ALEXEYEV, M. F., LeDOUX, S. P. & WILSON, G. L. Mitochondrial DNA and aging. *Clin. Sci.* **107**, (2004).
158. Satoh, A., Stein, L. & Imai, S. The role of mammalian sirtuins in the regulation of metabolism, aging, and longevity. *Handb. Exp. Pharmacol.* **206**, 125–62 (2011).
159. Masoro, E. J. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 913–922 (2005).
160. Cantó, C. & Auwerx, J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends Endocrinol. Metab.* **20**, 325–31 (2009).
161. Della-Morte, D. *et al.* Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. *Neuroscience* **159**, 993–1002 (2009).
162. Hwangbo, D. S., Gershman, B., Tu, M.-P., Palmer, M. & Tatar, M. Drosophila dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* **429**, 562–566 (2004).
163. Holzenberger, M. *et al.* IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* **421**, 182–187 (2003).
164. Ortega-Molina, A. & Serrano, M. PTEN in cancer, metabolism, and aging. *Trends Endocrinol. Metab.* **24**, 184–9 (2013).
165. Collado, M., Blasco, M. A. & Serrano, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* **130**, 223–233 (2007).
166. Tyner, S. D. *et al.* p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* **415**, 45–53 (2002).
167. Garcia-Cao, I. [ldquo]Super p53[rdquo] mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *Embo J.* **21**, 6225–6235 (2002).
168. Carrasco-Garcia, E., Moreno, M., Moreno-Cugnon, L. & Matheu, A. Increased Arf/p53 activity in stem cells, aging and cancer. *Aging Cell* (2017). doi:10.1111/accel.12574
169. Chalhoub, N. & Baker, S. J. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 127–50 (2009).
170. Ortega-Molina, A. *et al.* Pten Positively Regulates Brown Adipose Function,

- Energy Expenditure, and Longevity. *Cell Metab.* **15**, 382–394 (2012).
171. Kriete, A. *et al.* Cell autonomous expression of inflammatory genes in biologically aged fibroblasts associated with elevated NF-kappaB activity. *Immun. Ageing* **5**, 5 (2008).
 172. Adler, A. S. *et al.* Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kB activity. *Genes Dev.* **21**, 3244–3257 (2007).
 173. Helenius, M., Hänninen, M., Lehtinen, S. K. & Salminen, A. Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Biochem. J.* 603–8 (1996).
 174. Brégégère, F., Milner, Y. & Friguet, B. The ubiquitin-proteasome system at the crossroads of stress-response and ageing pathways: a handle for skin care? *Ageing Res. Rev.* **5**, 60–90 (2006).
 175. Giardina, C. & Hubbard, A. K. Growing old with nuclear factor-kappaB. *Cell Stress Chaperones* **7**, 207–12 (2002).
 176. Tilstra, J. S., Clauson, C. L., Niedernhofer, L. J. & Robbins, P. D. NF-kB in Aging and Disease. *Aging Dis.* **2**, 449–65 (2011).
 177. Cai, D. *et al.* IKK β /NF-kB Activation Causes Severe Muscle Wasting in Mice. *Cell* **119**, 285–298 (2004).
 178. Liu, Y., Drozdov, I., Shroff, R., Beltran, L. E. & Shanahan, C. M. Prelamin A Accelerates Vascular Calcification Via Activation of the DNA Damage Response and Senescence-Associated Secretory Phenotype in Vascular Smooth Muscle Cells Novelty and Significance. *Circ. Res.* **112**, (2013).
 179. Chen, Q. *et al.* DNA damage drives accelerated bone aging via an NF-kB-dependent mechanism. *J. Bone Miner. Res.* **28**, 1214–28 (2013).
 180. Valen, G. Signal transduction through nuclear factor kappa B in ischemia-reperfusion and heart failure. *Basic Res. Cardiol.* **99**, 1–7 (2004).
 181. O’Brown, Z. K., Van Nostrand, E. L., Higgins, J. P. & Kim, S. K. The Inflammatory Transcription Factors NFkB, STAT1 and STAT3 Drive Age-Associated Transcriptional Changes in the Human Kidney. *PLoS Genet.* **11**, e1005734 (2015).
 182. Tilstra, J. *et al.* Protein transduction: identification, characterization and optimization. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 811–815 (2007).
 183. Berenbaum, F. Signaling transduction: target in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **16**, 616–22 (2004).
 184. Steinman, L. Nuanced roles of cytokines in three major human brain disorders. *J. Clin. Invest.* **118**, 3557–63 (2008).
 185. Wyss-Coray, T. *et al.* Inflammation in Alzheimer disease: driving force,

