



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE VETERINARIA

**"INTERFERENCIA ENTRE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE
MEDIAN SUPERVIVENCIA Y PROLIFERACIÓN EN
QUERATINOCITOS: IMPLICACIONES EN
CARCINOGENESIS EPIDÉRMICA"**

Hugo Leis Martínez

Lugo, Julio de 2005

Este trabajo ha sido realizado con el soporte económico de los siguientes proyectos de investigación:

SAF2002-04368-C02-01
SAF2002-04368-C02-02
SAF2002-01037
CAM 08.1/0054.1/2001

Para la realización de este trabajo, Hugo Leis Martínez ha disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario en la Universidad de Santiago de Compostela, con estancias reconocidas en CIEMAT. (Centro de Investigaciones Energéticas, Medio-Ambientales y Tecnológicas, Madrid) y el IBV-CSIC (Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia) y una beca predoctoral del CIPF (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia).

ABSTRACT

Nuclear Factor κ B (NF- κ B), Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K/Akt) and the Glucocorticoid receptor (GR) are essential molecules that participate in a coordinated way in the control of several aspects of the keratinocyte homeostasis, including apoptosis, epidermal proliferation and differentiation and the inflammatory response in the skin. The I κ B kinase complex (IKK) is the main regulatory point of the NF- κ B activity, and numerous signals converge on it. The regulatory subunit IKK γ , also called Nemo (NF- κ B essential modulator) is critical for the IKK complex activity and its partial or total loss of function is correlated with a wide range of human pathologies which are characterized by primary defects in one or more epithelium.

In this work, we have approached the functional study of IKK γ in keratinocyte cultures and mouse skin through the use of the deletion mutant IKK γ - Δ N97, which acts as a dominant negative of the NF- κ B function by uncoupling the IKK complex subunits, thus inhibiting in a dose-dependent manner of the inducible IKK activity. Mouse keratinocytes stably transfected with IKK γ - Δ N97 exhibited morphological alterations and a dramatic increase in their apoptosis rate, even in the absence of stimulus, blocking the degradation of I κ B α and the nuclear localization of p65, increasing the levels of the PTEN phosphatase and reducing the phosphorylation of Akt. We have generated transgenic mice expressing the IKK γ N-terminal deleted form in the basal layer of the epidermis and other stratified epithelia by using the bovine Keratin 5 promoter (K5-IKK γ - Δ N97),

which shows alterations in the follicular morphogenesis and the inflammatory cutaneous response.

Using tumorigenic approaches *in vivo*, we have demonstrated that Akt contributes to the tumoral progression of the keratinocytes through the partial inhibition of GSK3 β , favoring the CycD1 nuclear localization by several mechanisms that increase the expression and stability of the cyclin.

In addition, we have showed that part of the antitumoral effects of the Glucocorticoids (GCs) during skin carcinogenesis are mediated by GR interaction with PI3K/Akt, resulting in a PI3K/Akt decreased activity. GCs reduced the IKK kinase activity and the NF- κ B-DNA binding due, at least in part, to a decrease in IKK γ levels.

RESUMEN

NF- κ B, PI3K/Akt y GR son moléculas esenciales que participan, de una manera conjunta y coordinada, en el control de diversos aspectos de la homeostasis de los queratinocitos, incluyendo la resistencia a la apoptosis, la proliferación y la diferenciación epidérmica, así como el proceso inflamatorio cutáneo. El complejo IKK es un punto central en la regulación de la actividad NF- κ B y numerosas señales convergen en él. La subunidad reguladora IKK γ es esencial para la función del complejo IKK y su falta de función total o parcial se correlaciona con diversas patologías humanas que se caracterizan por defectos primarios en uno o más epitelios. En este trabajo hemos abordado el estudio funcional de IKK γ en queratinocitos en cultivo y en piel de ratón *in vivo*, mediante el uso del mutante de delección IKK γ - Δ N97, que actúa como un dominante negativo de función NF- κ B. IKK γ - Δ N97 provoca el desacoplamiento de los complejos, dando como resultado una inhibición parcial y dependiente de dosis de la actividad NF- κ B inducible. Además produce alteraciones morfológicas y un aumento de la apoptosis de los queratinocitos sin estimular, bloqueando la degradación de I κ B α y la localización nuclear de p65, aumentando los niveles de PTEN y reduciendo la fosforilación de Akt. Hemos generado ratones transgénicos que expresan IKK γ - Δ N97 en los queratinocitos basales de la epidermis y otros epitelios estratificados (K5-IKK γ - Δ N97), los cuales presentan alteraciones en la morfogénesis folicular y la respuesta inflamatoria cutánea. Mediante aproximaciones de tumorigénesis *in vivo*, hemos demostrado que Akt contribuye a la progresión tumoral de los queratinocitos a través de la inhibición parcial de GSK3 β , permitiendo la localización nuclear de CycD1 mediante diversos mecanismos que aumentan la expresión y estabilidad de la ciclina. Asimismo, hemos demostrado que parte de los efectos antitumorales de los GCs durante la carcinogénesis epidérmica están mediados por la interacción de GR con PI3K/Akt. Dicha interacción da lugar a una disminución de la actividad PI3K/Akt, de la actividad IKK y de la actividad de unión de NF- κ B al ADN debido, al menos en parte, a un descenso en los niveles de IKK γ .

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AED	Displasia ectodérmica anhidrótica
Akt/PKB	Proteína quinasa B
AP-1	Proteína activadora-1
APC	Adenomatosis y poliposis de colon
AR	Receptor de andrógenos
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BAFF	Factor activador de células B
BAFFR	Receptor del factor activador de células B
BCR	Receptor de células B
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina-5-monofosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
c/EBP	Elemento de unión al AMP cíclico
CAC	Cáncer asociado a colitis
CAT	Cloranfenicol-acetil-transferasa
CBP	Proteína de unión a CREB
CK2	Caseína quinasa 2
CMV	Citomegalovirus
Co-IP	Co-inmunoprecipitación
CREB	Elemento de respuesta de unión al AMP cíclico
C-terminal	Extremo carboxi terminal
CycD1	Ciclina D1
CyPG	Prostaglandinas ciclopentanona
Cys	Cisteína
DBD	Dominio de unión al ADN
Dex	Dexametasona
Dim	<i>Dominio de dimerización</i>
DMBA	7,12-Dimetil-benzoantraceno
dpc	Días <i>post-coitum</i>
DSS	Sal sódica de dextran sulfato
DTT	Di-tio-treitol
ED	Displasia ectodérmica
EDA1	Ectodisplasina-1
EDAR	Receptor de la ectodisplasina
EDARADD	Dominio de muerte asociado al receptor de la ectodisplasina
EDTA	Etilen-diamin-tetra-acético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Etilen-glicol-tetra-acético
EMSA	Ensayo de cambio de movilidad electroforética
ER	Receptor de estrógenos
GCs	Glucocorticoides
GR	Receptor de Glucocorticoides
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides
GRR	Región rica en Glicina
GS-1	Glucógeno sintasa-1
GSK-3	Glucógeno sintasa quinasa 3

HA	Hemaglutinina
HED	Displasia ectodérmica hipohidrótica
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HLH	Hélice-lazo-hélice
HMG	Grupo de alta movilidad
HPA	Eje hipotalámico-pituitario-adrenal
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
IBD	Enfermedad inflamatoria Intestinal.
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
ID	Inmunodeficiencia
IF	Inmunofluorescencia
IH	Inmunohistoquímica
IκB	Inhibidor κB
IKK	Inhibidor κB quinasa
IKK-K	Inhibidor κB quinasa quinasa
IL-1	Interleuquina 1
IL-αR	Receptor de la interleuquina α
IMiS	Fármacos inmunomoduladores
IP	<i>Incontinentia Pigmenti</i>
JNK	Jun quinasa
K5	Queratina 5
Kba	Kilobase
KD	Dominio Quinasa
Kda	Kilodalton
LBD	Dominio de unión al ligando
LEF	Factor "enhancer" linfoide
LPS	Lipopolisacáridos
LTβR	Receptor de la linfotoxina β
Lys	Lisina
LZ	Cremallera de leucina
mA	MiliAmperio
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEFs	Fibroblastos Embrionarios de ratón
MEKK	MAPK/ERK quinasa quinasa
MMP9	Metaloproteinasa de la matriz 9
MMTV	Virus tumoral mamario de ratón
MnSOD	Magnesio superóxido dismutasa
NAC	N-acetil-L-cisteína
NBD	Dominio de unión a NEMO
NBP	Péptido de unión a NEMO
NEMO	Modulador esencial del factor nuclear κ-B
NES	<i>Secuencia de exportación nuclear</i>
NF-κB	Factor nuclear κB
NIK	Quinasa inductora de NF-κB
NLS	Señal de localización nuclear
NSAID	Antiinflamatorios no esteroideos
N-terminal	Extremo animo terminal
nu/nu	Ratones desnudos
P0	Día 0 tras el parto
Pap	Papiloma
PB	Línea de queratinocitos derivada de papiloma B

pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-quinasa
PIP3	Fosfatidil-inositol-3-fosfato
PKC	Proteína quinasa C
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PR	Receptor de progesterona
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina
RHD	Dominio de homología Rel
RIP	Proteína de interacción con el receptor
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RSK-1	Quinasa ribosomal S6-1
SCC	Carcinoma de células escamosas
SDS	Dodecil-sulfato-sódico
SENCAR	Ratones sensibles a carcinogénesis
Ser	Serina
SiRNA	Pequeño RNA de interferencia
SMI	Pequeñas moléculas inhibidoras
Spi2A	Inhibidor de la serina proteasa 2A
STAT	Activadora de la transcripción y transducción de señales
SUMO	Pequeño modificador similar a ubiquitina
TAD	Dominio de transactivación
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TCF	Factor de células T
TCR	Receptor de células C
TFIIB	Factor de transcripción II B
TG/tg	Transgénico
Thr	Treonina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TPA	12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato
TRAIL	Ligando de TNFR inductor de apoptosis
Tyr	Tirosina
Ub	Ubiquitina
uPA	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
UV	Ultravioleta
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WB	<i>Western-Blot</i>
WCE	Extracto total de proteínas
WT/wt	<i>Wild-type</i>
XIAP	Proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X
ZF	Dedo de Zinc

INTRODUCCIÓN	1
1. NF- κ B	1
1.1. La familia Rel/NF- κ B	1
1.2. La familia I κ B	3
1.3. Vías de activación de NF- κ B	5
1.4. Mecanismos adicionales de regulación de la actividad transcripcional NF- κ B	7
1.4.1. <i>Regulación por fosforilación</i>	8
1.4.2. <i>Otros mecanismos de regulación</i>	9
2. El complejo I κ B quinasa	11
2.1. Miembros y estructura	11
2.2. Mecanismos de activación	14
2.2.1. <i>De TNF-α a NF-κB</i>	15
2.2.2. <i>Procesos de fosforilación/defosforilación</i>	17
2.2.3. <i>Otros mecanismos de activación</i>	18
2.3. Mecanismos de inhibición de NF- κ B	20
3. NF- κ B y apoptosis	20
3.1. Mecanismos que protegen frente a estímulos pro-apoptóticos	21
3.2. Modelos transgénicos de NF- κ B en apoptosis	23
4. NF- κ B en inflamación y cáncer	23
4.1. NF- κ B como promotor tumoral	25
4.2. NF- κ B en la supresión tumoral	26
4.3. NF- κ B asocia inflamación y cáncer	28
5. La piel como sistema modelo	28
5.1. Estructura y fisiología	31
5.2. Modelo de carcinogénesis química en piel de ratón	33
6. Función de NF- κ B en la piel	33
6.1. Patologías cutáneas asociadas a NF- κ B	33
6.1.1. <i>Desórdenes proliferativos e inflamatorios</i>	34
6.1.2. <i>Cáncer</i>	35
6.1.3. <i>Patologías de carácter genético</i>	36
6.2. Modelos transgénicos NF- κ B en piel	40
7. Interferencia de NF- κ B con otras vías de señalización	40
7.1. PI3K/Akt	40
7.1.1. <i>Importancia biológica de Akt</i>	42
7.1.2. <i>Regulación de Akt</i>	43
7.1.3. <i>Función de GSK3β</i>	45
7.1.4. <i>Akt y NF-κB</i>	46
7.2. GR	46
7.2.1. <i>Importancia biológica de GR</i>	47
7.2.2. <i>Mecanismos moleculares de la acción de GR</i>	51
OBJETIVOS	53
MATERIALES Y MÉTODOS	53
MATERIALES	53
1. Productos	53
1.1. Reactivos químicos	53
1.2. Productos de Biología Molecular	53
1.3. Material Radioactivo	53

