

Abstract

The cylindromatosis *CYLD* gene was first identified in human affected with familial cylindromatosis, a rare autosomal dominant inherited disease characterized by the occurrence of multiple benign tumors, in hairy areas of the body. The *CYLD* gene consists of 20 exons and encodes an evolutionarily conserved protein of 956 aa with a predicted molecular weight of 107308 Da. Sequence analysis of the predicted protein reveals three CAP-Gly motifs as those found in microtubule-binding proteins and an ubiquitin carboxy-terminal hydrolysis domain responsible for removal of the ubiquitin chains from different substrates. Several *in vitro* and *in vivo* studies have established that the CYLD protein is indeed a deubiquitinating enzyme that removes lysine 63-linked polyubiquitin chains from proteins participating in the NF- κ B pathway. This activity is thought to underlie the tumor suppressing function of CYLD. However, transgenic mice with mutation or targeted deletion of the *CYLD* gene do not develop cylindromas as observed in human familial and sporadic cylindromatosis.

To uncover new functions for CYLD we used several approaches. By protein and imaging studies of cells and tissues from control individuals and patients suffering from cylindromatosis, we were able to show that CYLD is mainly expressed in the dermis, and mutations in *CYLD* gene lead to loss of CYLD protein in cylindroma. In accordance with previous studies, using small interfering RNA approach, we showed that lack of CYLD affects fibroblasts proliferation. Furthermore, CYLD knockdown cells showed alterations in actin cytoskeleton and focal adhesion organization as well as migration. Finally, we have found that CYLD deficiency has an impact on the expression of growth factors and cytokines. In particular, FGF-7 expression was up regulated in CYLD-deficient fibroblasts. This was of particular interest, because FGF-7 has been identified as a mediator of epithelial cells proliferation. Indeed, in a co-culture model in which HaCaT epithelial cells were cultivated with either control or CYLD-deficient fibroblasts, we found that CYLD deficiency in fibroblasts has a proliferative effect on HaCaT epithelial cells.

In conclusion, in this work, we have collected information on the CYLD protein. To our knowledge, this study presents for the first time, evidence for the high expression of CYLD in human dermal fibroblasts compared to keratinocytes. Furthermore, we

demonstrate the involvement of CYLD protein in the establishment of cytoskeleton architecture and thereby cell shape and movement. We proposed a model for an FGF-7 mediated functional implication of CYLD in dermal-epidermal crosstalk in the skin. Finally we show that the enhanced proliferation resulting from CYLD deficiency can be relieved by a combination of simple pharmacological agents like aspirin and a neutralizing antibody to FGF-7 suggests a strategy to restore growth control in patients suffering from familial cylindromatosis.

Zusammenfassung

Das Zylindromatosis Gen, *CYLD*, wurde ursprünglich bei Menschen mit einer seltenen autosomal-dominant vererbten Tumorerkrankungen, genannt familiäre Zylindromatosis, entdeckt. Diese Tumorerkrankung ist charakterisiert durch die Erscheinung mehrerer gutartiger Tumoren vor allem in behaarten Bereichen des Körpers.

Das *CYLD*-Gen besteht aus 20 Exons und codiert für ein evolutionär konserviertes ca. 107308 Da großes Protein, bestehend aus 956 AS. Sequenzanalysen ergaben das Vorhandensein von drei CAP-Gly Motiven, ähnlich denen in Mikrotubuli-bindenden Proteinen, sowie einer Ubiquitin Carboxy-terminale Hydrolase Domäne, welche für die Entfernung von Ubiquitin-Ketten aus verschiedenen Substraten zuständig ist.

Mehrere *in vitro* und *in vivo* Studien haben gezeigt, dass das *CYLD*-Protein tatsächlich eine Deubiquitinierungsaktivität aufweist, und Lysin-63-gekoppelten Polyubiquitin-Ketten von verschiedenen in NF- κ B Signalwegen beteiligten Proteinen entfernt. Es wird postuliert, dass die Tumor-Suppressor-Funktion von *CYLD* seiner Deubiquitinierungsaktivität zugrunde liegt. Allerdings entwickeln transgene Mäuse, bei denen Mutationen im *CYLD*-Gen eingefügt wurden, oder *CYLD*-knockout-Mäuse keine Zylindromas, wie die Menschen mit familiärer oder sporadischer Zylindromatosis.

Um neue Funktionen von *CYLD* aufzudecken, haben wir verschiedene Ansätze unternommen. Immunoblot- und Immunfluoreszenzanalysen von Zellen und Gewebe aus Kontrollpersonen und Menschen mit Zylindromatosis-Erkrankung haben gezeigt, dass *CYLD* vorwiegend in der Dermis exprimiert wird, und Mutationen in *CYLD* zum Verlust der Proteinexpression von *CYLD* in Zylindromas führt.

In Übereinstimmung mit früheren Studien, in denen die Expression von *CYLD* mittels *small interfering RNA* runterreguliert wurde, konnten wir zeigen, dass der Verlust von *CYLD* die Proliferation von Fibroblasten beeinflusst. Außerdem zeigen *CYLD*-defiziente Zellen Veränderungen im Aktin-Zytoskeletton, in der Organisation ihres Fokal-Adhäsionskomplexes, sowie in ihrer Migration.

Schließlich fanden wir heraus, dass *CYLD* einen Einfluss auf die Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokine hat. Vor allem war die Expression von FGF-7 in

CYLD-defizienten Fibroblasten erhöht. Dieser Fund ist vom besonderen Interesse, da FGF-7 als Mediator für die Proliferation von Epithelzellen bekannt wurde.

In der Tat, in einem ko-kultur Modell von HaCaT-Epithelzellen mit CYLD-kompetenten oder CYLD-defizienten Fibroblasten, fanden wir heraus, dass CYLD-Defizienz in Fibroblasten einen proliferativen Effekt auf HaCaT Epithelzellen hat.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit neue Informationen über das CYLD-Protein in Erfahrung bringen. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass CYLD viel stärker in dermalen Fibroblasten als in Keratinozyten exprimiert wird. Darüber hinaus konnten wir die Rolle von CYLD bei der Etablierung der Organisation des Zytoskeletons, der Zellform und Zellbewegung zeigen.

Wir präsentieren ein Model für FGF-7-abhängige Rolle von CYLD in der Wechselwirkung zwischen der Dermis und der Epidermis der Haut. Schlussfolgernd schlagen wir vor, die aufgrund der CYLD-Defizienz induzierte Erhöhung der Proliferation von Hautzellen durch Einsatz von pharmazeutischen Wirkstoffen, wie Aspirin, und neutralisierenden Antikörpern gegen FGF-7 zu stoppen, und dadurch normales Zellwachstum in Patienten mit familiärer Zylindromatosis wiederherzustellen.