



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina

**Vies de senyalització regulades per les
Presenilines en càncer de pell: paper del
receptor d'EGF**

Vidalba Rocher Ros

TESI DOCTORAL

Bellaterra 2009



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina

Vies de senyalització regulades per les Presenilines en càncer de pell: paper del receptor d'EGF

Memòria de tesi doctoral presentada per *Vidalba Rocher Ros* per optar al grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Treball realitzat a la Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Medicina del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Doctor Carlos Saura Antolín.

Projecte subvencionat per la Fundació Marató de TV3 (Nº ID: 050710; *Regulació de les vies de transducció de senyals dependents de les presenilines en el càncer de pell*). Amb el suport de l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya.

Bellaterra, 23 d'Abril del 2009

Doctoranda

Director de tesi

Vidalba Rocher Ros

Dr. Carlos Saura Antolín

*Als meus pares, al Gerard,
a la Berta i al David.*

[...] -Govinda - dijo - ¿cómo saber si vamos por el buen camino?
¿Estaremos acercándonos al conocimiento? Alcanzaremos pronto la
liberación? ¿No seguiremos dando vueltas en círculo... nosotros, que
tanto ansiamos evadirnos del terrible ciclo?

Y Govinda replicó:

- Hemos aprendido mucho, Siddhartha, y aún nos queda mucho por
aprender. No damos vueltas en círculo, nos dirigimos hacia arriba: el
círculo es una espiral y ya hemos ascendido bastante.

[...] (*Siddhartha*) Solo hay un conocimiento que está en todas partes,
amigo mío, y es el Atmán. Se halla en mí, en ti y en cada ser. [...]

Hermann Hesse. *Siddhatha*

I.	ÍNDEX.....	1
II.	ABREVIATURES	9
III.	RESUM.....	11
IV.	INTRODUCCIÓ	15
1.	LA PELL	17
1.1.	L'epidermis i el procés d'estratificació.....	18
1.2.	El cicle folicular.....	19
1.3.	Cèl·lules mare en l'epiteli de la pell adulta.....	21
1.4.	Vies de senyalització implicades en l'especificació del destí cel·lular en la pell.....	23
	• Via de senyalització de Wnt/ β -catenina	
	• Via de senyalització de Sonic hedgehod (Shh)	
	• Senyalització de les proteïnes morfogèniques òssies (de l'anglès BMP)	
	• Senyalització de Notch	
	• Paper del factor de transcripció Myc	
1.5.	Càncer de pell	27
1.5.1.	Tipus de càncer de pell	
1.5.2.	Origen cel·lular del càncer de pell	
1.5.3.	Inducció de tumors de pell en models experimentals: <i>multistage skin carcinogenesis</i>	
1.5.4.	Vies de senyalització implicades en el desenvolupament del càncer de pell	
	• Mutacions en H-ras són un esdeveniment d'iniciació tumoral	

○ Efectors de ras	
○ Reguladors de ras	
• p53 està implicat en la progressió maligna	
2. PRESENILINES	34
2.1. La malaltia d'Alzheimer	34
2.2. Factors genètics en la malaltia d'Alzheimer: importància de les presenilines	35
2.3. Estructura i localització de les presenilines.....	36
2.4. Funció de la Presenilina	38
2.4.1. Les PS són els components catalítics del complex γ - secretasa	
• Processament de la Proteïna Precursora de β -amiloid (APP) per la PS/ γ -secretasa	
• Processament del receptor Notch per la PS/ γ -secretasa	
2.4.2. Regulació de la via de senyalització de β -catenina	
2.4.3. Regulació de tràfic intracel·lular de proteïnes	
2.4.4. Paper de la presenilina durant el desenvolupament neural embrionari i adult	
2.4.5. Paper de la presenilina en el desenvolupament de tumors	
3. RECEPTOR DEL FACTOR DE CREIXEMENT EPIDÈRMIC (EGFR)	49
3.1. La família de receptors d'EGF.....	49
3.2. Vies de senyalització activades per l'EGFR.....	51
3.3. Mecanismes de regulació de l'activitat de l'EGFR	53

3.3.1.	Transcripció de l'EGFR	
3.3.2.	Atenuació de la senyalització de l'EGFR: degradació i inactivació	
3.4.	Paper fisiològic de l'EGFR	59
3.5.	Paper de l'EGFR en càncer	60
4.	FBW7	62
4.1.	Mecanisme d'acció i substrats de Fbw7	63
4.2.	Funció biològica de Fbw7: gen supressor de tumors	65
V.	OBJECTIUS	67
VI.	MATERIALS I MÈTODES	71
1.	CULTIU CEL·LULAR.....	73
1.1.	Línies cel·lulars.....	73
1.2.	Material de cultiu cel·lular	73
1.3.	Manteniment de les cèl·lules.....	74
1.4.	Proliferació cel·lular	74
1.5.	Formació de colònies en medi semi sòlid	75
1.6.	Transfecció cel·lular i generació de línies cel·lulars estables	75
1.7.	Cultiu primari de queratinòcits.....	76
1.7.1.	Procediment	
1.7.2.	Tractament de queratinòcits amb 4-hidroxitamoxifé	
2.	RATOLINS CONDICIONALS KNOCKOUT DE PS1/PS2 EN PELL (ePS cDKO).....	78

2.1. Generació de ratolins ePS cDKO.....	78
2.2. Tractament dels ratolins ePS cDKO amb 4-hidroxitamoxifé.....	78
2.3. Generació de cèl·lules que retenen el marcatge (LRC).....	79
3. MÈTODES BIOQUÍMICS.....	79
3.1. Tractaments farmacològics de les cèl·lules en cultiu.....	79
3.2. Co-Immunoprecipitació	80
3.3. Biotinació de proteïnes de membrana	81
3.4. Electroforesi i Western Blot.....	82
3.4.1. Lisi cel·lular i determinació de proteïna	
3.4.2. Electroforesi en gels d'acrilamida i transferència	
3.4.3. Detecció de proteïnes pel mètode de Western Blotting	
3.5. Anàlisi de l'activitat del promotor de l'EGFR.....	85
4. MÈTODES DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	86
4.1. ARN d'interferència	86
4.2. Amplificació i purificació d'ADN.....	87
4.2.1. Transformació i creixement dels bacteris	
4.2.2. Purificació d'ADN plasmídic	
4.2.2.1. Minipreparacions	
4.2.2.2. Maxipreparacions	
4.3. Purificació d'ADN genòmic.....	89
4.4. Reacció en cadena de la Polimerasa (PCR).....	89
4.4.1. Extracció d'ARN cel·lular	
4.4.2. Transcripció Inversa	

4.4.3. Amplificació de l'ADN per PCR semi-quantitativa	
4.5. Amplificació de l'ADN per PCR en temps real	92
5. MÈTODES DE BIOLOGIA CEL·LULAR	92
5.1. Tècniques d'Immunofluorescència.....	92
5.2. Tractament amb EGF conjugat a Alexa488.....	93
5.3. Assaig d'extensió en queratinòcits.....	93
5.4. Tècniques immunohistològiques.....	94
5.4.1. Obtenció i fixació de les mostres biològiques	
5.4.2. Immunohistoquímica amb peroxidasa	
5.4.3. Immunohistoquímica amb fluorescència	
6. MÈTODES ESTADÍSTICS.....	96
VII. RESULTATS.....	97

CAPÍTOL I: Regulació de la proliferació cel·lular per les presenilines a través de la via de senyalització de l'EGFR

1. PROPIETATS ONCOGÈNIQUES DELS FIBROBLASTS DEFICIENTS EN PS.....	101
1.1. Proliferació dels fibroblasts control i deficients en PS a diferents concentracions de sèrum	
1.2. Bloqueig de la proliferació dels fibroblasts deficients en PS amb inhibidors específics de receptors RTK	
1.3. Formació de colònies de fibroblasts PS-/- en medi semisòlid	
2. INCREMENT DEL NIVELLS TOTALS DEL RECEPTOR D'EGF I ERBB3 EN FIBROBLASTS PS-/-	105
3. INCREMENT DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ D'EGFR EN FIBROBLASTS DEFICIENTS EN PS.....	108

4. L'EXPRESSIÓ D'EGFR EN FIBROBLASTS ÉS INDEPENDENT DE L'ACTIVITAT γ -SECRETASA	111
5. LA PS NO AFECTA LA TRANSCRIPCIÓ DE L'EGFR EN FIBROBLASTS	112
6. REGULACIÓ DE LA DEGRADACIÓ DE L'EGFR PER LES PS	114
6.1. Increment de la vida mitja de l'EGFR durant la seva degradació constitutiva i induïda per lligand en absència de PS	
6.2. La degradació de l'EGFR induïda per lligand és independent del proteosoma en absència de PS funcional	
6.3. Les PS no afecten la internalització de l'EGFR però si la seva acumulació durant la ruta endocítica	
6.4. La ubiquitinització de l'EGFR es veu alterada en absència de PS	

CAPÍTOL II: Presenilina regula la degradació de l'EGFR a través de la E3 ubiquitina lligasa Fbw7

1. LA UBIQUITINA LLIGASA Fbw7 REGULA ELS NIVELLS D'EGFR ALTERANT LA SEVA UBIQUITINITZACIÓ.....	123
1.1. La sobreexpressió de Fbw7 produeix un increment dels nivells, estabilitat i fosforilació de l'EGFR	
1.2. La inactivació de Fbw7 produeix una disminució en els nivells de l'EGFR	
2. L'ABSÈNCIA DE PRESENILINA INCREMENTA L'EXPRESSIÓ I L'ACTIVITAT DE Fbw7	127
3. PS REGULA ELS NIVELLS DE Fbw7 ALTERANT LA SEVA TRANSCRIPCIÓ GÈNICA A TRAVÉS D'UN MECANISME INDEPENDENT DE L'ACTIVITAT γ -SECRETASA	129
4. LES PRESENILINES REGULEN ELS NIVELLS D'EGFR I LA TRANSFORMACIÓ CEL·LULAR DEPENDENT DE L'EGFR A TRAVÉS DE Fbw7	131
4.1. Disminució de l'expressió i activitat de Fbw7 mitjançant l'ús d'ARN d'interferència en fibroblasts PS-/-	

- 4.2. El silenciament de Fbw7 en fibroblasts PS-/- reverteix l'efecte oncogènic produït per l'absència de PS i mitjançant per EGFR

CAPÍTOL III: Generació i caracterització morfològica de ratolins condicionals induïbles doble knockout de PS1/PS2 en pell (ePS cDKO)

1. GENERACIÓ DE RATOLINS CONDICIONALS ePS cDKO	137
2. MORT DELS RATOLINS ePS cDKO ALS 2.5 MESOS D'EDAT.....	140
3. LA DELECIÓ DE PS1 I PS2 INDUEIX LA FORMACIÓ DE TUMORS EPITELIALS	143
4. ELS RATOLINS ePS cDKO PRESENTEN UNA MAJOR SUSCEPTIBILITAT A DESENVOLUPAR TUMORS EPITELIALS EN FRONT A UN AGENT CITOTÒXIC	146
5. ELS TUMORS DELS RATOLINS ePS cDKO PRESENTEN UN ELEVAT GRAU DE PROLIFERACIÓ I SÓN K15 NEGATIUS	149
5.1. Els tumors desenvolupats pels ratolins ePS cDKO presenten elevats nivells de β -catenina però són K15 negatius.	
5.2. Queratinòcits de ratolins ePS cDKO tenen un fenotip invasiu	
6. L'ABSÈNCIA DE PS EN L'EPIDERMIS PRODUEIX UN INCREMENT EN ELS NIVELLS TOTALS D'EGFR I Fbw7	152
7. ELS RATOLINS DEFICIENTS EN PS1 ESPECÍFICAMENT EN PELL DESENVOLUPEN TUMORS EPITELIALS A EDATS AVANÇADES.....	156
VIII. DISCUSIÓ	159
Les presenilines actuen com a gens supressors de tumors epitelials.....	161
Les presenilines regulen la proliferació cel·lular a través de la via de senyalització del receptor d'EGF	163
Les presenilines són clau en la regulació del tràfic intracel·lular de l'EGFR.....	165
Les presenilines regulen la ubiquitinització i deubiquitinització de l'EGFR.....	167

La presenilina regula els nivells i l'activitat de la ubiquitina lligasa Fbw7.....	168
La deleció condicional de PS1 i PS2 en ratolins ePS cDKO causa carcinogènesi epitelial.....	171
Crosstalk entre PS, EGFR i Fbw7 en el desenvolupament de tumors epitelials	175
Les presenilines són clau en la regulació de vies fisiològiques implicades en processos de carcinogènesi	176
Presenilines en diagnòstic i teràpia antitumoral.....	179
IX. CONCLUSIONS	183
X. BIBLIOGRAFIA.....	187

A β	<i>Amyloid-β</i>
AD	<i>Alzheimer Disease</i>
ADN	<i>Àcid desoxiribonucleic</i>
AICD	<i>Amyloid Intracellular Domain</i>
AK	<i>Actinic Keratosis</i>
APC/C	<i>Anaphase Promoter Complex/cyclosome</i>
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
APP-CTF	<i>C-Terminal Fragment of APP</i>
AREG	Amfiregulina
ARN	<i>Àcid ribonucleic</i>
BCC	<i>Basal Cell Carcinoma</i> (Carcinoma basocel·lular)
BMP	<i>Morphogenetic Bone Protein</i>
BrdU	5-bromo-2-deoxiuridina
BTC	Betacel·lulina
Cbl	<i>Casitas B-lineage Lymphoma</i>
CHX	Cicloheximida
CPD	<i>Cdc4 Phospho-Degron</i>
CTF	<i>C-Terminal Fragment</i>
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DMBA	7,12-dimetilbenz[α]antracé
DMSO	Dimetilsulfòxid
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	Receptor d'EGF
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
FAD	<i>Familial Alzheimer Disease</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
HB-EGF	<i>Heparin Binding EGF-like</i>
HES	<i>Hairy/Enhancer of Split</i>
IGF	<i>Insulin Growth Factor</i>
IGFR	Receptor d'IGF
IRS	<i>Inner Root Sheath</i>
LOH	<i>Lost of heterozygosity</i>
LRC	<i>DNA label-retaining cells</i>

MAPK	<i><u>Mitogen Activated Kinase Protein</u></i>
MEF PS ^{-/-}	Fibroblasts deficients en presenilina 1 i 2
MEF PS1 ^{-/-}	Fibroblasts deficients en presenilina 1
MEF PS1/PS2	Fibroblasts control
MEF PS2 ^{-/-}	Fibroblasts deficients en presenilina 2
MEF	<i><u>Mouse Embryonic Fibroblast</u></i>
MVB	<i><u>Multivesicular Body</u></i>
NCT	Nicastrina
NDF/HRG	<i><u>Neu differentiation factor</u></i> o heuregulina
NFT	<i><u>Neurofibrillary Tangles</u></i>
NGS	<i><u>Normal Goat Serum</u></i>
NICD	<i><u>Notch Intracellular Domain</u></i>
NRG	Neuregulina
NTF	<i><u>N-terminal fragment</u></i>
OHT	4-hidroxitamoxifé
ORS	<i><u>Outer Root Sheath</u></i>
PCR	<i><u>Polymerase Chain Reaction</u></i>
PHF	<i><u>Paired Helical Filaments</u></i>
PLC	<i><u>Phospholipase C</u></i>
PS	Presenilines
PTP	<i><u>Protein Tyrosine Phosphatase</u></i>
Rb	Retinoblastoma
RTK	<i><u>Receptor Tyrosine Kinase</u></i>
SC	<i><u>Stem Cell</u></i>
SCC	<i><u>Squamous Cell Carcinoma</u></i> (Carcinoma escatòs)
SCF	<i><u>Skp1/Cullin/protein F-box</u></i>
SH2	Dominis d'homologia src
Shh	<i><u>Sonic hedgehog</u></i>
TA	Amplificació transitòria
T-ALL	<i><u>T-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia</u></i>
TGF α	<i><u>Transformant Growth Factor α</u></i>
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
Tsg101	<i><u>Tumor Susceptibility Gene 101</u></i>
Vps	<i><u>Vacuolar proteins of sorting</u></i>
WB	<i><u>Western blotting</u></i>

RESUM

Mutacions autosòmiques dominants en els gens de presenilines (PS) són la principal causa d'Alzheimer familiar hereditari. Aquestes mutacions alteren el metabolisme de l'APP i la generació del pèptid β -amiloide, el qual s'acumula en forma de plaques en el cervell dels malalts d'Alzheimer. Les PS són les unitats catalítiques del complex enzimàtic γ -secretasa, responsable de la proteòlisi de proteïnes tipus I, entre elles l'APP i Notch. A més del seu important paper en la patologia de la malaltia d'Alzheimer, les PS regulen processos de proliferació ja que la seva inactivació produeix tumors epitelials en ratolins a través de mecanismes moleculars poc coneguts. Degut a l'important paper del receptor d'EGF (EGFR) en processos oncogènics, varem hipotetitzar que les PS podien alterar la transformació cel·lular en part mitjançant la regulació de la via de senyalització de l'EGFR.

Els resultats obtinguts indiquen que la inactivació de les PS en fibroblasts causa transformació cel·lular que és específicament bloquejada amb un inhibidor de l'EGFR. Observarem un increment en l'expressió i senyalització de l'EGFR degut a un retard en la degradació a causa d'alteracions en els processos d'ubiquitinització/deubiquitinització d'aquest receptor. La regulació de PS sobre EGFR depèn de l'activitat de la E3 ubiquitina lligasa Fbw7. En aquest treball hem descrit per primera vegada que la pèrdua de funció de PS ocasiona un excés en la transcripció gènica de Fbw7, el qual regula positivament els nivells d'EGFR. Aquests resultats són innovadors ja que, tot i que Fbw7 actua com gen supressor de tumors en altres teixits, en aquest cas està promovent transformació cel·lular sent la primera vegada que es descriu un increment en els nivells de Fbw7 en un procés tumoral epitelial. Aquests resultats són corroborats en un model de ratolí induïble amb deficiència específica d'ambdues PS en pell (ePS cDKO), que ha estat generat en el desenvolupament d'aquest treball. Els ratolins ePS cDKO desenvolupen espontàniament tumors escatosos (SCC) a la pell del coll i presenten susceptibilitat a desenvolupar tumors en front a l'exposició a agents citotòxics.

En aquesta tesi doctoral s'ha descrit que la pèrdua de funció de PS en pell té greus conseqüències en l'homeòstasi epitelial ja que l'absència de PS produeix el desenvolupament de SCC que porta a la mort dels animals a una edat màxima de 2.5-3 mesos d'edat. Aquest fenotip és degut a la desregulació de la via de senyalització de Notch, β -catenina i EGFR, tenint aquest últim un paper cabdal segons els resultats obtinguts en aquest treball. El paper central de PS en la regulació de les diferents vies de senyalització esmentades suggereix que PS és un important gen supressor de tumors.

INTRODUCCIÓ

1. LA PELL

La pell és l'òrgan que ocupa una major superfície en el cos humà sent responsable de la supervivència dels animals, ja que protegeix de la pèrdua d'aigua, canvis de temperatura, radiació, traumes i infeccions. A més, és el teixit que permet percebre l'estat de l'entorn a través del tacte. Està formada per tres capes, de l'exterior cap a l'interior: epidermis, dermis i hipodermis (Figura I-1).

L'**epidermis** és la capa més externa de la pell, no conté vasos sanguinis ja que es nodreix per difusió de la dermis. És un epiteli escamós estratificat, amb una làmina basal subjacent, format per quatre estrats: basal, espinós, granular i cornificat. La componen quatre tipus cel·lulars: queratinòcits, melanòcits, cèl·lules de Merkel i cèl·lules de Langerhans. La **dermis** consisteix en teixit connectiu, i conté glàndules sudorípares, sebàcies i apocrines, fol·licles pilosos, vasos sanguinis i limfàtics. Està formada per dos estrats: el papil·lar i el reticular. Finalment la **hipodermis** uneix la pell amb els ossos i múscles, estant formada per fibroblasts, adipòcits i macròfags.

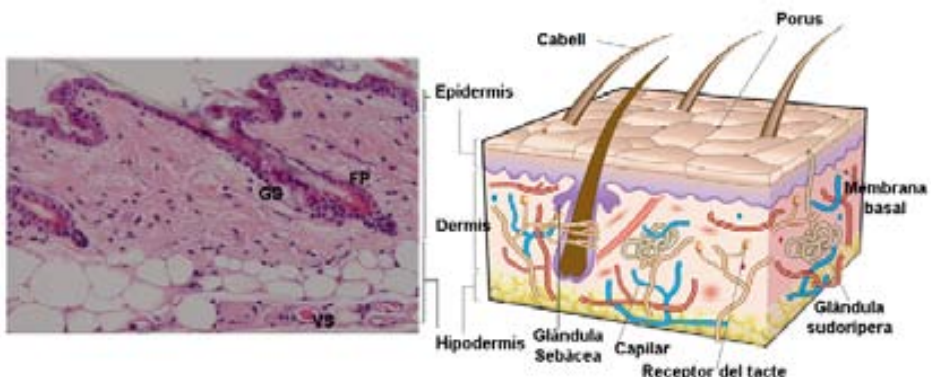


Figura I-1: Representació esquemàtica de la pell. La pell està formada per tres capes, de l'exterior a l'interior: epidermis, dermis i hipodermis. L'epidermis està formada principalment per queratinòcits i melanòcits. La dermis conté glàndules sebàcies (GS) i apocrines, fol·licles pilosos (FP), vasos sanguinis (VS) i limfàtics. La hipodermis, formada per teixits adipós, nodreix les capes superiors. (Adaptat de MacNeil, 2007).

1.1. L'epidermis i el procés d'estratificació

L'estrat basal de l'epidermis és l'únic mitòticament actiu. Aquest produeix, secreta i ensambla la matriu extracel·lular, que constitueix la membrana basal que separa l'epidermis de la dermis. A mesura que les cèl·lules deixen la capa basal i es dirigeixen cap a la superfície de la pell, aturen el cicle cel·lular i executen diferenciació final. En els estrats espinós i granular el programa de diferenciació és encara actiu. En canvi, culmina en l'estrat cornificat, format per cèl·lules mortes i aplanades, que es desprenen amb el roçament amb el medi, essent contínuament renovades per cèl·lules inertes que es mouen cap a l'exterior.

Les proteïnes estructurals més importants de l'epidermis són les queratines, que s'ensamblen com a heterodímers formant filaments intermitjos i es connecten amb hemidesmosomes i desmosomes donant lloc a una xarxa extensible i resistent. L'estrat basal es caracteritza per l'expressió de les queratines K5 i K14, mentre que les capes suprabasals expressen queratina K1 i K10. Finalment, les cèl·lules que han executat diferenciació terminal es caracteritzen per l'expressió de Loricrina. El programa de diferenciació terminal es pot dividir arbitràriament en tres fases que es duen a terme mitjançant l'activació de diverses famílies de factors de transcripció: aturada del creixement cel·lular, conduïda per retinoblastoma (Rb) i β -catenina/LEF1, a continuació iniciació de la diferenciació promoguda per Rb, Skn-1a/i i Tst-1 i finalment diferenciació terminal, degut a l'activació de Klf4, Dlx3 i Fxn1 així com β -catenina/LEF1 (revisat a Dai and Segre, 2004; Feldman et al., 1997). El mecanisme a través del qual es porta a terme l'estratificació no és del tot comprès. D'acord amb el model clàssic de manteniment de la pell interfol·licular, la cèl·lula mare interfol·licular dóna lloc a cèl·lules d'amplificació transitòria que després de varies divisions experimenten una disminució en l'expressió d'integrines conduït a la desadhesió de la làmina basal i diferenciació suprabasal (Vaezi et al., 2002). Aquest és el model més acceptat, tot i que diversos estudis en els darrers anys indiquen un nou model en el que existeix un sol progenitor que realitza una divisió

perpendicular asimètrica segons el seu entorn donant lloc a dues cèl·lules filles amb destins cel·lulars diferents (Clayton et al., 2007; Lechler and Fuchs, 2005).

1.2. El cicle folicular

El cicle folicular representa un bon model per estudi de la quiescència i activació de cèl·lules mare, així com l'amplificació transitòria de la proliferació cel·lular, decisió de destí cel·lular, diferenciació cel·lular i apoptosi en un teixit adult en regeneració (Alonso and Fuchs, 2006).

En l'embrió, la pell s'inicia com a una sola capa de cèl·lules mare epitelials. Tant bon punt les cèl·lules mesenquimals repoblen la pell per formar la dermis s'inicia la morfogènesi del cabell. Cèl·lules dèrmiques especialitzades formen petits grups just per sota de la capa epitelial, estimulants a aquestes cèl·lules a créixer i formar el fol·licle pilós. Aquest adquireix forma de vara amb diferents capes concèntriques, de les quals la més interna és la tija pilosa formada per queratinòcits que han executat diferenciació terminal la qual emergirà de la superfície formant el cabell. L'envolta la baina radicular interna (IRS) i la baina radicular externa (ORS), capa continua amb l'epidermis, que expressa K5 i K14. Un grup de cèl·lules mesenquimals anomenat papil·la dèrmica constitueix la part permanent de la base del fol·licle (revisat a Blanpain and Fuchs, 2006).

Per produir nous cabells, cada fol·licle localitzat en la dermis experimenta cicles de creixement (**anagen**), regressió (**catagen**) i quiescència (**telogen**). El primer cicle d'anagen es produeix en forma d'onada (del cap fins a la cua caudalment, i lateralment cap als costats de l'animal) iniciant-se en P14 i finalitzant a la cua en P18. A continuació, durant la fase de catagen es produeix un procés d'apoptosi i regressió que acaba en la fase de telogen, fase curta durant el primer cicle (un o dos dies) i molt més llarga en el segon (almenys dues setmanes). Durant la transició cap a una nova fase d'anagen es produeix l'activació d'una o dues cèl·lules mare localitzades a la part permanent del fol·licle pilós que exerciran diverses divisions abans de diferenciar-se per formar un nou fol·licle pilós (Figura I-2).

Aquest queratinòcit proliferatiu és coneix com a cèl·lula d'amplificació transitòria (TA) (revisat a Blanpain and Fuchs, 2006).

Els mecanismes moleculars que governen els processos de morfogènesi i cicle fol·licular no són del tot compresos, però diversos estudis revelen una gran importància de la via de senyalització de Wnt/ β -catenina, proteïnes morfogèniques òssies (de l'anglès, BMP), sonic hedgehog (Shh), factor de creixement de fibroblasts (FGF), factor de creixement de epidèrmic (EGF), Notch i NFkB (Alonso and Fuchs, 2006).

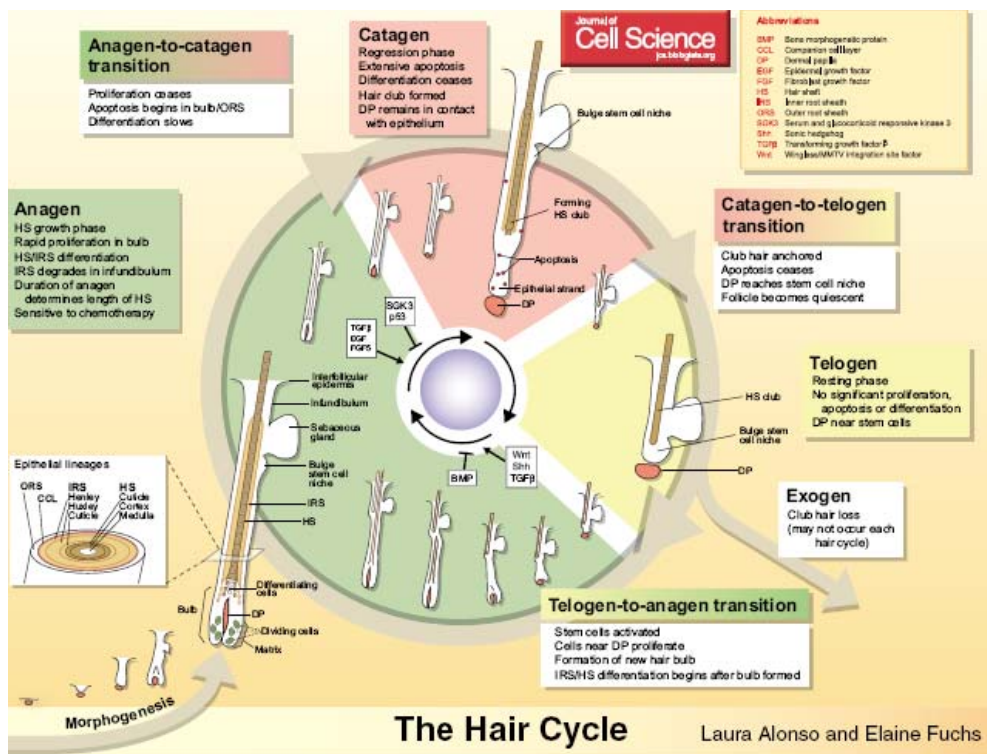


Figura I-2: Cicle fol·licular: El fol·licle pilós exerceix cicles de creixement (anagen), regressió (catagen) i quiescència (telogen). (Extret d'Alonso and Fuchs, 2006).

1.3. Cèl·lules mare en l'epiteli de la pell adulta

La pell adulta està formada per dos blocs estructurals i funcionals principals: la **unitat pilosebàcia** (el fol·licle pilós i la glàndula sebàcia) i la **pell interfol·licular**.