2. Cultivos celulares	53
2.1. Materiales	53
2.2. Líneas celulares utilizadas	54
2.3. Tratamientos	54
3. Animales	55
3.1. Cepas de ratón empleadas	56
3.2. Tratamientos	56
4. Anticuerpos	57
4.1. Anticuerpos primarios	57
4.2. Anticuerpos secundarios	58
5. Plásmidos y vectores de expresión	59
MÉTODOS	61
1. Transfecciones	61
1.1. Transfecciones transitorias	61
1.1.1. Transfección con fosfato cálcico	61
1.1.2. Transfección con lipofectamina	61
1.2. Transfecciones estables	61
2. Cinética del crecimiento celular	62
3. Estudios de Apoptosis	62
4. Extracción de proteínas	63
4.1. Obtención de extractos totales de proteína (WCE)	63
4.2. Fraccionamiento celular	63
5. Inmunodetección de proteínas (<i>Western Blot</i>)	64
5.1. Geles de acrilamida y transferencia a membrana	64
5.2. Bloqueo e incubación con los anticuerpos	64
6. Determinación de la actividad CAT	65
7. Ensayos de cambio de movilidad electroforética en gel (EMSA)	65
8. Ensayos de Co-inmunoprecipitación (Co-IP)	66
9. Ensayos de actividad quinasa	66
10. Inmunofluorescencias (IF)	67
11. Clonaje	68
12. Generación e identificación de los animales transgénicos	68
13. Estudio histológico	70
13.1. Preparación de las muestras	70
13.2. Tinción con Hematoxilina y Eosina	70
13.3. Inmunohistiquímica (IH)	71
14. Extracción de queratinocitos primarios de ratón	71
15. Carcinogénesis química en piel de ratón	72
16. Ensayos de tumorigénesis <i>in vivo</i>	72
RESULTADOS	73
1. Descripción del mutante de delección IKK γ - Δ N97	73
2. IKK γ - Δ N97 actúa como un dominante negativo de la función NF- κ B en queratinocitos	74
2.1. La fosforilación de I κ B α inducida por TNF- α se inhibe en los queratinocitos que expresan IKK γ - Δ N97 de forma transitoria	75
2.2. La fosforilación de p65 tras un estímulo con TNF- α se inhibe en los queratinocitos que expresan IKK γ - Δ N97 de forma transitoria	77

2.3. IKK γ - Δ N97 reduce la unión de los dímeros NF- κ B al ADN inducida por TNF- α	78
2.4. IKK γ - Δ N97 reduce los niveles de transactivación de NF- κ B inducidos por TNF- α	80
3. Expresión de IKK γ - Δ N97 de forma estable en queratinocitos de ratón	82
3.1. La expresión estable de IKK γ - Δ N97 provoca cambios morfológicos y un retraso en la cinética de crecimiento de los queratinocitos	82
3.2. IKK γ - Δ N97 provoca un aumento considerable en la tasa de apoptosis en queratinocitos	85
3.3. Alteraciones en la vía de activación de NF- κ B en queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97	87
3.3.1. <i>IκBα se acumula tanto en el citoplasma como en el núcleo de los queratinocitos PB-IKKγ-ΔN97</i>	89
3.3.2. <i>La fosforilación y translocación nuclear de p65 está alterada en los queratinocitos que expresan de forma estable IKKγ-ΔN97</i>	91
3.3.3. <i>La actividad inducible de unión al ADN de NF-κB disminuye en las células PB-IKKγ-ΔN97</i>	95
3.3.4. <i>Los niveles de las subunidades catalíticas IKKα e IKKβ están aumentados en los queratinocitos PB-IKKγ-ΔN97</i>	96
3.3.5. <i>IKKγ-ΔN97 altera el equilibrio del complejo IKK en queratinocitos PB</i>	97
3.4. Alteraciones en otras vías inducidas por IKK γ - Δ N97 en queratinocitos	99
3.4.1. <i>La tasa de fosforilación en la Serina 473 de Akt/PKB se encuentra disminuída en los queratinocitos PB-IKKγ-ΔN97</i>	99
3.4.2. <i>La proteína supresora de tumores PTEN presenta niveles elevados en los queratinocitos PB- IKKγ-ΔN97</i>	100
4. Generación y ensayo funcional del plásmido K5-HA-IKK γ - Δ N97	102
5. Generación de los ratones transgénicos K5-IKK γ - Δ N97	104
6. Análisis de los ratones transgénicos K5-IKK γ - Δ N97	106
6.1. Análisis de la expresión de IKK γ - Δ N97 en las líneas transgénicas generadas	106
6.2. Estudio histopatológico	107
7. Los queratinocitos primarios de ratones transgénicos K5-IKK γ - Δ N97 presentan defectos en la activación de NF- κ B	111
8. Expresión y fosforilación de GSK3 β durante la progresión tumoral en piel de ratón	115
8.1. La actividad relativa de GSK3 β aumenta en papilomas tempranos	116

8.2. La actividad de GSK3 β está controlada por procesos de fosforilación y defosforilación	118
8.3. Relación entre la fosforilación de GSK3 β y la localización subcelular de la Ciclina D1	120
9. La quinasa Akt regula el estado de fosforilación de GSK3 β en tumores epidérmicos	122
9.1. La fosforilación de GSK3 β en el residuo Ser9 se encuentra aumentada en tumores que sobreexpresan Akt	122
9.2. Las actividades Akt y GSK3 β están relacionadas en tumores que sobreexpresan Akt	124
9.3. Localización subcelular de CycD1 en tumores que sobreexpresan Akt	125
10. La sobreexpresión del receptor de glucocorticoides (GR) en queratinocitos de ratón interfiere con la vía PI3K/Akt	127
10.1. El tratamiento con Dexametasona induce un aumento de la asociación entre GR y la subunidad p85 α de PI3K	128
10.2. La asociación GR/p85 α disminuye la actividad PI3K y la fosforilación de Akt, independientemente de su actividad transcripcional	129
11. La sobreexpresión de GR en queratinocitos de ratón disminuye la capacidad tumorigénica de Akt in vivo	131
11.1. GR disminuye el número y el tamaño de los tumores inducidos por Akt	132
11.2. GR disminuye la capacidad proliferativa inducida por Akt	134
11.3. GR disminuye la tasa de fosforilación de Akt	135
12. La sobreexpresión de GR en la piel de ratón interfiere con la vía PI3K/Akt: uso del modelo transgénico K5-GR	137
12.1. La sobreexpresión de GR en la piel aumenta su asociación con p85	137
12.2. La sobreexpresión de GR en la piel disminuye la actividad de Akt	138
12.3. El tratamiento con Dex disminuye la fosforilación de Akt en la piel de ratón	139
13. La sobreexpresión de GR en la piel de ratón interfiere con la vía NF- κ B in vivo	141
13.1. La sobreexpresión de GR en la piel de ratón se correlaciona con una disminución de la actividad IKK	141
13.2. La sobreexpresión de GR en la piel de ratón se relaciona con una disminución de los niveles de la subunidad IKK γ	142
13.3. La sobreexpresión de GR en la piel de ratón, produce una disminución de la tasa de unión de NF- κ B al ADN	142
DISCUSIÓN	145
1. IKK γ - Δ N97 actúa como un dominante negativo de la función NF- κ B en los queratinocitos	146
1.1. La inhibición del complejo IKK	146

1.2. Estequiometría del complejo IKK	147
1.3. <i>IKKγ-ΔN97 actúa como dominante negativo de la función NF-κB en los queratinocitos</i>	150
1.4. Consecuencias de la inhibición parcial de NF- κ B en queratinocitos PB	154
1.5. Funciones de IKK γ en apoptosis	158
2. Importancia de NEMO/IKK γ en patologías	162
2.1. <i>Modelo animal K5- IKKγ-ΔN97</i>	164
3. Interacción cruzada entre IKK/NF- κ B y PI3K/Akt/PTEN	169
4. Akt y GSK3 β en la progresión tumoral	173
5. El receptor de glucocorticoides (GR) interfiere con las vías de señalización PI3K/Akt e IKK/NF- κ B en la epidermis	177
5.1. GR interfiere con PI3K/Akt	177
5.2. GR altera la actividad IKK/NF- κ B	180
CONCLUSIONES	183
BIBLIOGRAFÍA	185

1. NF- κ B

La familia de factores de transcripción *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B) juega un papel determinante en muchos procesos biológicos, tales como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis, y se ha conservado con pocos cambios a lo largo de la evolución. NF- κ B fue descrito por primera vez como un complejo proteico presente en el núcleo de las células B que se unía al promotor del gen de la cadena *kappa* ligera de las inmunoglobulinas (Sen y Baltimore, 1986). Desde entonces, se ha demostrado que NF- κ B se expresa de forma ubicua, desde *Drosophila* hasta el hombre (Aggarwal, 2004).

Las primeras funciones descritas para NF- κ B estaban relacionadas con el sistema inmune (Ghosh y cols., 1998; Li y Verma, 2002; Bonizzi y Karin, 2004), a través de la regulación de la expresión de citoquinas, factores de crecimiento, y enzimas que intervienen en la activación de receptores implicados en inmunidad, incluyendo receptores de células T y B (Ghosh y cols., 1998; Silverman y Maniatis, 2001; Bonizzi y Karin, 2004). En los últimos años, se han acumulado evidencias que demuestran que NF- κ B ejerce funciones cruciales en la fisiopatología de numerosos tejidos (Hayden y Ghosh, 2004). Concretamente, en la piel, se ha demostrado que NF- κ B interviene en el desarrollo y diferenciación de la epidermis y apéndices cutáneos, y en los procesos proliferativos, inflamatorios y tumorales, por lo que las alteraciones en la función de NF- κ B están asociadas a numerosas patologías cutáneas (Bell y cols., 2002).

1.1. La familia Rel/NF- κ B

Se han descrito cinco miembros de la familia de proteínas NF- κ B en mamíferos: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B1), y p100/p52 (NF- κ B2). Todas ellas se caracterizan por la presencia de un dominio altamente conservado, denominado dominio de homología Rel (RHD), localizado en el extremo N-terminal de la proteína (Figura 1A), en el que residen las propiedades de dimerización, unión al ADN e interacción con las proteínas

inhibidoras de la actividad NF- κ B (I κ B). En ausencia de estímulos, las proteínas NF- κ B se encuentran formando homo- o heterodímeros retenidos en el citoplasma mediante su unión a I κ B, lo que impide su translocación eficaz al núcleo. Además, p65, RelB y c-Rel poseen en su secuencia un dominio de transactivación (TAD; Figura 1A), por lo que son estos tres miembros los únicos que pueden actuar *a priori* como factores de transcripción propiamente dichos (Hayden y Ghosh, 2004).

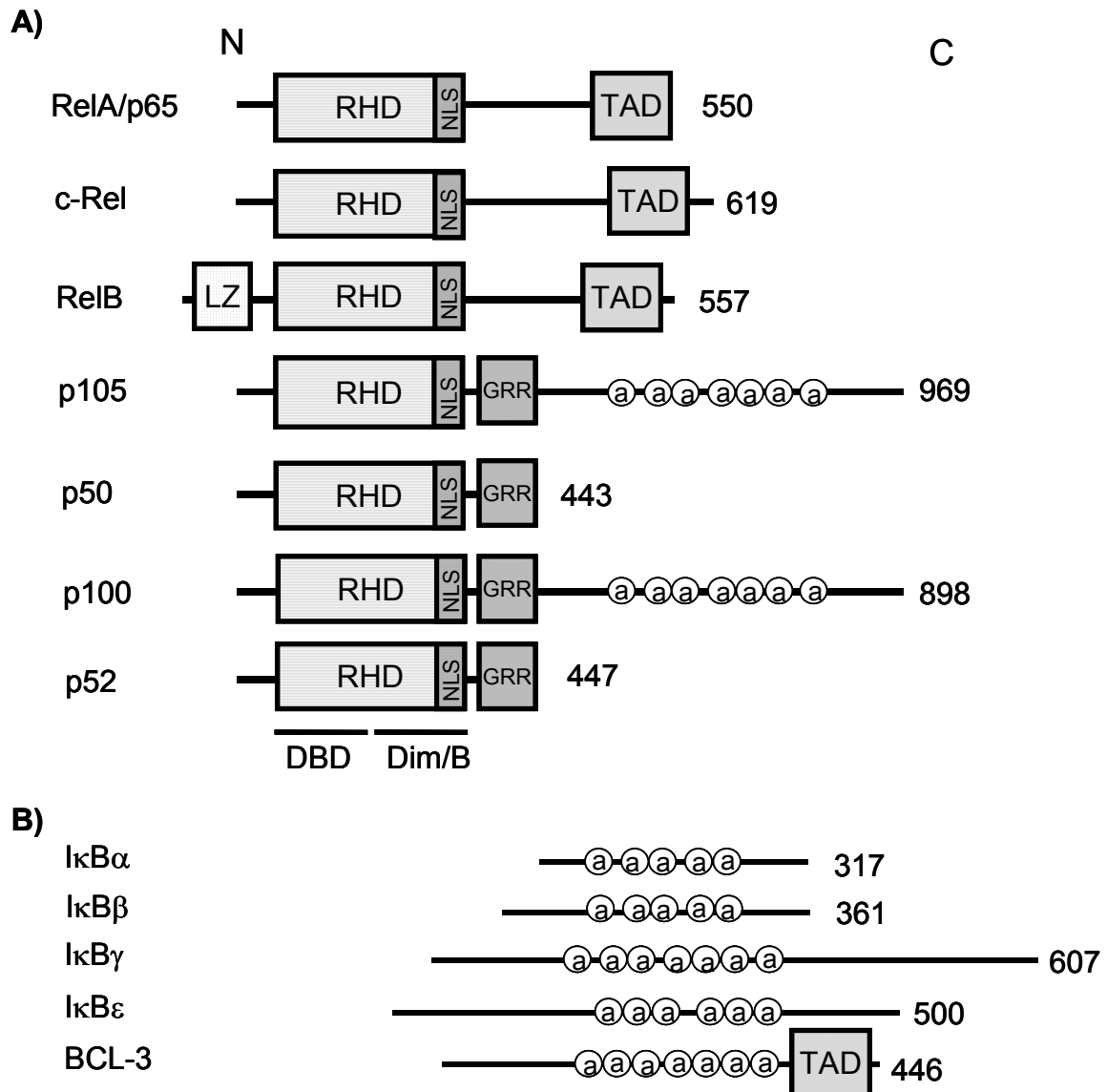


Figura 1: A) Representación esquemática de los miembros de la familia Rel/NF- κ B. B) Representación esquemática de los miembros de la familia I κ B. LZ: cremallera de leucina. RHD: dominio de homología Rel. NLS: señal de localización nuclear. GRR: región rica en glicina. TAD: dominio de transactivación. a: dominio de anquirina. DBD: dominio de unión al ADN. Dim: dominio de dimerización. B: dominio de unión al inhibidor. Adaptado de Hayden y Ghosh, 2004.