- bystander or beneficial response? *Nat. Med.* **12**, 1005–15 (2006).
186. Ghosh, A. *et al.* Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 18754–9 (2007).
 187. Kawahara, T. L. A. *et al.* SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell* **136**, 62–74 (2009).
 188. Tilstra, J. S. *et al.* NF-κB inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 2601–12 (2012).
 189. Osorio, F. G. *et al.* Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF-κB activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes Dev.* **26**, 2311–24 (2012).
 190. Leung, T. H. *et al.* Topical hypochlorite ameliorates NF- κ B – mediated skin diseases in mice. **123**, 5361–5370 (2013).
 191. Bernal, G. M. *et al.* Loss of Nfkb1 leads to early onset aging. *Aging (Albany. NY)*. **6**, 931–43 (2014).
 192. Jurk, D. *et al.* Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat. Commun.* **2**, 4172 (2014).
 193. Chung, H. Y. *et al.* Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* **8**, 18–30 (2009).
 194. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 99–118 (2010).
 195. Balistreri, C. R., Candore, G., Accardi, G., Colonna-Romano, G. & Lio, D. NF-κB pathway activators as potential ageing biomarkers: targets for new therapeutic strategies. *Immun. Ageing* **10**, 24 (2013).
 196. Villeda, S. A. *et al.* The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* **477**, 90–4 (2011).
 197. Smith, L. K. *et al.* β2-microglobulin is a systemic pro-aging factor that impairs cognitive function and neurogenesis. *Nat. Med.* **21**, 932–7 (2015).
 198. Choudhury, A. R. *et al.* Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat. Genet.* **39**, 99–105 (2007).
 199. Arai, Y. *et al.* Inflammation, But Not Telomere Length, Predicts Successful Ageing at Extreme Old Age: A Longitudinal Study of Semi-supercentenarians. *EBioMedicine* **2**, 1549–58 (2015).
 200. Martin-Ruiz, C. M., Gussekloo, J., van Heemst, D., von Zglinicki, T. &

- Westendorp, R. G. J. Telomere length in white blood cells is not associated with morbidity or mortality in the oldest old: a population-based study. *Aging Cell* **4**, 287–90 (2005).
201. Ramírez, A., Bravo, A., Jorcano, J. L. & Vidal, M. Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development. *Differentiation*. **58**, 53–64 (1994).
202. Alameda, J. P. *et al.* CYLD regulates keratinocyte differentiation and skin cancer progression in humans. *Cell Death Dis.* **2**, e208 (2011).
203. Xue, L. *et al.* Tumor Suppressor CYLD Regulates JNK-Induced Cell Death in Drosophila. *Dev. Cell* **13**, 446–454 (2007).
204. Hanafusa, T. *et al.* B-1 B cell progenitors transiently and partially express keratin 5 during differentiation in bone marrow. *J. Dermatol. Sci.* **81**, 173–181 (2016).
205. Singh, N., Khanna, N., Sharma, H., Kundu, S. & Azmi, S. Insights into the molecular mechanism of apoptosis induced by TNF-alpha in mouse epidermal JB6-derived RT-101 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 24–30 (2002).
206. Norris, D. A. Differential control of cell death in the skin. *Arch. Dermatol.* **131**, 945–8 (1995).
207. Kajino, Y. *et al.* beta-Catenin gene mutation in human hair follicle-related tumors. *Pathol. Int.* **51**, 543–8 (2001).
208. Arnold, I. & Watt, F. M. c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Curr. Biol.* **11**, 558–568 (2001).
209. Page, A. *et al.* IKKbeta leads to an inflammatory skin disease resembling interface dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 1598–610 (2010).
210. Tesio, M. *et al.* Hematopoietic stem cell quiescence and function are controlled by the CYLD-TRAF2-p38MAPK pathway. *J. Exp. Med.* **212**, 525–38 (2015).
211. Malzone, M. G. *et al.* Brooke-Spiegler syndrome presenting multiple concurrent cutaneous and parotid gland neoplasms: Cytologic findings on fine-needle sample and description of a novel mutation of the CYLD gene. *Diagn. Cytopathol.* **43**, 654–658 (2015).
212. Cataisson, C. *et al.* IL-1R-MyD88 signaling in keratinocyte transformation and carcinogenesis. *J. Exp. Med.* **209**, 1689–702 (2012).
213. Cogswell, P. C., Guttridge, D. C., Funkhouser, W. K. & Baldwin, A. S. Selective activation of NF-κB subunits in human breast cancer: potential roles for NF-κB2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene* **19**, 1123–1131 (2000).
214. Thornburg, N. J., Pathmanathan, R. & Raab-Traub, N. Activation of Nuclear Factor-κB p50 Homodimer/Bcl-3 Complexes in Nasopharyngeal Carcinoma.