La pell interfol·licular conté progenitors cel·lulars que asseguren la correcta renovació del teixit en absència de dany i la unitat pilosebàcia conté cèl·lules mare (de l'anglès, SC) multipotents que són activades a l'inici de cada cicle cel·lular i que proveeixen cèl·lules per a la regeneració del fol·licle pilós i reparació de l'epidermis (Ito et al., 2005; Levy et al., 2005). Per una altra banda, en la unitat pilosebàcia el nínxol de cèl·lules mare es troba localitzat en la zona denominada *bulge*, just per sota de la glàndula sebàcia dins de la baina exterior del cabell. Aquestes cèl·lules són multipotents i tenen un gran potencial regeneratiu (Claudinot et al., 2005; Blanpain et al., 2004), tanmateix també estan fortament implicades en processos d'oncogènesi epitelial (Jih et al., 1999; Morris et al., 2000). Degut a aquestes implicacions és de vital importància l'estudi de la regulació de l'activitat de les cèl·lules mare del *bulge*, procés que s'està començant a entendre en els darrers anys.

Les cèl·lules mare són responsables de la correcta regeneració i manteniment del teixit així com d'assegurar la renovació cel·lular. Per tal de poder complir aquesta funció les SC han adquirit algunes característiques especials: en primer lloc les SC no estan diferenciades podent donar lloc a un o més llinatges del teixit, en segon lloc tenen capacitat clonogènica i per últim tenen capacitat d'auto-renovació, podent realitzar divisió asimètrica de manera que la cèl·lula filla es diferenciarà i la cèl·lula mare mantindrà les seves propietats de multipotencialitat (Perez-Losada and Balmain, 2003).

Malgrat que els mecanismes involucrats en la regulació del destí cel·lular de les cèl·lules mare no han estat encara completament elucidats, en l'actualitat s'han descrit varies vies de senyalització que regulen la proliferació i la diferenciació del compartiment de cèl·lules mare interfol·liculars, tals com $\beta 1$ integrines, β -catenina, p63, TGF α i c-myc (Blanpain et al., 2007).

Queratinòcits amb una major expressió de $\beta 1$ integrina posseeixen un major potencial proliferatiu tant *in vitro* (Jones and Watt, 1993) com *in vivo* (Fuchs and Horsley, 2008). A més, $\beta 1$ integrina juga un paper important en les divisions asimètriques ja que ratolins amb una deficiència de $\beta 1$ en l'epidermis no són capaços d'executar aquest tipus de divisions (Lechler and Fuchs, 2005). Tanmateix, són necessaris marcadors addicionals per a la correcta identificació de cèl·lules mare interfol·liculars, ja que és difícil establir quins nivells de $\beta 1$ integrina són atribuïbles a un elevat potencial proliferatiu. A més, nombrosos estudis en la implicació de les integrines com a marcadors de SC del fol·licle indiquen que no són marcadors molt específics. Per exemple, tot i que s'ha observat una elevada expressió de $\beta 1$ integrina a l'àrea del *bulge*, únicament una part d'aquestes són cèl·lules que retenen el marcatge (de l'anglès, LRC) (revisat a Waters et al., 2007). Per tal de poder estudiar el funcionament de les SC del *bulge* és vital l'establiment de bons marcadors per a poder-les identificar. Les queratines van ser els primers marcadors utilitzats per definir l'àrea anatòmica en la que es troba el nínxol de SC, sobretot les queratines K15 i K19. La immunodetecció de K15 en cuir cabellut humà indica que K15 és un marcador de cèl·lules de baixa taxa de divisió localitzades en el nínxol de SC. L'expressió de GFP o *lacZ* sota el promotor de K15 en ratolí indica que les cèl·lules que l'expressen són multipotents, contribuint a tots el destins epitelials de nous fol·licles pilosos i ocasionalment epidermis i glàndules sebàcies. A més, presenten una gran capacitat proliferativa i la seva expressió va lligada a altres marcadors associats a SC epitelials com $\beta 1$ integrina i CD34. La queratina K19 també s'expressa en el *bulge*, però no s'associa amb cèl·lules en divisió ni colocalitza amb l'expressió de K15. S'ha suggerit doncs que l'expressió de K19 pot englobar una segona població de SC (revisat a Waters et al., 2007). El marcador de SC hematopoètic CD34 ha estat àmpliament estudiat en l'aïllament de SC epitelials. El fol·licle pilós de ratolí presenta cèl·lules CD34⁺, aquestes són predominantment quiescents i presenten un major potencial proliferatiu que les cèl·lules CD34⁻. Tanmateix no ocorre en fol·licles pilosos humans, indicant que CD34 és un bon marcador per SC del fol·licle pilós en ratolí però no en humà (revisat a Waters et al., 2007).

1.4. Vies de senyalització implicades en l'especificació del destí cel·lular en la pell

* Via de senyalització de Wnt/ β -catenina

La família de proteïnes de la via de senyalització de Wnt participa en múltiples processos durant el desenvolupament embrionari estant també implicada en l'homeòstasi del teixit adult. Aquestes funcions són realitzades majoritàriament a través de β -catenina, l'anomenada via canònica de Wnt. La diferent localització subcel·lular de β -catenina permet a aquesta exercir dues funcions cel·lulars ben diferenciades: com a proteïna associada a la membrana plasmàtica forma un complex amb E-cadherina regulant processos d'adhesió cèl·lula-cèl·lula i com a proteïna citoplasmàtica transloca al nucli activant gens diana del factor de transcripció Tcf (revisat a Logan and Nusse, 2004).

Les proteïnes Wnt són una família de proteïnes que regulen els nivells citosòlics de β -catenina. En absència de Wnt, la β -catenina citosòlica és fosforilada per la glicogen sintasa-3 (GSK3 β) i ràpidament degradada pel proteosoma. La unió dels lligands Wnt als receptors de superfície de la família Frizzled inactiva GSK3 i en conseqüència estabilitza β -catenina permetent la seva translocació al nucli on actuarà com a factor de transcripció (van Noort et al., 2002). Wnt i β -catenina són importants en la morfogènesi del fol·licle pilós i en el manteniment o activació de les cèl·lules mare de la pell. Així, la deleció condicional per a β -catenina es caracteritza per l'absència de fol·licles pilosos (Huelsken et al., 2001).

Postnatalment, la via de Wnt està associada a la diferenciació terminal de les cèl·lules de la matriu del fol·licle pilós en cèl·lules de la medul·la del cabell (DasGupta and Fuchs, 1999). La regulació d'aquest llinatge per la via de Wnt es fa evident en un model animal transgènic K14- Δ N β -catenina, el qual presenta formació de fol·licles *de novo* i masses tumorals de cèl·lules de la matriu (Gat et al., 1998), anomenades pilomatricomes (Chan et al., 1999).

En canvi, no es troba activació de la via de Wnt en el *bulge* (DasGupta and Fuchs, 1999). Dades de *microarrays* mostren que el *bulge* es troba normalment en un estat d'inhibició de la via de Wnt (Tumbar et al., 2004), suggerint que les cèl·lules del *bulge* en quiescència es troben en un estat d'inhibició de Wnt i que l'activació d'aquesta condueix a almenys un llinatge de diferenciació del cabell.

L'estabilització sostinguda de β -catenina produeix un increment en l'activació de les cèl·lules mare del fol·licle, tot i això, la morfologia del nínxol de cèl·lules mare no es veu modificada (Lowry et al., 2005). Aquests resultats indiquen que la senyalització de β -catenina promou un increment de la renovació de les SC del *bulge*, així com un augment en la sortida d'aquestes cèl·lules cap a l'exterior (Figura I-3).

* Via de senyalització de Sonic hedgehod (Shh)

Els tres gens mamífers de la família hedgehod (Sonic, Indian i Desert hedgehod, respectivament Shh, Ihh i Dhh) són importants en el desenvolupament de moltes estructures i teixits. La pèrdua o disminució de hh produeix greus malformacions i dèficits en el desenvolupament, una de les més greus, la ciclopia, està associada amb la pèrdua de la via de senyalització Shh. La unió del lligand Shh al seu receptor Patched (Ptch) produeix la inactivació d'aquest, el qual inhibeix Smoothed que és imprescindible per a transmetre la senyalització de Shh a través de la família de factors de transcripció Gli (revisat a Taipale and Beachy, 2001) (Figura I-3).

Durant el desenvolupament embrionari Shh sembla estar involucrat en el *crosstalk* existent entre epiteli i mesènquima durant la formació del fol·licle (Oro and Higgins, 2003). La senyalització de Shh és també important en la regeneració del fol·licle durant el cicle folicular en l'adult, durant el qual Shh s'expressa en la matriu en l'anafase (Oro and Higgins, 2003).

Per una altra banda, Ptch actua com a gen supressor de tumors ja que es troba mutat en un gran nombre de casos de carcinoma basocel·lular (BCC) i ratolins Ptch^{+/-} desenvolupen tumors molt similars als BCC (Aszterbaum et al., 1999), a

més juga un important paper en el destí de la cèl·lula tumoral iniciada (Wakabayashi et al., 2007).

* **Senyalització de les proteïnes morfogèniques òssies (de l'anglès BMP)**

Les BMPs són proteïnes secretades que activen un complex proteic transmembrana format pels receptors BMPR-1A i BMPR-1B. Després de la formació i activació del complex lligand-receptor es fosforila R-Smad que s'associa amb Smad 4 translocant a nucli produint activació d'expressió gènica (Shi and Massague, 2003).

La inhibició de la senyalització de BMPs és necessària per a l'especificació de les cèl·lules mare cap al destí del fol·licle pilós, mentre que l'activació és requerida per a que la cèl·lula mare activa adopti un dels sis llinatges que formen un fol·licle pilós madur (Kobielak et al., 2003) (Figura I-3).

* **Senyalització de Notch**

Notch és un receptor transmembrana que controla un gran nombre de processos cel·lulars, com ara l'especificació cel·lular, la diferenciació, la proliferació i la supervivència neuronal (Mumm and Kopan, 2000) (Figura I-3).

Diversos components de la via de senyalització de Notch s'expressen en l'epidermis adulta i embrionària. Durant l'inici del procés d'estratificació, Notch-1 s'expressa i s'activa en les cèl·lules basals i surpabasals de l'epidermis i en les glàndules sebàcies (Okuyama et al., 2004; Rangarajan et al., 2001). En estats més avançats de l'estratificació, l'activitat de Notch1 disminueix en l'estrat basal i es restringeix en l'estrat espinós (Okuyama et al., 2004). En el fol·licle pilós, la deleció de Notch-1 i Notch-2 específica en l'ectoderm produeix una pèrdua de fol·licles pilosos, l'aparició de cists epidèrmics i la desaparició de les glàndules sebàcies (Pan et al., 2004).

Per una altra banda, la pèrdua de la funció de Notch produeix un defecte en la diferenciació de l'epidermis (Rangarajan et al., 2001). L'absència condicional de

Notch1 en pell potencia el desenvolupament de tumors de pell induïts per tractament amb carcinògens (Nicolas et al., 2003). Sorprenentment, l'activació sostinguda de la via de Notch en progenitors de la medul·la del cabell promou proliferació i impedeix la diferenciació (Lin and Kopan, 2003). Aquests resultats suggereixen que el paper de Notch en l'epidermis i en el fol·licle pilós pot ser diferent.

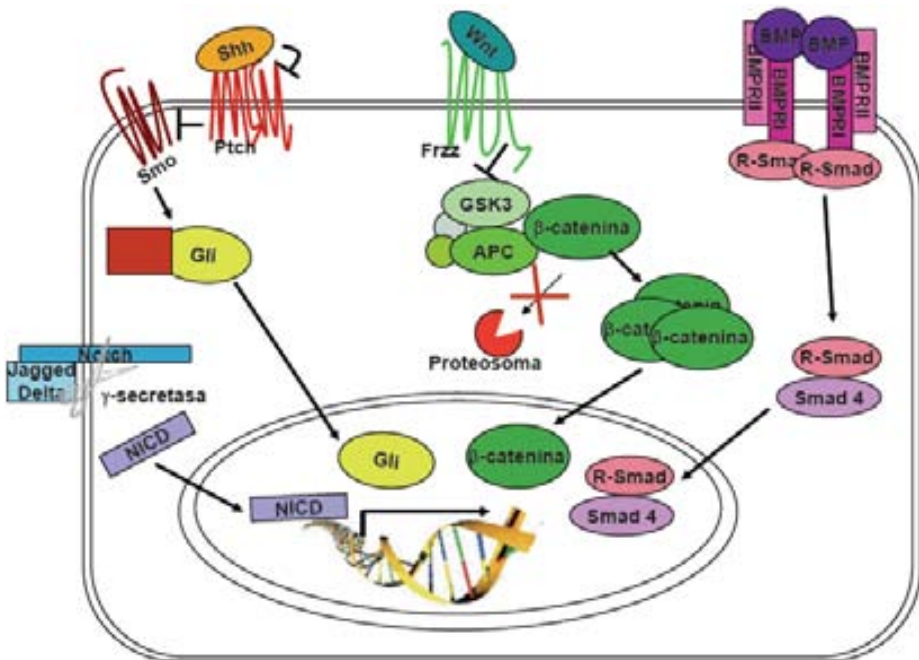


Figura I-3: Vies de senyalització estan implicades en el destí cel·lular de les cèl·lules mare de la pell. En destaquen la via de senyalització de Shh (en vermell), de Wnt/ β -catenina (en verd), de les BMP (en violeta) i de Notch (en blau).

* **Paper del factor de transcripció Myc**

El protooncogen c-myc codifica pel factor de transcripció Myc que regula proliferació cel·lular, diferenciació i apoptosi. És interessant el paper de Myc en l'homeòstasi cel·lular ja que la seva expressió indueix proliferació però si aquesta és sostinguda produeix diferenciació terminal, aquests fets dibuixen un model en que la diferenciació induïda per Myc és un mecanisme de protecció del queratinòcits vers a una proliferació incontrolada (Watt et al., 2008). Els nivells de Myc són regulats per la via de senyalització de l'EGFR ja que l'activació d'aquesta produeix un increment en l'activitat del promotor de c-myc (Jensen and Watt, 2006). Per una altra banda la GTPasa de la família Rho, Rac1, regula negativament l'activitat de Myc mitjançant la fosforilació de la PAK2 (Benitah et al., 2005). Aquest efecte és necessari per al correcte manteniment de l'epidermis ja que la deleció condicional de Rac1 provoca una disminució del compartiment de les cèl·lules mare epitelials tan en l'adult com en l'embrió (Benitah et al., 2005; Benitah and Watt, 2007).

1.5. Càncer de pell

El càncer cutani és el càncer més comú, representant almenys la meitat de tots els càncers. La incidència d'aquest tipus de càncer augmenta cada any, probablement degut a una millora en la detecció, un increment a la exposició solar i un envelliment de la població. Tot i la seva elevada incidència, la mortalitat associada al càncer de pell és baixa, representant únicament el 0.1% de les morts causades per càncer. Als Estats Units es diagnostiquen cada any un milió de casos i es creu que cada any moren unes 10000 persones a causa del càncer de pell, la majoria causades per melanoma (<http://www.nccn.org/>).

1.5.1. Tipus de càncer de pell

El càncer cutani s'origina a partir dels diferents tipus cel·lulars de la pell, principalment melanòcits (melanoma) i queratinòcits (carcinoma basocel·lular – **BCC**- i carcinoma escatós –**SCC**-). Als Estats Units, es diagnostiquen cada any 800000-900000 casos de **BCC**. Aquest tumor acostuma a aparèixer en zones d'elevada exposició solar, especialment al cap i al coll. És un tumor de creixement lent però si no rep tractament pot arribar a produir metàstasi. La meitat dels pacients diagnosticats per a BCC tornen a desenvolupar-ne un altre en els 5 anys següents al diagnòstic (<http://www.skincancer.org>).

Una de les característiques més sorprenents és la varietat entre pacients en l'aparició del tumor, alguns tumors apareixen com a una única lesió mentre que altres ho fan en forma de grups. L'aparència del BCC en forma de grups descriu predisposició del pacient a desenvolupar diversos tumors i aquesta habilitat sembla estar relacionada amb certs polimorfismes gènics (Ramachandran et al., 2000). Existeixen moltes variants histològiques de BCC, i totes elles poden ser localment agressives i produir metàstasi. La forma més comú de BCC (un 75-80% dels casos) és la forma nodular i el 90% d'aquestes es desenvolupa al cap i coll. Els grups de cèl·lules estan formades per lòbuls de petites cèl·lules hipercromàtiques, uniformes en mida i poligonals, les cèl·lules perifèriques es troben alineades en paral·lel en angle recte respecte les cèl·lules centrals, aquesta disposició característica s'anomena empallissada perifèrica. Un altre tret característic és l'aparició d'un artefacte en forma d'esclatxa degut a la retracció de la mucina durant la fixació del teixit. S'observen poques figures mitòtiques. Gairebé sempre, la dermis del voltant presenta elastosi actínica peritumoral (McGuire et al., 2009).

Els **SCC** apareixen amb una freqüència molt menor (200000-300000 casos per any als EEUU) però són més agressius ja que poden envair teixits greixosos i metastatitzar a través de vasos limfàtics. Apareixen en zones d'elevada exposició solar, com ara a la cara, orella, coll, llavis i part posterior de les mans. També es poden desenvolupar en cicatrius o pell ulcerada.

L'espectre histològic de SCC s'inicia amb el desenvolupament de queratosi actínica (AK). Histològicament la diferència entre AK i SCC rau en que en l'AK només compren una part de l'epidermis mentre que el SCC ocupa tot el gruix de l'epidermis, a més un SCC invasiu penetra la membrana basal de l'epidermis. Totes les lesions SCC mostren una pèrdua de maduració cel·lular a mesura que la cèl·lula progressa de l'estrat basal al superficial, hi ha variabilitat en la mida nuclear, forma i marcatge, s'observen mitosis i multinucleació i són freqüentment acompanyades per hiperqueratosi (McGuire et al., 2009).

Es coneix una llarga llista de factors de risc a desenvolupar BCC i SCC, aquests són: exposició a la llum UV, pell clara, gènere masculí, edat avançada, exposició a radiacions, haver desenvolupat prèviament un càncer de pell, exposició a certs agents químics (arsènic, carbó, querosè, quitrà), inflamació de la pell perllongada o severa, tractament per a psoriasi, xeroderma pigmentosum, síndrome nerviós de la cèl·lula basal, infecció pel virus del papil·loma, fumar (en el cas de SCC) i susceptibilitat genètica.

La teràpia tradicional inclou criocirurgia, radioteràpia, electrodissecció i excisió simple, obtenint molt bons resultats. També s'utilitza la cirurgia microgràfica de Mohs, tècnica que aconsegueix les més elevades curacions a 5 anys. És important el seguiment del pacient després del tractament, ja que un 36% d'ells desenvoluparan un segon BCC en els 5 anys següents; en el cas dels SCC, ja que es tracta d'un tumor metastàtic, s'ha de mantenir un seguiment indefinit (<http://www.nccn.org/>).

1.5.2. Origen cel·lular del càncer de pell

El desenvolupament tumoral és un procés de diversos passos, que s'inicia amb un esdeveniment genètic i irreversible. La promoció del tumor representa l'expansió clonal de la cèl·lula iniciada formant un tumor benigne, que progressarà cap a un tumor maligne, probablement degut a un segon esdeveniment gènic.

Però, quin és l'origen de la primera cèl·lula iniciada? Com s'expliquen les llargues latències existents entre l'exposició a un carcinogen i el desenvolupament tumoral?

Un possible punt de vista de l'origen de la cèl·lula tumoral és que provingui d'una cèl·lula multipotent, ja que aquesta viu el temps suficient com per acumular els canvis genètics observats en molts dels tumors. D'aquesta manera, el destí del tumor ve donat per la combinació específica dels canvis genètics que es produeixen durant el desenvolupament del tumor. Alternativament, cèl·lules mare i cèl·lules diferenciades poden donar lloc a un tumor sent la naturalesa de la cèl·lula important en el potencial maligne del tumor. Aquesta darrera interpretació implica que la cèl·lula tumoral, en cas de ser diferenciada re-adquireix capacitat d'autorenovació, és a dir, es produirien esdeveniments gènics que atorgarien de nou a la cèl·lula la capacitat proliferativa. Diversos estudis reforcen aquesta idea. Per exemple, l'expressió de c-myc sota el control del promotor de la involucrina en cèl·lules suprabasals de l'epidermis reactiva la seva proliferació induint hiperplàsia. Tanmateix totes les lesions produïdes en aquests tipus d'estudis són benignes, indicant que són necessàries mutacions gèniques en tipus cel·lulars més indiferenciats. De fet, l'expressió de H-ras mutat en cèl·lules del *bulge* induïx la formació de tumors benignes amb una elevada progressió cap a tumors malignes. Aquests estudis indiquen un esquema en el que les SC es troben protegides de transformació ja que són poques en nombre, es troben físicament en un lloc poc accessible als carcinògens i proliferen esporàdicament. Tanmateix, si aquestes cèl·lules es transformen tenen una gran capacitat de progressió maligna en contraposició a les nombroses i menys protegides cèl·lules proliferatives, la transformació de les quals donaria lloc a alteracions de tipus benigne (Perez-Losada and Balmain, 2003; Owens and Watt, 2003).

1.5.3. Inducció de tumors de pell en models experimentals: *multistage skin carcinogenesis*

Molts dels principis de la recerca en càncer de pell han estat establerts a partir de models animals. El model animal més utilitzat en l'estudi d'aquesta malaltia és el *multistage skin carcinogenesis*, en el qual s'indueixen tumors de pell en ratolins mitjançant el tractament tòpic d'un primer carcinogen que genera una

població de cèl·lules iniciades seguit del tractament d'un agent promotor tumoral. Les avantatges d'aquest model són la seva simplicitat, versalitat i reproductibilitat. Consisteix en tractar la pell dorsal de l'animal amb una sola dosi del carcinogen 7,12-dimetilbenz[α]antracé (DMBA) seguit de múltiples dosis del promotor tumoral 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA). Aquest tractament dona lloc en primer lloc a papil·lomes en els tres primers mesos, que són lesions neoplàsiques benignes que poden ser quantificades de manera longitudinal. Entre un 5 i un 10% dels papil·lomes progressaran cap a malignes i invasius SCC (Boutwell et al., 1982). Amb aquest model es poden estudiar tres fases ben diferenciades de la progressió tumoral: la iniciació, la progressió i la transformació.

1.5.4. Vies de senyalització implicades en el desenvolupament del càncer de pell

El nombre de papil·lomes desenvolupats és una mesura d'iniciació, la taxa de creixement dels papil·lomes indica promoció tumoral i la taxa de papil·lomes que es converteixen en carcinomes indica malignitat. En cada etapa del desenvolupament dels tumors de pell es produeixen esdeveniments gènics concrets, de fàcil estudi mitjançant l'ús del model d'inducció de tumors de pell.

*** Mutacions en H-ras són un esdeveniment d'iniciació tumoral**

Diferents estudis mostren que més del 90% dels papil·lomes induïts pel tractament DMBA/TPA presenten la mutació CTA en lloc de CAA en el codó 61 del gen *H-ras*, la qual confereix una activitat constitutiva a la proteïna H-ras (Balmain et al., 1984; Quintanilla et al., 1986; Bremner and Balmain, 1990).

Ras és una proteïna associada a la membrana que transmet senyals de factors de creixement cap a vies efectores regulant múltiples processos cel·lulars incloent proliferació, apoptosi, diferenciació i migració. Per tant, molts grups d'investigació han focalitzat la seva recerca en l'estudi de vies *upstream* o *downstream* a

l'activació de Ras per tal d'esbrinar quines funcions relacionades amb Ras promouen promoció tumoral.

↳ Efectors de ras

Pten: El gen supressor de tumors Pten és una fosfatasa de lípids i proteïnes que regula negativament la via de senyalització PI3K/Akt activada per Ras. Ratolins amb deleció específica en pell de PTEN desenvolupen espontàniament papil·lomes que progressen a carcinomes si reben irradiació. Tractament amb DMBA/TPA de ratolins heterozigots produeix un increment en el nombre de papil·lomes amb una progressió cap a carcinomes accelerada. Aquests tumors mostren o bé una pèrdua total de Pten (LOH) o bé mutacions en H-ras, indicant que són mutacions mútuament exclusives (revisat a To et al., 2005).

Tiam1: Ras uneix Tiam1, que regula la GTPasa Rac1, proteïna implicada en migració cel·lular. Ratolins deficients en Tiam1 són resistents al desenvolupament de tumors per tractament DMBA/TPA, tanmateix els tumors que apareixen són molt més agressius i invasius, indicant que Tiam1 té un paper bifàsic en la progressió tumoral (revisat a Kemp, 2005).

Fosfolipasa C ϵ (PLC): efector de Ras que proteolitza 2,3-difosfoinositol donant lloc a dos segons missatgers vitals: diacilglicerol, activador de la proteïna cinasa C, i inositol 1,4,5-trifosfat, el qual mobilitza el Ca⁺⁺ intracel·lular. Ratolins PLC ϵ -/- desenvolupen més tardanament i en menys quantitat papil·lomes després del tractament amb DMBA/TPA, i aquests papil·lomes no evolucionen cap a carcinomes (revisat a Kemp, 2005).

RalGDS: és un intercanviador de nucleòtids de guanina que activa la Ral GTPasa regulant l'endocitosi, exocitosi, organització d'actina i transcripció gènica del complex AP1. Ratolins *knockout* de RalGDS desenvolupen menys i més petits tumors, amb una baixa progressió maligna (revisat a Kemp, 2005).

Raf-1: és el primer efector de ras identificat, senyalitza a través de la via de les MAPK induint l'activació de ciclina D i proliferació cel·lular a través de la família de

factors de transcripció ETS. La via de senyalització MAPK i ciclina E es troba incrementada en tumors induïts pel tractament DMBA/TPA (revisat a Kemp, 2005).

↳ Reguladors de ras

TGF α és un potent mitògen membre de la família de factors tròfics d'EGF. Uneix el receptor d'EGF activant la via de Ras. Ratolins transgènics de TGF α desenvolupen papil·lomes al voltant d'una ferida o en ser tractats únicament amb TPA, aquests tumors no contenen mutacions de Ras indicant que la sobreexpressió de TGF α pot substituir la mutació de Ras incrementant suficientment la senyalització per a la iniciació del tumor (Vassar et al., 1992; Dominey et al., 1993). L'expressió d'una forma activada de Sos en la pell resulta en el ràpid desenvolupament de papil·lomes de forma espontània, fenotip que és rescatat mitjançant la inactivació de l'EGFR, indicant que la via de senyalització d'EGFR dona senyals addicionals a part de l'activació de Ras essencials per a la formació de papil·lomes (Sibilia et al., 2000).

* **p53 està implicat en la progressió maligna**

Els carcinomes, però no els papil·lomes, presenten una elevada freqüència de mutació o LOH en p53, el que indica que p53 està involucrat en la progressió maligna tumoral (Burns et al., 1991). Ratolins p53^{-/-} no desenvolupen espontàniament tumors epitelials, tanmateix en un model d'inducció de tumors per carcinògens, presenten més d'un 50% de conversió a carcinomes, mentre que normalment és del 5-10%. Si p53 es troba en situació d'heterozigosi també es produeix un increment en progressió a carcinomes, però amb una latència major, degut a la necessitat de pèrdua de l'al·lel restant (Donehower et al., 1992; Kemp et al., 1994).

2. PRESENILINES

2.1. La malaltia d'Alzheimer

La malaltia d'Alzheimer (AD) és la forma més comú de demència sent responsable del 50-60% de tots els casos. Les conseqüències d'aquesta malaltia són la pèrdua de les principals qualitats humanes: memòria, enteniment, judici, abstracció i llenguatge. Va ser descrita per primera vegada per Alois Alzheimer l'any 1906 al presentar a la comunitat científica els resultats de la neuropatologia de la seva pacient, August D., que presentava als 51 anys progressiva demència acompanyada d'al·lucinacions i deliris (Tanzi and Bertram, 2005). Per al correcte diagnòstic de la malaltia d'Alzheimer és necessari un estudi neuropatològic per tal d'excloure altres possibles demències. El cervell d'un malalt d'Alzheimer, patològicament presenta una atrofia de l'hipocamp i de l'escorça cerebral i un engrandiment dels ventricles. Microscòpicament, s'observa una disminució de cossos neuronals al sistema límbic i l'escorça associativa i en alguns nuclis subcorticals que projecten cap a aquestes zones. Les dues alteracions més característiques són la presència de cabdells neurofibril·lars (*neurofibrillary tangles*, NFT), formats principalment per acumulacions de proteïna tau hiperfosforilada, i per l'increment del número de plaques senils, formades majoritàriament pel pèptid β -amiloide (A β). Aquestes dues lesions es troben de forma abundant en l'hipocamp, l'escorça cerebral, l'amígdala i alguns nuclis subcorticals (O'Brien, 1996). Els NFTs estan formats per filaments aparellats helicoidals o PHF. La principal subunitat dels PHF és la proteïna associada a microtúbuls tau anormalment hiperfosforilada en PHF per diferents cinases. La hiperfosforilació de tau, normalment soluble, produeix que es dissociï dels microtúbuls i que esdevingui insoluble formant els PHF que s'agreguen entre si donant lloc als NFTs que s'acumulen en dendrites i cossos neuronals (Friedhoff et al., 2000). Les plaques d'amiloide estan formades per un nucli central de pèptids de A β normalment de 40 i 42 aminoàcids envoltat per axons, dendrites i cèl·lules glials

degenerades. Els pèptids A β de 40 i 42 aminoàcids són generats constitutivament per la proteòlisi seqüencial de la proteïna precursora de β -amiloide (de l'anglès, APP) pels enzims β - i γ -secretasa. La forma A β 42 de l'amiloide té una major tendència a agregar-se, sent aquesta la espècie d'A β més tòxica (Walsh and Selkoe, 2004).