Por otro lado, NF- κ B1 y NF- κ B2 se sintetizan en forma de proteínas precursoras denominadas p105 y p100, respectivamente, las cuales poseen en su extremo C-terminal una serie de repeticiones de anquirina similares a las de las proteínas I κ B. Los precursores son procesados mediante proteólisis parcial, que elimina el extremo C-terminal para dar origen a p50 y p52, respectivamente (Bonizzi y Karin, 2004; Figura 1A).

En general, los factores NF- κ B pueden homo- y heterodimerizar formando combinaciones múltiples, aunque el dímero prototípico es el formado por p65 y p50. Los dímeros en los que participan RelB y c-Rel tienen sus funciones principales en el control de la respuesta inmune y se ha descrito que los dímeros RelB/p52 son los responsables de la actividad constitutiva de NF- κ B en órganos linfoides (Weih y cols., 1995; Hayden y Ghosh, 2004). Por otro lado, la mayoría de los datos indican que la unión de los dímeros formados por los miembros sin TAD (p50 y p52) a las secuencias κ B ejerce un efecto transcripcional represor; en cualquier caso, y como veremos más adelante, este es un tema controvertido.

1.2. La familia I κ B

Se conocen hasta la fecha 7 miembros de la familia de proteínas inhibitoras I κ B: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , BCL-3, p100 y p105. Todas ellas se caracterizan por la presencia de cinco a siete repeticiones de anquirina (Figura 1B), las cuales se unen a los dominios de dimerización de las proteínas NF- κ B (Hatada y cols., 1992; Karin y Delhase, 2000). El análisis cristalográfico de las estructuras de I κ B α e I κ B β unidas a distintos dímeros NF- κ B indica que las proteínas I κ B enmascaran únicamente la secuencia de localización nuclear (NLS) de p65, mientras que la NLS de p50 queda libre (Huxford y cols., 1998; Jacobs y Harrison, 1998; Malek y cols., 2001, 2003; Hayden y Ghosh, 2004). Este hecho, unido a que en la estructura de I κ B α y p65 existen secuencias de exportación nuclear (NES), da lugar a una circulación continua de los complejos NF- κ B/I κ B entre el núcleo y el citoplasma, aunque su localización en

ausencia de estímulo, sea preferentemente citosólica (Jonhon y cols., 1999; Huang y cols., 2000). Este equilibrio entre el núcleo y el citoplasma se ve alterado tras la degradación de $I\kappa B\alpha$, pues se desenmascara la NLS de p65 al tiempo que desaparece la contribución de las NES de $I\kappa B\alpha$, dando lugar a una localización preferentemente nuclear de los dímeros NF- κ B.

La especificidad transcripcional de NF- κ B está regulada, en parte, por la abundancia relativa de los distintos miembros de la familia $I\kappa B$ /NF- κ B en diversos tipos celulares, así como por la capacidad de ciertos dímeros de unirse preferentemente con ciertos inhibidores. Así, el heterodímero clásico p65/p50 está regulado predominantemente por $I\kappa B\alpha$. No obstante, el hecho de que los ratones deficientes en $I\kappa B\alpha$ tengan una actividad de unión al ADN de p65/p50 elevada, aunque no constitutivamente activa, demuestra la existencia de mecanismos adicionales de regulación (Klement y cols., 1996).

$I\kappa B\alpha$ es el inhibidor principal de la actividad NF- κ B (y el más estudiado) y, al mismo tiempo, se induce transcripcionalmente a través de secuencias κ B presentes en su promotor, por lo que constituye un ejemplo de mecanismo de autorregulación de la actividad NF- κ B. Actualmente, se asume que $I\kappa B\alpha$ ejerce su función también en el núcleo, puesto que el inhibidor, recién sintetizado, se une a los dímeros activos en el núcleo, promoviendo su exportación al citoplasma y finalizando así la activación de NF- κ B. En ausencia de $I\kappa B\alpha$, el término de la inducción de NF- κ B por TNF- α se encuentra retrasado y, si se expresa $I\kappa B\beta$ bajo el control del promotor de $I\kappa B\alpha$, se recupera la cinética de activación (Cheng y cols., 1998). Las proteínas $I\kappa B$ ($I\kappa B\alpha$, $I\kappa B\beta$ e $I\kappa B\epsilon$) regulan de forma diferente la terminación de la respuesta NF- κ B inducida, principalmente a través de distintas afinidades relativas hacia los dímeros NF- κ B y patrones temporales de degradación y resíntesis desiguales (Hoffmann y cols., 2002).

El inhibidor BCL-3 es el único que se localiza exclusivamente en el núcleo y, a través de la interacción con los homodímeros p50 y p52, promueve la actividad transcripcional de genes NF- κ B por mecanismos no completamente

elucidados. Se postula que, o bien BCL-3 retira estos homodímeros represores de las secuencias κB en el ADN, o bien forma con ellos complejos transcripcionalmente activos (Hayden y Ghosh, 2004). Trabajos previos revelan un papel de las proteínas p50, p52 y BCL-3 en la carcinogénesis en piel de ratón (Budunova y cols., 1999).

1.3. Vías de activación de NF- κB

La activación de NF- κB se desencadena por numerosos efectores (más de 150), incluyendo citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , factores de crecimiento, radiación UV y agentes virales y bacterianos, que actúan a través de numerosas cascadas de señalización. La mayoría de ellas convergen en la activación del complejo I κB quinasa (IKK), que da lugar a la consecuente degradación del inhibidor I $\kappa B\alpha$, promoviendo la actividad transcripcional de NF- κB . A continuación, describimos las tres vías de activación de NF- κB .

A) La primera de ellas, la vía “clásica” o “canónica”, se induce prototípicamente por TNF- α , el cual, tras la interacción con su receptor (TNFR), promueve el reclutamiento de varias proteínas adaptadoras, entre las que se encuentra la proteína con dominio de muerte asociada al receptor de TNF (TRADD), la proteína de interacción con el receptor (RIP) y el factor asociado al TNFR 2 (TRAF2) hacia la membrana plasmática (Hu y cols., 1995). A esto le sigue el reclutamiento y posterior activación del complejo IKK (Devin y cols., 2000).

El complejo IKK está formado por las subunidades IKK α e IKK β , que poseen actividad catalítica (Zandi y cols., 1997), y la subunidad reguladora IKK γ , también llamada NEMO (NF- κB *Essential Modulator*; Yamaoka y cols., 1998), que actúa a modo de soporte del complejo. Una vez activo, IKK fosforila las proteínas I κB (residuos Ser32 y Ser36 en I $\kappa B\alpha$ y Ser19 y Ser23 en I $\kappa B\beta$). Tras su fosforilación, las proteínas I κB , son reconocidas y poliubiquitinizadas en los residuos conservados de lisina 21 y 22 por miembros de la familia de

ubiquitin-ligasas SCF o SCRF, lo que marca a la proteína para su degradación por el sistema del complejo multiproteosoma 26S, permitiendo la liberación de NF- κ B de su inhibidor y su translocación al núcleo (Ben-Neriah 2002; Hayden y Ghosh, 2004; Figura 2A). A pesar de no tener actividad catalítica, se ha descrito que IKK γ es imprescindible para el correcto ensamblaje y funcionamiento del complejo IKK, y la activación de NF- κ B por la vía clásica (Hayden y Ghosh, 2004).

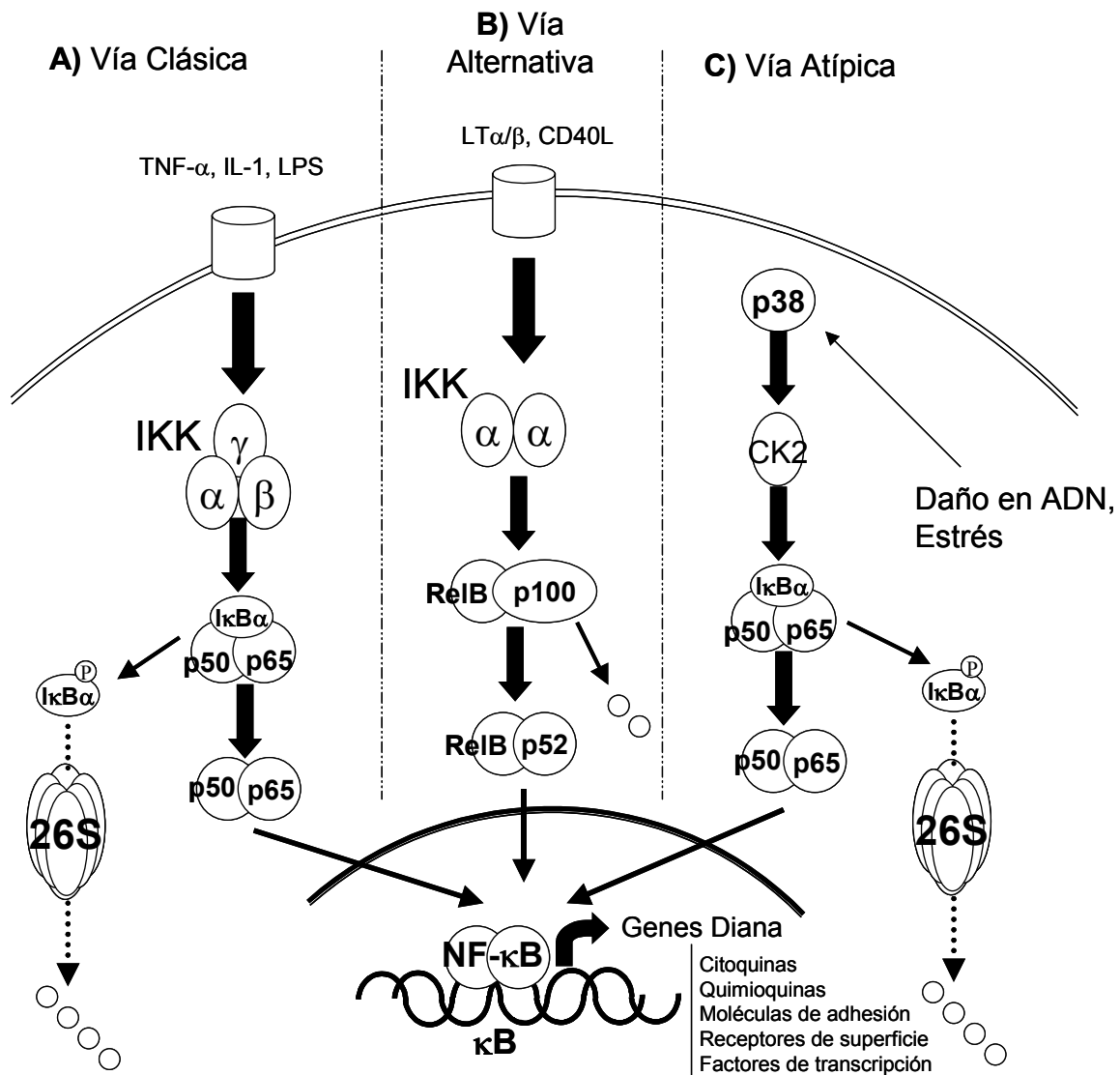


Figura 2: Representación esquemática de las vías de activación NF- κ B: A) vía clásica. B) vía alternativa. C) vía atípica. Adaptado de Ben-Neriah 2002.

B) La segunda vía de activación de NF- κ B, denominada “alternativa”, depende únicamente de IKK α , y no requiere la formación del complejo IKK. Esta ruta se activa por citoquinas como linfotoxina β (LT β), el factor activador de células B (BAFF), o el ligando de CD40, además de por virus, como el de la leucemia de células T o el virus de Epstein-Barr (Karin y cols., 2004), de forma que se reclutan las proteínas TRAF y NIK (quinasa inductora de NF- κ B). TRAF y NIK en la membrana celular activan IKK α en forma homodimérica, la cual promueve el procesamiento del precursor p100, generando la proteína p52. De este modo, los heterodímeros RelB/p52 pueden translocarse al núcleo y promover la transcripción de genes diana de NF- κ B (Karin y Delhase, 2000; Figura 2B).