- Cancer Res.* **63**, (2003).
215. Zhao, H. *et al.* BCL3 exerts an oncogenic function by regulating STAT3 in human cervical cancer. *Onco. Targets. Ther.* **9**, 6619–6629 (2016).
216. Tu, K. *et al.* BCL-3 promotes the tumor growth of hepatocellular carcinoma by regulating cell proliferation and the cell cycle through cyclin $\frac{1}{2}$ D1. *Oncol. Rep.* (2016). doi:10.3892/or.2016.4616
217. Puvvada, S. D. *et al.* NF-kB and Bcl-3 activation are prognostic in metastatic colorectal cancer. *Oncology* **78**, 181–8 (2010).
218. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* **87**, 159–170 (1996).
219. Derksen, P. W. B. *et al.* Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6122–7 (2004).
220. Qiang, Y.-W. *et al.* Wnts induce migration and invasion of myeloma plasma cells. *Blood* **106**, 1786–93 (2005).
221. Sukhdeo, K. *et al.* Targeting the beta-catenin/TCF transcriptional complex in the treatment of multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7516–21 (2007).
222. Annunziata, C. M. *et al.* Frequent Engagement of the Classical and Alternative NF-kB Pathways by Diverse Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma. *Cancer Cell* **12**, 115–130 (2007).
223. Peinado, H., Portillo, F. & Cano, A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 365–375 (2004).
224. Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I. & Nelson, W. J. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**, 889–901 (2005).
225. Conacci-Sorrell, M. *et al.* Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J. Cell Biol.* **163**, 847–57 (2003).
226. Detmar, M. The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. *J. Dermatol. Sci.* **24 Suppl 1**, S78-84 (2000).
227. Detmar, M. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor induces an invasive phenotype in human squamous cell carcinomas. *Am. J. Pathol.* **156**, 159–67 (2000).
228. Ferrara, N. & Bunting, S. Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **5**, 35–44 (1996).
229. Larcher, F., Murillas, R., Bolontrade, M., Conti, C. J. & Jorcano, J. L. VEGF/VPF overexpression in skin of transgenic mice induces angiogenesis, vascular hyperpermeability and accelerated tumor development. *Oncogene* **17**, 303–311

- (1998).
230. Mirones, I., Conti, C. J., Martínez, J., Garcia, M. & Larcher, F. Complexity of VEGF Responses in Skin Carcinogenesis Revealed through Ex Vivo Assays Based on a VEGF-A Null Mouse Keratinocyte Cell Line. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 730–741 (2009).
 231. Keck, P. *et al.* Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science (80-.)*. **246**, (1989).
 232. Bolontrade, M. F. *et al.* Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors. *Carcinogenesis* **19**, 2107–13 (1998).
 233. Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* **7**, 415–428 (2007).
 234. Zhang, K. *et al.* Activation of NF- κ B upregulates Snail and consequent repression of E-cadherin in cholangiocarcinoma cell invasion. *Hepatogastroenterology*. **58**, 1–7
 235. Matheu, A. *et al.* Anti-aging activity of the *Ink4/Arf* locus. *Aging Cell* **8**, 152–161 (2009).
 236. Trueb, R. M. Aging of hair. *J. Cosmet. Dermatol.* **4**, 60–72 (2005).
 237. Kamenisch, Y. & Berneburg, M. Progeroid Syndromes and UV-Induced Oxidative DNA Damage. *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* **14**, 8–14 (2009).
 238. Sun, L.-Q. *et al.* Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the SNF2-like gene, PASG. *Genes Dev.* **18**, 1035–46 (2004).
 239. Kondratov, R. V, Kondratova, A. A., Gorbacheva, V. Y., Vykhoanets, O. V & Antoch, M. P. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev.* **20**, 1868–73 (2006).
 240. Zouboulis, C. C. & Boschnakow, A. Chronological ageing and photoageing of the human sebaceous gland.
 241. Sada-Ovalle, I., Gorocica Rosete, P., Lascurain Ledesma, R. & Zenteno Galindo, E. Aspectos inmunológicos del envejecimiento. *Rev. del Inst. Nac. Enfermedades Respir.* **17**, 293–300 (2004).
 242. Osorio, F. G., Soria-Valles, C., Santiago-Fernández, O., Freije, J. M. P. & López-Otín, C. *NF- κ B signaling as a driver of ageing. International Review of Cell and Molecular Biology* **326**, (Elsevier Inc., 2016).
 243. Freund, A., Orjalo, A. V, Desprez, P.-Y. & Campisi, J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol. Med.* **16**, 238–46 (2010).