2.2. Factors genètics en la malaltia d'Alzheimer: importància de les presenilines

La malaltia d'Alzheimer és una malaltia heterogènia amb una forma familiar i un altra esporàdica. L'Alzheimer esporàdic afecta a persones més grans de 65 anys, representa la majoria dels casos (>95%) i no està associada a un patró d'herència clar (Tanzi and Bertram, 2005). Un meta-anàlisi de pacients d'AD va definir el polimorfisme ϵ 4 de l'APOE com el factor de susceptibilitat més gran per l'AD en edats compreses entre 40-90 anys, tant en homes com en dones (Farrer et al., 1997). L'Alzheimer familiar (FAD) és una malaltia d'herència autosòmica dominant que apareix abans dels 65 anys i representa menys del 5% dels casos. La majoria de casos d'Alzheimer familiar són deguts a mutacions en els gens de les presenilines (PS) i l'APP. El gen de l'APP, situat al cromosoma 21, va ser clonat i seqüenciat a partir de l'anàlisi de l'amiloide cerebrovascular de pacients d'Alzheimer. A aquest resultat el va seguir la descripció d'un lligam genètic del cromosoma 21 en quatre famílies amb Alzheimer familiar i, més tard, la caracterització de la primera mutació en el gen de l'APP en un cas d'Alzheimer familiar (revisat a Tanzi and Bertram, 2005). Tanmateix, la descripció d'altres mutacions addicionals del gen de l'APP expliquen únicament un 5-7% dels casos de FAD (Small, 1998). Simultàniament a la caracterització de l'APP, es va descriure una important associació entre l'al·lel ϵ 4 de l'APOE i el desenvolupament de casos d'Alzheimer esporàdic i familiar (revisat a Tanzi and Bertram, 2005). Posteriorment, el clonatge posicional del gen de presenilina-1 (PS1) al cromosoma 14 va identificar el major locus per l'Alzheimer autosòmic dominant (Sherrington et al., 1995). Actualment, s'han descrit més de 160 mutacions en el gen de la PS1

que causen FAD (Figura I-4). També s'han trobat mutacions que causen AD en l'homòleg de PS1, presenilina-2 (PS2), tot i que únicament s'han descrit 10 mutacions en aquest gen (Tanzi and Bertram, 2005, per informació actualitzada <http://www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/>). Les mutacions en PS1 causen l'Alzheimer en un rang d'edat temprà (28-60 anys) mentre que les mutacions en PS2 produeixen la malaltia en general a una edat més tardana i variable (35-82 anys) (Hutton and Hardy, 1997).

Les mutacions de PS1 es localitzen en les regions transmembrana, que són les més conservades de la proteïna (Figura I-4). La majoria de mutacions en PS produeixen un increment de la relació $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, augment que pot ser causat per un increment en $A\beta_{42}$ o a una disminució de $A\beta_{40}$ o a una combinació dels dos (De Strooper B., 2007). D'aquesta manera el debat sobre si les mutacions de presenilina produeixen un guany o una pèrdua de funció o si les mutacions afecten a totes les funcions de presenilina ha estat sobre la taula durant els darrers anys. L'expressió de PS humana contenint diferents mutacions associades a AD en fibroblasts de ratolí deficientes en PS té diferents efectes en l'activitat γ -secretasa, produint tan una disminució com un increment en el tall dels substrats estudiats. Aquests resultats suggereixen que les mutacions poden tenir diferents efectes en els diferents substrats tot i que en general presenten una pèrdua parcial de funció (Bentahir et al., 2006).

2.3. Estructura i localització de les presenilines

Els gens de les presenilines mantenen una elevada conservació al llarg de l'escala evolutiva. Així els gens de la PS1 i PS2 comparteixen un 68% d'identitat en la seqüència aminoacídica.

La predicció d'hidrofobicitat de les presenilines indica que es tracta de proteïnes amb diverses regions hidrofòbiques, previsiblement ancorades a la membrana. De les deu regions hidrofòbiques que es prediuen, el model més acceptat proposa que vuit d'elles són dominis transmembrana (Li and Greenwald, 1996). Tanmateix, recentment s'ha proposat un model amb nou dominis transmembrana, on la gran

regió hidrofílica entre els dominis transmembrana 6-7 i l'extrem N-terminal estan situats encarats cap al citoplasma mentre que l'extrem C-terminal es troba en l'espai extracel·lular (Laudon et al., 2005) (Figura I-4). Pel que fa a les regions conservades, tan els segments transmembrana com l'extrem C-terminal presenten un elevat grau de conservació. A més, s'han identificat en els segments transmembrana 6 i 7 dos residus conservats d'aspartat (Asp257 i Asp385) en PS1, els quals conformen el centre actiu de PS (Wolfe et al., 1999).

En el *loop* hidrofílic s'han definit dos subdominis: el primer, amb un elevat grau de conservació en les diferents PS, inclou el setè segment transmembrana i el segon, el qual juntament amb l'extrem N-terminal, és altament divergent en les diferents PS (Li and Greenwald, 1996).

PS1 és sintetitzada com a un polipèptid de 42-43 kDa i s'endoproteolitza en el *loop* citoplasmàtic. La proteòlisi dona lloc a un fragment N-terminal (NTF) de 27-28 kDa i a un fragment C-terminal (CTF) de 16-17 kDa (Thinakaran et al., 1996). Els fragments NTF i CTF es mantenen units en estequiometria 1:1 en un complex d'elevat pes molecular corresponent al complex γ -secretasa, conformant la forma activa de PS (Thinakaran et al., 1997).

Les PS es localitzen majoritàriament en el reticle endoplasmàtic, en el compartiment intermedi, la xarxa *cis*-Golgi, en algunes vesícules de transport i, en menor quantitat, a la membrana citoplasmàtica (Annaert et al., 1999; Chyung et al., 2005). També s'ha observat que presenilina es localitza a la membrana nuclear així com en el centrosoma i cinetocor de la interfase, estructures involucrades en processos de segregació cromosòmica (Li et al., 1997).

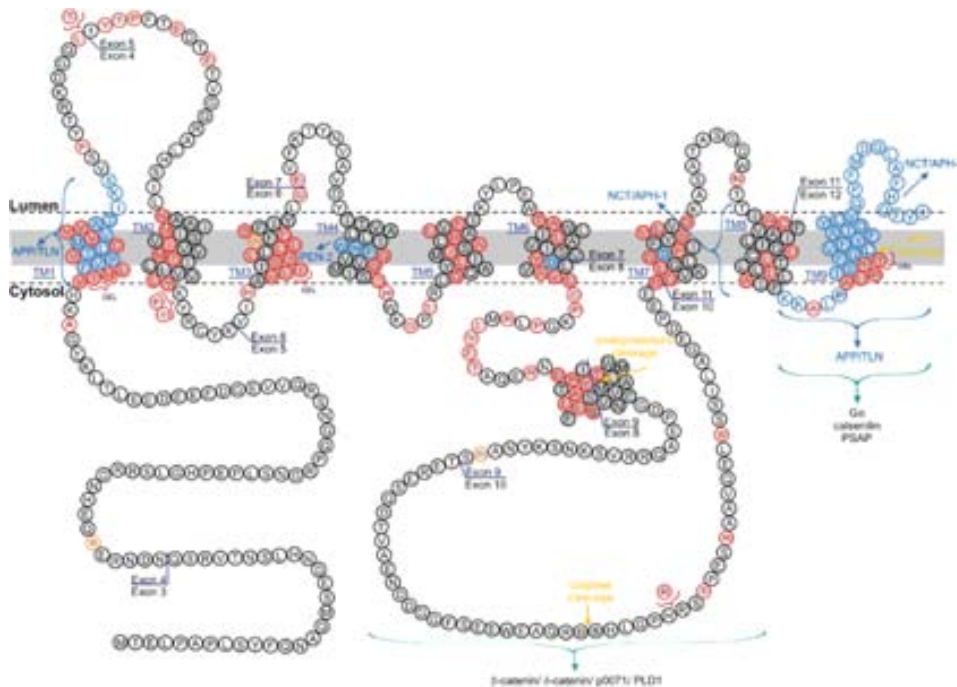


Figura I-4: Topologia de Presenilina 1 Representació aminoacídica de la topologia dels 9 dominis transmembrana (TMD) de PS1, incloent els extrems dels exons. Les mutacions relacionades amb FAD s'indiquen en vermell, mentre que les mutacions no patogèniques s'indiquen en taronja. Els dominis d'interacció amb APP/TLN o NCT/APH1/PEN-2 es senyalen en blau, així com les residus conservats D257 i D385 formant el lloc catalític putatiu. El domini d'interacció amb proteïnes del domini C-terminal i el *loop* hidrofílic es mostra en verd fosc. El lloc d'endoproteòlisi que produirà els fragments C i N-terminal en la setena regió hidrofòbica, el lloc de tall de SPP (signal peptide peptidase) en el novè TMD i el tall per caspases en el *loop* hidrofílic s'indiquen amb fletxes grogues. (Extret de Dillen and Annaert, 2006).

2.4. Funció de la Presenilina

2.4.1. Les PS són els components catalítics del complex γ -secretasa

La PS és el centre catalític de l'enzim γ -secretasa, un complex multiproteic responsable de la proteòlisi de proteïnes transmembrana tipus I (De Strooper B., 2003; Iwatsubo, 2004). El complex γ -secretasa està format per cofactors que

l'estabilitzen i l'activen: Aph-1, nicastrina (NCT) i l'*enhancer* de presenilina (pen-2) (Iwatsubo, 2004) (Figura I-5). Aph-1 estabilitza la presenilina, mentre que Pen-2 intervé en la maduració del complex, induint la proteòlisi de PS i permetent la seva activitat (Takasugi et al., 2003). S'ha suggerit nicastrina com la subunitat d'unió als substrats gràcies a un residu conservat del domini extracel·lular, tanmateix un treball recent mostra que aquest residu és crític per l'ensamblatge i maduració del complex però no pel reconeixement de substrats (Shah et al., 2005; Chavez-Gutierrez et al., 2008). En aquest complex PS es troba formant dímers, els quals són responsables de la seva activitat enzimàtica (Schroeter et al., 2003; Cervantes et al., 2004). L'ensamblatge del complex es produeix en el reticle endoplasmàtic, de manera que únicament complexes funcionals es traslladen a la membrana plasmàtica. Allà, part dels complexes són endocitats a endosomes, cossos multivesiculars i/o lisosomes i altres romanen a la membrana per dur a terme la seva activitat catalítica en les diferents localitzacions subcel·lulars (revisat a Dries and Yu, 2008).

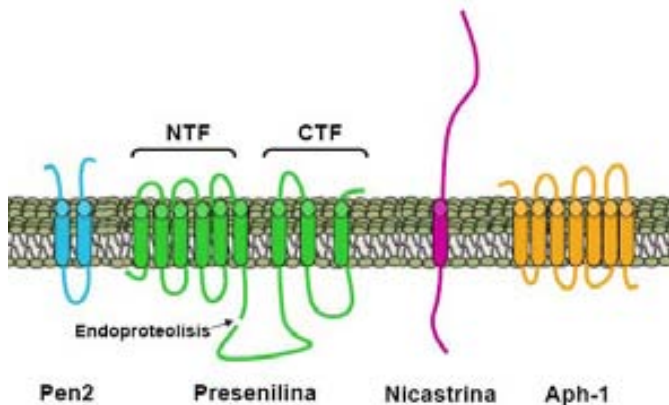


Figura I-5: Presenilina és la unitat catalítica del complex γ -secretasa. Pen2 intervé en la maduració del complex, que es produeix en el reticle endoplasmàtic. Nicastrina i Aph-1 estabilitzen els fragments N-terminal (NTF) i C-terminal (CTF) de presenilina.

Els primers substrats descrits proteolitzats per l'enzim γ -secretasa van ser el receptor Notch i l'APP (De Strooper B. et al., 1999; Walter et al., 2001). Tanmateix des del seu descobriment un nombre creixent de substrats han estat descrits, incloent els homòlegs de l'APP (APLP1 i APLP2), homòlegs de Notch (Notch 1-4), els lligands de Notch (Delta i Jagged), el receptor ErbB4, CD44, N-cadherina i E-cadherina, nectina-1 α , el receptor de neurotrofines p75, entre d'altres resumits en la Taula I-1 (Wakabayashi and De Strooper B., 2008).

Taula I-1: Substrats de l'enzim γ -secretasa

Substrat	Funció biològica	Referència
APP	Adhesió cel·lular, migració, sinaptogènesi i creixement neurític	De Strooper et al., 1998
APLP1, APLP2	Adhesió cel·lular, migració, sinaptogènesi i creixement neurític	Naruse et al., 1998; Scheinfeld et al., 2002
Notch 1,2,3 i 4	Diferenciació cel·lular	De Strooper B. et al., 1999
ErbB4	Receptor tirosina cinasa (RTK)	Ni et al., 2001
E-cadherina	Adhesió cel·lular	Marambaud et al., 2002
LRP1	Receptor de la superfamília LDL. Endocitosi	May et al., 2003
CD44	Adhesió cel·lular, metàstasi i creixement tumoral	Lammich et al., 2002; Murakami et al., 2003
Nectina-1 α	Adhesió cel·lular, contacte sinàptic	Kim et al., 2002
NRG-1	Lligand de la família ErbB. Factor de creixement, diferenciació	Bao et al., 2003
Delta 1	Lligand del receptor Notch	Six et al., 2003
GluR3	Receptor de glutamat ionotrópic	Meyer et al., 2003
P75NTR	Regulació de creixement axonal, supervivència cel·lular	Kanning et al., 2003

Substrat	Funció biològica	Referència
DCC	<i>Deleted in colorectal cancer</i> Receptor de netrina-1. Guia axonal.	Taniguchi et al., 2003
N-cadherina	Adhesió cel·lular	Marambaud et al., 2003
Jagged	Lligand del receptor Notch	LaVoie and Selkoe, 2003
ApoER2/LRP8	Receptor de la superfamília LDL. Plasticitat sinàptica, LTP	May et al., 2003
Syndecan-3	Proteoglicà, receptor de citoquines	Schulz et al., 2003
CSF-1R	RTK. Proliferació i diferenciació	Wilhelmsen and van der Geer P., 2004
Alcadeina α, β, γ	Proteïna postsinàptica. Unió a Ca^{2+}	Araki et al., 2004
Megalina/ LRP2	Receptor de la superfamília LDL regula l'endocitosi	Zou et al., 2004
NRADD	Inducció d'apoptosi en neurones	Gowrishankar et al., 2004
Pcdh	Connectivitat neuronal i supervivència	Haas et al., 2005
CD43	Proliferació i migració de cèl·lules T, interacció cèl·lula-cèl·lula en leucòcits	Andersson et al., 2005
GHR	Receptor de la hormona del creixement	Cowan et al., 2005
VGSCb	Modulador de funcions del canal de voltatge de sodi.	Wong et al., 2005; Kim et al., 2005
Tyr, Tyrp1, DCT/Tyrp2	Conversió de tirosina a DOPA, síntesi de pigments	Wang et al., 2006
Efrina B1 i B2	Lligands dels receptor d'efrina Neuritogènesi i angiogènesi	Georgakopoulos et al., 2006
SorLA, Sortilin, SorCS1b	Receptors Vps10p. <i>Sorting</i> i tràfic intracel·lular	Bohm et al., 2006; Nyborg et al., 2006

Substrat	Funció biològica	Referència
RPTP-k	Fosfatasa de RTK. Adhesió cel·lular	Anders et al., 2006
HLA-A2	Proteïna MHC classe I Desenvolupament de cèl·lules T	Carey et al., 2007
LAR	Fosfatasa de RTK. Formació de la sinapsi i xarxa neuronal	Haapasalo et al., 2007
EphB2	RTK, neuritogènesi i angiogènesi	Litterst et al., 2007
IGF-1R	RTK, proliferació cel·lular	McElroy et al., 2007
Tie1	RTK, desenvolupament vascular	Marron et al., 2007

Taula I-1: Substrats de la γ -secretasa. Es descriu breument la funció de les proteïnes proteolitzades per PS i el treball científic on s'ha demostrat la proteòlisi.

Actualment, es desconeix la funció biològica de la majoria dels esdeveniments proteolítics en els diferents substrats. En general γ -secretasa proteolitza els seus substrats per la regió transmembrana de la proteïna alliberant els fragments de la proteïna a l'espai extracel·lular i intracel·lular (De Strooper B., 2003). El tall per presenilina es produeix amb una marcada baixa especificitat de seqüència, els únics requeriments aparents fins l'actualitat són la conformació tipus I del domini transmembrana i la presència d'un ectodomini curt (<50 aminoàcids) (revisat a Wakabayashi and De Strooper B., 2008).

En general, el tall per presenilina pot contribuir a la generació de fragments que poden **1)** translocar al nucli (com és el cas de Notch), **2)** finalitzar determinades vies de senyalització (en el cas de DCC) o bé **3)** que el tall serveixi per modificar la senyal que s'està transmetent, de manera que la proteïna transmembrana activa una via de senyalització i el fragment un altra (per exemple el cas d'ErbB4) (Hass et al., 2008).

* **Processament de la Proteïna Precursora de β -amiloid (APP) per la PS/ γ -secretasa**

El processament de l'APP inclou la proteòlisi seqüencial de la proteïna per la α - o β - i la γ -secretasa. El tall inicial de l'APP per la proteasa β -secretasa (BACE) genera un fragment C-terminal unit a la membrana (CTF- β) d'inici a l'Asp1 de l'extrem N-terminal del domini A β de l'APP. A continuació, la γ -secretasa proteolitza el CTF- β donant lloc al pèptid β -amiloid (A β) i el domini intracel·lular de l'amiloid (AICD) (De Strooper et al., 1998). Alternativament, l'APP pot ser proteolitzat per α -secretasa (TACE) al centre del domini A β , de manera que s'inhibeix la formació del pèptid A β (Walter et al., 2001) (Figura I-6).

Les mutacions en les PS en casos de FAD produeixen un increment de la relació A β_{42} /A β_{total} generalment degut a un increment en els nivells d'A β_{42} tot i que també pot produir una disminució en els nivells d'A β_{40} o una combinació dels dos efectes. A més, aquestes mutacions produeixen un increment en l'acumulació de APPCTF i una disminució en l'AICD (revisat a De Strooper B., 2007).

El nostre grup ha demostrat que l'activitat γ -secretasa és necessària pel correcte processament de l'APP endògena (Yu et al., 2001). A més la inactivació de PS1 en un model de la malaltia d'Alzheimer transgènic d'APP disminueix l'acumulació d'A β i plaques d'amiloid, fet que demostra que PS1 juga un paper important en el desenvolupament de la patologia en d'AD (Saura et al., 2005).

* **Processament del receptor Notch per la PS/ γ -secretasa**

Notch és una proteïna transmembrana tipus I que actua com a receptor de membrana i que intervé en un gran nombre de processos cel·lulars, com ara l'especificació cel·lular, la diferenciació, la proliferació i la supervivència neuronal (Selkoe and Kopan, 2003). Notch (Notch 1-4, en mamífers) es sintetitza com a precursor i és processat a l'aparell de Golgi per una convertasa tipus furina generant dos fragments que es mantenen associats no covalentment, formant un receptor heterodimèric a la superfície cel·lular. La unió del lligand Delta o Jagged al receptor, ambdós ancorats a la membrana, produeix l'alliberació del domini extracel·lular de Notch per acció de la metal·loproteasa TACE (ADAM17).

Finalment, el processament del domini transmembrana per la γ -secretasa en el lloc E3 allibera el domini intracel·lular de Notch (NICD) que translocarà al nucli on s'associarà amb el factor de transcripció CSL activant la transcripció de diversos gens diana, entre ells els gens de la família HES (*Hairy/Enhancer of Split*) (De Strooper B. et al., 1999; Koo and Kopan, 2004) (Figura I-6).

2.4.2. Regulació de la via de senyalització de β -catenina

A més del seu important paper en el processament de proteïnes transmembrana, PS1 interacciona amb β -catenina modulant la via de senyalització de Wnt/ β -catenina (Zhang et al., 1998). En absència de PS1, es produeix una disminució de la ubiquitinació de β -catenina el que incrementa la seva estabilitat i la senyalització de la via de Wnt (Soriano et al., 2001). PS1 promou doncs la degradació de β -catenina i ho fa a través d'un mecanisme independent de la via de Wnt i de la seva activitat γ -secretasa (Soriano et al., 2001). S'ha proposat que presenilina actua com a proteïna adaptadora presentant β -catenina a PKA i GSK3, de manera que PKA fosforila β -catenina facilitant la subseqüent fosforilació per GSK3 dirigint-la a degradació proteosomal (Kang et al., 2002) (Figura I-6). Tanmateix, mecanismes alternatius per els quals PS1 pot regular la via de senyalització de β -catenina han estat també demostrats. Per una banda la forma no processada de PS1 interacciona, juntament amb plakoglobina, amb Tcf-4 segrestant-lo i evitant la seva acció necessària per a l'activitat transcripcional de β -catenina (Raurell et al., 2006; Raurell et al., 2008). A més PS1 afecta la senyalització de β -catenina a través d'un mecanisme depenent de l'activitat γ -secretasa. La proteòlisi de N- i E-cadherina per PS1 genera fragments intracel·lulars que desestabilitzen el cofactor transcripcional de β -catenina CBP (de l'anglès, *Creb Binding Protein*) (Raurell et al., 2008).

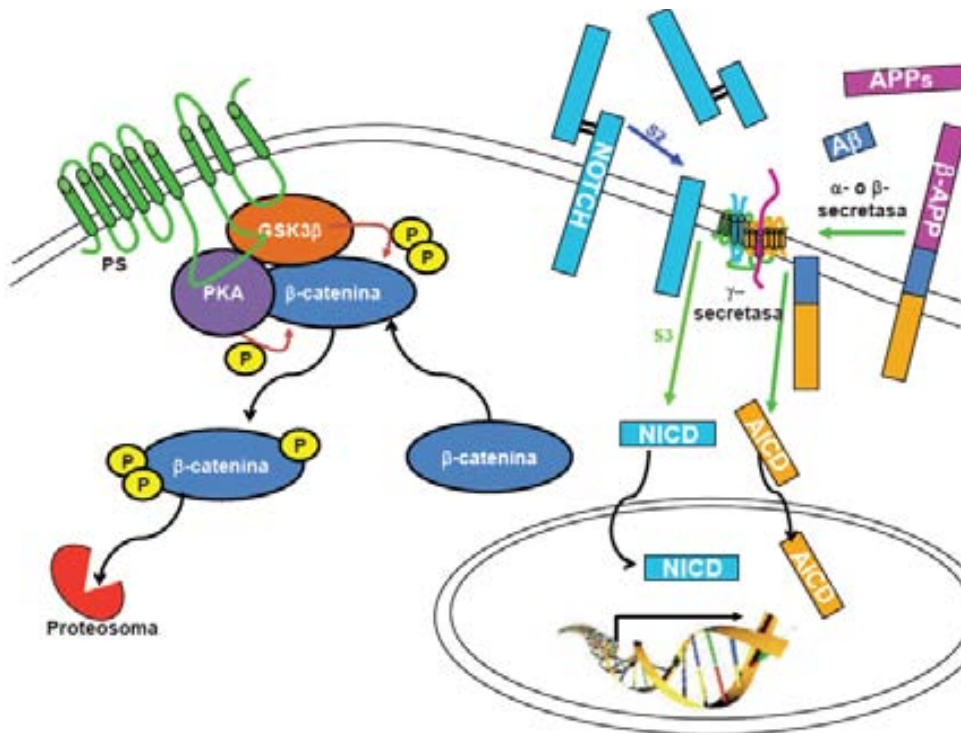


Figura I-6: Funcions de presenilina. PS/ γ -secretasa proteolitza proteïnes transmembrana tipus I alliberant un fragment citoplasmàtic que pot translocar al nucli activant transcripció gènica. En la proteòlisi de l'APP es produeix un tall inicial per la β -secretasa (BACE) generant un fragment C-terminal unit a la membrana que serà proteolitzat per PS donant lloc al pèptid β -amiloide i al fragment intracel·lular d'APP (AICD). L'APP també pot ser proteolitzat per α -secretasa (TACE) en el centre del domini A β situació en la que no es forma el pèptid A β . En el cas de Notch, la maduració del receptor en l'aparell de Golgi per una convertasa tipus furina produeix un receptor heterodimèric unit no covalentment (S1). La forma madura es localitza a la membrana plasmàtica i la unió d'un dels seus lligands induïx el tall per TACE alliberant un domini extracel·lular (S2) que induïx la proteòlisi en S3 alliberant el fragment intracel·lular de notch (NICD).

A més PS regula l'estabilitat de β -catenina en un mecanisme independent de la seva activitat γ -secretasa i de la via de Wnt. En aquest cas PS actua com a proteïna adaptadora facilitant que PKA i GSK3 fosforil·len β -catenina, fosforilacions que la dirigiran cap a una degradació proteosomal.

2.4.3. Regulació de tràfic intracel·lular de proteïnes

A part de la seva funció proteolítica, les presenilines regulen el tràfic cel·lular d'un gran nombre de proteïnes, tanmateix no es coneix el mecanisme pel qual es produeix aquesta regulació. Així, diversos laboratoris han observat una acumulació de l'APP i del seu fragment C-terminal en la membrana plasmàtica en cèl·lules deficientes en PS1 (Leem et al., 2002; Cai et al., 2003). També s'ha observat que la deficiència de PS1 produeix l'acumulació d'altres proteïnes com l'enzim tirosinasa, Notch, el receptor TrkB i nicastrina (Wang et al., 2006; Kaether et al., 2002; Naruse et al., 1998; Herreman et al., 2003), efectes que depenen de l'activitat γ -secretasa. Diversos membres del sistema de transport vesicular són substrats de PS (per exemple SorLA o sortilina) sent possible l'acumulació indirecta de les proteïnes esmentades.

De forma independent a l'activitat γ -secretasa, presenilina també regula el tràfic proteic de les syntaxines i membres de la família Rab (Smith et al., 2000; Suga et al., 2004; Scheper et al., 2004). Paral·lelament al desenvolupament del present treball, també s'ha descrit que presenilina regula la degradació lisosomal de l'EGFR (Zhang et al., 2007). Presenilina també regula la renovació de les vacuoles autofàgiques de forma independent a l'activitat γ -secretasa. S'ha descrit que PS1 interacciona i modula el tràfic de telencefalina afectant la maduració de les vacuoles autofàgiques (Esselens et al., 2004). A més, neurones deficientes en PS1 acumulen orgànuls de degradació que contenen α - i β -sinucleïna (Wilson et al., 2004).

2.4.4. Paper de la presenilina durant el desenvolupament neural embrionari i adult

La implicació clau de les presenilines en la malaltia d'Alzheimer va impulsar l'estudi de la seva funció fisiològica. Les PS tenen un paper essencial en el desenvolupament embrionari ja que l'absència de PS1 en ratolins produeix mort perinatal, fenotip degut a l'alteració de la via de Notch (Herreman et al., 1999;

Donoviel et al., 1999; Shen et al., 1997; Wong et al., 1997). Així, els ratolins PS1^{-/-} moren en estadis perinatals degut a defectes en l'esquelet, hemorràgies cerebrals i un increment en diferenciació neuronal (Shen et al., 1997). En canvi, els ratolins PS2^{-/-} mostren un desenvolupament normal (Herreman et al., 1999; Donoviel et al., 1999). La deleció postnatal de PS1 i PS2 el sistema nerviós central produeix pèrdua de memòria hipocampal i de plasticitat sinàptica en animals joves i neurodegeneració a edats més avançades (Saura et al., 2004). Així, aquests estudis han establert a les presenilines com a importants reguladores de supervivència neuronal i plasticitat sinàptica (Shen et al., 1997; Wong et al., 1997; Saura et al., 2004).

2.4.5. Paper de la presenilina en el desenvolupament de tumors

Degut a la letalitat embrionària produïda per la deleció completa de PS, s'han realitzat estratègies alternatives. La reintroducció de PS1 en el sistema nerviós central en ratolins PS1^{-/-} produeix ratolins totalment viables. Tanmateix, aquest ratolins desenvolupen a edats avançades diferents tipus d'alteracions epitelials, incloent hiperplàsia epidèrmica, hiperqueratosi i severos carcinomes escamosos (Xia et al., 2001; Li et al., 2007). Els ratolins PS1^{+/-}; PS2^{-/-} desenvolupen també a edats avançades (entre 6 i 18 mesos) alteracions epitelials, caracteritzades per hiperplàsia benigna, extremadament similar a la queratosi seboreica humana (Tournoy et al., 2004). Aquests efectes, produïts per l'absència de PS en pell, són atribuïts a una alteració de la senyalització de la β -catenina degut a l'increment de β -catenina citosòlica en l'epidermis (Xia et al., 2001; Tournoy et al., 2004). Tanmateix, treballs posteriors mostren que han d'existir mecanismes addicionals ja que l'estabilització de β -catenina produeix formació *de novo* de fol·licles pilosos (Gat et al., 1998) i pilomatricomes (Gat et al., 1998; Lo Celso et al., 2004), fenotip que no és observat quan PS1 és deleccionada. A més, un treball recent en el que es va utilitzar un ratolí amb deleció específica del domini citosòlic de PS1 d'unió a β -catenina ($\Delta E10$) no desenvolupa tumors epitelials (Deng et al., 2006).