C) Por último, la vía “atípica” se denomina así porque es independiente de IKK y se activa por estímulos como el daño en el ADN mediado por las radiaciones UV o por doxorubicina, estrés oxidativo y H₂O₂. En el caso de daño por UV, la caseína quinasa 2 (CK2) activada por p38, media la fosforilación de residuos de serina en el extremo C-terminal de I κ B α , mientras que en el caso del estrés oxidativo o por H₂O₂, I κ B α se fosforila en residuos de tirosina. A pesar de que todos estos eventos de fosforilación son inducidos por un estímulo, I κ B α está fosforilada constitutivamente en la Ser293 por CK2, y esta fosforilación es necesaria para una degradación rápida del inhibidor (Viatour y cols., 2005; Figura 2C).

1.4. Mecanismos adicionales de regulación de la actividad transcripcional NF- κ B

La actividad transcripcional de NF- κ B está regulada adicionalmente por modificaciones que alteran la capacidad de los dímeros de unirse al ADN y reclutar co-activadores en los promotores de sus genes diana. La fosforilación de p65, de una manera dependiente de estímulo, fue el primer mecanismo alternativo a la degradación de I κ B descrito (Naumann y Scheidereit, 1994). Desde entonces, numerosos estudios han señalado la capacidad de distintas

quinasas de fosforilar p65 de manera dependiente de estímulo y, probablemente, de tipo celular; pudiendo ocurrir tanto en el núcleo como en el citoplasma (Viatour y cols., 2005).

1.4.1. Regulación por fosforilación

Hasta la fecha, se han descrito cuatro residuos de serina en p65, que son fosforilados por distintas quinasas. Dos de estos residuos (Ser276 y Ser311), se encuentran localizados en el RHD N-terminal de p65, y su fosforilación facilita la interacción con el ADN y otros cofactores generales de la transcripción como CBP/p300 (Zhong y cols., 1997; Vermeulen y cols., 2003; Duran y cols., 2003).

p65 también puede ser fosforilada en el TAD de su extremo C-terminal. Concretamente, el residuo serina 536 es fosforilado por distintas quinasas a través de distintas vías de señalización, en la mayoría de los casos, potenciando la actividad transcripcional de NF- κ B. Tanto IKK α como IKK β promueven esta fosforilación, la primera tras un estímulo con la oncoproteína Tax y LT β y, la segunda, tras un estímulo vía TNFR o TCR (Viatour y cols., 2005). La fosforilación en la Ser536 por IKK β promueve la translocación nuclear de p65 en células T (Mattioli y cols., 2004). La vía del fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa B (Akt/PKB), esencial para la supervivencia y proliferación celular (ver apartado 7.1), también es capaz de estimular la fosforilación en el TAD de p65 tras una estimulación con IL-1, de una manera dependiente de IKK α (Sizemore y cols., 2002). La mayoría de estas fosforilaciones ocurren tras la estimulación con citoquinas pro-inflamatorias, aunque otros estímulos, como el daño en el ADN, también son capaces de reproducir este efecto. Tal es el caso de la doxorubicina o el etopósido, que activan NF- κ B de una manera dependiente de p53, e independiente de IKK, a través de la fosforilación de la Ser536 de p65 por la quinasa ribosomal S6-1 (RSK-1). En este caso, el resultado es un descenso de la afinidad de p65 por I κ B α (Bohuslav y cols., 2004). El residuo serina 529, localizado también en el TAD de p65, es fosforilado tras un estímulo con TNF- α o IL-1, aunque no se conocen en detalle sus efectos sobre la actividad

transcripcional de NF- κ B. Además, se ha sugerido recientemente que una fosforilación adicional en la treonina 254 de p65 (Thr254) puede jugar un papel importante en la regulación nuclear de NF- κ B (Viatour y cols., 2005).

A pesar de que no se conocen en detalle las especificidades de la regulación de la actividad dependiente de cada fosforilación en p65, ni las de tipo celular, se ha propuesto un modelo de activación gradual, en el que una proteína con las cuatro fosforilaciones sería la más activa. Aún así, se piensa que son necesarias, al menos, una fosforilación en el TAD y otra en el RHD para alcanzar una inducción óptima de la actividad transcripcional (Hayden y Ghosh, 2004).

También se han descrito fosforilaciones en otros miembros de la familia NF- κ B, como RelB, c-Rel, p50, e incluso BCL-3, con efectos sobre su potencial de transactivación, su afinidad por el ADN o, simplemente, para marcar su degradación por la vía del proteosoma (Viatour y cols., 2005).

1.4.2. Otros mecanismos de regulación

Otro amplio mecanismo de regulación de la actividad transcripcional de NF- κ B es la interacción con otros factores y cofactores de transcripción, formando macro-complejos transcripcionales. Así, se ha visto que la interacción de p65 con el factor general de transcripción IIB (TFIIB) y la proteína de unión a la caja TATA (TBP), así como con el grupo de alta movilidad-1 (HMG-1) y el cofactor CBP/p300 potencian la transcripción dependiente de NF- κ B, mientras que su interacción con proteínas de la familia de los activadores de la transcripción y transducción de señales (STAT) o la proteína de unión al promotor CCAAT (C/EBP) desemboca en una inhibición de su potencial de transcripción (McKay y Cidlowski, 1999). NF- κ B también puede interaccionar con otros factores de transcripción inducibles, como la proteína activadora-1 (AP-1), lo que lleva a una potenciación de la actividad transcripcional de ambos, o como el receptor de glucocorticoides (GR), el receptor de andrógenos (AR) o los receptores de progesterona (PR) y estrógenos (ER), con los que se produce un antagonismo funcional mutuo (McKay y Cidlowski, 1999).

Se ha sugerido que también se puede regular la actividad transcripcional de p65 mediante acetilación directa. De hecho, se piensa que la acetilación en los residuos lisina 221 y 310 puede potenciar la afinidad de la proteína por los sitios κ B, y disminuirla con I κ B (Hayden y Ghosh, 2004).

Recientemente se ha descrito una función nuclear de las subunidades IKK α e IKK γ , independiente de la formación del complejo IKK. Así, IKK α estimula la expresión de genes diana de NF- κ B en respuesta a citoquinas, en asociación con p65 y CBP, fosforilando la histona H3 para activar la expresión génica (Yamamoto y cols., 2003), mientras que IKK γ en el núcleo, compite con IKK α y p65 para unirse a CBP, inhibiendo la activación transcripcional (Verma y cols., 2004)

2. El complejo I κ B quinasa

La mayoría de las vías de señalización que conducen a la activación de NF- κ B convergen en la activación de IKK, por lo que este complejo quinasa constituye uno de los puntos de regulación más importantes para determinar la respuesta de NF- κ B ante un estímulo específico. Se postulan distintos mecanismos de formación y activación del complejo IKK de forma específica de estímulo y tipo celular, aunque actualmente se cree que uno de los principales eventos para la activación de IKK es la fosforilación cruzada de sus subunidades (Hayden y Ghosh, 2004). El complejo IKK fue descrito por primera vez por Chen y colaboradores en 1996, como un complejo macromolecular de alto peso capaz de fosforilar I κ B α . Posteriormente, varios grupos lo identificaron como un complejo de 700-900 Kda que podía fosforilar I κ B α e I κ B β en las serinas aceptoras, y que se activaba rápidamente tras un estímulo con TNF- α , IL-1 o lipopolisacáridos (LPS) (DiDonato y cols., 1997; Mercurio y cols., 1997; Woronicz y cols., 1997; Zandi y cols., 1997).

2.1. Miembros y estructura

El primer componente identificado del complejo I κ B fue CHUK (renombrado más tarde como IKK α), una proteína de 85 Kda; poco después se identificó la proteína IKK β , de 87 Kda. Ambas son quinasas específicas de residuos serina y treonina, que se caracterizan por la presencia de un dominio quinasa (KD) en el extremo N-terminal y un dominio hélice-lazo-hélice (HLH) en el C-terminal, además de una cremallera de leucina (LZ, Figura 3) (Karin y cols., 2004). El tercer componente del complejo es la subunidad reguladora NEMO (modulador esencial de NF- κ B, también llamada IKK γ , IKKAP1 y Fip3), cuyo gen mapea en el cromosoma X en humanos y ratones, y que fue identificada mediante clonaje complementario en una línea celular sin actividad inducible NF- κ B (Rothwarf y cols., 1998; Yamaoka y cols., 1998), como una proteína de 48 Kda, que carece de actividad quinasa y posee un dominio LZ, un dedo de zinc (ZF) en el extremo C-terminal, y dos dominios de espiral enrollada (CC) en los extremos C- y N-terminales (Figura 3). Recientemente, se

ha descrito la subunidad no catalítica ELKS (nombrada en base a la abundancia relativa de los aa glutámico [E], leucina [L], lisina [K] y serina [S]); se trata de una proteína de 105 Kda, propuesta como parte del complejo, que actuaría facilitando la interacción de IKK con I κ B α (Sigala y cols., 2004).

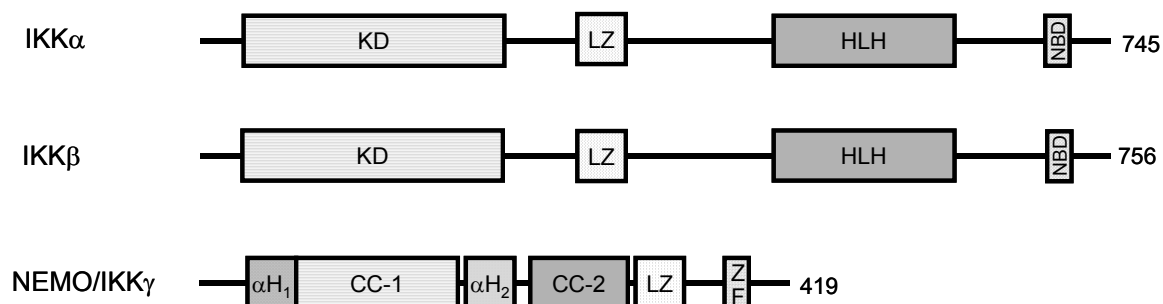


Figura 3: Representación esquemática de los miembros del complejo I κ B quinasa. KD: dominio quinaso. LZ: cremallera de leucina. HLH: dominio hélice-lazo-hélice. NBD: dominio de unión a NEMO. α H: hélice alfa. C-C: dominio de espiral enrollada. ZF: dedo de zinc. Adaptado de Hayden y Ghosh, 2004.

IKK α e IKK β tienen una homología del 52% en su secuencia, que llega al 65% en el KD y ambas son capaces de fosforilar distintos miembros de la familia I κ B. Aunque no conocemos la especificidad ni la eficiencia de cada quinasa respecto a las distintas I κ Bs, sabemos que tanto IKK α como IKK β son más eficientes fosforilando I κ B α que I κ B β , lo que explicaría en parte las diferencias en el patrón temporal de su degradación tras un estímulo con TNF- α (Hayden y Ghosh, 2004). Además, IKK β es más eficiente fosforilando I κ B α unido a NF- κ B que cuando se encuentra en estado libre, impidiendo de esta forma la degradación del inhibidor recién sintetizado y permitiendo así que se acumule y regule el complejo NF- κ B (Zandi y cols., 1998). Además de las I κ Bs, IKK α e IKK β poseen también otros substratos, siendo p65 el más importante.

Se ha descrito que IKK α e IKK β pueden homo- y heterodimerizar *in vitro*, de una manera dependiente del dominio LZ (también necesario para la actividad quinaso), aunque *in vivo* forman, preferentemente, heterodímeros (Mercurio y cols., 1997; Woronicz y cols., 1997; Zandi y cols., 1997). De todas

formas, también se ha descrito que los homodímeros de IKK β son más eficaces fosforilando I κ B α que los homodímeros de IKK α .

IKK α e IKK β interaccionan con IKK γ a través de un hexapéptido en su extremo C-terminal (Leu-Asp-Trp-Ser-Trp-Leu), denominado dominio de unión a NEMO (NBD); se ha demostrado que un péptido sintético con idéntica secuencia (NBP) es capaz de bloquear la formación de complejos IKK (May y cols., 2000, 2002). Para la unión de IKK γ con las subunidades catalíticas, es necesaria la región comprendida entre los aa 44 y 86 del extremo N-terminal de NEMO, pudiendo interactuar con el NBD tanto de IKK α como de IKK β , aunque IKK β se une a IKK γ con mayor afinidad que IKK α (May y cols., 2000; Hayden y Ghosh, 2004). IKK α también actuaría en el complejo facilitando la interacción de IKK β con I κ B α y estimulando su actividad quinasa (Yamamoto y cols., 2001).

IKK γ puede encontrarse en varios estados oligoméricos: se ha visto que puede formar dímeros o trímeros (Israël, 2004), e incluso tetrámeros (Tegethoff y cols., 2003). Se ha postulado que NEMO puede estar en forma monomérica en células sin estimular, siendo regulada su oligomerización tras la acción de un estímulo activador de NF- κ B, probablemente a través de RIP, resultando imprescindible el dominio CC C-terminal (aa 248-291) y el dominio LZ (aa 294-341) de NEMO/IKK γ . Posteriormente, se ha propuesto que la multimerización de NEMO puede ser específica de tipo celular (Poyet y cols., 2000; Israël, 2004; Agou y cols., 2004).

Las subunidades IKK α , IKK β e IKK γ están fuertemente asociadas y la inmunoprecipitación (Co-IP) con anticuerpos frente a una de ellas, resulta en el aislamiento de las otras dos (Karin y Delhase, 2000). La estequiometría de este complejo continúa siendo materia de debate, aunque varios grupos sostienen la idea de una molécula de NEMO unida a un heterodímero IKK α /IKK β (Hayden y Ghosh, 2004). Los modelos actuales predicen un tamaño del complejo entre los 200 y los 350 Kda, aunque el peso molecular observado experimentalmente es de 700 a 900 Kda.