244. Krishnamurthy, J. *et al.* p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* **443**, 453–457 (2006).
245. Bektas, A. *et al.* Age-associated changes in basal NF- κ B function in human CD4⁺ T lymphocytes via dysregulation of PI3 kinase. *Aging (Albany, NY)*. **6**, 957–74 (2014).
246. Aw, D. & Palmer, D. B. The origin and implication of thymic involution. *Aging Dis.* **2**, 437–43 (2011).
247. Hu, L. *et al.* Polysaccharide Extracted from *Laminaria japonica* Delays Intrinsic Skin Aging in Mice. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2016**, 5137386 (2016).
248. Chappell, W. H. *et al.* Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* **2**, 135–64 (2011).
249. Hofmann, J. W. *et al.* Reduced expression of MYC increases longevity and enhances healthspan. *Cell* **160**, 477–488 (2015).
250. Vafa, O. *et al.* c-Myc Can Induce DNA Damage, Increase Reactive Oxygen Species, and Mitigate p53 Function: A Mechanism for Oncogene-Induced Genetic Instability. *Mol. Cell* **9**, 1031–1044 (2002).
251. Schumacher, B., Hoeijmakers, J. H. & Garinis, G. A. Sealing the gap between nuclear DNA damage and longevity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **299**, 112–117 (2009).
252. Eilers, M. & Eisenman, R. N. Myc's broad reach. *Genes Dev.* **22**, 2755–66 (2008).
253. Whitfield, J. R. & Soucek, L. Tumor microenvironment: becoming sick of Myc. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 931–4 (2012).
254. Zhang, G. *et al.* Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. *Nature* **497**, 211–6 (2013).
255. La Rosa, F. A., Pierce, J. W. & Sonenshein, G. E. Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF-kappa B rel family of transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1039–44 (1994).
256. Toll, A. *et al.* MYC gene numerical aberrations in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* **161**, 1112–1118 (2009).
257. Akervall, J. *et al.* The Gene Ratios c-MYC:Cyclin-dependent Kinase (CDK)N2A and CCND1:CDKN2A Correlate with Poor Prognosis in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin. Cancer Res.* **9**, (2003).
258. Little, C. D., Nau, M. M., Carney, D. N., Gazdar, A. F. & Minna, J. D. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* **306**, 194–6

259. Mariani-Costantini, R. *et al.* In Situ c-myc Expression and Genomic Status of the c-myc Locus in Infiltrating Ductal Carcinomas of the Breast. *Cancer Res.* **48**, (1988).
260. Sato, H. *et al.* Gene expression in skin tumors induced in hairless mice by chronic exposure to ultraviolet B irradiation. *Photochem. Photobiol.* **65**, 908–14 (1997).
261. Alameda, J. P. *et al.* Deciphering the role of nuclear and cytoplasmic IKK α in skin cancer. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.8792
262. Lovaglio, J. *et al.* Case study: polycystic livers in a transgenic mouse line. *Comp. Med.* **64**, 115–20 (2014).
263. Neess, D. *et al.* Delayed Hepatic Adaptation to Weaning in ACBP $^{-/-}$ Mice Is Caused by Disruption of the Epidermal Barrier. *Cell Rep.* **5**, 1403–1412 (2013).
264. Munn, L. L. Cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **9**, e1370 (2017).