Per una altra banda, l'aparició de tumors epitelials també s'observa en ratolins condicionals *knockout* en l'epidermis de Notch1^{-/-} i, sorprenentment, en aquests tumors també s'observa un increment en la via de senyalització de la β -catenina (Nicolas et al., 2003). El conjunt dels resultats descrits indiquen que la via de senyalització de Notch i β -catenina podrien interaccionar induint carcinogènesi epitelial, estant ambdós mecanismes implicats en el desenvolupament de tumors en absència de PS. Per tal d'estudiar el paper de presenilina en el desenvolupament de l'epidermis, Pan Y. *et al* va generar un ratolí amb una deficiència total de presenilina en tots els teixits derivats de l'ectoderm embrionari, entre ells la pell. Aquest model animal presenta una alteració en la finalització de la morfogènesi del fol·licle pilós, produïda segons els autors a una desregulació de la via de Notch (Pan et al., 2004). A causa de la prematura mort d'aquests ratolins no és possible observar si aquestes alteracions desemboquen en la formació de tumors epitelials. Així, el desenvolupament d'un model animal induïble amb deficiència total de presenilina específicament en pell seria necessari per estudiar les vies de senyalització regulades per les PS en carcinogènesi de pell.

De manera molt interessant, la transformació neoplàstica de Notch requereix la via de senyalització de ras/MAPK (Weijzen et al., 2002). Així, en *C.elegans* Notch i el receptor d'EGF cooperen antagònicament en processos de diferenciació i especificació cel·lular (Yoo et al., 2004). De fet, recentment s'ha proposat l'EGFR com a regulador negatiu clau de l'expressió gènica del receptor Notch1, tant en pell sana com en tumors de tipus escatós (Kolev et al., 2008).

Diversos treballs dels darrers anys impliquen les presenilines en la regulació de la via de senyalització de les proteïnes activades per mitògens (de l'anglès, MAPK). Paral·lelament al desenvolupament d'aquesta tesi doctoral, s'ha descrit que presenilina regula negativament els nivells del receptor d'EGF (EGFR) per un procés mitjançat per l'activitat γ -secretasa/PS a través de la regulació de la transcripció de l'EGFR per l'AICD (Zhang et al., 2007) o contràriament regulant la degradació de l'EGFR (Repetto et al., 2007). Actualment però no es coneix el paper que pot tenir la desregulació de l'EGFR en el desenvolupament de tumors

induïts per l'absència de PS ni els mecanismes moleculars pels quals presenilina regula els nivells de l'EGFR durant tumorigènesi epitelial.

3. RECEPTOR DEL FACTOR DE CREIXEMENT EPIDÈRMIC (EGFR)

Les cèl·lules de tots els organismes vius estan en contacte amb el seu entorn i responen a estímuls provinents d'aquest a través de receptors de membrana que transmeten senyals a l'interior de la cèl·lula. Els receptors de membrana es poden classificar en diferents famílies segons els lligands que reconeixen, les respostes biològiques que indueixen i la seva estructura primària. Una de les famílies més grans de receptors de membrana són aquells amb activitat tirosina cinasa intrínseca (RTK), els quals catalitzen la transferència d'un γ -fosfat de l'ATP a grups tirosina de proteïnes diana (Hunter, 1998). Els RTKs participen en el control dels principals processos cel·lulars implicats en la regulació del cicle cel·lular, migració cel·lular, metabolisme, supervivència, proliferació i diferenciació. Tots els RTKs tenen un domini extracel·lular d'unió al lligand connectat a un domini citoplasmàtic a través d'una única hèlix transmembrana. El domini intracel·lular conté una seqüència altament conservada amb activitat proteïna tirosina cinasa i altres seqüències reguladores que són sotmeses a autofosforilació i fosforilació per proteïnes cinasa heteròlogues (Schlessinger, 2000).

3.1. La família de receptors d'EGF

El receptor del factor de creixement epidèrmic (de l'anglès, EGFR) també anomenat ErbB1 o HER1, va ser el primer RTK descrit (Downward et al., 1984). Després del descobriment de l'EGFR es van caracteritzar els tres membres restants que conformen la família dels EGFR o ErbB: ErbB2 (Neu, HER2), ErbB3 (HER3) i ErbB4 (HER4). L'EGFR és una proteïna de 170 kDa formada per una cadena polipeptídica de 130 kDa unida per l'extrem N-terminal a oligosacàrids. Com tots els RTKs, l'EGFR i els altres membres de la família d'EGFR tenen un

domini extracel·lular d'unió a lligand unit a un domini intracel·lular amb activitat cinasa intrínseca. El domini extracel·lular de la família d'EGFR està format per quatre subdominis denominats domini I, II, III i IV. S'ha proposat que els dominis I i III formen el domini d'unió a lligand de l'EGFR mentre que els altres dominis extracel·lulars estan involucrats en la dimerització del receptor i interaccions amb altres proteïnes (Schlessinger, 2000).

Els lligands de l'EGFR són sintetitzats com a proteïnes transmembrana tipus I format per l'extrem C-terminal, el mòdul EGF (domini de 40 aminoàcids contenint sis cisteïnes altament conservades), un domini hidrofòbic transmembrana i una cua citoplasmàtica N-terminal. L'EGF és únic ja que posseeix nou mòduls EGF, tot i que únicament el mòdul adjacent a la membrana és funcional sent el que interacciona amb l'EGFR. És sintetitzat com a precursor, el qual és proteolitzat per metal·loproteases de la família ADAM i alliberat a la matriu extracel·lular donant lloc a la forma madura del lligand (Figura I-7).

Existeixen altres molècules amb estructura similar a l'EGF que formen una sola família de factors de creixement (revisat a Schneider and Wolf, 2009). Aquestes molècules són el factor de creixement transformant α ($TGF\alpha$), l'amfiregulina (AREG), l'EGF d'unió a heparina (HBEGF), la betacel·lulina (BTC) i el factor de diferenciació de neu o heuregulina (NDF/HRG) que conformen el grup de les neuregulines (NRG). L'EGF, el $TGF\alpha$ i AREG uneixen i activen únicament l'EGFR. NDF/HRG és el lligand de ErbB3 i ErbB4, mentre que HBEGF, BTC i l'epiregulina uneixen tant EGFR com ErbB4 (Wong and Guillaud, 2004). No s'ha descrit en canvi cap lligand natural pel receptor ErbB2 (Klapper et al., 1999) fet que fa que es consideri ErbB2 com a un correceptor (Figura I-7).

La unió del lligand al domini extracel·lular produeix la formació tant d'homodímers com d'heterodímers. La dimerització de l'EGFR té lloc únicament quan els dos monòmers estan ocupats per una molècula de lligand (EGF o $TGF\alpha$) (Schlessinger, 2002). Malgrat no tenir lligand propi conegut, s'ha descrit l'ErbB2 com el receptor preferent d'heterodimerització d'EGFR, ErbB3 i ErbB4, tot i que altres heterodímers són possibles (Graus-Porta et al., 1997). La formació d'aquests heterodímers potencia tant la senyal induïda pel lligand com l'activació de vies de

senyalització alternatives (Graus-Porta et al., 1997). Per una altra banda, ErbB3 és un receptor amb un domini cinasa no funcional (Guy et al., 1994), això fa que únicament pugui transmetre senyal en acomplexar-se amb un altre receptor formant heterodímers (Figura I-7).

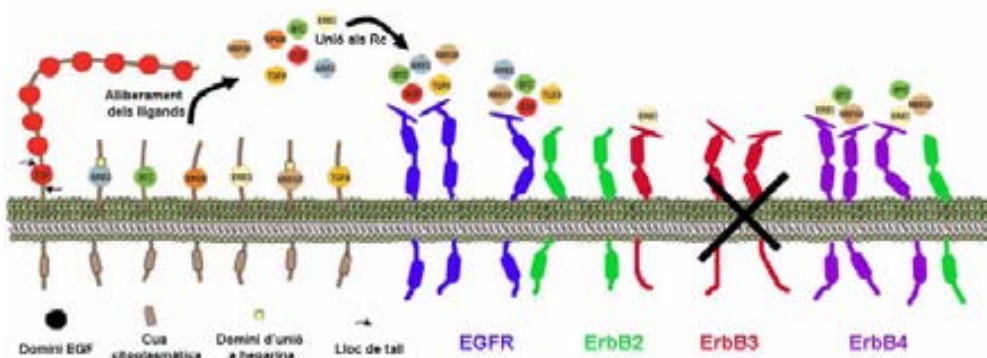


Figura I-7: Membres dels receptors de la subfamília d'ErbB i els seus lligands. Representació esquemàtica dels precursors de lligands de la família d'EGF ancorats a la membrana: factor de creixement epidèrmic (EGF), factor de creixement transformant α ($TGF\alpha$), l'EGF d'unió a heparina (HBEGF), amfiregulina (AREG), betacel·lulina (BTC), epiregulina (EREG) i epigenina (EPGN). Aquests es proteolitzen i s'uneixen als receptors corresponents, els quals dimeritzen formant homodímers i heterodímers. (Adaptat de Schneider and Wolf, 2009).

3.2. Vies de senyalització activades per l'EGFR

Després de la dimerització i activació de l'EGFR produïda per la unió d'EGF, l'EGFR s'autofosforila en els seus residus tirosina del domini citoplasmàtic. Aquestes tirosines fosforilades són residus d'alta afinitat per molècules que contenen dominis d'homologia src (SH2) que s'uniran al receptor activat actuant com a molècules de senyalització (Wong and Guillaud, 2004). L'especificitat de la senyalització vindrà determinada per les seqüències flanquejants a la fosfotirosina i residus variables del domini SH2 de la molècula de senyalització. Proteïnes amb domini SH2 que s'uneixen directament l'EGFR fosforilat són la fosfolipasa $C\gamma$ ($PLC\gamma$), Ras-GAP, Grb2, Nck, Shc i SHP-2 (Wong and Guillaud, 2004). La unió

d'aquestes proteïnes produeix l'activació de diferents cascades de senyalització que conduiran a la modulació d'activitat d'enzims i canvis en la transcripció gènica, i interaccionaran també amb les vies apoptòtiques prevenint la mort de la cèl·lula (Figura I-8).

L'activació d'una de les vies de senyalització més rellevants es produeix per la unió de Grb2 a l'EGFR fosforilat. Grb2 uneix el factor intercanviador de nucleòtids guanina (Sos). La unió del complex Grb2/Sos al receptor fosforilat a través del domini SH2 de Grb produeix l'activació de ras que fosforila raf1 (MAPKKK), que en conseqüència fosforilarà MEK1/2 (MAPKK) i aquest finalment fosforilarà ERK1/2 (MAPK). L'activació d'ERK1/2 produeix l'increment dels nivells de membres de la família Bcl-2 antiapoptòtics (Henson and Gibson, 2006) i activació de factors de transcripció implicats en proliferació com Elk-1 i c-myc (Wong and Guillaud, 2004) (Figura I-8).

Degut a l'absència en l'EGFR de domini d'unió a PIK3, l'EGFR a través d'altres proteïnes amb domini SH2 (ErbB3, Cbl i Gap1) recluta PIK3 (Wong and Guillaud, 2004). L'activació de PI3K indueix l'activació d'Akt/PKB que resulta en l'activació de diferents factors de transcripció anti-apoptòtics (NFκB, HIF-1α i CREB) i en la fosforilació de GSK-3β, mTOR, Ask-1, MLK-3 i Sek1/MKK4, produint en tots els casos un efecte anti-apoptòtic (Henson and Gibson, 2006) (Figura I-8). El tractament amb EGF també produeix l'activació de la via de senyalització JAK/STAT. L'EGFR activat recluta JAK i STAT, que condueix a la fosforilació de STAT per JAK el qual activa la seva activitat transcripcional.

Per una altra banda s'ha descrit que EGFR transloca al nucli on s'associa amb STAT3 cooperant en les seves funcions anti-apoptòtiques (Lin et al., 2001).

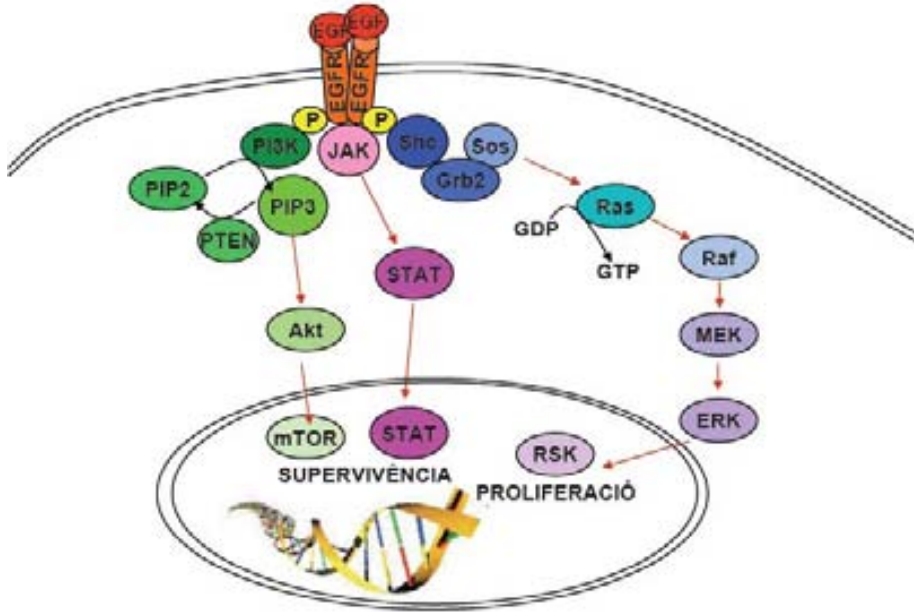


Figura I-8: Vies de senyalització activades per l'EGFR. La transactivació de l'EGFR produeix l'activació de a la via de senyalització PI3K/Akt i JAK/STAT, promovent la supervivència de la cèl·lula i l'activació de la via MEK/ERK, que indueix proliferació cel·lular.

3.3. Mecanismes de regulació de l'activitat de l'EGFR

3.3.1. Transcripció de l'EGFR

El gen de l'EGFR es localitza a la regió 7p12, té una llargada de 110 kb i està dividit en 26 exons (Haley et al., 1987). A l'exó 1 es troba una zona rica en CG que s'ha caracteritzat com el seu promotor. Aquest no té les típiques CAAT o TATA *box* i té múltiples llocs d'inici de transcripció i llocs d'unió per Sp1 (Ishii et al., 1985). De fet, la transcripció basal del gen de l'EGFR és regulada pel factor de transcripció Sp1 (Kageyama et al., 1988). A més, s'ha descrit un polimorfisme en el lloc d'unió per Sp1 (G216T) que ocasiona un increment en l'activitat del promotor del 30% (Liu et al., 2005). Variacions en el nombre de dinucleòtids CA de l'intró 1 ocasiona diferents nivells de transcripció en el pre-ARN, de manera que

una disminució en el nombre de repeticions es tradueix en una major expressió, tan *in vitro* com *in vivo* (Gebhardt et al., 1999; Buerger et al., 2000).

S'han identificat altres factors de transcripció que interaccionen amb el promotor, com per exemple AP-2 (Johnson et al., 2000) amb l'ADN polimerasa-I actuant com a cofactor (Mialon et al., 2005) o WT-1 (Englert et al., 1995). Egr-1 incrementa l'activitat del promotor de l'EGFR en condicions d'hipòxia (Nishi et al., 2002). Per altra banda, p53 activa l'activitat el promotor de l'EGFR, mentre que p63 o GC2 la reprimeixen (Ludes-Meyers et al., 1996; Rikiyama et al., 2003; Nishi et al., 2001).

3.3.2. Atenuació de la senyalització de l'EGFR: degradació i inactivació

La durada i intensitat de les senyals emeses per l'EGFR estan regulades per la seva desfosforilació i així com per la seva internalització i degradació. Les proteïnes tirosina fosfatasa (PTP) són les proteïnes encarregades de defosforilar un gran nombre de proteïnes regulant la seva activitat. Les PTPs clàssiques formen una gran família d'enzims transmembrana i no-transmembrana que comparteixen tots ells un domini catalític conservat que és específic per a la hidròlisi de la fosfotirosina (Tonks and Neel, 2001; Ostman and Bohmer, 2001). PTP1B s'ha descrit com la principal fosfatasa de l'EGFR, només defosforilant el receptor quan aquest és internalitzat (Haj et al., 2003; Ostman and Bohmer, 2001). Per una altra banda, la inactivació de la senyal es dona per l'endocitosi i degradació dels receptors activats i la inactivació de les molècules de senyalització associades. Aquests processos són essencials per evitar l'activitat constitutiva del receptor. En absència de lligand el receptor és internalitzat de forma molt similar al reciclatge basal de la membrana plasmàtica i reciclat de nou a la membrana, però la taxa de reciclatge és molt major de forma que en condicions basals la majoria del receptor es troba a la membrana (Wiley et al., 1991; Chang et al., 1993; Resat et al., 2003). Després de l'activació i dimerització de l'EGFR induïda per la unió del lligand, l'EGFR activat és ràpidament ubiquitinitzat i internalitzat normalment en vesícules de clatrina. Tanmateix, s'ha observat que la sobreexpressió o elevades

concentracions de lligand indueix internalització independent de clatrina (revisat a Sorkin and Goh, 2008).

La internalització de l'EGFR depèn de la unió a aquest de Grb2, el qual té un domini SH2 que uneix fosfotirosines d'EGFR i a través dels seus dominis SH3 acosta diverses proteïnes al receptor. Una de les proteïnes que interaccionen amb Grb2 més importants és la E3 ubiquitina lligasa Cbl (Levkowitz et al., 1998), oncogen caracteritzat a partir del virus ecotòpic Cas-Br-M rebent el nom de la malaltia que aquest ocasiona (*Casitas B-lineage Lymphoma*) (Langdon et al., 1989). Així, Cbl ubiquitinitza l'EGFR sent un pas necessari per l'endocitosi i degradació del receptor però no per a la seva internalització (procés d'ubiquitinització detallat al Panell 1). Aquest fet fa que sigui necessària la cerca de proteïnes implicades en la internalització a través del complex EGFR-Grb2-Cbl (revisat a Sorkin and Goh, 2008). Per exemple, Cbl recluta CIN85 i aquest al mateix temps interacciona amb un component regulador de les vesícules de clatrina, l'endofilina. Nombrosos reguladors de clatrina poden reconèixer l'EGFR activat, regulant així la formació de les vesícules de clatrina (AP-2, AP-180, Epsin, Eps15, Hip1) (Bache et al., 2004) (Figura I-9). Després de la internalització, les vesícules endocítiques sense cobertura de clatrina es fusionen amb els endosomes temprans gràcies al control per la GTPasa Rab5, la qual recluta efectors implicats en la fusió (Rabex5, EEA1) (Figura I-9). L'EGFR, encara dimeritzat, fosforilat, ubiquitinitzat i unit a Grb2-Cbl, serà alliberat als cossos multivesiculars (MVB). L'EGFR segueix senyalitzant en els endosomes temprans, i no és fins la seva transferència als MVB i la seva deubiquitinació que s'inactiva completament. Per aquest motiu, l'alliberament de l'EGFR als MVB és un pas crític en l'atenuació de la senyal induïda pel lligand (Bache et al., 2004). Aquells receptors que estiguin situats a la membrana més externa del cossos multivesiculars seran reciclats cap a la membrana plasmàtica (revisat a Sorkin and Goh, 2008) (Figura I-9). Lligands que uneixen el receptor amb menor afinitat, com el TGF α , presenten un major reciclatge cap a la membrana, fet que indica la importància de la dimerització, fosforilació i ubiquitinització sostinguda durant tot el procés de degradació.

El conjunt de la maquinària involucrada en l'alliberament dels receptors en els MVBs va ser descrit en estudis genètics de llevat, identificant més de 50 proteïnes implicades en el *sorting* vacuolar de proteïnes (Vps). La caracterització de 18 gens de la classe E de proteïnes Vps ha revelat que 10 d'aquests codifiquen per subunitats de complexes de *sorting* endosòmic necessàries pel transport (de l'anglès ESCRT) i les 8 restants codifiquen per a proteïnes relacionades amb aquests complexes. Els complexes ESCRT juguen un paper central en el *sorting* de proteïnes en MVBs a través del reconeixement d'ubiquitines (revisat a Slagsvold et al., 2006). Es creu que l'EGFR ubiquitinitzat interacciona amb dos proteïnes que contenen dominis d'unió a ubiquitina, Hrs i STAM1/2, que formen part del complex ESCRT-0. A continuació la subunitat Tsg101 (gen 101 de susceptibilitat a tumors) del complex ESCRT-I uneix Hrs transferint el receptor ubiquitinitzat a aquest darrer complex (Bishop et al., 2002; Babst et al., 2000). Tot i la importància del complex ESCRT-II en el *sorting* en MVB en llevats sembla ser que aquest complex no és necessari per la degradació de l'EGFR en mamífers (revisat a Slagsvold et al., 2006). Així, la subunitat Vps24 del ESCRT-III uneix el lípid endosomal fosfadidilinositol 3,5-bifosfat suggerint que el complex ESCRT-III uneix directament la membrana endosomal. Aquest complex recluta l'enzim deubiquitinitzador Doa4p, que probablement deubiquitinitzarà el receptor abans de ser degradat, podent així ser reciclada la ubiquitina (revisat a Slagsvold et al., 2006). Finalment els MVB es fusionen amb els lisosomes on l'EGFR serà degradat (Figura I-9). El proteosoma també està implicat en la degradació de l'EGFR, ja que tant la inhibició de la via proteosomal com la inhibició de la via lisosomal bloqueja la seva degradació (Longva et al., 2002). Així, la seva activitat és necessària per al tràfic del receptor jugant cert paper en l'alliberament de l'EGFR a l'interior dels MVB (Melikova et al., 2006; Longva et al., 2002).

A més, moltes altres proteïnes estan implicades en la regulació del receptor per exemple regulant l'activitat de Cbl. Sprouty2 així com un regulador de la GTPasa Cdc42, Cool-1, uneixen Cbl inhibint la seva activitat i en conseqüència disminuint la ubiquitinització del receptor (Wong et al., 2002; Rubin et al., 2003; Feng et al., 2006). També s'han descrit altres proteïnes que regulen la degradació de l'EGFR

sense afectar l'activitat de Cbl, com per exemple Yme1, Spartin i la tirosina cinasa associada a Cdc42 (ACK1) (revisat a Sorkin and Goh, 2008).

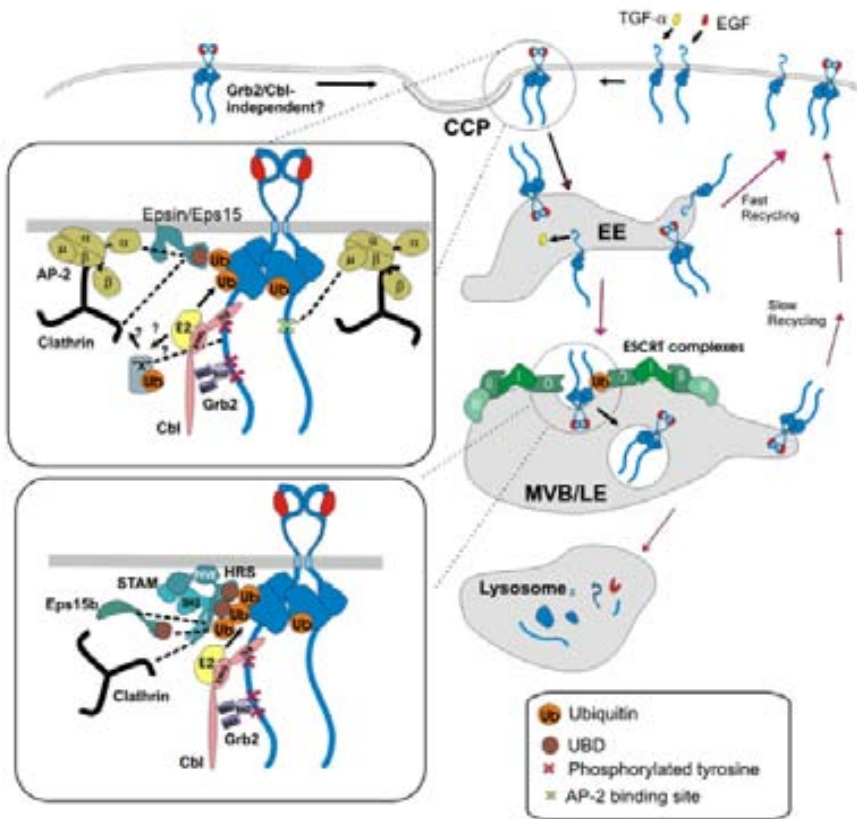
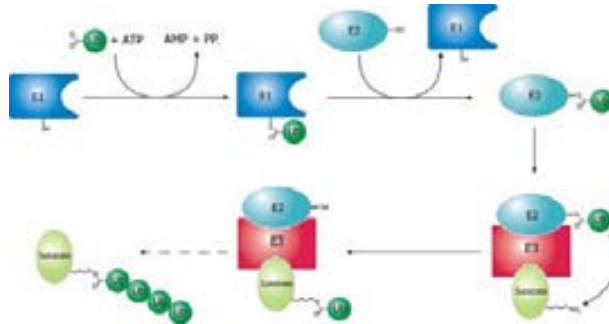


Figura I-9: Degradació de l'EGFR. La degradació de l'EGFR és el principal mecanisme d'atenuació de l'activació del receptor. La unió del lligand al receptor produeix la seva ràpida internalització i ubiquitinització, procés on l'activitat de Grb2 i Cbl és essencial. A continuació les vesícules endocítiques es fusionen amb endosomes temperans (EE) i aquests amb cossos multivesiculars (MVB), pas clau del procés ja que és en aquest moment on finalitza tota senyalització emesa pel receptor. Aquest procés de *sorting* és mitjançat per complexos ESCRT. Finalment els MVB es fusionen amb els lisosomes on serà degradat el receptor. (Extret de Sorkin and Goh, 2008).

PANEL·L 1: El procés d'ubiquitinització

La ubiquitinització, és a dir la transferència covalent d'una molècula d'ubiquitina (Ub) en un residu de lisina, té lloc en tres passos mitjançats per tres enzims diferents: l'activador d'ubiquitina (E1), el conjugador (E2) i la lligasa (E3). L'enzim E1 produeix l'activació de l'extrem C-terminal d'ubiquitina per ésser transferit a un grup amino del substrat, de manera que es forma una Ub-adenilada intermèdia que es conjuga a una cisteïna de l'enzim E1. A continuació es transfereix la ubiquitina a un residu de cisteïna de l'enzim E2. L'especificitat del procés ve donat per la lligasa E3, que reconeix i interacciona amb el substrat acostant-lo a l'enzim E2 que li transferirà la Ub.



Actualment distingim dos grans tipus d'E3 lligases: el sistema Skp1/Cullin/proteïna F-box (SCF) (Skowyra et al., 1997) i el complex promotor d'anafase/cyclosoma (APC/C) (King et al., 1995; Watt and Green, 1982; Sudakin et al., 1995). Els sistema SCF compren una gran família de E3 modulars que controlen la degradació d'una gran quantitat de substrats. Els complexes SCF contenen quatre subunitats: les subunitats invariables Skp1, Cull1 (també coneguda com a Cdc53), Rbx1 (també coneguda com a Roc1 o Hrt1) i una proteïna variable que conté domini F-box. Les subunitats Cull1 i Skp1 actuen com a nexes d'unió entre l'enzim E2 i el domini d'unió a substrat. La proteïna amb domini F-box confereix especificitat de substrat al complex SCF mitjançant la unió de la proteïna diana a degrons (seqüències consens) fosforilats a través de dominis WD40 (unitat que conté 40 residus amb triptòfan (W) i aspàrtic (D) en determinades posicions) o repeticions riques en leucines (LRRs). El tipus d'ubiquitinització determinarà el destí de la proteïna, de manera que la monoubiquitinització o multiubiquitinització produeix l'endocitosis de proteïnes de membrana mentre que la poliubiquitinització (addició d'una cadena llarga d'ubiquitines) és senyal de degradació proteosomal. A més, la ubiquitinització també juga un paper important en reparació de l'ADN i transcripció gènica (Haglund and Dikic, 2005; Kirkin and Dikic, 2007).

3.4. Paper fisiològic de l'EGFR

L'estudi de ratolins deficients en el gen de l'EGFR (EGFR^{-/-}) ha revelat un paper important d'aquest receptor durant el desenvolupament embrionari i post-natal. Aquests ratolins tenen un creixement retardat i moren a diferents estadis del desenvolupament depenent del seu *background* genètic (Threadgill et al., 1995; Sibilina and Wagner, 1995). Els ratolins EGFR^{-/-} que sobreviuen presenten importants alteracions en les estructures epitelials com la pell, fol·licles pilosos, ulls, intestins i pulmó, indicant que l'EGFR juga un paper important en la proliferació i diferenciació de cèl·lules epitelials (Sibilina and Wagner, 1995). A nivell del sistema nerviós central, els ratolins EGFR^{-/-} presenten una progressiva neurodegeneració en el còrtex frontal, bulb olfatori i tàlem, caracteritzada per una apoptosi massiva i un increment en l'expressió de *c-fos* (Sibilina et al., 1998). També s'observa un desordre en la migració cel·lular, ja que s'observen neurones ectòpiques en l'hipocamp de ratolins EGFR^{-/-}. Per altra banda, l'EGFR està involucrat en la proliferació i/o diferenciació dels astròcits i en la supervivència de les neurones postmitòtiques (Sibilina et al., 1998; Wagner et al., 2006).