Aparte de la conocida interacción de IKK con varios miembros de la familia NF- κ B e I κ B, se ha descrito recientemente que la proteína de choque térmico Hsp90 está constitutivamente asociada a IKK, pudiendo actuar como una chaperona durante la formación del complejo (Chen y cols., 2002). Aunque se siguen proponiendo posibles miembros, se ha demostrado que los tres componentes básicos (IKK α , IKK β e IKK γ) pueden formar complejos del tamaño apropiado. Una posible explicación para la discordancia entre el peso observado y el esperado, podría ser el alto índice de Stokes de IKK γ , ya que se ha observado que los trímeros de NEMO (150 Kda aproximadamente) migran con una masa molecular aparente de 550 Kda (Agou y cols., 2004).

2.2. Mecanismos de activación

Tras un estímulo con TNF- α y otros estímulos de la vía clásica, se producen una serie de complejas reacciones en cadena, que llevan a la activación de IKK. Actualmente se piensa que esta activación depende principalmente de procesos de auto- y trans-fosforilación de sus componentes, aunque también son susceptibles de sufrir otras modificaciones que van a determinar la funcionalidad del complejo (Hayden y Ghosh, 2004).

2.2.1. De TNF- α a NF- κ B

Dada la gran variedad y número de estímulos que activan NF- κ B, son necesarios diversos mecanismos que aseguren una respuesta transcripcional única ante un estímulo dado, en un tipo celular específico (Hayden y Ghosh, 2004). Una de las familias de activadores de NF- κ B más estudiada es la superfamilia TNFR. Esta superfamilia consta de, al menos, 19 ligandos y 29 receptores, con una marcada diversidad en su distribución tisular y su fisiología (Aggarwal, 2003). La interacción entre el ligando y el receptor promueve una gran variedad de respuestas biológicas, principalmente mediante la activación de factores de transcripción inducibles como NF- κ B y AP-1 (Wajant y cols., 2003).

Los receptores de la familia TNF carecen de actividad enzimática intrínseca, por lo que la señal es transmitida a través del reclutamiento de diferentes moléculas adaptadoras, que se asocian con el extremo citoplásmico de los TNFR (Aggarwal 2003; Wajant y cols., 2003). El acoplamiento de un trímero TNF- α a TNFR1, provoca la agregación del receptor, y la disociación del silenciador del “dominio de muerte” (SODD), un inhibidor endógeno del receptor de TNF. De este modo, la proteína con dominio de muerte asociada a TNFR (TRADD) puede acoplarse al receptor, reclutando otros adaptadores, lo que lleva a la activación del complejo IKK, p38, JNK y caspasas (Hayden y Ghosh, 2004). Entre estos nuevos adaptadores, se encuentra la familia de factores asociados TNFR (TRAF). Se ha sugerido que tras el tratamiento con TNF- α , TRAF2 recluta al complejo IKK por su interacción con IKK α o IKK β (Devin y cols., 2001; Tada y cols., 2001). TRAF2 también interacciona con la proteína quinasa de interacción con el receptor (RIP), la cual también puede asociarse de manera independiente a TRAF2 con TRADD. Se ha descrito que RIP1 es esencial para la activación de NF- κ B por TNF- α (Hu y cols., 1995), y que también puede reclutar al complejo IKK hacia el receptor TNFR1 a través de NEMO/IKK γ , de una manera independiente de TRAF2 (Zhang y cols., 2000). De todas formas, la interacción de IKK con TNFR1 en ausencia de RIP (presumiblemente a través de TRAF2), no es suficiente para la activación de IKK (Devin y cols., 2001), demostrando que RIP tiene otras funciones aparte del simple reclutamiento del complejo IKK. Parece que RIP juega un papel central en la activación de IKK, probablemente promoviendo la oligomerización de NEMO/IKK γ y la consecuente auto-fosforilación del complejo IKK (Karin y cols., 2004).

2.2.2. Procesos de fosforilación/defosforilación

La activación del complejo IKK está regulada, principalmente, por procesos de trans- y autofosforilación. De hecho, se ha visto que muchas de las IKK-K propuestas actúan, más que como quinasas, como moléculas adaptadoras. De esta forma, proteínas como RIP y miembros de la familia TRAF actuarían a modo de plataforma para el reclutamiento, formación y activación por auto-fosforilación de los complejos IKK (Tang y cols., 2003). Los

datos muestran que NIK, una quinasa de la familia de las MAP3K, actúa como una IKK-K, puesto que es capaz de fosforilar directamente -y de activar IKK α - como respuesta a estímulos que activan NF- κ B a través de la vía alternativa. Está descrito que NIK puede formar complejos con IKK β e IKK γ y también se le ha implicado en la activación de NF- κ B por la vía canónica (Regnier y cols., 1997; Hayden y Ghosh, 2004).

Otros miembros de la familia MAP3K como MEKK3 (MAPK/ERK quinasa quinasa 3) o MAP3K8 (también conocida como Tpl2) han sido propuestos como IKK-K. MEKK3 puede fosforilar a IKK β *in vitro* e inducir la activación del complejo IKK en células deficientes en RIP. También se ha descrito que MEKK3 se une a IKK tras un estímulo inductor NF- κ B y que esta unión es necesaria para la asociación del complejo IKK con I κ B α , aunque no está claro si MEKK3 fosforila directamente IKK o simplemente media la unión de I κ B α por fosforilación de alguna proteína adaptadora como ELKS. La función de Tpl2 en la activación del complejo tampoco está clara: sabemos que si se sobreexpresa, activa IKK y que se puede asociar con IKK α , NIK y p105, en este último caso promoviendo su procesamiento (Hayden y Ghosh, 2004). Aparte de las mencionadas, se han propuesto otras quinasas, como PKC ζ (implicada en la fosforilación de p65 en la Ser311), PKC λ , Act-1 y Akt, como potenciales IKK-K (Hayden y Ghosh, 2004).

IKK β es fosforilado en la región de activación de su KD en dos residuos serina (Ser177 y Ser181; Delhase y cols., 1999), así como en múltiples serinas del dominio HLH en el extremo C-terminal. Parece ser que, mientras que la fosforilación del dominio KD por quinasas que fosforilan IKK (IKK-K) conlleva una activación de IKK β , la fosforilación de su extremo C-terminal, probablemente por autofosforilación, es un mecanismo de regulación negativa de IKK β (Delhase y cols., 1999). Se ha propuesto que esta fosforilación del C-terminal permite el acceso a la proteína fosfatasa 2C β (PP2C β), la cual defosforila el dominio KD de la quinasa, inactivando el complejo. La proteína A20 también es susceptible de participar en la regulación negativa de IKK: su expresión se regula por NF- κ B y se expresa rápidamente tras una estimulación,

participando del mecanismo de autoregulación de la actividad NF- κ B inducida por TNF- α (Hayden y Ghosh, 2004).

2.2.3. Otros mecanismos de activación

Aparte de los procesos de fosforilación/defosforilación, otros mecanismos como la ubiquitinización están cobrando importancia en la regulación de la actividad IKK. Recientemente, se ha visto que varios componentes de la vía de señalización NF- κ B tienen funciones de ubiquitina-ligasas, substrato de ubiquitina-ligasas, o ambos (Ben-Neriah 2002). Varios miembros de la familia TRAF tienen actividad E3-ligasa y se cree que catalizan la auto-ubiquitinación necesaria para la activación del complejo IKK vía TNF- α . De hecho, el producto del gen de la cilindromatosis (CYLD) es capaz de de-ubiquitinar TRAF2, regulando negativamente la activación de NF- κ B vía TNFR (Hayden y Ghosh, 2004). Se asume que para la agregación del complejo IKK se requieren procesos de ubiquitinización. La proteína inhibidora de la apoptosis cIAP1 es capaz de ubiquitinar a NEMO, probablemente vía TRAF2; se ha especulado que este proceso desemboca en la formación de oligómeros IKK γ que median la activación de IKK (Tang y cols., 2003). TRAF6 también posee actividad Ub-ligasa y es capaz de activar IKK *in vitro* (Sun y cols., 2004). SUMO-1 (*small ubiquitin-like modifier*) también tiene funciones en la señalización mediada por NF- κ B. Así, I κ B α se sumoíla en varios tipos celulares independientemente de su estado de estimulación y, la sobreexpresión de SUMO, inhibe la activación de NF- κ B, indicando que la sumoilación de I κ B α previene su ubiquitinación y posterior degradación. Recientemente también se ha descrito que NEMO es sumoílado en respuesta al estrés genotóxico, probablemente promoviendo su localización nuclear, necesaria para su posterior ubiquitinación y activación (Huang y cols., 2003).

2.3. Mecanismos de inhibición de NF- κ B

Desde su descubrimiento, se ha visto que los factores de transcripción NF- κ B juegan un papel crucial en el desarrollo de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas. Desde entonces, se ha demostrado que una regulación defectuosa de estos factores también puede ser la causa de enfermedades autoinmunes y diferentes tipos de cáncer (Greten y Karin, 2004). Teniendo en cuenta el papel central del complejo IKK en la regulación de NF- κ B, dentro de los múltiples mecanismos de inhibición desarrollados, el más efectivo y selectivo es el uso de inhibidores de la actividad IKK (Karin y cols., 2004).

Los anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs) y los glucocorticoides (GCs), deben gran parte de sus efectos anti-inflamatorios a la inhibición de NF- κ B. Así, tanto la aspirina como los salicilatos, el sulindac y la sulfasalazina pueden inhibir la actividad catalítica de IKK β , evitando la fosforilación de las I κ Bs (Greten y Karin, 2004). Los GCs actúan en la célula a través del receptor de glucocorticoides (GR), un factor de transcripción con funciones antagónicas a NF- κ B, con el que además puede interaccionar a distintos niveles, inhibiéndolo (De Bosscher y cols., 2003).

Además, algunos fármacos inmunomoduladores (IMiDs) como la talidomida o las prostaglandinas ciclopentanona (cyPGs) son capaces de bloquear la actividad IKK y algunos agentes antioxidantes, como la N-acetil-L-cisteína (NAC), la vitamina C, o los flavonoides, son capaces de inhibir la actividad NF- κ B. Actualmente, numerosos grupos de investigación están desarrollando un gran número de pequeñas moléculas inhibitorias específicas de IKK β , que están siendo ensayadas actualmente para el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Karin y cols., 2004).

También se están desarrollando nuevas estrategias de inhibición de la actividad IKK, como el uso de oligonucleótidos antisentido que bloquean la expresión de IKK β , o el empleo de ARN de interferencia (siRNA) que reduce la

expresión de las proteínas IKK (Karin y cols., 2004). Adicionalmente, se han desarrollado péptidos permeables a la célula (NBP) que contienen el dominio de unión con IKK γ (NBD) y, compiten con las subunidades quinasa por la unión con NEMO, impidiendo la formación del complejo IKK, bloqueando la activación de NF- κ B por la vía clásica (May y cols., 2000, 2002).

3. NF- κ B y apoptosis

Los factores de transcripción NF- κ B juegan un papel central en el control de la apoptosis en respuesta a distintos estímulos (Kucharczak y cols., 2003). Se asume que NF- κ B ejerce una función predominantemente anti-apoptótica aunque, en algunos casos, también puede promover la muerte celular. El equilibrio entre estos dos efectos determinará el destino final de la célula y, los mecanismos que subyacen a estas acciones, probablemente tengan una alta especificidad de tipo celular.

3.1. *Mecanismos que protegen frente a estímulos pro-apoptóticos*

El mecanismo principal -y más común- por el cual NF- κ B ejerce efectos anti-apoptóticos es a través de la regulación transcripcional de varios genes relacionados con la supresión de la muerte celular (Kucharczak y cols., 2003). Entre ellos, encontramos a varios miembros de la familia Bcl-2 que son capaces de suprimir la liberación de los agentes pro-apoptóticos citocromo C y Smac/Diablo desde las mitocondrias y bloquear, de esta forma, la muerte celular programada en respuesta a estímulos como TNF- α y agentes quimioterapéuticos como el etopósido (Sun y cols., 2002). Otro gen diana de NF- κ B con efectos anti-apoptóticos es *xiap*, que inhibe el procesamiento de la procaspasa-9 y la actividad de las caspasas -7 y -3, además de estar implicado en la supresión de la vía de señalización de JNK mediada por NF- κ B (Tang y cols., 2001). Otros agentes anti-apoptóticos diana de NF- κ B que incluyen a cIAP1 y cIAP2, así como a los factores asociados al receptor de TNF, TRAF1 y TRAF2, actúan de manera conjunta para evitar la muerte celular inducida por TNF- α . También las proteínas A20, c-FLIP, Gadd45 β y MnSOD, entre otras, colaboran, a través de diversos mecanismos, para mantener a la célula viva tras un estímulo que induce la actividad NF- κ B (Kucharczak y cols., 2003).

Aparte de la inducción de genes anti-apoptóticos, NF- κ B también es capaz de reprimir la expresión de genes pro-apoptóticos como la *caspasa-8*, *bax*, y algunos genes mitocondriales relacionados con la ejecución y

amplificación de algunos programas apoptóticos, para reforzar la supervivencia celular (Kucharczak y cols., 2003). El control de la apoptosis en la célula es complejo e implica diversas vías de señalización que interactúan entre ellas en un complejo equilibrio para determinar el destino de la célula. Akt es una molécula bien conocida por sus efectos proliferativos y anti-apoptóticos (Datta y cols., 1999), y parte de las acciones de Akt sobre la supervivencia celular, están mediadas por su interacción con NF- κ B (Madrid y cols., 2000). Akt es necesaria para la activación de NF- κ B por TNF- α ya que, tras su activación mediada por la citoquina, Akt fosforila y activa IKK α , estimulando la función de NF- κ B (Ozes y cols., 1999). Además, Akt también puede fosforilar p65 tras un estímulo con TNF- α , aumentando el potencial de transactivación de p65 sobre genes anti-apoptóticos (Kucharczak y cols., 2003).

3.2. Modelos transgénicos de NF- κ B en apoptosis

Todos los miembros de las familias NF- κ B/I κ B han sido inactivados funcionalmente de forma individual en ratones y el fenotipo de estos animales indica una función de NF- κ B preferentemente ligada a un efecto protector de la apoptosis mediada por TNF- α .

Los ratones $p65^{-/-}$ mueren en la etapa embrionaria (15.5 dpc.) por apoptosis hepática (Beg y cols., 1995a). Posteriormente, se demostró que éste era un efecto mediado por TNF- α puesto que, si se eliminaba también en estos animales la citoquina ($p65^{-/-}/tnf- \alpha^{-/-}$; Doi y cols., 1999) o su receptor ($p65^{-/-}/tnfr^{-/-}$ Alcamo y cols., 2001), se rescataba el fenotipo apoptótico. Los ratones $p50^{-/-}$, sin embargo, no presentan defectos en el desarrollo, indicando su papel redundante en anti-apoptosis (Sha y cols., 1995). De todos modos, la eliminación de ambos, p50 y p65, así como la deficiencia simultánea de p65 y c-Rel en ratón, provoca la muerte embrionaria a día 13.5 d.p.c. por lo que tanto p50 como c-Rel pueden suplir algunas funciones de p65 (Horwitz y cols., 1997; Grossmann y cols., 2000).

No es sorprendente que la eliminación de los componentes del complejo IKK, principal activador de NF- κ B, conduzca a un fenotipo similar. Así, los ratones transgénicos deficientes en IKK β (Li y cols. 1999b, 1999c; Tanaka y cols., 1999) y los ratones deficientes en IKK γ /NEMO (Makris y cols., 2000; Schmidt-Supprian y cols., 2000; Rudolph y cols., 2000), mueren por apoptosis hepática entre los días 12.5 y 14.5 d.p.c. Sin embargo, este fenotipo no se observa en los animales deficientes en IKK α , indicando un papel crítico para IKK β en la mediación de las señales anti-apoptóticas, a través de la vía NF- κ B, inducidas por citoquinas pro-inflamatorias en los hepatocitos, mientras que en la piel esta acción parece estar mediada preferentemente por IKK γ (Karin y Delhase, 2000).

4. NF- κ B en inflamación y cáncer

NF- κ B es uno de los principales mediadores de la inflamación y se encuentra constitutivamente activado en células T, B, timocitos, monocitos y astrocitos, pero no en el resto de tipos celulares. Sin embargo, NF- κ B sí está constitutivamente activado en las patologías inflamatorias de carácter crónico, donde encontramos un aumento en la actividad IKK, así como una mayor localización nuclear de p65 (Aggarwal 2004). No obstante, aparte de la activación de NF- κ B durante el inicio de la inflamación, también es necesaria su activación durante su resolución –proceso por el cual se recupera la homeostasis normal del tejido–, mediando la expresión de anti-inflamatorios endógenos y ejerciendo un papel pro-apoptótico en leucocitos (Lawrence y cols., 2001). Muy recientemente, se ha demostrado que IKK α juega un papel crucial en la resolución de la inflamación (Lawrence y cols., 2005). NF- κ B se encuentra constitutivamente activo en la mayoría de líneas celulares tumorales. El bloqueo de NF- κ B en dichas líneas celulares tumorales inhibe la proliferación, provoca una parada del ciclo celular y lleva a la apoptosis, indicando que NF- κ B tiene un papel crucial en la proliferación y supervivencia de las células tumorales. Además, muchas sustancias carcinógenas, como el 7,12-dimetil-benzoantraceno (DMBA), el humo del tabaco, o los ésteres de forbol, pueden activar NF- κ B; del mismo modo, TNF- α , quizá el activador más potente de la vía, puede mediar la carcinogénesis a través de la inducción de la proliferación, la invasión y la metástasis de las células tumorales (Aggarwal 2004).

4.1. NF- κ B como promotor tumoral

Existe un alto grado de homología entre las proteínas de la familia NF- κ B y el oncogén *v-rel* del virus de la reticuloendoteliosis aviar. En los últimos años, se ha descrito que existe una conexión entre una de-regulación de la actividad Rel/NF- κ B y la oncogénesis en mamíferos, acorde con la oncogenicidad aguda del oncogén viral *v-rel* en modelos animales (Rayet y

Gelinas, 1999). En muchos tumores hematopoyéticos y sólidos, se han descrito amplificaciones, sobreexpresiones y reordenamientos de genes que codifican para proteínas de la familia Rel/NF- κ B. Además, en algunos linfomas de tipo Hodgkin se han encontrado mutaciones de pérdida de función en algunas proteínas inhibitoras I κ B, que producen una activación constitutiva de NF- κ B. Sin embargo, las alteraciones genéticas en NF- κ B o I κ B no son frecuentes, aunque sí lo es encontrar una activación aberrante de esta ruta de señalización en muchas variedades de cáncer. El hecho es que otras vías de señalización, que sí se encuentran genéticamente alteradas en la mayoría de tumores, regulan a NF- κ B. Estas alteraciones en las vías “paralelas” pueden desembocar tanto en una activación constitutiva del complejo IKK, como en la pérdida de los mecanismos de regulación negativa (Perkins 2004). Por ejemplo, la pérdida del gen supresor de tumores CYLD, que está asociada a la cilindromatosis familiar (un tipo de tumor de los apéndices cutáneos), lleva a la activación de NF- κ B. También el oncogén Ha-Ras y el proto-oncogén Akt/PKB, que se encuentran activos en varios tipos tumorales, pueden estimular la transactivación de p65, independientemente de la degradación de I κ B α (Madrid y cols., 2000; Perkins 2004).

NF- κ B constitutivamente activo en el núcleo de las células tumorales es capaz de conferir resistencia a la apoptosis, inducir transformación y mediar un aumento en la proliferación celular. NF- κ B también estimula la capacidad invasiva del tumor, a través de la expresión de la metaloproteinasa de la matriz 9 (MMP9), o del activador del plasminógeno uPA, promoviendo la angiogénesis al inducir la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y aumentando la capacidad metastática, mediante la regulación de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 (Aggarwal 2004). Como consecuencia del aumento constitutivo de la actividad NF- κ B en las células tumorales, la apoptosis inducida por algunos fármacos quimioterapéuticos y radiaciones ionizantes resulta inhibida, restando eficacia a la terapia. Además, hay que tener en cuenta que el mismo tratamiento antitumoral puede ser un estímulo inductor de NF- κ B y que el entorno tumoral contiene, frecuentemente, altas concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias. Por estas razones, resulta de

gran importancia equilibrar la inhibición de NF- κ B durante el tratamiento anticancerígeno, con objeto de conseguir una eficacia máxima. Por tanto, la inhibición de NF- κ B constituye un punto clave en el desarrollo de nuevos fármacos anti-tumorales (Perkins 2004).

4.2. NF- κ B en la supresión tumoral

Muchos estímulos inductores de NF- κ B también inducen la proteína supresora de tumores p53, que media una función opuesta a NF- κ B en el control de la apoptosis. Esta señalización antagónica sugiere que en la célula deben existir mecanismos que integren las actividades de estas vías con funciones divergentes. p53 puede inhibir la actividad transcripcional de p65 y viceversa; sin embargo, también sabemos que RelA/p65 es necesaria para que se produzcan los efectos pro-apoptóticos de p53. De este modo, NF- κ B puede, potencialmente, contribuir a la supresión tumoral (Perkins 2004). Además, se ha demostrado que, a pesar de su papel principal en anti-apoptosis, la estimulación con TNF- α induce la expresión de la proteína pro-apoptótica TRAIL, de una manera dependiente de NEMO/IKK γ (Siegmund y cols., 2001). Estas observaciones nos sugieren que puede ser más eficaz el empleo de fármacos que restauren selectivamente las funciones de NF- κ B en anti-apoptosis, que la simple inhibición de la localización nuclear de p65 (Perkins 2004).

Se ha propuesto que NF- κ B actúa de manera diferente en las células normales que en las células transformadas. Así, un estímulo oncogénico en una célula no transformada, puede activar tanto la actividad transcripcional de NF- κ B, como de los genes supresores tumorales (p53, PTEN), inhibiendo las funciones tumorigénicas de NF- κ B. De esta manera, en las primeras etapas de la promoción, NF- κ B puede actuar más como un supresor que como un promotor tumoral. Sin embargo, en las células transformadas que van acumulando mutaciones, se reduce la eficacia de los genes supresores de tumores, desembocando en una activación de NF- κ B que lleva a la

malignización y a la metástasis. Puede que este mecanismo en dos pasos sea también específico del tipo celular (Perkins 2004).

4.3. *NF- κ B* asocia inflamación y cáncer

Históricamente, se ha sospechado la existencia de una relación causal entre la inflamación y el cáncer, como describieron Galeno en el siglo XVI y, posteriormente Virchow en el XIX. En la inflamación crónica, NF- κ B puede evitar la apoptosis de células genéticamente alteradas, que representan lesiones pre-cancerosas, como es el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), en la cual existe un alto riesgo de cáncer de colon asociado a la colitis (CAC) (Karin y cols, 2004).

El grupo del Dr. Michael Karin ha demostrado, recientemente, evidencias genéticas de que la inflamación puede mediar la tumorigénesis y cómo NF- κ B constituye un nexo entre ambos (Greten y cols., 2004; Luo y cols., 2004). En el trabajo de Greten y colaboradores, utilizando un modelo animal de CAC y modificando los niveles de NF- κ B en el tumor, y/o en el entorno celular, se demuestra que la delección de IKK β , tanto en enterocitos como en las células mieloides, reduce la incidencia y desarrollo de CAC, pero a través de mecanismos diferentes. Así, mientras su eliminación en los enterocitos lleva a una menor incidencia, pero sin afectar al crecimiento de los tumores, en la línea mieloide produce un menor crecimiento, aunque sin afectar a la apoptosis (Greten y cols., 2004). En el primer caso, la pérdida de IKK β en los enterocitos no impide la inflamación, pero aumenta la apoptosis. Sin embargo, la eliminación de IKK β en las células mieloides reduce la expresión de TNF- α , IL-1 y otras citoquinas por parte de los macrófagos (Greten y cols., 2004). Estos resultados, indican que IKK β promueve el crecimiento tumoral en células mieloides, a través de la producción de factores paracrinos que actúan como promotores tumorales, mientras que en enterocitos, contribuye a la iniciación y promoción mediante la expresión de proteínas anti-apoptóticas (Aggarwal, 2004; Greten y Karin, 2004).

La escisión quirúrgica de muchos tumores primarios malignos, con frecuencia, deriva en el desarrollo muy rápido de metástasis; se ha sugerido que la liberación de endotoxinas como los lipopolisacáridos (LPS), puede ser uno de los mecanismos responsables de este efecto sobre el crecimiento tumoral (Aggarwal 2004). En el trabajo de Luo y colaboradores, se demuestra que la activación de NF- κ B mediada por endotoxinas en células cancerosas, induce el crecimiento del tumor a través de la expresión de TNF- α , mientras que la inhibición de NF- κ B lleva a la regresión tumoral. En dicho trabajo concluyen que la activación de NF- κ B por LPS en los macrófagos es necesaria para la inducción del crecimiento tumoral vía TNF- α . Esta producción de TNF- α por las células inmunitarias es necesaria para la activación de NF- κ B en las células cancerígenas (Luo y cols., 2004). Todos estos datos nos indican que la respuesta inflamatoria generada a través de la activación de NF- κ B juega un papel crítico en la tumorigénesis.

5. La piel como sistema modelo

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, representa casi un tercio del peso corporal y constituye la barrera externa entre el organismo y el medio ambiente. Entre las principales funciones que cumple este tejido, está la protección ante agresiones físicas (UV, temperatura), químicas y biológicas. Además, la piel es el órgano termoregulador más importante y evita la deshidratación corporal. También participa de la sensibilidad, a través de receptores cutáneos de presión, dolor y temperatura, así como del metabolismo, almacenando energía en forma de triglicéridos y sintetizando la vitamina D. La piel nos ofrece importantes ventajas como modelo experimental, siendo un órgano que puede examinarse directamente y perfectamente accesible para la toma de biopsias. Además, al ser la primera barrera defensiva ante las agresiones externas, este órgano es susceptible de sufrir numerosas patologías, sobre todo de carácter inflamatorio y neoplásico.