A més, tots els receptors de la família ErbB estan implicats en el desenvolupament i proliferació de la glàndula mamària. Concretament, l'EGFR té un gran paper en el desenvolupament del conducte mamari (revisat a Olayioye et al., 2000).

Per tal d'evitar la letalitat embrionària i estudiar el paper de l'EGFR en l'adult *Sibilina et al.* ha generat un model *knock in* condicional en el que es va introduir el gen de l'EGFR humà flaquejat per seqüències loxP. Aquest ratolí presenta un creixement retardat però pot sobreviure fins a sis mesos després del naixement, s'observen alteracions en la pell i fol·licles pilosos similar als ratolins EGFR^{-/-}, així com una hipertròfia cardíaca i alteracions en les formacions òssies i de cartílag (Sibilina et al., 2003).

EGFR juga també un important paper en el desenvolupament hepàtic, ja que un ratolí amb deficiència en l'adult de l'EGFR específicament en hepatòcits presenta

alteracions en la regeneració hepàtica tot i que la funció i desenvolupament normal no es veu alterat (Natarajan et al., 2007).

3.5. Paper de l'EGFR en càncer

Nombrosos protooncogens codifiquen per a factors tròfics o els seus receptors així com per a molècules implicades en la seva senyalització, ja que afavoreixen els processos tumorals a través de diferents mecanismes (Normanno et al., 2006).

La implicació d'EGFR en el desenvolupament de càncer es va originar inicialment gràcies als estudis amb virus oncogènics ja que es va demostrar que l'EGFR és l'homòleg cel·lular de l'oncogen del virus eritroblastosi aviar v-erbB. Per una altra banda, la sobreexpressió de TGF α i/o ErbB2 en ratolins transgènics es va associar amb el desenvolupament anormal de la glàndula mamària i amb la formació de carcinomes espontanis (Sebastian et al., 2006).

La sobreexpressió d'EGFR en tumors cerebrals és molt freqüent, trobant-se mutat en un 40% dels gliomes i està associat a baix supervivència (Wikstrand and Bigner, 1998). L'expressió anòmala d'EGFR en tumors malignes humans es dona un 33-50% de múltiples tipus de tumors epitelials (Sebastian et al., 2006). L'increment de l'EGFR en diversos tipus de càncer humà (cap, coll, ovari, cèrvix, vesícula biliar, esòfag, gàstric, mama, endometri i colon) fa que sigui un bon indicador de diagnòstic en càncer (Nicholson et al., 2001). En tumors de pell escamosos l'EGFR es troba incrementat en un 90% dels casos i correlaciona amb un elevat risc de reaparició del tumor i relativa resistència al tractament (Rogers et al., 2005). En tumors benignes, com queratosi seboreica, l'EGFR es localitza en la membrana, mentre que en tumors malignes, com carcinomes de les cèl·lules basals o carcinomes cutanis de cèl·lules escamoses, hi ha una pèrdua del receptor en la membrana i una acumulació en el citoplasma (Groves et al., 1992). L'increment de l'EGFR en tumors epitelials es pot donar per varis mecanismes, incloent un increment de la expressió gènica, mutacions activadores, alteracions en el procés de dimerització, alteracions en l'endocitosi o una deficiència en la

funcionalitat de fosfatases (Sebastian et al., 2006). La implicació de l'EGFR en el desenvolupament de tumors de pell es fa palesa en un model animal transgènic que expressa sota el promotor de la queratina K5 una forma constitutivament activa de Sos. Aquest ratolí desenvolupa papil·lomes espontàniament, fenotip revertit en un *background* EGFR-/- (Sibilia et al., 2000).

Així, l'EGFR és una atractiva diana en la teràpia contra el càncer. Actualment s'utilitzen anticossos neutralitzats humanitzats (Cetuximab, Panitumumab, Trastuzumab) i petits compostos sintètics inhibidors de l'activitat tirosina cinasa (Erlotinib, Gefitinib) en el tractament de càncer colorectal, cutanis de cap i de coll, de pulmó, pàncrees i mama. El tractament amb Gefitinib en pacients amb elevats nivells d'EGFR produeix la millora únicament del 10% dels pacients tractats. L'anàlisi mutacional dels tumors d'aquests pacients mostra que la mutació somàtica T790M en el domini cinasa de l'EGFR confereix resistència al tractament. Aquests estudis revelen la importància de l'anàlisi de mutacions en l'EGFR pel correcte tractament dels pacients (revisat a Higashiyama et al., 2008).

4. FBW7

Tal com hem detallat anteriorment, l'enzim E3 ubiquitina lligasa és el responsable de reconèixer el substrat i permetre la ubiquitinització de proteïnes per l'enzim E2 sent proteïnes clau en controlar els nivells cel·lulars de les proteïnes diana. Fbw7 (*F-box* i *7* repeticions *WD*) és una E3 ubiquitina lligasa membre de la família SCF (Panell 1). Fbw7 va ser inicialment descrit en llevat, sent anomenat Cdc4 (Hartwell et al., 1973). Posteriorment va ser descrit l'ortòleg en *C. elegans* *Sel-10* (Hubbard et al., 1997) fet que va conduir a la descripció del gen en mamífers Fbxw7 o Fbw7.

El gen humà de Fbw7 està situat en la regió cromosòmica 4q32 abarçant aproximadament 210 kb i codifica per a tres transcrits produïts per *splicing* alternatiu anomenats Fbw7 α , β i γ (Spruck et al., 2002). Cada ARNm consisteix en un exó isoforma-específic unit a deu exons comuns a les diferents isoformes, que donen lloc a tres proteïnes diferents que difereixen en el seu extrem N-terminal sota el control de promotors independents (Spruck et al., 2002) (Figura I-10). Aquesta organització genòmica confereix a cada una de les isoformes la possibilitat d'ésser regulades diferencialment. La isoforma Fbw7 α s'expressa en teixits adults de forma ubiqüa i a uns nivells molt superiors que les isoformes β i γ , que s'expressen únicament en nivells elevats en cervell i múscle esquelètic (Spruck et al., 2002; Matsumoto et al., 2006). Així mateix, la localització subcel·lular de les diferents isoformes també varia: Fbw7 α es troba al nucleoplasma, Fbw7 β al citoplasma i Fbw7 γ al nuclèol (Kimura et al., 2003; Welcker et al., 2004) (Figura I-10).

Les tres isoformes comparteixen però una mateixa estructura proteica, formada per tres dominis diferents. El domini **F-box**, d'aproximadament 40 aminoàcids, recluta el SCF a través de la unió directa amb SKP1 (Bai et al., 1996). El domini **WD40**, responsable de la unió de Fbw7 al substrat, està format per vuit seqüències de repeticions WD40 que formen un hèlix- β de vuit fulles amb butxaques per a la unió a fosfo-degrons ben definides (Orlicky et al., 2003). Finalment, el **domini D**

facilita la dimerització de Fbw7 i és necessari per a la seva activitat (Welcker and Clurman, 2007) (Figura I-10).

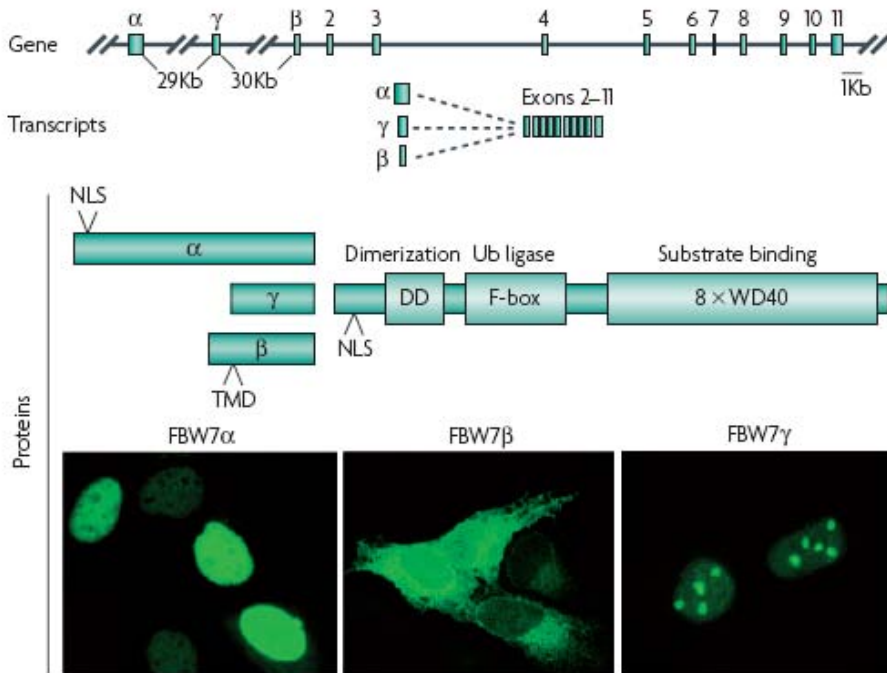


Figura I-10: Organització del gen i proteïna Fbw7: Fbw7 presenta tres isoformes diferents produïdes per *splicing* alternatiu. Totes les isoformes comparteixen tres dominis funcionals: les vuit repeticions WD40 que reconeixen el substrat, el domini F-box que recluta la resta de complex SCF i el domini de dimerització (DD). Les isoformes difereixen en el domini N-terminal, que conté les senyals necessàries per localitzar Fbw7 α al nucleoplasma (NLS), Fbw7 β al citoplasma i Fbw7 γ al nuclèol. Es mostra la localització de les tres isoformes sobreexpressades en cèl·lules U2O2. (Extret de Welcker and Clurman, 2008).

4.1. Mecanisme d'acció i substrats de Fbw7

L'especificitat de substrat d'una ubiquitina lligasa és el factor més important a tenir en compte en estudiar la seva regulació i activitat. Fbw7 reconeix epítops fosforilats anomenats CPD (*Cdc4 Phospho-Degron*), continguts en tots els substrats descrits fins al moment. La seqüència consens CPDs consisteix en una

treonina fosforilada immediatament seguida per una prolina, a més, es necessària una càrrega negativa (ja sigui per fosforilació o per residus aminoacídics) en posició +4 (Nash et al., 2001). Previ al reconeixement del substrat per Fbw7 és necessària la fosforilació de la treonina central per GSK3 β , tenint així un paper crucial en la degradació de proteïnes mitjançada per Fbw7. Així, la degradació de ciclina E requereix la fosforilació de T380 per GSK3 β , mentre que també s'ha descrit un paper important de la fosforilació de la S384 per CDK2 en la formació del CPD (revisat a Welcker and Clurman, 2008). Tanmateix s'ha observat que aquesta fosforilació és estrictament necessària pel reconeixement de Fbw7 β i Fbw7 γ , però que en el cas de Fbw7 α depèn de la estequiometria de Fbw7 α i ciclina E. Addicionalment s'ha descrit en la ciclina E un segon degrò que, tot i que sembla tenir un paper secundari, és necessari pel correcte funcionament de la ciclina E *in vivo* (revisat a Welcker and Clurman, 2008) (Figura I-11).

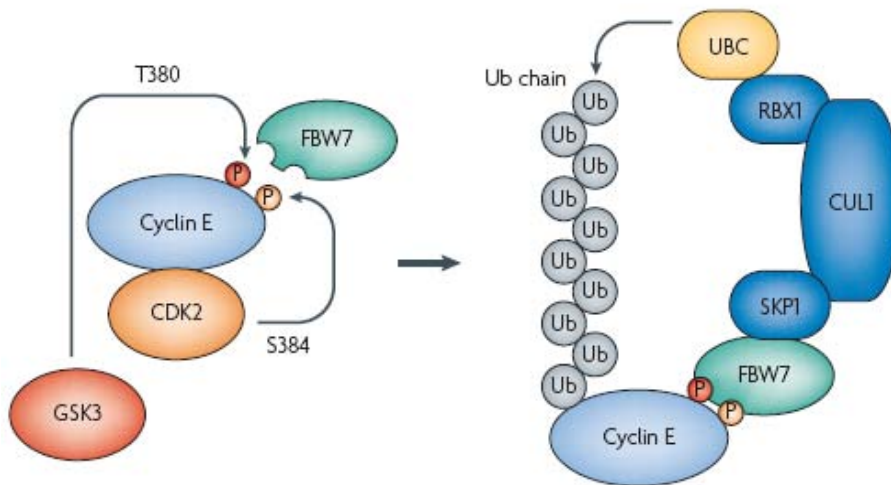


Figura I-11: Degradació de ciclina E dependent de la seva fosforilació. La fosforilació de ciclina E en la S384 (per CDK2) i en la T380 (per GSK3 β) genera un lloc d'alta afinitat per a la unió de Fbw7. Després d'unir-se, Fbw7 recluta el complex SCF que condueix a la ubiquitinització de la ciclina E senyalitzant-la per a la seva degradació proteosomal. (Extret de Welcker and Clurman, 2008).

Recentment s'ha descrit que Fbw7 forma dímers els quals són importants per la seva activitat (Welcker and Clurman, 2007). La importància de la dimerització en la regulació de la activitat ubiquitina lligasa de Fbw7 no ha estat encara elucidada, tanmateix es postula que tant la dimerització com la presència de múltiples CPD podria permetre diferenciar diferents mecanismes d'acció de Fbw7 i subdividir els substrats de Fbw7 en diferents grups (Welcker and Clurman, 2007).

Fbw7 contribueix a la degradació de diverses proteïnes, totes elles involucrades en proliferació i regulació del cicle cel·lular. La descripció del primer substrat de Fbw7, Sic1, va ser utilitzada com a paradigma per a la caracterització del sistema SCF (Feldman et al., 1997; Skowyra et al., 1997; Verma et al., 1997). Altres substrats de Fbw7 són Notch (Wu et al., 2001; Gupta-Rossi et al., 2001; Koepp et al., 2001; Strohmaier et al., 2001), c-myc (Welcker et al., 2004; Yada et al., 2004), Aurora A (Mao et al., 2004), c-jun (Nateri et al., 2004; Wei et al., 2005), SREBP (Sundqvist et al., 2005) i mTOR (Mao et al., 2008). En *C. elegans* s'ha descrit una interacció funcional de Fbw7 i PS1 (Wu et al., 1998). A més, s'ha descrit un increment de la ubiquitinització de PS quan SEL-10 és sobreexpressat (Li et al., 2002).

4.2. Funció biològica de Fbw7: gen supressor de tumors

Fbw7 és responsable de la degradació de múltiples oncoproteïnes, per la qual cosa s'ha considerat Fbw7 com un gen supressor de tumors. A més, la regió cromosòmica en la que es troba el gen Fbw7 es troba mutada en el 30% de càncers humans. L'evidència de que Fbw7 actua com a gen supressor de tumors ve donada per la presència de mutacions en el gen de Fbw7 en una gran varietat de tumors humans com limfoma i càncers de mama, d'endometri i colorectal (Rajagopalan et al., 2004; Spruck et al., 2002). Un treball recent, en el que s'ha dut a terme un extens estudi genètic de tumors de diversos teixits ha mostrat que Fbw7 es troba mutat de mitjana un 6% en el seu espai mostral, de les majors freqüències en destaca el càncer de conducte biliar (35%), leucèmia tipus T-ALL (31%), colon (9%), endometri (9%) i estómac (6%) (Akhoondi et al., 2007) corroborant estudis anteriors (Rajagopalan et al., 2004; Spruck et al., 2002;

Calhoun et al., 2003). La majoria d'aquestes mutacions es troben en el domini WD40, concretament en el lloc d'unió dels substrats. S'ha comprovat que les formes mutades de Fbw7 poden interferir en el correcte funcionament de la forma salvatge de Fbw7 actuant així com a dominant negatiu, probablement mitjançant dimerització (Akhoondi et al., 2007). Tot i les fortes evidències de que Fbw7 actua com a gen supressor de tumors, en la actualitat el mecanisme molecular exacte involucrat en el desenvolupament d'aquests càncers encara roman controvertit. Durant molt de temps s'ha considerat l'acumulació de ciclina E el principal factor responsable de el increment de proliferació i inestabilitat genòmica de cèl·lules deficientes en Fbw7 (Strohmaier et al., 2001). Tanmateix, ciclina E no es troba sempre elevada en absència de Fbw7 (Mao et al., 2004; Kwak et al., 2005), suggerint que Fbw7 contribueix a la degradació de ciclina E de forma context-depenent. Així, altres substrats com c-myc, c-Jun o Aurora A poden estar implicats en el mecanisme pel qual Fbw7 causa inestabilitat genòmica i càncer (Fujii et al., 2006). Ratolins amb completa deleció de Fbw7 moren el dia 10.5 de gestació a causa d'anormalitats en el sistema vascular degut a la desregulació de la via de Notch (Tsunematsu et al., 2004; Tetzlaff et al., 2004). Alternativament s'ha estudiat la deleció parcial de Fbw7 (Fbw7^{+/-}). Aquests ratolins mostren una major susceptibilitat a la formació de tumors induïda per irradiació, a més els tumors desenvolupats en aquests ratolins segueixen conservant l'al·lel salvatge, indicant que Fbw7 és un gen supressor de tumors haplosuficient (Mao et al., 2004). Una important àrea de recerca relacionada amb Fbw7 és la seva relació amb p53. Diversos estudis demostren que Fbw7 és una diana transcripcional directa de p53 (Kimura et al., 2003; Mao et al., 2004). La pèrdua de funció de p53 i de Fbw7 cooperen produint inestabilitat cromosòmica i tumorigènesi, de manera que en un context d'heterozigosi per p53 i Fbw7 no només s'accelera el procés de formació de tumors comparat amb ratolins p53^{-/-} si no que també canvia radicalment l'espectre de tumors desenvolupats, sent aquest majoritàriament d'origen epitelial (Mao et al., 2004; Perez-Losada et al., 2005).

OBJECTIUS

Els objectius d'aquest treball han estat:

- Caracteritzar diferències fenotípiques relacionades amb la transformació cel·lular entre fibroblasts control i deficients en ambdues presenilines (PS).
- Estudiar les bases moleculars implicades en el fenotip transformant de fibroblasts deficients en PS.
- Elucidar els mecanismes cel·lulars i bioquímics regulats per les PS i que intervenen en vies de senyalització implicades en proliferació cel·lular.
- Generar i caracteritzar fenotípicament un model murí condicional i induïble amb deleció específica de PS en pell (ePS cDKO).
- Analitzar la morfologia i vies de senyalització en tumors epitelials del model mutant ePS cDKO.

MATERIALS I MÈTODES

1. CULTIU CEL·LULAR

1.1. Línies cel·lulars

- **Fibroblasts immortalitzats embrionaris:** Fibroblasts de pell d'embrions de ratolins (MEF) control (PS1/PS2), deficients en presenilina 1 (PS1^{-/-}), en presenilina 2 (PS2^{-/-}) i en ambdues presenilines (PS^{-/-}) immortalitzats utilitzant l'antigen T SV40 (De Strooper et al., 1998; De Strooper et al., 1999). Aquestes línies van ser cedides pel Dr. B. De Strooper (University of Leuven, Bèlgica)
- **293T:** Variació de la línia cel·lular de ronyó humà embrionari (HEK 293) que conté l'antigen T SV40.
- Línia cel·lular **Phoenix Anfortòpica** cedida pel laboratori del Dr. Nolan, USA (<http://www.stanford.edu/group/nolan/>).
- Fibroblasts d'embrions de ratolins **Fbw7 f/f** (Onoyama et al., 2007) cedits pel Dr. A. Balmain (University of California San Francisco, USA)
- Línia cel·lular de queratinòcits **C5N** (Linardopoulos et al., 1995) infectada amb *stocks* retrovirals pSuper o pSuper siFbw7 (Mao et al., 2004). Aquestes línies van ser cedides pel Dr. A. Balmain (University of California San Francisco, USA).

1.2. Material de cultiu cel·lular

- Medi de cultiu: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Sigma Aldrich D5796) suplementat amb 2 mM glutamina, 0.25 mg/ml penicil·lina i streptomicina) i 0-10% de sèrum boví fetal (Gibco). En les cèl·lules MEF PS1/PS2, MEF PS1^{-/-}, MEF PS2^{-/-}, MEF PS^{-/-} es va utilitzar 0.2 mg/ml geneticina (G418; Gibco) com antibiòtic de selecció.
- Tampó fosfat salí (PBS, 1x): 136.8 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.8 mM NaH₄PO₄, 1.47 mM K₂HPO₄, pH 7.4.

- Tripsina-EDTA (Gibco), Dimetilsulfòxid (DMSO; Sigma) i altres reactius químics obtinguts de Sigma.

1.3. Manteniment de les cèl·lules

Totes les línies cel·lulars es van créixer en medi de cultiu a 37°C en una atmosfera humida amb 5% CO₂. Les cèl·lules es van subcultivar dos cops per setmana (dilució 1:20) seguint el següent procediment. Previ rentat amb PBS a 37°C, es va afegir 0.25% tripsina-EDTA i es va incubar a 37°C durant 3 minuts. La reacció es va aturar amb medi de cultiu descartant les cèl·lules no necessàries pel manteniment de la línia.

Per conservar les cèl·lules a llarg termini es van tripsinitzar les cèl·lules, es van centrifugar (1000 rpm, 5 min) i es van ressuspendre en 4.5 ml per placa de 75 mm de medi de congelació (50% FBS, 40% DMEM i 10% DMSO). La suspensió cel·lular es va transferir a tubs de congelació prèviament rotulats. Les alíquotes es van conservar a -80°C durant 2 setmanes i després van ser transferides al tanc de nitrogen líquid.

1.4. Proliferació cel·lular

Pels experiments de proliferació es van sembrar 100000 cèl·lules MEF per placa de 60 mm en medi que contenia 1% FBS. En els experiments d'inhibició de la proliferació, es van sembrar 200000 cèl·lules en medi de cultiu contenint 0.1% FBS en plaques de 60 mm, a les 24 hores es va afegir medi nou que contenia DMSO o un inhibidor específic dels receptors EGFR (PD168393; 2µM; Calbiochem) o FGFR (SU5402; 10µM; Calbiochem). Les cèl·lules es van cultivar en aquestes condicions durant 48 hores. El número de cèl·lules per placa es va determinar cada 24 hores utilitzant una càmera de Neubauer. Els experiments de proliferació van ser realitzats com a mínim per triplicat.

1.5. Formació de colònies en medi semi sòlid

En primer lloc es van preparar plaques de 60 mm amb una base sòlida de 3 ml de medi DMEM suplementat amb 10% FBS i 0.5% agar. A continuació, es van sembrar 15000 cèl·lules per placa en 3 ml de medi DMEM suplementat amb 10% FBS i 0.35% agar. Per obtenir aquestes solucions es va utilitzar medi DMEM (2x, Sigma) suplementat amb 20% de FBS, antibiòtics i glutamina i es va mesclar a parts iguals amb una solució al 0.7% o 1% d'agar. En els experiments d'inhibició del receptor d'EGF, les cèl·lules es van incubar en presència de l'inhibidor PD 168393 (2 μ M; Calbiochem) durant 24 hores previ a ser sembrades en agar. A més, tant l'agar base com l'agar superior contenien l'inhibidor de l'EGFR. Les plaques es van mantenir a 37°C durant 15 dies i passat aquest temps el número total de colònies de cada placa van ser quantificades.

1.6. Transfecció cel·lular i generació de línies cel·lulars estables

Pels experiments de transfecció, es van sembrar 400000 cèl·lules per placa de 60 mm i es van mantenir a 37°C durant 24 hores. La transfecció es va realitzar utilitzant la tècnica de formació de liposomes mitjançant el reactiu Lipofectamina2000 (Invitrogen). Els complexos ADN-liposoma es van formar incubant durant 20 minuts 2 μ l de lipofectamina per cada microgram d'ADN en 500 μ l de medi OptiMEM (Gibco) suplementat amb glutamina (2 mM). Previ rentat amb PBS i addició de 2.5 ml d'OptiMem/Gln per placa, es va dispensar la mescla a les plaques i es van mantenir a 37°C durant 3 hores. Passat aquest temps es va substituir el medi de transfecció per medi de cultiu i es van incubar 24-48 hores a 37°C abans de la seva lisi.

Per a la generació de línies cel·lulars estables per PS1 es van transfectar durant 24h amb els plàsmids pAG3Zeo o pAG3Zeo-hPS1 on la PS1 humana va ser clonada en el lloc HindIII. Les cèl·lules es van seleccionar amb zeosina (0.4 mg/ml, Invivogen) durant 14 dies abans de l'anàlisi de *pools* cel·lulars tal com s'ha descrit prèviament (Saura et al., 2000).

1.7. Cultiu primari de queratinòcits

1.7.1. Material utilitzat

- **Medi HCM:** EMEM sense calci (LONZA) contenint 8% sèrum boví fetal, 1% antibiòtic/antimicòtic (Invitrogen) afegint CaCl_2 fins a 0.6 mM.
- **Medi EMEM.06:** EMEM sense calci (LONZA) contenint 8% sèrum boví fetal sense calci, 1% antibiòtic/antimicòtic (Invitrogen) afegint CaCl_2 fins a 0.06 mM.
- **Medi-N:** 50% medi EMEM.06 i 50% medi condicionat de fibroblast suplementat amb 2 ng/ml d'EGF, 0.4 ug/ml hidrocortisona (Sigma Aldrich), 0.75 mM aminoguanidin nitrat (Sigma Aldrich) i 10^{-10} M de toxina del còlera (Biomol).
- **Medi KGM.15:** Medi de creixement de queratinòcits (KGM; Bullet Kit without Ca^{2+} ; Cambrex Bioscience). S'afegeix CaCl_2 fins a obtenir 0.15 mM Ca^{2+} .
- Medi de congelació baix en calci: 20% FBS sense calci, 8.8% DMSO en EMEM sense calci.
- Solució de col·lagenasa: 0.35% col·lagenasa crua tipus I (Sigma Aldrich) dissolta en medi M199 (Invitrogen).
- cFBS (FBS quelat): Per a quelar el calci del FBS es van utilitzar 20 g de resina d'intercanvi iònic Chelex 100 (Biorad) per cada 100 ml de FBS. Per a equilibrar la resina es va rentar dos cops amb aigua MiliQ i PBS ajustant el pH a 7.4. Es va incubar el FBS fred en agitació durant 1 hora en la foscor i a 4°C. Finalment, es va filtrar amb un filtre 0.22 μm , es va al·liquotar i congelar a -20°C fins el seu ús.

1.7.2. Procediment

La obtenció de queratinòcits es va realitzar tal com prèviament s'ha descrit (Pirrone et al., 2005; Hager et al., 1999), utilitzant cries de ratolí d'un o dos dies de vida. Es van sacrificar per decapitació amputant les extremitats i la cua (reservant una part per a genotipar) i es va retirar la pell del tronc del coll cap a la cua d'un sol

tros. La pell es va rentar 3 cops amb PBS sense Ca^{2+} i Mg^{2+} amb 1% antibiòtic/antimicòtic. Les pells es van allisar en paper de filtre estèril situat en una placa de Petri amb el cantó dèrmic cap a baix i es van incubar tota la nit a 4°C en tripsina 0.25% (Gibco).

Al dia següent, l'epidermis es va separar de la dermis amb pinces estèrils: l'epidermis és brillant i transparent mentre que la dermis és vermella, relativament gruixuda i opaca. Per a l'obtenció de fibroblasts per tal d'obtenir medi condicionat, la **dermis** trossejada es va incubar amb solució col·lagenasa durant 30 minuts a 37°C . A continuació la suspensió cel·lular es filtrà utilitzant una malla estèril i es centrifugà a 200 g durant 5 minuts. El sobrenedant es va ressuspendre i les cèl·lules es van sembrar en flascons en medi HCM, incubant-les a 5% CO_2 i 37°C . A les 24 h, quan els fibroblasts es trobaren a 60-80% de confluència, es van rentar dos cops amb PBS per eliminar restes de calci i s'afegiren 30 ml de EMEM.06 a cada flascó incubant-lo durant 48 h. Passat aquest temps es recollí el medi, es filtrà, s'aliquotà i es congelà a -20°C .

L'**epidermis** es situà en un tub amb EMEM.06 agitant fortament 50 cops. A continuació les cèl·lules es van centrifugar a 200 g durant 5 min i es van retirar els trossos grans d'epidermis. Finalment, el pelet cel·lular es va ressuspendre amb una pipeta de plàstic en medi-N sembrant les cèl·lules en plaques cobertes amb col·lagen tipus IV ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; Sigma Aldrich). Després d'incubar-les 24 hores a 37°C i 5% CO_2 , es va canviar el medi i un altre cop cada 3 dies.

Passat aquest temps les cèl·lules es **diferenciaren** o **subcultivaren** per a mantenir el cultiu cel·lular.

Per a **subcultivar** les cèl·lules, després d'un rentat amb PBS les cèl·lules s'incubaren amb 0.25% de tripsina durant 6-8 minuts a 37°C , s'afegí EMEM.06 i es centrifugà la suspensió cel·lular plaquejant les cèl·lules en medi-N. Alternativament les cèl·lules es poden congelar en medi de congelació baix en calci. Per a **diferenciar**, s'incubaren les cèl·lules amb medi KBM.15 suplementat amb ClCa_2 (0.25 mM).

1.7.3. Tractament de queratinòcits amb 4-hidroxitamoxifé

Per tal d'induir la deleció de presenilina 1 en queratinòcits, en el mateix moment de la diferenciació es va afegir 4-hidroxitamoxifé (OHT: 200nM; Sigma) o vehicle (etanol) incubant les cèl·lules a 37°C durant 72h, realitzant a continuació l'experiment corresponent.