5.1. Estructura y fisiología

La piel es un tejido bien compartimentalizado, constituido por tres zonas diferenciadas: la más superficial, la epidermis, es un epitelio plano estratificado queratinizado; la dermis, intermedia, está formada por tejido conectivo fibroelástico denso muy vascularizado (Figura 4), finalmente la zona más profunda o hipodermis, compuesta principalmente por tejido adiposo, por donde transcurren los vasos y nervios.

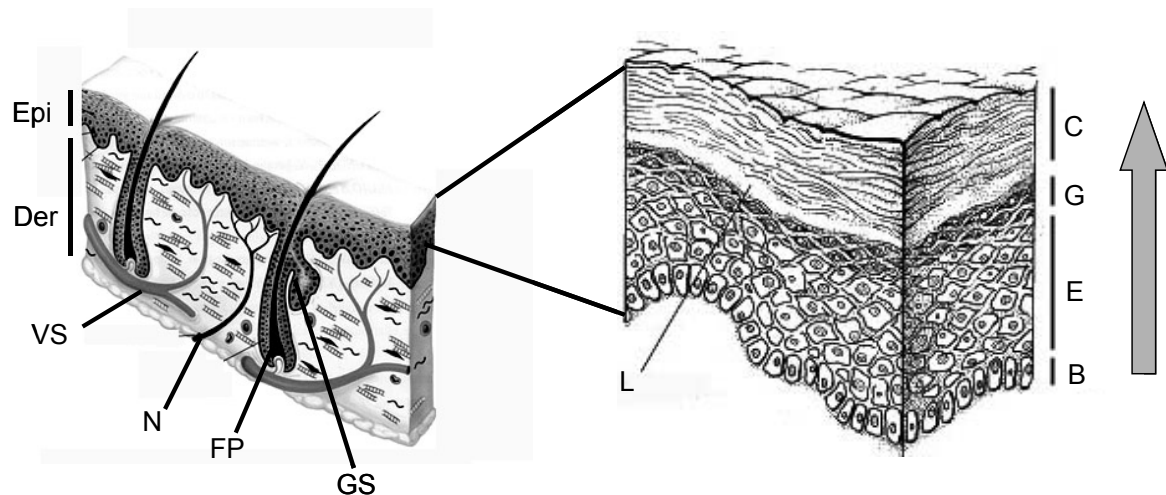


FIGURA 4: esquema de la estructura de la epidermis y la dermis: Representación esquemática de la epidermis y dermis (Izquierda) y epidermis (Derecha). Epi: epidermis; Der: dermis; VS: vaso sanguíneo; N: nervio; FP: folículo piloso; GS: glándula sebácea; B: estrato basal; E: estrato espinoso; G: estrato granuloso; C: estrato córneo; L: estrato lúcido; La flecha indica el sentido de migración de los queratinocitos durante el proceso de diferenciación terminal. Adaptado de Byrne y Hardman, 2002.

La epidermis es un derivado ectodérmico constituido principalmente por queratinocitos, las células responsables de la queratinización, aunque también podemos encontrar melanocitos (responsables de la coloración y la resistencia a la luz UV) y células de Langerhans, implicadas en la respuesta inmune. Dermis e hipodermis derivan del mesénquima inmediatamente inferior al ectodermo. La primera constituye el sostén biológico de la epidermis y está constituida mayoritariamente por fibroblastos embebidos en una matriz de colágeno, elastina, glucosaminoglicanos y proteoglucanos, mientras que la hipodermis tiene una función de reserva nutricional y energética, de protección contra presión y traumatismos (acolchado) y de aislamiento del frío. Dermis y epidermis están separadas por la membrana basal, una fuerte lámina de colágeno sobre la que se anclan los queratinocitos (Yager y Scott, 1993; Byrne y Hardman, 2002). En la piel también podemos encontrar una serie de órganos anejos, principalmente folículos pilosos y glándulas sebáceas, que se originan durante la embriogénesis por invaginación del epitelio epidérmico hacia el interior de la dermis. Tras la gastrulación, una capa de células ectodérmicas pluripotentes cubre la superficie del embrión. La epidermis y sus apéndices comienzan a formarse justo después de que las células mesenquimales pueblen el esbozo de la piel. Epitelio y mesénquima se encuentran separados

por una membrana basal y la formación de los apéndices cutáneos está coordinada por estos dos tejidos. Consecuentemente, este proceso es un modelo óptimo para el estudio de las interacciones epitelio-mesénquima. La señal inicial para la formación de los folículos pilosos y las glándulas sebáceas es emitida por el mesénquima. En respuesta a esta señal, las células ectodérmicas comienzan a proliferar en profundidad, formando el gérmen del pelo. En este punto, el ectodermo emite unas señales que derivan en la formación de la papila dérmica del folículo piloso. Finalmente, las células del gérmen del pelo crecen rodeando a la papila dérmica formando el bulbo piloso y este estrecho contacto estimula al epitelio a proliferar y formar el folículo piloso. Cada folículo está asociado a una glándula sebácea, que se origina como un apéndice en la parte superior de cada folículo piloso (Fuchs y cols. 2001).

La epidermis es un tejido en constante renovación, que se organiza en capas originadas por un proceso de proliferación y diferenciación terminal de los queratinocitos (Figura 4). Así, las células del estrato basal, o germinativo, forman una capa simple de queratinocitos mitóticamente activos, con forma cilíndrica y un núcleo oval o redondeado con la cromatina condensada. Se unen fuertemente a la membrana basal mediante hemidesmosomas y, a las células que les rodean, mediante desmosomas. Estas células expresan específicamente la pareja de queratinas K5 y K14, así como receptores de superficie de la familia de las integrinas y cadherinas (Byrne y cols., 1994). A partir de señales no bien conocidas, los queratinocitos de la capa basal comienzan a migrar hacia la superficie, en un proceso de diferenciación espacialmente ordenado. El siguiente estrato, el espinoso, consta de 2 a 5 capas de células poligonales en humanos, unidas entre sí por un gran número de desmosomas ("espinas"). Los queratinocitos de este estrato tienen un núcleo redondeado y un citoplasma basófilo, y hacia las capas superiores se aplanan y se alargan, se vuelven eosinofílicos y se colocan en paralelo a la superficie cutánea. Estas células expresan las queratinas K1 y K10; aunque en situaciones de hiperplasia o hiperproliferación su expresión disminuye, siendo reemplazadas por el par de queratinas K6/K16. Siguiendo hacia arriba nos encontramos con el estrato granuloso, que consta de 1 a 3 capas de células

aplanadas en humanos, llenas de gránulos de queratohialina intensamente basófilos. En estos gránulos está el precursor de la filagrina (pro-filagrina), que actúa como cementante de los filamentos de queratina. En la capa externa de este estrato, los queratinocitos mueren por rotura de sus membranas lisosomales, dando paso al proceso final de queratinización (Fuchs, 1996). Entre este estrato y el siguiente, en los epitelios gruesos de la región palmar y plantar, se observa una capa homogénea y eosinófila de transición, denominada estrato lúcido. Finalmente, el último estrato, el córneo, está compuesto por varias capas de células aplanadas, muertas y terminalmente diferenciadas, repletas de queratina madura y recubiertas de una membrana de alto contenido lipídico que le confiere la impermeabilidad a la epidermis y en cuya formación intervienen otras moléculas como la involucrina y la loricrina. El número de capas de la epidermis varía según la región corporal y la edad del animal. Así, en el lomo de los ratones adultos la epidermis es fina y podemos apreciar de 1 a 3 capas de células, mientras que en los recién nacidos y en las zonas de rozamiento en adultos este número se incrementa a 6-8 capas (Murphy, 2005).

Además de la formación de una matriz de queratinas específicas en cada capa y de la expresión diferencial de proteínas de superficie, incluidas las moléculas de adhesión, la diferenciación terminal de los queratinocitos es la principal responsable de la arquitectura de la epidermis. Esta diferencia espacial y funcional en la expresión de las queratinas en la epidermis, nos provee de una eficaz herramienta para la investigación en este tejido, puesto que los elementos de regulación génica de las queratinas, junto con la tecnología actual en transgénesis, nos permiten dirigir la expresión de moléculas con gran precisión hacia un compartimento específico.

5.2. Modelo de carcinogénesis química en piel de ratón

La piel, en especial la epidermis, por su situación de límite externo del organismo, está expuesta a numerosos agentes físicos y químicos, potencialmente carcinogénicos. A pesar de la existencia de aproximadamente

200 tipos celulares en el organismo, casi un 90% de los tumores tienen su origen a partir de células epiteliales, probablemente, porque es el tipo celular que mantiene más tiempo la capacidad de dividirse. Estos factores en conjunto podrían explicar por qué el cáncer de piel es uno de los más prevalentes en la actualidad. Uno de los modelos animales que más ha contribuido a establecer la naturaleza secuencial del desarrollo neoplásico, así como la implicación de determinados oncogenes y genes supresores de tumores, es el de carcinogénesis química en piel de ratón (Balmain y cols., 1984; Slaga y cols., 1996).

Operativamente, el desarrollo tumoral en este modelo puede dividirse en las etapas denominadas de iniciación, promoción y conversión (Conti, 1994). La iniciación consiste en una mutación de naturaleza irreversible y transmisible a la descendencia celular, pero sin efecto fenotípico aparente. En este modelo, la iniciación viene dada por la mutación del oncogén *Ha-ras* inducida por el agente iniciador DMBA. La promoción implica la selección y expansión de la población celular iniciada y se produce en respuesta a un estímulo hiperproliferativo sostenido. En este modelo, el promotor utilizado es el 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA). Como consecuencia, aparecen papilomas, tumores benignos bien diferenciados, que en su mayor parte regresan de forma espontánea. La etapa de conversión o progresión corresponde a los cambios ocurridos durante el tránsito entre un fenotipo pre-maligno hacia la malignidad, caracterizado histológicamente por el paso de papilomas a carcinomas de células escamosas (SCCs). Durante esta fase, a nivel molecular, se producen cambios irreversibles que afectan, principalmente, a oncogenes y genes supresores de tumores (amplificación de *Ha-ras*, mutaciones en PTEN, etc.) (Angel y DiGiovanni, 1999).

6. Función de NF- κ B en la piel

NF- κ B desempeña un papel central en la biología de la epidermis, tal y como demuestran los modelos transgénicos generados hasta la fecha (ver apartado 6.2); además, está implicado en el programa de diferenciación terminal de los queratinocitos, protegiéndolos de una apoptosis prematura durante su proceso de migración, diferenciación y senescencia (Weisfelner y Gottlieb, 2003). Se ha sugerido que NF- κ B media el paso de una célula en proliferación hacia la parada del ciclo celular y la diferenciación y durante el proceso de senescencia de los queratinocitos se produce un aumento de la actividad NF- κ B (Bernard y cols., 2004). En la piel, TNF- α es la principal citoquina que regula procesos inflamatorios, además de ser esencial para la angiogénesis durante la reparación de heridas, e indispensable durante la embriogénesis epidérmica (Moore y cols., 1999). De los dos tipos de receptores de TNF- α , los queratinocitos expresan principalmente TNFR1; la unión de la citoquina a su receptor desencadena una serie de procesos que llevan a la activación de factores de transcripción como NF- κ B, AP-1 y C/EBP, entre otros. La síntesis y liberación de TNF- α por los queratinocitos aumenta drásticamente tras un daño epidérmico, una infección, radiación UV o contacto con agentes sensibilizadores; la primera respuesta tras la liberación de TNF- α por el daño epidérmico es la inducción de citoquinas y quimioquinas que alertan al organismo de la lesión, así como la inducción de factores de transcripción que, en conjunto, modulan la parada del ciclo celular (Banno y cols., 2005).

6.1. *Patologías cutáneas asociadas a NF- κ B*

6.1.1. *Desórdenes proliferativos e inflamatorios*

El papel de NF- κ B en la diferenciación y proliferación de los queratinocitos ha sido demostrado en animales transgénicos (ver apartado 6.2.). En humanos, existen numerosas enfermedades de la piel que cursan con hiperproliferación e inflamación y la enorme mayoría de los tratamientos prescritos actúan a través de la regulación de la actividad NF- κ B, lo que convierte a este factor de transcripción en la principal diana terapéutica de las

patologías cutáneas. La psoriasis es una enfermedad cutánea muy prevalente en humanos, caracterizada por un aumento de la proliferación y un aumento de la apoptosis de los queratinocitos, acompañado de una expresión elevada de citoquinas proinflamatorias (Bell y cols., 2002). De hecho, los polimorfismos en el promotor de TNF- α , están asociados con un alto riesgo de padecer psoriasis juvenil (Höler y cols., 1997) y se ha observado que los pacientes con esta enfermedad muestran una actividad NF- κ B elevada (Danning y cols., 2000). Como veremos más adelante, los ratones transgénicos deficientes en I κ B α , presentan una mayor actividad NF- κ B en la epidermis, acompañado de lesiones psoriáticas (Klement y cols., 1996); en contradicción con estos resultados, el bloqueo de NF- κ B en la epidermis, también produce una hiperplasia epidérmica (Seitz y cols., 1998). En conjunto, el papel de NF- κ B en ésta y otras patologías cutáneas continúa siendo materia de debate.