2. RATOLINS CONDICIONALS *KNOCKOUT* DE PS1/PS2 EN PELL (ePS cDKO)

2.1. Generació de ratolins ePS cDKO

Per tal d'investigar l'efecte de la deleció total de PS en pell varem generar un model de ratolí induïble amb deficiència de PS1 i PS2 específicament en pell. Per a la generació d'aquest model es va creuar un ratolí contenint el gen endogen de PS1 flanquejat per dues seqüències lox-P (PS1f/f) amb absència de PS2 (PS2-/-) (Saura et al., 2004) amb un ratolí transgènic que expressa el gen de la Cre recombinasa sota el promotor de queratina K14 induïble per tamoxifè (K14-ER^{T2}) (Li et al., 2000). Els descendents PS1f/f; PS2+/-; K14-Cre-ER^{T2} van ser creuats amb PS1f/f; PS2-/- per obtenir ratolins control PS1f/f; PS2+/- i ratolins PS1f/f; PS2-/-; K14-Cre-ER^{T2} (ePS cDKO). Els ratolins resultants tenen un fons genètic mixt, ja que els ratolins PS1f/f; PS2-/- són C57BL6/129 i els ratolins K14-Cre-ER^{T2} són C57BL/6.

2.2. Tractament dels ratolins ePS cDKO amb 4-hidroxitamoxifé

Per tal de deleccionar condicionalment el gen de PS1 en epidermis es van tractar els animals amb 4-hidroxitamoxifé (OHT, Sigma Aldrich) amb administració intraperitoneal i administració tòpica.

Tal com s'ha descrit prèviament (Indra et al., 1999), per a l'administració intraperitoneal es va afegir etanol absolut al OHT en pols per tal d'obtenir una suspensió de 100 mg/ml, a continuació es va preparar una solució 10 mg/ml

afegint oli de gira-sol autoclavat. La solució es va sonicar durant 30 minuts. Ratolins de 1.5-2 mesos d'edat van ser injectats amb 100 µl de solució (contenint 1 mg de OHT o únicament vehicle) durant tres dies consecutius. Per a l'administració tòpica de OHT es va afaitar amb una rasuradora de cabell la part posterior de ratolins de 1.5 mesos d'edat i es va aplicar mitjançant l'ús d'una pipeta 100 µl d'una solució 10 mg OHT/ml acetona o vehicle durant tres dies consecutius. En ambdós casos es van supervisar els animals diàriament aplicant el protocol de supervisió de benestar animal "*Regulació de les vies de transducció de senyals dependents de les presenilines en càncer de pell*" aprovat pel comitè d'ètica d'experimentació animal i humana de la UAB (CEEAH, Número 601) i pel Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya (Número d'ordre 3594) sota la tutela del Dr. Carles Saura Antolín.

2.3. Generació de cèl·lules que retenen el marcatge (LRC)

Per a marcar cèl·lules LRC es van injectar intraperitonealment cries de ratolí de 10 dies d'edat amb 50 mg/kg de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU; Sigma Aldrich) cada 12 hores durant dos dies consecutius. Es van recollir les mostres 70 dies després de la darrera injecció.

3. MÈTODES BIOQUÍMICS

3.1. Tractaments farmacològics de les cèl·lules en cultiu

Pels diferents tractaments farmacològics, les cèl·lules PS1/PS2 i PS-/- van ser sembrades una densitat de 400000 cèl·lules per placa en plaques de 60 mm durant 24 hores a 37°C. Els tractaments que es van dur a terme són els següents:

- **Tractament amb factors tròfics:** després de 24 hores es va procedir a deprivar les cèl·lules de sèrum durant 3 h. A continuació les cèl·lules van ser tractades amb medi que contenia EGF recombinant (hEGF: 150 ng/ml, R&D) o IGF (50 ng/ml, Sigma Aldrich) durant 0, 5, 15 i 30 minuts a 37°C.

- **Tractament amb cicloheximida (CHX):** Les cèl·lules es van sembrar com s'ha indicat anteriorment. Després de 24 hores les cèl·lules van ser incubades amb medi que contenia cicloheximida (25 µg/ml; Applichem) amb o sense EGF (150 ng/ml) a 37°C durant 0, 1, 3, 6, 12, 24 i 48 hores.
- **Inhibició proteosomal (lactacistina) i lisosomal (NH₄Cl):** Les cèl·lules van ser deprivades de sèrum durant 12 hores i pre-incubades amb NH₄Cl (10 mM) durant 10 min o lactacistina (50 µM, SIGMA) durant 1 hora a 37°C. A continuació, es va afegir al medi cicloheximida (25 µg/ml) amb o sense hEGF (150 ng/ml). Les cèl·lules es van incubar a 37°C durant els senyalats temps abans de la seva lisi.
- **Inhibició de l'activitat γ-secretasa:** Les cèl·lules crescudes durant 24 hores es van incubar amb l'inhibidor reversible de l'activitat γ-secretasa DAPT (1 µM, Sigma Aldrich) durant 6, 12 i 24 hores.
- **Detecció de l'EGFR ubiquitinatzat:** Les cèl·lules crescudes durant 48 hores van ser deprivades de sèrum durant 2 hores a 37°C. A continuació es van incubar amb DMEM (mostra control) o DMEM/EGF (150 ng/ml) a 4°C durant 15 minuts per tal de permetre que el lligand s'uneixi al receptor i evitant la internalització del receptor. Les cèl·lules es van lisar (temps zero) o es va retirar el medi, es van rentar amb PBS dos cops i es va afegir medi fresc sense EGF amb posterior incubació de les cèl·lules a 37°C durant 10, 30 minuts. Els lisats obtinguts es van utilitzar per realitzar immunoprecipitació contra ubiquitina.

En tots els casos, el tractament va ser aturat posant les plaques ràpidament a 4°C, rentant amb PBS fred (2 cops) i lisant les cèl·lules amb tampó de lisi RIPA-Doc fred.

3.2. Co-Immunoprecipitació

Pels experiments d'immunoprecipitació es va incubar el lisat cel·lular (500 µg de proteïna) amb l'anticòs purificat (5-10 µl) en un volum final de 600 µl durant 2 hores o tota la nit a 4°C en agitació circular. A continuació es va afegir 30 µl de

proteïna G (Pierce) per anticossos monoclonals i proteïna A (Pierce) per anticossos policlonals durant 2 hores o tota la nit a 4°C en agitació circular. Els immunocomplexes es van aïllar centrifugant els tubs a 4000 rpm durant 3 minuts a 4°C, el sobrenedant es va descartar i es va afegir de nou tampó de lisi. La mostra es va rentar durant 10 minuts a 4°C en agitació circular per tal d'eliminar possibles unions inespecífiques i es va tornar a centrifugar realitzant dos rentats més amb tampó de lisi 0.5% i 0.1% NP40. El pelet es va ressuspèndre en 25 µl de tampó d'electroforesi 2x.

Tampó de lisi per a immunoprecipitació: 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% NP40, 1mM PMSF i inhibidors de fosfatases (Sigma Aldrich) i proteases (Complete, Roche).

3.3. Biotinació de proteïnes de membrana

Per tal d'evitar la internalització de proteïnes de membrana les cèl·lules van ser rentades amb PBS-Ca-Mg (1 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂, pH 7.4) fred. Les cèl·lules es van incubar a 4°C durant 30 minuts amb PBS-Ca-Mg contenint *sulfo-NHS-Biotin* (0.25 mg/ml Pierce) i es va aturar la reacció mitjançant la incubació durant 10 minuts a 4°C amb Glicina 10 mM en PBS-Ca-Mg. Les cèl·lules es van rentar amb PBS, es van lisar i homogeneïtzar amb tampó RIPA-Doc i centrifugar durant 10 minuts a 2000 rpm a 4°C.

Igual quantitat de proteïna va ser incubada amb *ImmunoPuro Immobilized Streptavidin* (Pierce) durant tota la nit a 4°C en rotació. El dia següent, les mostres es van centrifugar a 4000 rpm a 4°C durant 4 minuts aïllant els complexos formats. Després de tres rentats amb tampó de lisi RIPA-Doc es van ressuspèndre en tampó d'electroforesi dos cops concentrat i es van resoldre les proteïnes per SDS-PAGE electroforesi.

3.4. Electroforesi i Western Blot

3.4.1. Lisi cel·lular i determinació de proteïna

Les cèl·lules en cultiu es van rentar dues vegades amb PBS (1x) fred i a continuació van ser lisades en tampó de lisi RIPA-Doc fred contenint inhibidors de proteases i fosfatases. A continuació els lisats cel·lulars van ser sonicats durant 15 segons amb un sonicador (potència 30%). La concentració proteica del lisat cel·lular va ser determinada pel mètode BCA (Pierce), per tal de poder carregar la mateixa quantitat de proteïna a cada carril del gel d'electroforesi.

Tampó de Lisi RIPA-Doc: 50 mM Tris base pH 7.4, 150 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 1% NP40, 0.5% deoxicolat de sodi, 0.1% SDS, 1mM Na₃VO₄, inhibidors de proteases (Complete, Roche), inhibidors de fosfatases (Sigma).

3.4.2. Electroforesi en gels d'acrilamida i transferència

Els lisats proteics es van diluir amb tampó de càrrega (3X) i es van escalfar a 60°C durant 5 minuts. Es va incloure un marcador de pes molecular (Invitrogen, ref. 10748-010) per tal d'identificar correctament les proteïnes resoltes. Les proteïnes van ser separades per electroforesi en gels d'acrilamida (PAGE) del 7.5-12.5%. En finalitzar l'electroforesi, les proteïnes van ser transferides en tampó de transferència 1x que contenia 10% metanol (Baker) a membranes de PVDF (Bio-Rad) prèviament activades amb metanol a 110 V durant 1h. En finalitzar la transferència les membranes van ser tenyides amb solució de Ponceau's (Fluka) i destenyides amb aigua destil·lada.

3.4.3. Detecció de proteïnes pel mètode de Western Blotting

Les membranes de PVDF es van bloquejar amb solució de bloqueig durant 30 minuts a temperatura ambient per evitar unions inespecífiques i seguidament es van incubar amb l'anticòs primari (taula M1) diluït en tampó d'anticòs. A continuació es van realitzar 3 rentats de 10 minuts amb PBS-Tween 0.05% (PBS-T) i la membrana es va incubar amb l'anticòs secundari ant-conill, anit-ratolí o anti-cabra (1:3000, BioRad) diluït en tampó de bloqueig durant 45 minuts a

temperatura ambient. Finalment es van realitzar 3 rentats de 10 minuts amb PBS-T i es va procedir a la visualització de les proteïnes utilitzant el reactiu de quimioluminescència *Western Lighting plus-ECL* (PerkinElmer).

En determinats casos va ser necessari visualitzar dues bandes en un mateix rang de pes molecular. Per a poder-ho realitzar, es va incubar la membrana en tampó de *Stripping* durant 20 minuts a 55°C en agitació. Passat aquest temps es va rentar la membrana exhaustivament amb PBS i es va tornar a iniciar el Western blot.

Reactius i solucions:

- **Tampó d'electroforesi SDS-PAGE (10x):** 250 mM Tris Base, 2 M Glicina, 1% SDS, pH 8.3
- **Tampó de transferència (20x):** 200 mM Tris base, 2 M glicina , pH 8.3
- **Solució de bloqueig:** 10 % de llet sencera, 0.1 % BSA en PBS, pH 7.4.
- **Tampó d'anticòs:** PBS (pH 7.4), 0.1 % BSA i 0.02 % timerosal.
- **Tampó de càrrega (1x):** 62.5 mM tris HCl (pH 6.8), 10 % Glicerol, 2% SDS, 5% mercaptoetanol (β ME) i 0.01% blau de bromofenol.
- **Tampó de *Stripping*:** 62.5 mM tris base (pH 6.8), 2% SDS i 0.7% β ME.

Taula M1- Anticossos primaris utilitzats

Anticòs	Casa Comercial	Ref.	Hoste	Dilució i aplicació		
				WB	IF	IHQ
β -actina	Sigma	T7816	Ratolí	1:100000	-	-
β -catenina	Sigma	C2206	Conill	1:3000	-	1:1000
α -tubulina	Sigma	T9026	Ratolí	1:100000	-	-
APP-CTF	Saeko	-	Ratolí	1:7500	-	-
BrdU	Abcam	ab6326	Rata	-	-	1:500
Cicina E	Sta. Cruz Biotech.	sc-481	Conill	1:750		

Anticòs	Casa Comercial	Ref.	Hoste	Dilució i aplicació		
				WB	IF	IHQ
Cleaved Notch1 (Val1744)	Cell Signaling	2421	Conill	1:750	-	-
c-Myc	Sta. Cruz Biotech.	sc-40	Ratolí	1:1000	-	-
E-cadherina	Sta. Cruz Biotech.	sc-7870	Conill	1:1000	-	-
EGFR	Sta. Cruz Biotech.	sc-03	Conill	1:1500	1:250	1:100
EGFR	Upstate	06-847	Conill	1:2000	-	-
ErbB2	Sta. Cruz Biotech.	sc-284	Conill	1:1.500	-	-
ErbB3	Sta. Cruz Biotech.	Sc-285	Conill	1:1500	-	-
ERK1/2	Cell Signaling	9102	Conill	1:1000	-	-
Fbw7	Abcam	Ab12292	Conill	1:2000	1:250	1:250
FLAG	Sigma	F3165	Ratolí	1:5000	-	-
p-c-Raf (Ser 338)	Cell Signaling	9421	Conill	1:1000	-	-
p-EGFR (Tyr 1068)	Cell Signaling	2236	Conill	1:1000	-	-
p-EGFR (Tyr 1092)	Sta. Cruz Biotech.	sc-16903	Cabra	1:1000	-	-
p-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204)	Cell Signaling	9101	Conill	1:1000	-	-
p-MEK1/2 (Ser 217/221)	Cell Signaling	9121	Conill	1:1000	-	-
p-p90RSK (Ser380)	Cell Signaling	9341	Conill	1:1000	-	-

Anticòs	Casa Comercial	Ref.	Hoste	Dilució i aplicació		
				WB	IF	IHQ
HA	Sta. Cruz Biotech.	sc-7392	Ratolí	1:1000	-	-
IGFR	Sta. Cruz Biotech.	sc-713	Conill	1:1500	-	-
K15	LabVision	ms1068	Ratolí	-	-	1:500
Ki67	Abcam	ab15580	Conill	-	-	1:250
Lamina B ₁	Zymed	33-2000	Ratolí	1:1000	-	-
MEK 1/2	Cell Signaling	9122	Conill	1:1000	-	-
Notch 4	Sta. Cruz Biotech.	sc-5594	Conill	1:750	-	-
PS1- loop	Calbiochem	529592	Conill	1:5000	-	-
PS1NT	Calbiochem	529591	Conill	1:10000	-	1:250
PS1 (Ab2)	Oncogene	PC267	Conill	1:500	-	-
PS2 (Ab2)	Oncogene	PC235	Conill	1:500	-	-
Ubiquitina	Sta. Cruz Biotech.	sc-8017	Ratolí	1:1000	-	-

Taula M1: Anticossos primaris utilitzats. S'inclou la casa comercial, l'hoste i la dilució i aplicació que s'ha utilitzat: Western blot (WB), immunofluorescència (IF) o immunohistoquímica (IHQ).

3.5. Anàlisi de l'activitat del promotor de l'EGFR

Per l'anàlisi de l'activitat del promotor de l'EGFR (EGFRp) es van sembrar 20000 cèl·lules/pou en plaques de 24 pous durant 24 hores. A continuació les cèl·lules es van cotransfectar (veure apartat 1.6) amb 0.5 µg del plàsmid pER1-Luc

que conté el gen de la luciferasa sota el control del promotor del receptor d'EGF (Rikiyama et al., 2003) o amb 0.5 µg del plàsmid control (pGL3-basic) i 0.25 µg del plàsmid Renilla luciferasa (pRL-TK) utilitzat com control intern de transfecció (Promega). A les 24 hores les cèl·lules es van lissar i es va mesurar l'activitat luciferasa utilitzant i seguint les instruccions del kit comercial *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega).

4. MÈTODES DE BIOLOGIA MOLECULAR

4.1. ARN d'interferència

Per tal de disminuir l'expressió de la proteïna Fbw7 es va utilitzar la tecnologia d'ARN d'interferència mitjançant el mètode pSUPER (OligoEngine). Es va utilitzar un plàsmid pSUPER.puro.retro que contenia una seqüència única de 19 nucleòtids derivada del transcrit del ARN missatger del gen *Fbw7* (Figura M1) (Perez-Losada et al., 2005). Aquest oligonucleòtid (5'-CACAAAGCTGGTGTGTGCA-3') reconeix específicament l'exó 10, en la regió codificant 1965-1983 (GenBank, nombre d'accés NM_080428). Per a l'expressió estable de *Fbw7* siRNA es va utilitzar el sobrenedant de la transfecció de cèl·lules Phoenix anfortròpiques amb el plàsmid pSUPER (control) i pSUPER.Fbw7siRNA. La línia cel·lular Phoenix Anfortròpica és una línia cel·lular derivada de cèl·lules 293T, que expressen establement les proteïnes d'empaquetament viral necessàries per a la constitució del retrovirus (gag-pol i embolcall viral). La transfecció es va dur a terme durant 24 hores, passat aquest temps es va canviar el medi per medi fresc i 24 hores més tard es va recollir el medi (contenint les partícules virals). El medi es va centrifugar durant 3 minuts a 2000 rpm, es va filtrar utilitzant un filtre 0.22 µm i es va afegir 1 µg/ml de polibré (Sigma Aldrich) per tal d'incrementar la eficiència d'infecció. Aquest medi es va afegir sobre les cèl·lules MEF en proporció 40% medi d'infecció i 60% medi complet i es van incubar les cèl·lules a 37°C durant 24h. Passat aquest temps es va retirar el medi i es va afegir medi de selecció amb puromicina (1 µg/ml, InvivoGen) durant 48 hores.

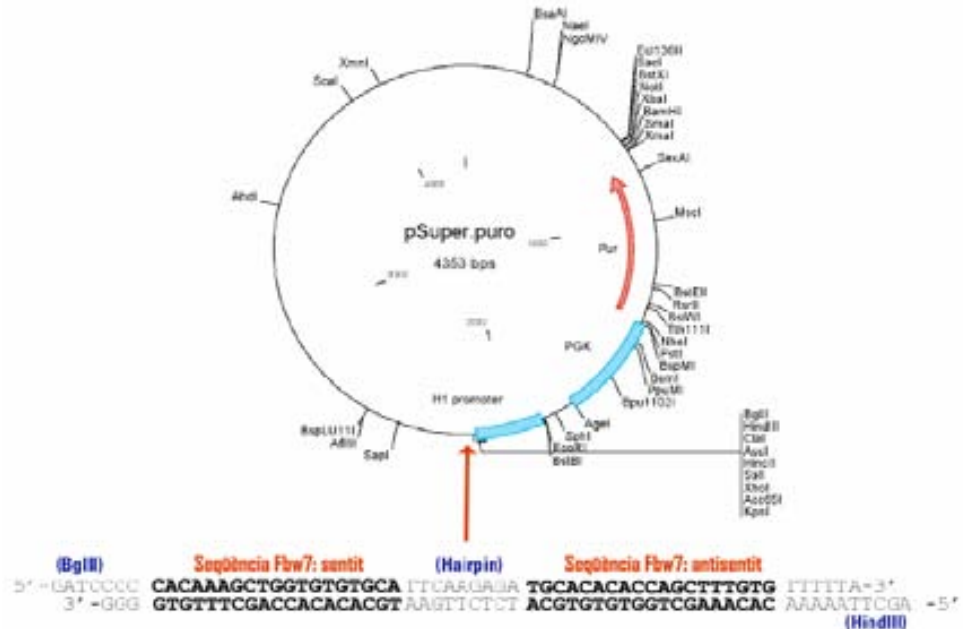


Figura M1: Plàsmid pPURO utilitzat per a dur a terme l'ARN d'interferència. S'inclou la seqüència dissenyada per al silenciament del gen de ratolí *Fbw7*.

4.2. Amplificació i purificació d'ADN

4.2.1. Transformació i creixement dels bacteris

Per la transformació dels bacteris es van descongelar 30 µl de bacteris competents DH5α (Invitrogen) en tubs estèrils i es va afegir 1 µl d'ADN purificat. S'incubà la mescla a 4°C durant 15 minuts, a continuació es realitzà un xoc tèrmic durant 40 segons a 37°C i immediatament es va col·locar el tub en gel durant 10 minuts. Es van afegir 800 µl de medi LB (Invitrogen) i s'incubà en agitació durant 45 minuts (37°C, 200 rpm). Part de la suspensió bacteriana obtinguda fou sembrada en plaques d'agar amb ampicil·lina (100 µg/ml) les quals van ser incubades tota la nit a 37°C.

El dia següent es va picar 1 colònia obtinguda a partir de la transformació i s'inoculà en 1 ml de medi LB/ampicil·lina i es va créixer durant 6 hores en agitació constant (37°C, 200 rpm). Passat aquest temps es van inocular 500 µl de medi

bacterià en 100 ml de medi LB/ampicil·lina i es va créixer durant 12 h en agitació (37°C, 200 rpm). El dia següent es va recollir 1 ml del cultiu bacterià per a realitzar una minipreparació d'ADN que ens va permetre saber si el plàsmid s'havia amplificat. La resta del cultiu es va centrifugar a 1500 rpm durant 15 minuts i el pelet bacterià s'utilitzà per la purificació d'ADN.

4.2.2. Purificació d'ADN plasmídic

4.2.2.1. Minipreparacions

El cultiu bacterià (1 ml) es va centrifugar en una minicentrífuga a 10000 rpm durant 3 minuts. Es va descartar el sobrenedant i el pelet es va ressuspendre en tampó GTE (50 mM de glucosa, 24 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0). Les cèl·lules es van lisar en 200 µl de dissolució de lisi (0.2 M NaOH i 1% SDS) invertint el tub 6-8 cops. Immediatament es va afegir 150 µl de solució d'acetat de potassi (5 M, pH 4.8). Els tubs es van centrifugar a 10000 rpm durant 2 minuts transferint el sobrenedant a un nou tub. A continuació es va precipitar l'ADN amb 500 µl d'isopropanol en gel durant 10 minuts i centrifugant a 10000 rpm durant 2 minuts. Es va rentar el pelet amb 70% etanol i es va deixar assecar a temperatura ambient. L'ADN precipitat es va dissoldre amb aigua destil·lada autoclavada i es va mesurar la concentració d'ADN utilitzant un espectrofotòmetre (BioPhotometer, Eppendorf). L'ADN purificat es va analitzar per electroforesi en gels d'agarosa del 0.8% marcat amb SYBR-Safe (Invitrogen) i visualitzat amb llum ultraviolada (UV).

4.2.2.2. Maxipreparacions

Es va utilitzar el *kit* de purificació d'ADN plasmídic QAFiler Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) seguint les instruccions detallades per la casa comercial. Es va partir de 50 o 100 ml de medi bacterià. El plàsmid purificat es va ressuspendre en 100-500 µl d'aigua destil·lada estèril i es va mesurar la concentració d'ADN utilitzant un espectrofotòmetre (BioPhotometer, Eppendorf). La puresa de l'ADN es va confirmar per electroforesi en gel d'agarosa 0.8%.

Reactius i solucions:

- **Medi LB (Luria Broth):** Es van dissoldre 25 g de preparat LB (Invitrogen) en un litre d'aigua destil·lada i es va ajustar el pH a 7.4. La dissolució va ser esterilitzada per autoclau.
- **Plaques d'agar:** Es van dissoldre 32 g d'agar (Invitrogen) en 500 ml de medi LB i es va esterilitzar per autoclau. Quan la solució estèril es va refredar fins a $\approx 37^{\circ}\text{C}$, es va afegir l'ampicil·lina (100 $\mu\text{g/ml}$) i es va dispensar en condicions estèrils en plaques de Petri deixant-ho gelificar.

4.3. Purificació d'ADN genòmic

Pel genotipatge dels ratolins es va purificar l'ADN genòmic a partir d'un fragment ($\sim 1\text{-}2$ mm) de la cua dels animals. El teixit va ser tractat amb 0.1 mg/ml de proteïnasa K (Roche) dissolta en tampó de lisi (100 mM Tris HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl) a 56°C durant tota la nit per tal de digerir les proteïnes. L'ADN genòmic es va precipitar utilitzant isopropanol (Baker), es va rentar amb 70% etanol (Baker) i es va precipitar mitjançant centrifugació a 12.000 rpm durant 10 min. Finalment el pelet es va ressuspèndre en tampó TE (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM EDTA) dissolent-lo mitjançant incubació a 65°C durant 2h. Finalment es va utilitzar la tècnica de la PCR (detallat en el punt 4.4.3) per identificar el genotip de cada animal, utilitzant com a encebadors pel gen de PS1 (PS1f/f: 261 pb i PS1 al·lel salvatge: 216 bp) P139, P140 i P158. Per a la Cre recombinasa (700 pb) els P156 i P157. Per al gen PS2 (al·lel salvatge: 540 pb; al·lel delectat: 326 pb) es van utilitzar P162, P163 i P164 (Taula M2).

4.4. Reacció en cadena de la Polimerasa (PCR)

4.4.1. Extracció d'ARN cel·lular

Per l'obtenció de l'ARN es van sembrar 400000 cèl·lules en plaques de 60 mm i es van incubar a 37°C durant 24 hores. A les 24 hores es va realitzar l'extracció de l'ARN mitjançant la utilització del *kit* comercial *RNeasy Protect Mini*

kit (QIAGEN) incloent el pas opcional de digestió de l'ADN (*RNase-free DNase Set*, QIAGEN). La concentració i puresa de l'ARN obtingut es va determinar per espectrofotometria i per electroforesi en gel d'agarosa (1.2%) lliure d'ARNases.

4.4.2. Transcripció Inversa

Per realitzar la transcripció inversa, per cada mostra es van utilitzar 2 µg d'ARN, 0.5 µl de hexàmers aleatoris i 0.5 µl de oligo(dT). La preparació es va incubar 10 minuts a 70°C i posteriorment es va posar en gel. A continuació, es va preparar la següent solució: 10 µl de tampó *First-Strand* (5x), 1 µl d'enzim *SuperScript* (200 unitats), 2.5 µL dNTP 10 mM, 2.25 µl DTT 10 mM i 0.25 µl de *RNAsaOUT* més aigua lliure de ARNasa fins un volum total de 33 µl. La mescla es va afegir a les preparacions i es va incubar durant 10 minuts a 25°C, 1 hora a 42°C i 10 minuts a 72°C. L'ADNc obtingut es va conservar a -20°C. Tots els reactius utilitzats per a la retrotranscripció de l'ARN provenen d'Invitrogen.

4.4.3. Amplificació de l'ADN per PCR semi-quantitativa

Per a cada mostra es va utilitzar 1 µl del ADN obtingut en la retrotranscripció de l'ARN. S'hi va afegir 0.5 µl de mescla de desoxiribonucleòtids trifosfats (dNTP, 10 mM), 2.5 µl de tampó de PCR (10x), 0.75 µl de MgCl₂ (50 mM), 1.25 µl de cada encebador (10 µM), 0.2 µl de Taq ADN polimerasa (5 U/ml) portant-ho amb aigua destil·lada a un volum final de 24 µl. L'amplificació es va realitzar en un termociclador (PTC-100, MJ Research) seguint les següents condicions estàndard on el nombre de cicles i la temperatura d'hibridació (T^aH) de l'encebador és variable per a cada gen (Taula M2): 94°C durant 4 minuts, N^o cicles de 1 minut a 94°C, 1 minut a T^aH i 1 minut a 72°C, finalment 7 minuts a 72°C essent conservat a 4°C. Part del producte de la PCR (10 µl) va ser resolt en un gel 2.5% d'agarosa contenint SYBR-Safe (Invitrogen) per la seva visualització per llum UV. Es va utilitzar el gen GAPDH com a control intern.

Per a l'amplificació de cada gen analitzat es va utilitzar un plàsmid en direcció *forward* (F) i un altre en direcció *reverse* (R), que es detallen a la Taula M2.

Encebador	Seqüència	T ^a H (°C)	Cicles
mEGFR-F	5' GCT GGG GAG GAG GAG AGG AGA A 3'	60	29
mEGFR-R	5' GTA CAC CCC GCA GCA CAT TGG 3'	60	29
mErbB2-F	5' GTG AAG CCA GAC CTC TCC TAC AT 3'	60	29
mErbB2-R	5' CTG GGC AGC CTC GTT CG 3'	60	29
mErbB3-F	5' CTT GGG GAG GCT TGT CTG GAT TCT 3'	60	29
mErbB3-R	5' AT GGC CCT CTG ATG ACT CTG ACG 3'	60	29
mFbw7_F	5' TTCATACACAGCCCATGGAA 3'	60	30
mFbw7_R	5' GCATCTCGAGAACCGCTTAC 3'	60	30
GAPDH-F	5'-AAT TCA ECG GCA CAG TCA AGC C-3'	65	23
GAPDH-R	5'-TAC TCA GCA CCG GCC TCA CC-3'	65	23
P139	5':GGT TTC CCT CCA TCT TG GTT G 3'	60	35
P140	5' TCA ACT CCT CCA GAG TCA GG 3'	60	35
P158	5' TGC CCC CTC TCC ATT TTC TC 3'	60	35
P156	5' GCC TGC ATT ACC GGT CGA TGC AAC GA 3'	60	35
P157	5' GTG GCA GAT GGC GCG GCA ACA CCA TT 3'	60	35
P162	5' CAT CTA CAC GCC CTT CAC GG 3'	65	35
P163	5' CAC ACA GAG AGG CTC AAG ATC 3'	65	35
P164	5' AAG GGC CAG CTC ATT CCT CC 3'	65	35

Taula M2: Encebadors utilitzats per a PCR semiquantitativa i/o PCR en temps real. Per a cada encebador es mostra la seqüència, la temperatura d'hibridació (T^aH) idònia i el nombre de cicles utilitzats en la PCR semiquantitativa.

4.5. Amplificació de l'ADN per PCR en temps real

Per a cada mostra es va utilitzar 1 µl de l'ADN obtingut en la retrotranscripció de l'ARN. La reacció es va dur a terme utilitzant primers específics per a cada gen (descrits en la Taula M2).

Es va utilitzar el *kit* comercial *QuantiMix Easy SYG* (Biotools), que utilitza l'agent intercalant d'ADN SYBR Green com a detector. Per cada mostra es va afegir 1 µl d'ADN, 10 µl de mescla comercial i 1 µl de cada encebador (0.1 µM) en un volum total de 20 µl. La reacció es va dur a terme en el sistema de microseqüenciació ABI Prism 7900 (Applied Biosystems). L'anàlisi es va realitzar utilitzant el programari SDS 2.1 mitjançant el mètode $\Delta\Delta C_t$ utilitzant el gen GAPDH com a control intern.

5. MÈTODES DE BIOLOGIA CEL·LULAR

5.1. Tècniques d'Immunofluorescència

Les cèl·lules MEF PS1/PS2 i PS^{-/-} van ser sembrades en cobreobjectes en plaques de 6 pous a baixa densitat (20000 cèl·lules/pou). A les 24 hores, les cèl·lules es van rentar amb PBS i van ser fixades durant 15 minuts a temperatura ambient amb 4% paraformaldehid en PBS. Les cèl·lules van ser permeabilitzades amb 0.2% Tritó X-100 en PBS, bloquejades amb 10 mM glicina en PBS durant 15 min i incubades amb 10 mM Gly/5%BSA/PBS durant 30 min. A continuació es van incubar amb l'anticòs primari (detallat a la Taula M1) diluït en 1% de sèrum de cabra en PBS tota la nit a 4°C. Les cèl·lules es van rentar amb PBS i a continuació es van incubar amb l'anticòs secundari conjugat al fluorocrom Alexa488 o Alexa594 (1:400; Molecular Probes) durant una hora a temperatura ambient. Les preparacions es van rentar amb PBS i es van incubar amb el marcador específic de nuclis Hoechst durant 5 minuts (1 µg/ml, Invitrogen). Els cobreobjectes van ser muntats amb la solució FluorSave Reagent (Calbiochem).

Les preparacions van ser examinades amb un microscopi laser confocal Leica TCS SP2 AOBS al servei de microscòpia de la UAB.

5.2. Tractament amb EGF conjugat a Alexa488

Les cèl·lules MEF PS1/PS2 i PS-/- van ser sembrades en cobreobjectes en plaques de 6 pous a baixa densitat (20000 cèl·lules/pou). A les 24 hores, les cèl·lules van ser incubades amb EGF conjugat a Alexa488 (EGF-A488, 150 ng/ml, Molecular Probes) a 37°C durant 5-180 minuts. Per tal de marcar únicament el receptor de superfície les cèl·lules van ser incubades amb EGF-A488 durant 30 minuts a 4°C. En finalitzar la incubació, les cèl·lules es van fixar durant 15 minuts a temperatura ambient amb 4% paraformaldehid en PBS. A continuació es van rentar les cèl·lules amb PBS (3 rentats) i es van incubar amb el marcador específic de nuclis Hoechst durant 5 minuts (1µg/ml, Invitrogen). Els cobreobjectes van ser muntats amb solució FluorSave Reagent (Calbiochem) per la posterior visualització de les mostres mitjançant microscòpia laser confocal. Es va realitzar anàlisi quantitatiu de les imatges utilitzant el programa MetaMorph 6.1. (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA). En imatges prèviament umbralitzades, es va mesurar la quantitat de fluorescència per cèl·lula i vesícula així com el nombre i mida de les vesícules per cèl·lula (n=10-30). Totes les imatges analitzades van ser capturades en les mateixes condicions.

5.3. Assaig d'extensió en queratinòcits

Es van sembrar aproximadament 1000 queratinòcits diferenciats (tractats amb vehicle o OHT durant 72 hores) en cobreobjectes durant 10 minuts a 37°C. Passat aquest temps es va retirar el medi, rentar amb PBS i es van fixar les cèl·lules adherides amb 4% paraformaldehid/PBS durant 15 minuts a temperatura ambient. Després de dos rentats amb PBS, es van permeabilitzar les cèl·lules amb 0.2% Tritó-x 100 en PBS durant 7 minuts a temperatura ambient. Previ rentat amb PBS les cèl·lules es van incubar amb 10 mM glicina/PBS durant 15 minuts i 30

minuts a en 10 mM glicina/ 5% BSA. Les cèl·lules van ser incubades amb faloidina-AlexaFluor595 (Molecular Probes) en 1% NGS/PBS durant 1h a temperatura ambient, protegint-ho de la llum. Les cèl·lules es van rentar amb 0.01% saponina en PBS i es van incubar amb el marcador nuclear Hoechst (Invitrogen) durant 5 minuts a temperatura ambient. Els cobreobjectes van ser muntats en reactiu FluorSave (Calbiochem) per la posterior visualització de les mostres mitjançant un microscopi Nikon Eclipse 90i amb sistema de captació d'imatges DXM1200F i el software ACT-1. Es va realitzar anàlisi quantitatiu de les imatges utilitzant el programa MetaMorph 6.1. (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA).

5.4. Tècniques immunohistològiques

5.4.1. Obtenció i fixació de les mostres biològiques

Per a l'obtenció de mostres per a immunohistoquímica els ratolins van ser sacrificats per asfíxia i immediatament es va procedir a la dissecció aïllant la pell del coll i pell de la esquena, prèviament afaitades. Els teixits van ser fixats en PBS-paraformaldehid al 4% durant tota la nit a 4°C. El dia següent es va substituir el PBS-paraformaldehid per etanol 70% per a ser englobades en blocs de parafina per a la obtenció de talls histològics utilitzats per a immunohistoquímica.

5.4.2. Immunohistoquímica amb peroxidasa

Les seccions de pell (5 µm) van ser desparafinitzades amb dos banys de xilol (Merk) i rehidratades utilitzant una bateria de solucions d'etanol de concentracions decreixents amb incubacions de tres minuts (100% - 100% - 96% - 70% - 50%). A continuació, després d'un bany d'aigua destil·lada, es va inhibir la peroxidasa endògena incubant durant 15 minuts amb metanol/ 3% H₂O₂. Per tal d'exposar l'antigen les seccions es van incubar durant 8 minuts al microones a una potència de 200 watts amb solució de citrat (BioGenex) bullent, rentant finalment les mostres amb aigua destil·lada. A continuació, les mostres es van incubar amb sèrum de cabra al 10% (NGS; Invitrogen) en TBS (50 mM Tris HCl pH 7.4; 150

mM NaCl) durant 30 minuts a temperatura ambient i es va dispensar l'anticòs primari en diluït en 10% NGS en TBS durant tota la nit a 4°C (Taula M1).

El dia següent es van rentar les seccions en TBS i es van incubar amb l'anticòs secundari anti-ratolí o anti-conill biotinitat (1:400) diluït en 10% NGS en TBS. Per tal de revelar la tinció es va utilitzar el kit ABC (Vector Laboratories) i amb el reactiu 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Vector Laboratories). Per a contrastar els nuclis de la mostra les seccions es van tenyir amb hematoxilina (SurgiPath) i a continuació es van deshidratar amb solucions d'etanol en concentració creixent i muntar els cobreobjectes amb la solució DPX Mountant (Fluka). Les preparacions es van analitzar utilitzant un microscopi Nikon Eclipse 90i amb sistema de captació d'imatges DXM1200F i el software ACT-1.

5.4.3. Immunohistoquímica amb fluorescència

Les seccions de pell (5 µm) van ser desparafinitzades amb dos banys de xilol (Merk) i rehidratades utilitzant una bateria de solucions d'etanol de concentracions decreixents amb incubacions de tres minuts (100% - 100% - 96% - 70% - 50%). A continuació, per tal d'exposar l'antigen les seccions es van incubar en solució de citrat (BioGenex) bullent durant 8 minuts al microones a una potència de 200 watts. Per a la detecció de BrdU es va realitzar un tractament previ de les mostres amb 1 N HCl a 37°C durant 60 minuts per tal de desnaturalitzar l'ADN i fer accessible l'epítot a l'anticòs. A continuació, les mostres pre-tractades amb HCl es van rentar consecutivament amb 0.1 M Borat pH 8.5 i TBS tres cops durant 5 minuts cadascun.

Es va prosseguir la immunodetecció en totes les mostres incubant-les amb 10% sèrum de cabra (NGS; Invitrogen) en TBS (50 mM Tris HCl pH 7.4; 150 mM NaCl) a temperatura ambient durant 30 minuts i es va dispensar l'anticòs primari diluït en 10% NGS en TBS a 4°C durant tota la nit.

El dia següent es van rentar les seccions en TBS i es van incubar amb el marcador específic de nuclis Hoechst (1µg/ml; Molecular Probes) i l'anticòs secundari anti-ratolí, anti-rata o anti-conill conjugat a un fluoròfor (Alexa594 o Alexa488; 1:200; Molecular Probes) diluït en 10% NGS en TBS a temperatura ambient durant 1 hora.

Les seccions es van cobrir amb cobreobjectes amb la solució Fluorsave (Calbiochem) i analitzades tal com es detalla en l'apartat anterior.

6. MÈTODES ESTADÍSTICS

Els experiments es van realitzar com a mínim per triplicat. Els resultats de les gràfiques mostren la mitjana dels diferents experiments \pm desviació estàndard de la mitja. Els grups experimentals van ser comparats mitjançant l'anàlisi de variància amb el test ANOVA d'una via o de dues vies en comparar més de dos grups entre si. Els valors van ser considerats significatius quan $p < 0.05$.

RESULTATS

***CAPÍTOL I: Regulació de la proliferació
cel·lular per les presenilines a través de la
via de senyalització de l'EGFR***

CAPÍTOL I: Regulació de la proliferació cel·lular per les presenilines a través de la via de senyalització de l'EGFR

1. PROPIETATS ONCOGÈNIQUES DELS FIBROBLASTS DEFICIENTS EN PS

1.1. Proliferació dels fibroblasts control i deficients en PS a diferents concentracions de sèrum

Prèviament s'ha descrit a la literatura que la pèrdua parcial de les presenilines (PS) en la pell dels ratolins PS1+/-; PS2-/- o ratolins PS1-/- rescatats amb PS1 en cervell, dona lloc a queratocarcinomes i queratosi seborreica benigna respectivament (Xia et al., 2001; Tournoy et al., 2004). Aquests resultats suggereixen que les PS podrien actuar com a gens supressors de tumors. D'aquesta manera, el primer objectiu d'aquest treball va ser avaluar el paper de les PS en la proliferació de fibroblasts de pell de ratolins.

En primer lloc, es va avaluar la possible existència de diferències en proliferació entre els fibroblasts deficients en PS (PS-/-) i els fibroblasts control (PS1/PS2) a diferents concentracions de sèrum. L'estudi va ser realitzat mantenint les cèl·lules en condicions normals de sèrum (10% FBS) o en medi baix en sèrum (1% FBS) a 37°C fins 72 h.

En quantificar el nombre de cèl·lules al llarg de 0-72 h en condicions normals de sèrum, es va observar que a les 48 hores els fibroblasts PS-/- presentaven un increment de proliferació estadísticament significatiu respecte fibroblasts control ($p < 0.05$) (Figura R-1A). A les 72 hores, es produeix un estancament de la proliferació tant en fibroblasts PS-/- com en fibroblasts control, degut a que arriben a confluència. A diferència del creixement en condicions normals de cultiu, els fibroblasts control creixen molt lentament en condicions baixes de FBS (1%) durant el període de 0-72 hores (Figura R-1A). En canvi, en aquestes últimes condicions, els fibroblasts deficients en PS presenten un increment de la proliferació al llarg dels dies que en tots els casos és significativament superior a les cèl·lules control ($p < 0.05$). L'expressió estable de PS1 humana (hPS1) en fibroblasts PS-/- redueix

la proliferació d'aquestes equiparant-se als nivells de proliferació de les cèl·lules control indicant que els efectes observats no són deguts a efectes derivats de línies cel·lulars transformades (Figura R-1A). Aquest resultat indica que els fibroblasts deficients en PS mostren una major proliferació respecte els fibroblasts control i que aquestes diferències s'accentuen en condicions limitants de sèrum.

1.2. Bloqueig de la proliferació dels fibroblasts deficients en PS amb inhibidors específics de receptors RTK

Els resultats previs suggereixen que la inactivació d'ambdues presenilines incrementa la sensibilitat dels fibroblasts als factors tròfics. Degut a l'important paper dels receptors tirosina cinasa (RTK) en la proliferació i transformació cel·lular (Hunter, 1998), es va estudiar la contribució dels RTK en l'efecte de les PS sobre la proliferació.

Les cèl·lules control i PS^{-/-} es van sembrar en condicions baixes de sèrum (0.1% FBS) i a les 24 hores el medi es va substituir per medi suplementat amb DMSO (control) o un inhibidor específic de l'activitat tirosina cinasa del receptor d'EGF (PD168393; Fry et al., 1998) o un inhibidor del receptor de FGF (SU5402; Mohammadi et al., 1997). Com s'ha mostrat anteriorment, les cèl·lules control van créixer molt lentament en condicions limitants de sèrum durant 0-72 hores (Figura R-1B). En canvi, les cèl·lules PS^{-/-} van créixer molt ràpidament durant aquest període, existint diferències significatives en la proliferació entre ambdós genotips (PS^{-/-} vs PS1/PS2, $p < 0.05$) (Figura R-1B). L'increment en la proliferació en fibroblasts PS^{-/-} va ser específicament bloquejat amb l'inhibidor específic de l'EGFR, PD168393, de manera que el nombre i la densitat de les cèl·lules PS^{-/-} disminueix després de 24-48 hores de tractament sent similar al nombre de cèl·lules control (Figura R-1B). Contràriament, l'inhibidor del receptor de FGF, SU5402, no produeix cap efecte sobre la proliferació de fibroblasts PS^{-/-} a les 24 hores de tractament, mentre que a les 48 hores de tractament produeix certa reducció del creixement però sense arribar a la inhibició produïda per l'inhibidor de l'EGFR. Degut a que les cèl·lules control pràcticament no proliferen en aquestes condicions no es produeix una inhibició significativa de la seva proliferació en els

tractaments amb l'inhibidor de l'EGFR o del FGFR (Figura R-1B). Com a control, paral·lelament en una placa de cultiu de cèl·lules PS^{-/-} es va verificar que el tractament amb PD168393 i SU5403 bloquejava l'increment de la fosforilació d'ERK1/2 induït per l'activació de l'EGFR i FGFR (Figura R-1B).

En resum, aquests resultats indiquen que l'increment de la proliferació dels fibroblasts deficients en PS depèn directament de la senyalització de l'EGFR.

1.3. Formació de colònies de fibroblasts PS^{-/-} en medi semisòlid

La proliferació anòmala és una característica de les cèl·lules canceroses i el creixement continuat d'aquestes indueix la formació de tumors. L'increment de la proliferació de les cèl·lules deficients en presenilina suggereix que la pèrdua de PS pot induir un fenotip oncogènic. La formació de colònies en medi semisòlid és indicatiu de transformació cel·lular cap a un fenotip oncogènic (Ke et al., 2004; Rao et al., 2003). D'aquesta manera, es va avaluar la capacitat de formar colònies en medi semisòlid de cèl·lules control i deficients en presenilina. Les cèl·lules van créixer immerses en un medi semisòlid (medi de cultiu contenint un 0.35% d'agar) sobre una base d'agar tou (0.5%). D'aquesta manera, les cèl·lules han de proliferar sense poder adherir-se a cap substrat físic, mostrant un creixement independent de l'ancoratge. El nombre total de colònies formades de més de 10 cèl·lules es va quantificar passats 15 dies. En la Figura R-1C s'observa que les cèl·lules control gairebé no formen colònies, contràriament els fibroblasts deficients en PS van formar un elevat nombre de colònies (≈ 100 colònies/placa de 60 mm). La inhibició de la via de senyalització de l'EGFR va reduir significativament el nombre de colònies formades pels fibroblasts PS^{-/-} (Figura R-1C). Aquest resultat indica la presència d'un fenotip oncogènic causat per la pèrdua de funció de la PS.

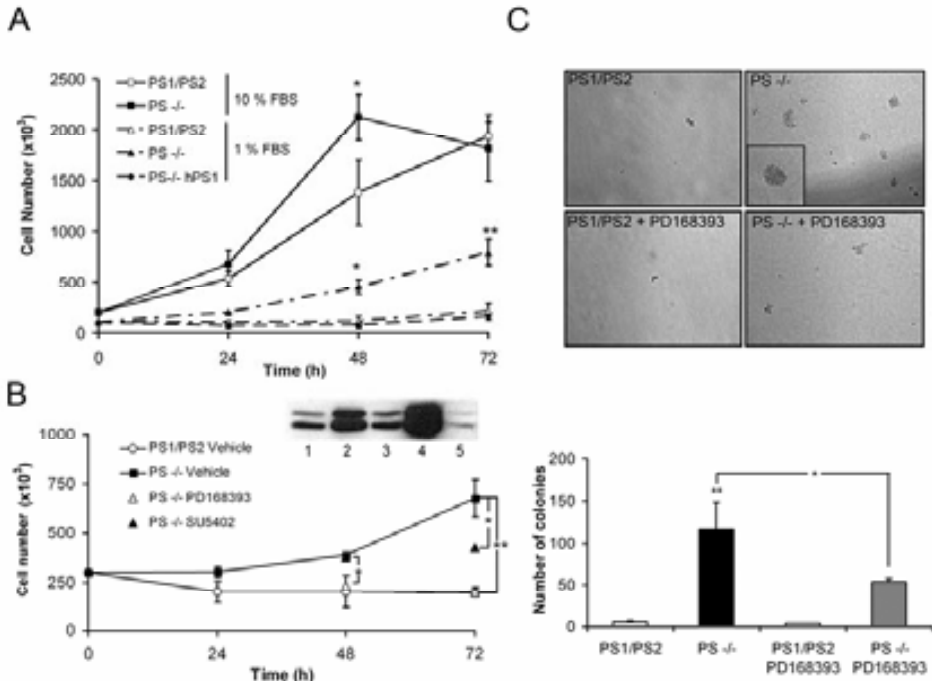


Figura R-1: L'increment de la proliferació i transformació oncogènica de fibroblasts deficients en PS depèn de la via de senyalització de l'EGFR. A) Fibroblasts d'embrions de ratolins control (PS1/PS2), PS^{-/-} i PS^{-/-} expressant establement PS1 humana (hPS1) es van cultivar en condicions normals (10% FBS) o baixes (1% FBS) de sèrum. **B)** Els fibroblasts es van mantenir en cultiu (0.1% FBS) durant 24h i es van incubar durant 24 o 48 hores amb un inhibidor específic de l'EGFR (2 μM, PD168393) i un inhibidor del receptor de FGF (10 μM, SU5402). Per tal de comprovar l'efectivitat dels inhibidors es va analitzar la inhibició de la fosforilació d'ERK1/2 produïda per PD168393 i SU5402 per WB. Les cèl·lules PS^{-/-} es van tractar durant 5 min amb vehicle (carril 1), FGF (carril 2), FGF més SU5402 (carril 3), EGF (carril 4) o EGF més PD168393 (carril 5). **C)** Els assajos de formació de colònies es van realitzar en plaques amb medi semi-sòlid en presència o absència de PD168393. El nombre de colònies presents en tres plaques va ser quantificat al cap de 15 dies de creixement a 37°C. Aquest experiment és representatiu de tres experiments independents. Totes les dades es presenten com la mitja ± s.e.m (n=3). **p*<0.05; ***p*<0.001.

2. INCREMENT DEL NIVELLS TOTALS DEL RECEPTOR D'EGF I ErbB3 EN FIBROBLASTS PS-/-

L'expressió anòmala o mutacions en receptors de la família de l'EGFR han estat implicades en una gran varietat de càncers incloent tumors epitelials en humans i ratolins (Sebastian et al., 2006). Com hem vist anteriorment, l'increment de la proliferació dels fibroblasts PS-/- pot ser bloquejat amb un inhibidor específic de l'EGFR, el que suggereix que les PS poden regular els nivells i la senyalització de l'EGFR. D'aquesta manera, el següent pas fou l'anàlisi bioquímic dels nivells dels receptors de la família d'ErbB.

En analitzar per Western blot els lisats proteics de fibroblasts control i deficients en PS s'observà un increment significatiu dels nivells totals d'EGFR (≈ 2 vegades) i ErbB3 (≈ 3.5 vegades) en els fibroblasts PS-/. Els nivells d'ErbB2 no varien en fibroblasts PS-/- respecte fibroblasts control. Com s'esperava, PS1 no s'expressa en les cèl·lules PS-/- (Figura R-2A). El quart membre de la família ErbB, ErbB4, no s'expressa en fibroblasts de pell d'origen embrionari (no mostrat, Wang et al., 2007). També es van estudiar els nivells d'un receptor tirosina cinasa aliè a la família ErbB, el receptor d'IGF (IGFR). En aquest cas també observarem un increment significatiu en els nivells totals d'aquest receptor (Figura R-2A).

L'expressió de l'EGFR també va ser analitzada per tècniques d'immunofluorescència i visualitzada per microscòpia confocal. En la Figura R-2B es mostra la reconstrucció d'una sèrie de talls d'una mateixa cèl·lula. Les imatges d'immunofluorescència realitzades amb un anticòs contra l'EGFR mostren un increment de l'expressió total del receptor confirmant el resultat de Western blot. Per estudiar si en les cèl·lules PS-/- també s'acumula més receptor en la superfície cel·lular, el qual està directament implicat en la senyalització induïda per lligand, es van incubar les cèl·lules amb el seu lligand conjugat amb el fluorocrom Alexa-488 (EGF-A488) durant 30 minuts a 4°C. En aquestes condicions, en les que no es produeix internalització, s'observa un marcat increment de l'EGFR de membrana en els fibroblasts PS-/- respecte els fibroblasts control (Figura R-2C). Per excloure

la possibilitat que la senyal observada en les imatges fos deguda a la unió inespecífica de l'EGF-A488, es va incubar simultàniament EGF no marcat en excés amb EGF-A488 durant 5 minuts a 37°C (Figura R-2D). Així, en presència d'un lligand competitiu el marcatge de l'EGF-A488 és eliminat. El marcatge per biotina de totes les proteïnes extracel·lulars mostra com efectivament existeix un increment en els nivells d'EGFR de membrana en les cèl·lules PS^{-/-}, tanmateix no existeixen diferències en els nivells d'IGFR i ErbB2 de superfície (Figura R-2B).

En conjunt, aquestes dades demostren un increment de l'expressió de l'EGFR total i de superfície cel·lular en fibroblasts PS^{-/-}. També s'observa un increment en els nivells totals però no de superfície del receptor IGFR, mentre que ErbB2 no varia en els fibroblasts PS^{-/-}.

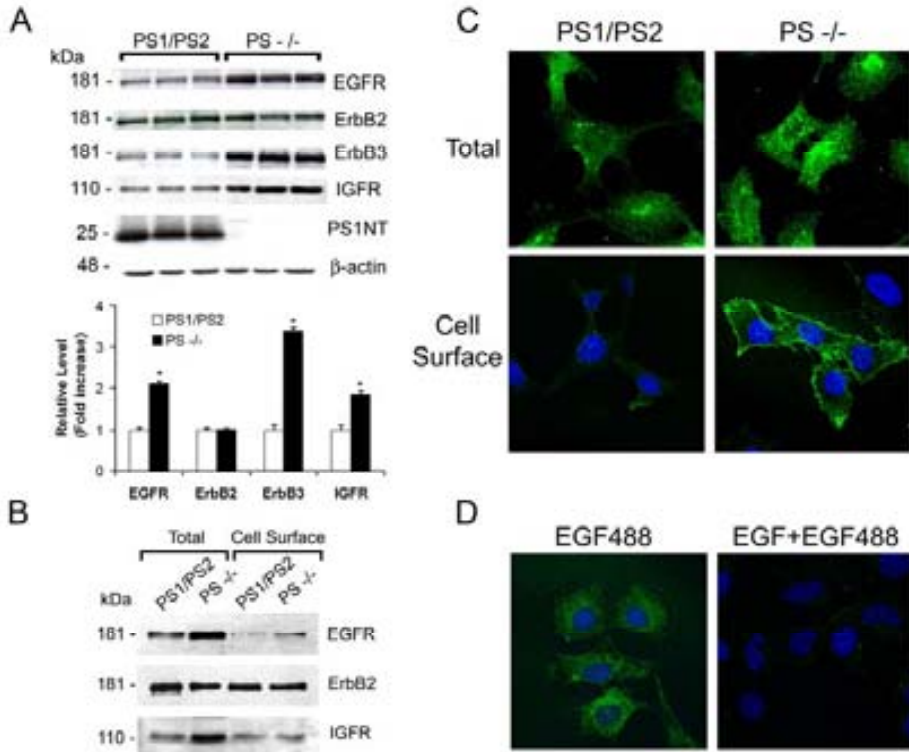


Figura R-2: Increment d'EGFR i ErbB3 en fibroblasts PS -/-. **A)** Els nivells totals de PS1, EGFR, ErbB2, ErbB3 i IGFR es van analitzar en lisats de fibroblasts control i PS-/- per WB. La quantificació dels immunoblots mostra un increment significatiu en les nivells d'EGFR, ErbB3 i IGFR en cèl·lules deficientes en PS. Les dades representen la mitja \pm s.e.m. (n=3) $*p < 0.05$ (test de Student). **B)** L'expressió de superfície de l'EGFR, ErbB2 i IGFR es va detectar per biotiniació amb Sulfo-NHS-LC-biotin, immunoprecipitació amb proteïna NeutrAvidin i anàlisi per Western blot, que demostra un increment en l'EGFR de superfície però no d'ErbB2 i IGFR en cèl·lules PS-/- . **C)** Imatges de microscòpia confocal mostren un increment dels nivells totals i de membrana de l'EGFR. Cèl·lules permeabilitzades es van analitzar per immunofluorescència amb un anticòs anti-EGFR (α EGFR, Sta Cruz Biotech). En els panells inferiors es mostra l'EGFR de la superfície cel·lular detectat per la unió del lligand EGF conjugat al fluorocrom Alexa-488 (EGF-A488, 30 min, 4°C) al seu receptor. **D)** El marcatge per EGF-A488 es mostra específic ja que la incubació durant 5 minuts a 37°C de cèl·lules PS-/- amb EGF en excés + EGF-A488 durant 5 minuts elimina el marcatge que es produeix en presència únicament d'EGF-A488.

3. INCREMENT DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ D'EGFR EN FIBROBLASTS DEFICIENTS EN PS

A continuació es van estudiar les conseqüències funcionals de l'acumulació d'EGFR en la membrana dels fibroblasts deficients en PS. Per estudiar l'estat de la via de senyalització de l'EGFR es va realitzar un tractament durant 0-30 minuts amb EGF en fibroblasts control i PS-/- (Figura R-3A).

Com s'ha demostrat prèviament en nombrosos treballs, l'EGF indueix un increment en la fosforilació d'EGFR (Tyr 1068) que disminueix ràpidament degut a la seva desfosforilació en compartiments intracel·lulars. De la mateixa manera, en les nostres condicions experimentals, l'EGF produeix en els fibroblasts control un ràpid increment de la fosforilació d'EGFR que disminueix ràpidament als 15 minuts. En canvi, el tractament amb EGF produeix un increment sostingut dels nivells d'EGFR fosforilat fins als 30 minuts en fibroblasts PS-/-.

És conegut que l'activació de l'EGFR produeix una activació de la via de transducció de senyals de Ras/MEK/ERK1/2. Així doncs, es va examinar l'estat de fosforilació dels efectors d'aquesta via. L'anàlisi bioquímic de lisats cel·lulars de fibroblasts control mostren una ràpida i transitòria fosforilació de Raf, MEK1/2, ERK1/2 i p90/RSK que disminueix ràpidament als 15 min. Contràriament, en fibroblasts PS-/- tots els components de la via de senyalització de ERK1/2 mostren un increment similar en la seva fosforilació als 5 minuts però que es manté almenys fins als 30 minuts (Figura R-3A).

Com hem vist anteriorment (Figura R-2), les cèl·lules deficients en presenilina presenten un increment en els nivells de totals de l'IGFR però no en els nivells de receptor de superfície. Així doncs, es va analitzar si tal com passa amb l'EGFR, l'activació de la via de senyalització de l'IGFR està alterada en aquestes cèl·lules. Els fibroblasts control i PS-/- es van tractar amb IGF durant 0-30 min i les cèl·lules es van lisar com s'ha descrit anteriorment. Com s'observa en la Figura R-3B, l'estimulació amb IGF durant 0-30 min indueix la fosforilació d'ERK1/2 (Thr202/204) amb un pic màxim d'activació als 5 minuts que disminueix significativament als 15

minuts tornant als nivells basals tant a les cèl·lules control com a les PS^{-/-}. Els nivells totals d'ERK1/2 són similars en ambdues línies cel·lulars. Per tant, al contrari del que passa amb la senyalització de l'EGFR i tal com s'ha descrit prèviament (Kang et al., 2005) no s'observen canvis en la senyalització d'IGFR en les cèl·lules PS^{-/-}. Aquest resultat indica que l'increment de la activació de la via de senyalització de l'EGFR és una alteració específica de les cèl·lules PS^{-/-}.

Per tal d'estudiar quina de les dues presenilines està implicada en l'increment de l'expressió, fosforilació i senyalització de l'EGFR vam comparar els nivells d'expressió i l'estat de fosforilació d'EGFR en absència de PS1 i/o PS2. Per a dur-ho a terme, es van utilitzar fibroblasts controls (PS1/PS2), deficientes en PS1 (PS1^{-/-}), deficientes en PS2 (PS2^{-/-}) i deficientes en ambdues PS (PS^{-/-}). Les cèl·lules es van tractar amb EGF durant 15 minuts (temps on s'observen les diferències en fosforilació i activació de l'EGFR) i es va analitzar l'expressió i la fosforilació de l'EGFR i d'ERK1/2.

Com es mostra en la Figura R-3C, l'anàlisi per WB indica que no hi ha diferències en la fosforilació d'EGFR i ERK1/2 en les cèl·lules PS1^{-/-} i PS2^{-/-} respecte a les cèl·lules control. En canvi, els nivells de p-EGFR (Tyr 1068) i p-ERK1/2 estan incrementats en fibroblasts PS^{-/-}. Aquest resultat demostra que en fibroblasts és necessària l'absència de PS1 i PS2 per a que es produeixi una alteració de la via de senyalització de l'EGFR i un increment dels nivells totals d'aquest. En resum, els resultats descrits indiquen que l'absència d'ambdues PS produeix en fibroblasts una activació sostinguda de la via d'EGFR però no de la via d'IGFR.

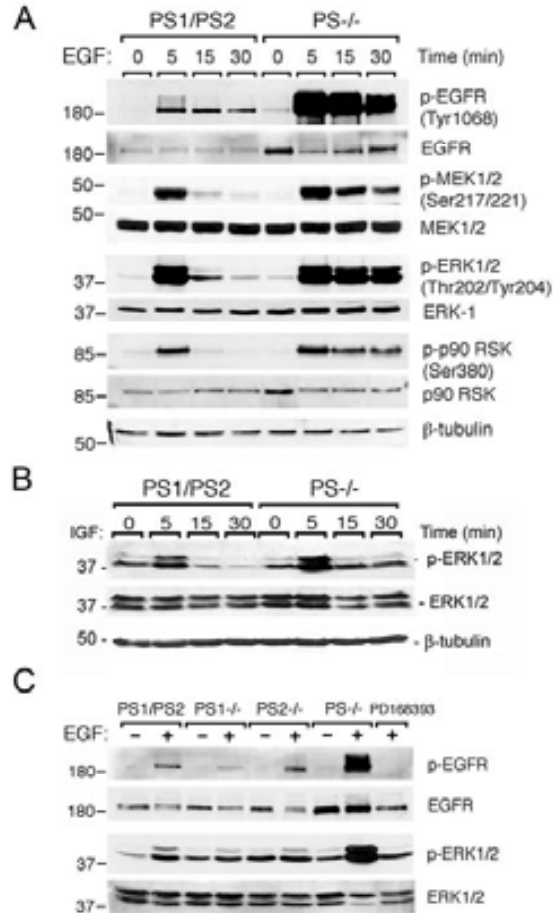


Figura R-3: La via de senyalització de l'EGFR es troba alterada específicament en cèl·lules PS^{-/-}. **A)** Les cèl·lules PS1/PS2 i PS^{-/-} es van estimular amb EGF (150 ng/ml) durant 0-30 minuts. A continuació les cèl·lules es van lisar i es van analitzar per WB amb anticossos específics contra les formes totals i fosforilades dels principals components de la via de senyalització de l'EGFR. Els resultats mostren com en fibroblasts control es produeix un increment en la fosforilació de l'EGFR, Raf, MEK, ERK1/2 i p90 als 5 minuts, la qual decau ràpidament als 15 minuts. En canvi, en fibroblasts PS^{-/-} es produeix una activació sostinguda de la via de senyalització durant els 30 minuts. **B)** Per contra, l'estimulació de cèl·lules PS1/PS2 i PS^{-/-} amb IGF no mostra canvis en els nivells d'activació de p-ERK1/2. **C)** Cèl·lules PS1/PS2, PS1^{-/-}, PS2^{-/-} i PS^{-/-} van ser estimulades amb EGF (150 ng/ml) durant 15 minuts i els nivells d'EGFR i l'estat de fosforilació de l'EGFR i ERK1/2 es van analitzar per Western blot. En tots els casos les imatges són representatives de tres experiments.

4. L'EXPRESSIÓ D'EGFR EN FIBROBLASTS ÉS INDEPENDENT DE L'ACTIVITAT γ -SECRETASA

PS és un component essencial del complex γ -secretasa implicat en la proteòlisi de proteïnes transmembrana tipus I (Annaert and De Strooper, 2002). Per tal d'elucidar si l'augment dels nivells de l'EGFR en absència de PS és degut a la inhibició d'activitat γ -secretasa o d'altres funcions de PS, es van tractar fibroblasts control i PS^{-/-} amb l'inhibidor específic reversible de l'activitat γ -secretasa DAPT (Morohashi et al., 2006) i es va estudiar l'expressió de l'EGFR. Com a control es va utilitzar l'acumulació del seu substrat, el fragment C-terminal de l'APP (APP CTF). Com es pot observar en la Figura R-4, la inhibició de l'activitat γ -secretasa en fibroblasts control no produeix un increment dels nivells de l'EGFR tot i que s'observa una acumulació dependent del temps dels APP CTFs, indicatiu de la correcta inhibició produïda pel DAPT. A més, malgrat que la inhibició de l'activitat γ -secretasa amb DAPT durant 24 h en fibroblasts control és similar als fibroblasts PS^{-/-}, els nivells d'EGFR només estan incrementats en aquests últims. En conclusió, aquest resultat ens indica que l'activitat γ -secretasa de PS no està implicada en la regulació negativa dels nivells de l'EGFR.

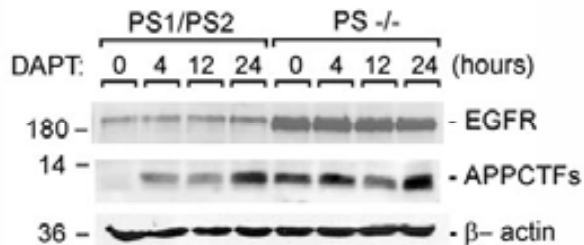


Figura R-4: L'activitat γ -secretasa no és responsable de la regulació dels nivells d'EGFR. Les cèl·lules control i PS^{-/-} van ser tractades amb l'inhibidor de l'activitat γ -secretasa DAPT (1 μ M) durant 0-24 h. La incubació amb l'inhibidor DAPT no incrementa els nivells de l'EGFR en cèl·lules control. La part inferior de la figura mostra l'acumulació dependent del temps dels fragments C-terminal de l'APP (APP CTF) en cèl·lules control tractades amb DAPT, fet que demostra la inhibició de l'activitat γ -secretasa durant el tractament farmacològic. S'utilitzà com a control de càrrega β -actina. Es mostra un experiment representatiu de tres experiments.

5. LA PS NO AFECTA LA TRANSCRIPCIÓ DE L'EGFR EN FIBROBLASTS

Els principals mecanismes de regulació de l'expressió l'EGFR són la seva transcripció i la seva degradació. Així, el següent objectiu d'aquest estudi va ser analitzar si les PS regulaven la transcripció i/o degradació de l'EGFR.

L'estudi de la transcripció de l'EGFR va ser abordada mitjançant dues tècniques complementàries. En primer lloc es va analitzar l'activitat del promotor del gen de l'EGFR. Aquesta estratègia va ser duta a terme cotransfectant transitòriament fibroblasts control i PS^{-/-} amb un plàsmid que conté el gen de la luciferasa sota el control del promotor de l'EGFR (pER1-Luc, Rikiyama et al., 2003) i el plàsmid Renilla-TK (pRL-TK), utilitzat com a control intern de transfecció. A continuació es va mesurar l'activitat luciferasa d'ambdós tipus cel·lulars. Com a control de la correcta activitat del plàsmid pER1-Luc es van transfectar els dos tipus cel·lulars amb el mateix plàsmid que conté el gen de la luciferasa sense el promotor del gen de l'EGFR (pGL3-basic). L'activitat del promotor d'EGFR mesurant l'activitat luciferasa normalitzada amb renilla està disminuïda en cèl·lules PS^{-/-} (5 ± 1 unitat) respecte cèl·lules control (8 ± 1 unitat) (Figura R-5A). Aquest resultat indica que l'increment dels nivells d'EGFR observat en absència de PS no és probablement degut a l'activació del promotor de l'EGFR. És possible que en els fibroblasts PS^{-/-} es produeixi una disminució de l'activació del promotor de l'EGFR probablement deguda a un mecanisme de compensació provocat per l'increment en els nivells proteics d'EGFR.

La segona estratègia experimental que es va seguir per avaluar la transcripció de l'EGFR i altres receptors de la família ErbB va ser l'anàlisi per PCR de l'ARN missatger d'aquests receptors. L'anàlisi tant per PCR semiquantitativa (Figura R-5B) com per PCR en temps real (Figura R-5C) mostra que els nivells d'ARNm d'EGFR i ErbB3 en les cèl·lules PS^{-/-} són similars a les cèl·lules control. En conjunt, aquests resultats indiquen que l'increment dels nivells de l'EGFR en els fibroblasts PS^{-/-} no és degut a una alteració a nivell transcripcional del receptor o a una activació del seu promotor.

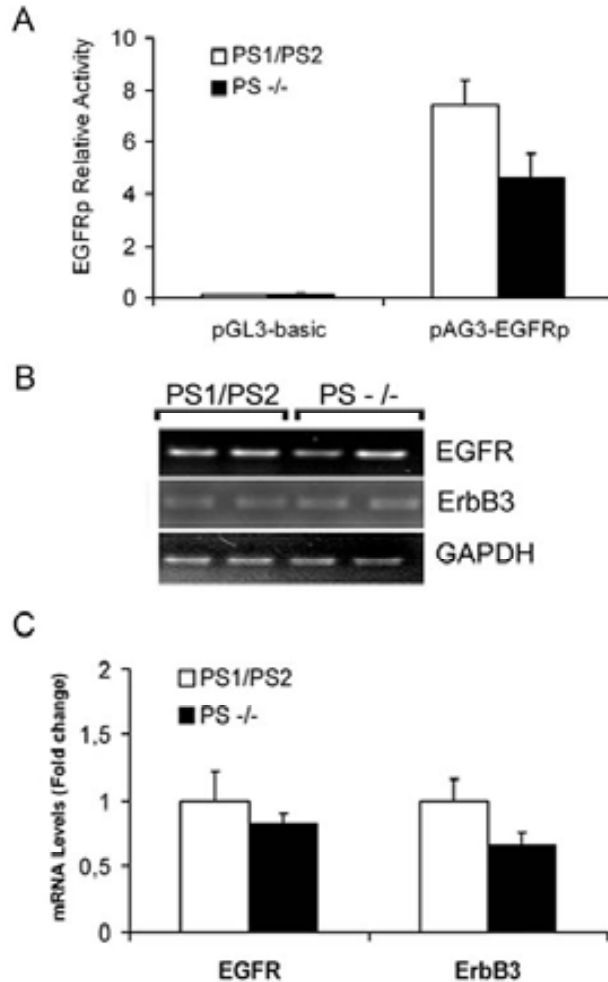


Figura R-5: L'absència de PS no afecta la transcripció de l'EGFR. **A)** Regulació del promotor del gen de l'EGFR (EGFRp). La figura mostra l'anàlisi de l'activitat de l'EGFRp en fibroblasts control (n=6) i PS^{-/-} (n=6). La mesura es va realitzar transfectant les cèl·lules amb un plàsmid amb el gen de la luciferasa sense el promotor d'EGFR que l'activi (PGL3-basic) o sota el control d'EGFRp (pER1-Luc). Les mesures de l'activitat luciferasa es van realitzar per triplicat i es van estandarditzar amb un control intern de transfecció (Renilla) al qual es van referir cada una de les mesures d'activitat luciferasa. **B,C)** L'anàlisi per RT-PCR (**B**) i RT-PCR en temps real (**C**) dels nivells d'ARNm d'EGFR i ErbB3 en fibroblasts control i deficients en PS. Els valors van ser normalitzats al gen GAPDH. Les dades representen la mitja ± s.e.m. de tres mostres independents.

6. REGULACIÓ DE LA DEGRADACIÓ DE L'EGFR PER LES PS

6.1. Increment de la vida mitja de l'EGFR durant la seva degradació constitutiva i induïda per lligand en absència de PS

En absència de lligand, l'EGFR és internalitzat lentament ($t_{1/2} \approx 20-30$ min) i la seva vida mitja en fibroblasts és aproximadament 10-14 hores (Wiley, 2003). Per estudiar si les PS afecten l'estabilitat de l'EGFR mitjançant la regulació de la seva degradació, fibroblasts control i PS^{-/-} es van cultivar en condicions normals de cultiu (10% FBS) incloent cicloheximida (CHX, 25 µg/ml). La CHX és un inhibidor de l'elongació durant la síntesi proteica, de manera que evita la formació de proteïnes *de novo* permetent visualitzar la cinètica de degradació d'una determinada proteïna.

En les nostres condicions experimentals, es va comprovar que en cèl·lules control i en condicions normals de cultiu l'EGFR és estable durant 6h i que progressivament és degradat ($t_{1/2} \approx 12$ h). Contràriament, en cèl·lules deficientes en PS l'EGFR té una vida mitja més llarga ($t_{1/2} = 24-48$ h), el que indica una major estabilitat de l'EGFR en absència de la PS (Figura R-6A).

La degradació induïda per lligand és el principal mecanisme de *downregulation* de l'EGFR posterior a la seva activació. Així, es va voler analitzar l'estat d'aquest mecanisme en fibroblasts control i PS^{-/-} mitjançant la incubació d'aquestes amb CHX (25 µg/ml) i EGF (150 ng/ml). A diferència de les cèl·lules no tractades amb lligand, la degradació de l'EGFR en cèl·lules control en presència d'EGF està accelerada ($t_{1/2} \approx 1$ h) (Figura R-6A). En canvi, en els fibroblasts PS^{-/-} la degradació induïda per lligand de l'EGFR està retardada respecte els fibroblasts control ($t_{1/2} \approx 3$ h) (Figura R-6A).

6.2. La degradació de l'EGFR induïda per lligand és independent del proteosoma en absència de PS funcional

La principal via de degradació de l'EGFR és la via de degradació lisosomal. Malgrat tot, l'activitat proteosomal és necessària per l'eficient transferència del receptor als compartiments de degradació (Longva et al., 2002). Per estudiar si les PS regulen diferencialment la degradació de l'EGFR a través del lisosoma o del proteosoma, es va analitzar la degradació de l'EGFR incubant les cèl·lules amb EGF en presència de CHX i en presència o absència de NH_4Cl , que disminueix l'acidificació les vesícules endocítiques i impedeix la degradació del lisosoma, o de l'inhibidor proteosomal lactacistina. En presència de CHX i EGF i en absència dels dos inhibidors es reproduïx el resultat presentat en la Figura 6A, és a dir, l'EGFR en cèl·lules PS^{-/-} presenta una major estabilitat que en les cèl·lules control (Figura R-6B). En inhibir el proteosoma amb lactacistina l'estabilitat de l'EGFR en les cèl·lules control s'incrementa passant a tenir una vida mitja de $\approx 6-12$ h. En canvi, la inhibició del proteosoma no causa canvis en l'estabilitat de l'EGFR en els fibroblasts PS^{-/-}. En inhibir el lisosoma amb NH_4Cl la degradació de l'EGFR s'inhibeix tant en cèl·lules control com en cèl·lules deficientes en PS ($t_{1/2} \approx 12$ h) (Figura R-6B).

En conjunt, aquests resultats indiquen que la degradació de l'EGFR induïda per lligand es produeix principalment via lisosomal però que el proteosoma té un important paper en aquesta degradació (Longva et al., 2002). A més a més, els nostres resultats indiquen que en absència de PS la degradació de l'EGFR és independent de l'activitat proteosomal.

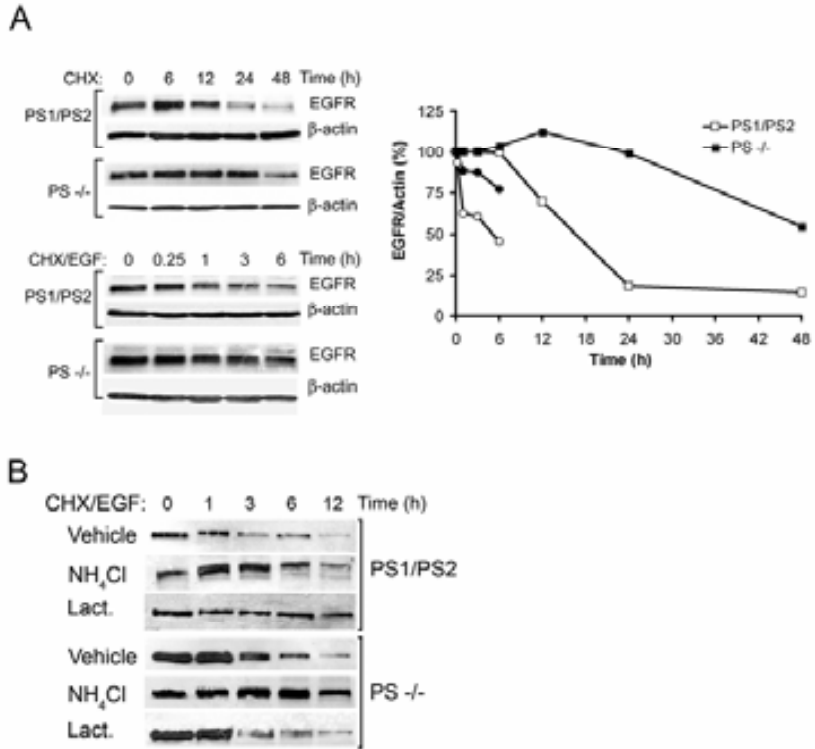


Figura R-6: Presenilina regula la degradació dependent del proteosoma d'EGFR. A) La degradació de l'EGFR va ser analitzada en cèl·lules en cultiu en absència (panell superior i quadrats en la quantificació) o presència (panell inferior i cercles) d'EGF (150 ng/ml) i l'inhibidor de la síntesis proteica *de novo* cicloheximida (CHX, 25 μ g/ml) durant 0-48h. El percentatge d'EGFR normalitzat a β -actina va ser quantificat per cada punt. El temps d'exposició dels Western blots van ser ajustats per tal de mostrar en el temps zero similars nivells d'EGFR en fibroblasts control (en blanc) o PS^{-/-} (en negre). Tant la degradació constitutiva com la induïda per lligand de l'EGFR es troba retardada en absència de PS. **B)** Degradació de l'EGFR en presència d'EGF i CHX i d'inhibidors del proteosoma (lactacistina, 50 μ M) i lisosoma (NH₄Cl, 10 mM) en cèl·lules control i PS^{-/-} durant 0-12 hores. NH₄Cl va inhibir la degradació de l'EGFR tant en fibroblasts control com PS^{-/-}, en canvi la lactacistina només va inhibir la degradació de l'EGFR en fibroblasts control.

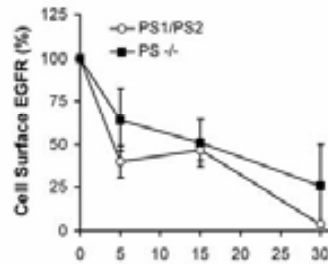
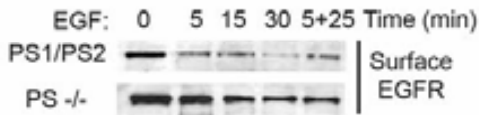
6.3. Les PS no afecten la internalització de l'EGFR però sí la seva acumulació durant la ruta endocítica

La regulació de la degradació de l'EGFR per PS es podria explicar per diferències en la internalització del receptor. Assajos de biotinació de l'EGFR de superfície mostren taxes d'internalització de l'EGFR similars en fibroblasts control i PS-/- (Figura R-7A). Tanmateix, mentre que en cèl·lules control l'EGFR és reciclat de nou a la membrana plasmàtica després de retirar el lligand, el reciclatge de l'EGFR es veu alterat en fibroblasts PS-/- (Figura R-7A).

Assajos d'immunofluorescència utilitzant l'EGF conjugat a un fluorocrom (EGF-Alexa488) i visualització per microscòpia confocal posen de manifest un increment en els nivells d'EGFR en la superfície cel·lular en les cèl·lules PS-/- en el temps inicial respecte les cèl·lules control (Figura R-7B i R-2B). A temps curts, no s'observen canvis en la internalització de l'EGFR en fibroblasts PS-/- respecte als control corroborant els assajos de biotinació (Figura R-7A). En ambdós tipus cel·lulars, els nivells d'EGFR de la superfície cel·lular disminueixen significativament als 15 minuts d'estimulació, mentre que les vesícules endocítiques que contenen EGFR es van incrementant. L'anàlisi quantitatiu de les imatges mostra com el nombre de vesícules formades entre els 15-60 minuts de tractament és similar en cèl·lules control i PS-/. Sorprenentment, i a diferència de les cèl·lules control, les cèl·lules PS-/- acumulen l'EGFR en vesícules grans i irregulars a temps llargs (1-3 h).

En conjunt, aquests resultats suggereixen una alteració en la degradació de l'EGFR induïda per lligand en absència de PS probablement deguda a l'acumulació de l'EGFR en compartiments intracel·lulars en etapes tardanes de la ruta endocítica i una alteració en el procés de reciclatge del receptor.

A



B

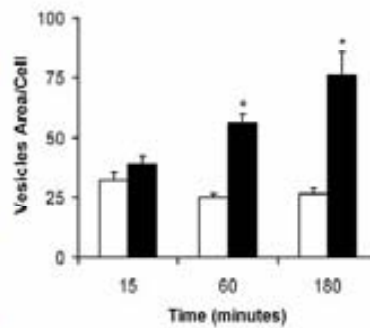
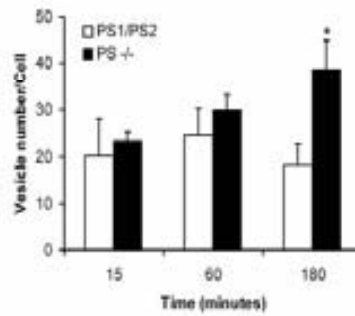
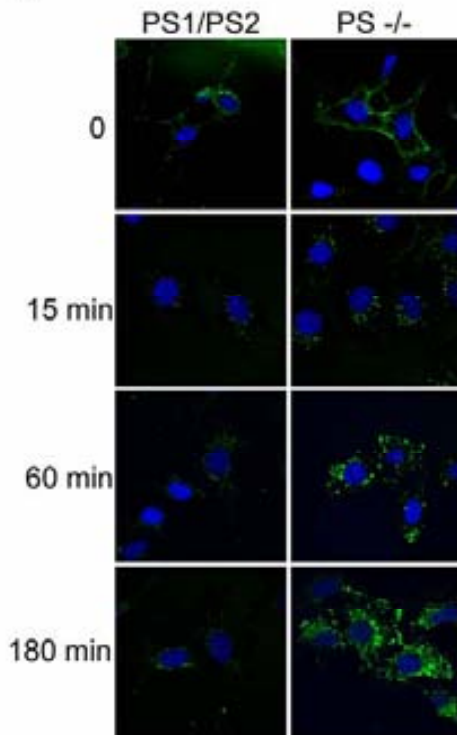


Figura R-7: L'absència de PS no afecta la internalització de l'EGFR però sí afecta a les etapes tardanes de la ruta endocítica i el reciclatge. A) Les cèl·lules van ser tractades amb EGF (150 ng/ml) en els temps indicats o tractades durant 5 minuts i després de retirar completament el lligand sent substituït el medi de cultiu per medi fresc incubades durant 25 minuts a 37°C (últim carril). La taxa d'internalització i reciclatge es va analitzar mitjançant el marcatge amb biotina i aïllament per immunoprecipitació de l'EGFR de superfície. La internalització de l'EGFR és similar en cèl·lules control i PS^{-/-}, tanmateix el reciclatge de l'EGFR cap a la membrana plasmàtica (darrer carril) no es produeix en fibroblasts PS^{-/-}. Les dades de la quantificació (a la dreta) es mostren com a mitja ± s.d. de tres experiments independents. **B)** L'endocitosi de l'EGFR induïda per lligand als temps indicats es va estudiar visualitzant el receptor unit a l'EGF conjugat a un fluorocrom (EGF-A488; 150 ng/ml). Les cèl·lules es van fixar amb 4% paraformaldehid en PBS i es van examinar per microscòpia confocal. Les imatges obtingudes es van analitzar i quantificar amb el programa Metamorph. S'observa una acumulació de l'EGFR entre 1 i 3 hores en les cèl·lules PS^{-/-} indicant una alteració en les fases tardanes de la ruta endocítica en aquestes cèl·lules (n=10-28 per tractament i temps), * $p < 0.05$.

6.4. La ubiquitinització de l'EGFR es veu alterada en absència de PS

La ubiquitinització sostinguda i la deubiquitinització depenent del proteosoma són necessàries pel correcte alliberament de l'EGFR als cossos multivesiculars i en conseqüència per a la seva degradació lisosomal (Alwan et al., 2003; Longva et al., 2002). Per determinar si PS pot regular l'estabilitat de l'EGFR alterant la seva ubiquitinització, les cèl·lules es van incubar amb i sense EGF a 4°C durant 15 minuts i després de retirar completament el medi es van transferir a 37°C durant els temps indicats. En fibroblasts control, en absència de lligand es van detectar baixos nivells d'EGFR ubiquitinitzat (Figura R-8A) que van incrementar-se progressivament en afegir el lligand, a més, l'addició del lligand va induir l'aparició de formes d'elevat pes molecular que probablement corresponen al receptor multiubiquitinitzat (Figura R-8B). Sorprenentment, en fibroblasts PS^{-/-} la ubiquitinització de l'EGFR es troba significativament incrementada en absència de lligand (Figura R-8 A i B) mentre que és ràpidament deubiquitinitzat en addicionar-hi l'EGF, especialment les formes del receptor multiubiquitinitzades (Mosesson et al., 2003) coincidint amb sostinguts nivells d'EGFR total i fosforilat (Figura R-8B).

En conjunt, aquestes dades suggereixen que la pèrdua de PS estabilitza d'EGFR afectant el procés d'ubiquitinització/deubiquitinitació, pas essencial per a la degradació de l'EGFR.

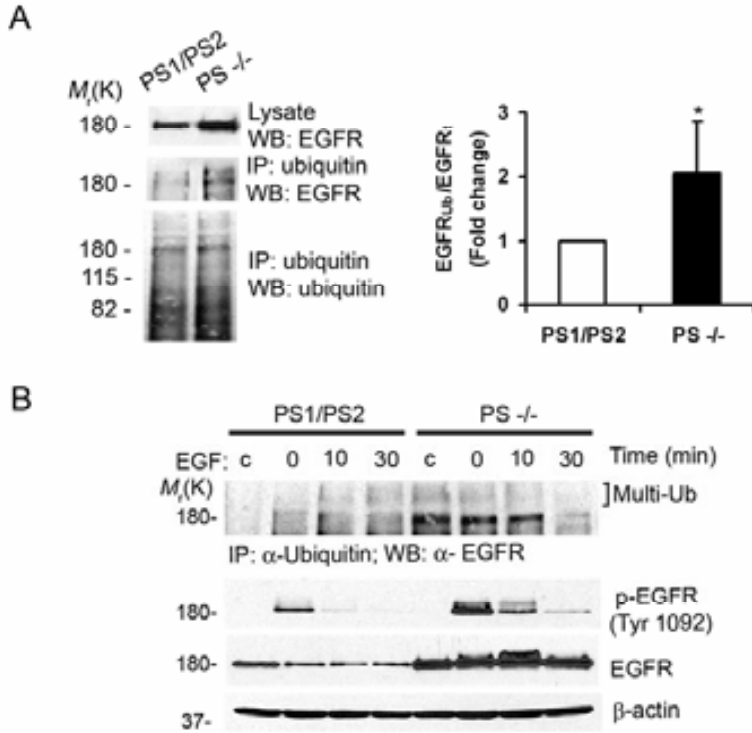


Figura R-8: El procés d'ubiquitinització i deubiquitinització de l'EGFR es veu alterat en absència de PS. A) Lisats de fibroblasts control i PS^{-/-} van ser immunoprecipitats amb anticòs α-ubiquitina i analitzats per WB tal com es detalla. La proporció d'EGFR_{ubiquitinitzat}/EGFR_{total} es troba significativament incrementada en fibroblasts PS^{-/-}. Es presenten les dades com a mitja ± s.d. de quatre experiments. * $p < 0.05$. **B)** Fibroblasts control i PS^{-/-} es van incubar en absència (c) o presència d'EGF a 4°C durant 15 minuts i o bé lisats (0) o bé transferits a 37°C durant 10 i 30 minuts després de retirar completament el lligand sent substituït el medi de cultiu per medi fresc. Els lisats es van immunoprecipitar amb un anticòs α-ubiquitina i/o es va detectar l'EGFR o p-EGFR en els lisats per Western blot. La imatge és representativa de tres experiments.