NF- κ B también está involucrado en el inicio y resolución de la inflamación, ya que muchos de sus genes diana, incluyendo citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión, son esenciales para el inicio y desarrollo de la inflamación cutánea. Además, diversos microorganismos susceptibles de causar patologías inflamatorias en la piel (*Borrelia burgdorferi*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* y *Herpes simplex Virus* entre otros), son potentes activadores de NF- κ B (Pahl, 1999). Es importante destacar también la implicación de NF- κ B en las quemaduras solares, dada la capacidad de la luz UV de activar dicho factor de transcripción, así como en las dermatitis alérgicas y de origen autoinmune, por la relación de NF- κ B con la regulación de la respuesta inmune y presentación de antígenos (Bell y cols., 2002)

6.1.2 Cáncer

Por su papel en la regulación de la proliferación, diferenciación, apoptosis e inflamación, NF- κ B también está involucrado en la transformación de los queratinocitos y en la carcinogénesis epidérmica. La inflamación e hiperplasia epidérmicas tienen un papel primordial en la promoción tumoral, siendo NF- κ B uno de los mediadores más conocidos de este efecto. Además,

substancias como los ésteres de forbol, que son conocidos promotores tumorales en piel, son también inductores de NF- κ B (Bell y cols., 2002). Algunas vías de señalización esenciales en el desarrollo tumoral epidérmico, como la activada por el oncogén ras y la vía PI3K/Akt, también han sido implicadas en la activación de NF- κ B. Empleando el modelo de carcinogénesis química en piel de ratón, nuestro grupo de investigación ha demostrado que se produce un aumento de la actividad NF- κ B durante este proceso, detectándose niveles elevados de p50 y p52 tanto en papilomas como en SCC (Budunova y cols., 1999). Una de las características de los tumores derivados de los melanocitos es la alta expresión de ICAM-1, una molécula de adhesión implicada en metástasis y diana de NF- κ B (Pandolfi y cols., 1992). Se ha descrito en este tipo de tumores una activación aberrante del complejo IKK, con hiperfosforilación de I κ B α y p65, acompañado de un aumento de la localización nuclear de NF- κ B, implicando a esta vía de señalización también en la patogenia del melanoma (Bell y cols., 2002).

6.1.3 Patologías de carácter genético

Muy recientemente, se han descrito una serie de enfermedades humanas congénitas asociadas a mutaciones en las vías de activación de NF- κ B, que tienen como denominador común defectos en el desarrollo de los derivados ectodérmicos (dientes, uñas, pelo y glándulas sudoríparas)(Smahi y cols., 2002; Puel y cols., 2004). Los pacientes con displasia ectodérmica (ED), se caracterizan por tener el pelo fino y escaso, hipodoncia o anodoncia, dientes cónicos e hipohidrosis (HED) o anhidrosis (AED); en ocasiones, este síndrome también está asociado a inmunodeficiencia (ID) (Orange y Geha, 2003). El síndrome ED es muy heterogéneo clínicamente, habiéndose descrito más de 170 fenotipos asociados. La forma más común está causada por mutaciones en el gen de la ectodisplasina A1 (*eda1*), un miembro de la superfamilia de citoquinas TNF. Las mutaciones en el gen *eda3*, que codifica para EDAR, el receptor de la ectodisplasina A1 perteneciente a la superfamilia TNFR, así como las mutaciones en el gen de *edaradd* (proteína con “dominio de muerte” asociado a EDAR), también cursan con ED; las mutaciones en *xedar* (el

receptor de la ectodisplasina A2, otro miembro de la superfamilia TNFR) también producen este síndrome (Smahi y cols., 2002).

La activación de NF- κ B por EDAR es dependiente de NEMO/IKK γ (Döffinger y cols., 2001), por eso no sorprende que los pacientes con mutaciones en el gen de *nemo* también desarrollen una forma de ED, denominada *Incontinentia Pigmenti* (IP) que, de hecho, fue la primera patología de carácter genético asociada a NF- κ B (Smahi y cols., 2000). El gen *nemo* se localiza en el cromosoma X en humanos y ratones de manera que la IP es una enfermedad letal en varones; en mujeres, se manifiesta en forma de lesiones cutáneas, defectos en el desarrollo de los dientes, ojos, pelo, y sistema nervioso central. Las lesiones cutáneas asociadas a la IP se desarrollan en cuatro fases sucesivas, aunque en ocasiones se solapan. La primera fase se caracteriza por el desarrollo de erupciones eritematosas y vesículas lineares, seguida de lesiones verrugosas e hiperqueratóticas distribuidas linealmente a lo largo de la piel (fase 2). Al cabo de un tiempo estas lesiones desaparecen, dejando en su lugar las típicas manchas hiperpigmentadas, debidas a la pérdida (incontinencia) de melanina por parte de los queratinocitos basales y su depósito como pigmento libre o en el interior de los macrófagos epidérmicos (melanófagos; fase 3); por último, se produce la fase de cicatrización (fase 4) (Landy y Donnai, 1993). Las células derivadas de los pacientes con IP no pueden activar NF- κ B en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio y, por tanto, tienen una alta sensibilidad a la apoptosis inducida por TNF- α (Smahi y cols., 2002).

6.2. Modelos transgénicos NF- κ B en piel

Como hemos dicho anteriormente, tanto los ratones transgénicos deficientes en p65, como los deficientes en IKK β , mueren por apoptosis hepática mediada por TNF- α durante el desarrollo embrionario. Sucede lo mismo en el caso de los ratones con una deficiencia completa en IKK γ . Sin embargo, las hembras heterocigotas *ikk γ ^{+/-}* sobreviven, aunque desarrollan una patología similar a la IP en humanos (Makris y cols., 2000; Schmidt-Suprian y cols., 2000). Poco después de nacer, los ratones hembra *ikk γ ^{+/-}* muestran una

pigmentación cutánea poco uniforme, que progresa hacia una severa inflamación y lesiones hiperqueratóticas, con un crecimiento poco denso del pelo y una erupción eritematosa generalizada de la piel, que se torna dura e inflexible. La mayoría mueren perinatalmente pero, en las supervivientes, las lesiones van cicatrizando y desapareciendo progresivamente, dejando algunas áreas calvas (Makris y cols., 2000; Schmidt-Supprian y cols., 2000). Histológicamente, las pieles de estos animales muestran una desorganización de las células basales, espongiosis suprabasal (edema intercelular), y un estrato córneo engrosado (hiperqueratosis). También presentan un infiltrado inflamatorio, compuesto principalmente por eosinófilos y neutrófilos, con un aumento en la expresión de las queratinas K5/K14 y K6 y de los niveles de TNF- α e IL-1, probablemente secretadas desde el infiltrado granulocítico y responsables de la hiperproliferación. Además de la mayor proliferación, también hay un aumento de la apoptosis de los queratinocitos, así como un gran incremento de la citotoxicidad inducida por TNF- α en los fibroblastos embrionarios (MEFs) de estos animales (Makris y cols., 2000; Schmidt-Supprian y cols., 2000; Hayden y Ghosh, 2004).

Los ratones transgénicos deficientes en IKK α , a diferencia de los *ikk β ^{-/-}* y los *p65^{-/-}*, no presentan problemas de apoptosis hepática. Los animales *ikk α ^{-/-}* nacen vivos, aunque mueren a las pocas horas como consecuencia de los múltiples defectos morfológicos que presentan en el desarrollo epidérmico y del esqueleto. Las pieles de los ratones *ikk α ^{-/-}* se muestran hiperproliferativas y mal diferenciadas. Presentan malformaciones en las zonas distales de las extremidades y el cráneo, aunque mueren a causa de defectos en la función de barrera de la piel. No se observa degradación de I κ B α ni translocación nuclear de p65 en los queratinocitos basales de estos ratones transgénicos, aunque sus MEFs conservan la respuesta inducible a TNF- α e IL-1, con una activación normal del complejo IKK (Takeda y cols., 1999; Hu y cols., 1999; Li y cols., 1999a). La generación de ratones mutantes IKK α sin actividad quinasa no produce este fenotipo, indicando que los efectos de IKK α sobre el desarrollo epidérmico son independientes de esta actividad y, probablemente, también del complejo IKK (Cao y cols., 2001; Hu y cols., 2001). Si a los animales

deficientes en IKK α se les reintroduce la quinasa únicamente en los queratinocitos basales, empleando el promotor de la queratina 5 bovina (*ikk α ^{-/-}-K5-ikk α*), no solo se recupera el fenotipo epidérmico, sino que también se recuperan los defectos morfogénéticos, indicando que NF- κ B juega un papel esencial en la comunicación epitelio-mesénquima y que IKK α es determinante para el correcto desarrollo de las extremidades y el cráneo, dirigido desde la epidermis (Sil y cols., 2004).

La inhibición de NF- κ B en ratones mediante la expresión de forma ubicua de una forma super-represora, no fosforilable, del inhibidor I κ B α (I κ B α SR; Schmidt-Ullrich y cols., 2001) provoca defectos en la morfogénesis de los folículos pilosos y otros derivados ectodérmicos, habiendo sido caracterizado como un modelo de ED. La expresión de este mutante dirigida específicamente a la capa basal epidérmica (K5-I κ B α SR; Van Hogerlinden y cols., 1999), produce un incremento en la apoptosis de los queratinocitos, acompañado de una gran reacción inflamatoria e hiperproliferación. Además, estos animales están predispuestos a la aparición de SCCs. No obstante, si expresamos el mutante I κ B α SR en SCCs disminuye la supervivencia de las células tumorales e inhibe su crecimiento *in vivo*, revelando el papel dual de NF- κ B en la carcinogénesis epidérmica (Duffey y cols., 1999). Los efectos observados en estos animales son dependientes de TNF- α , puesto que en los animales K5-I κ B α SR-*tnfr^{-/-}* se revierte el fenotipo epidérmico (Van Hogerlinden y cols., 2002, 2004; Lind y cols., 2004).

Por otro lado, los ratones transgénicos deficientes en I κ B α , con un aumento de la actividad NF- κ B, también muestran defectos hiperproliferativos en la epidermis, al presentar una piel escamosa y una capa basal poco definida, recordando a las lesiones psoriáticas. La piel de estos animales está infiltrada con un gran número de granulocitos, por lo que los defectos observados pueden deberse más a una dermatitis severa que a una diferenciación aberrante (Beg y cols., 1995b; Klement y cols., 1996). Hay que destacar que tanto el aumento como el descenso de la actividad de NF- κ B en la piel puede desembocar en un fenotipo de proliferación epidérmica. Las

funciones de NF- κ B en el control de la proliferación de los queratinocitos no han sido resueltas y es probable que estos efectos no sean de tipo autónomo-celular. No obstante, la activación de NF- κ B en epidermis mediante la expresión de p50, p65 o TNF- α dirigidas por el promotor de la K14, provoca una piel hipoplásica, con una disminución de la proliferación de los queratinocitos y una parada del ciclo celular mediada por p21, aunque sin afectar al proceso de diferenciación (Seitz y cols., 1998, 2000).

Debido a la letalidad embrionaria de los animales *ikk β ^{-/-}* (Tanaka y cols., 1999), Pasparakis y colaboradores generaron ratones transgénicos con una delección específica de IKK β en epidermis, observando que IKK β , al contrario que IKK α , no es imprescindible para una correcta embriogénesis epidérmica. A pesar de esto, los ratones mueren perinatalmente tras desarrollar un fenotipo inflamatorio e hiperproliferativo en la piel, con un aumento de la apoptosis de los queratinocitos, además de presentar niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-1) en la epidermis. Sin embargo, los queratinocitos de estos ratones en cultivo proliferan menos con respecto a los controles y no presentan un aumento de la apoptosis basal, aunque sí tras el tratamiento con TNF- α . Los investigadores concluyen que la deficiencia de IKK β en epidermis no interfiere con la diferenciación ni la proliferación de los queratinocitos y que, el fenotipo de hiperplasia y apoptosis, se debe a la respuesta inflamatoria en la piel (Pasparakis y cols., 2002).

De esta forma, la vía de señalización mediada por NF- κ B en queratinocitos se considera esencial para el correcto desarrollo embrionario de la piel y tejidos circundantes (principalmente a través de IKK α), de una correcta respuesta inflamatoria de la piel (principalmente a través de IKK β), y del mantenimiento de la homeostasis epidérmica a través de IKK γ y el complejo IKK (Makris y cols., 2000; Pasparakis y cols., 2002; Sil y cols., 2004).

7. Interferencia de NF- κ B con otras vías de señalización

NF- κ B interacciona con diversas vías de señalización para regular conjuntamente diversos procesos en el entorno celular. Entre ellas y, dado el importante papel que ejercen los GCs como agentes anti-inflamatorios y anti-proliferativos, destaca la interferencia entre NF- κ B y el receptor de glucocorticoides (De Bosscher y cols., 2003). Recientemente, se ha descrito que la interferencia funcional entre GR y PI3K/Akt es responsable de algunos de los efectos anti-inflamatorios rápidos de los GCs, cuyas consecuencias dependen, probablemente, del tipo tisular (Losel y Wehling, 2003; De Bosscher y cols., 2003). Además, parte de los efectos de PI3K/Akt están mediados a través de su interferencia con NF- κ B. Akt es una quinasa esencial en la supervivencia y proliferación celular y participa de la activación de NF- κ B a varios niveles, probablemente a través de mecanismos específicos de estímulo y tipo celular (Meng y D'Mello, 2003).

Las tres vías (GR, NF- κ B y PI3K/Akt) se relacionan en un complejo equilibrio para regular funciones vitales de la célula ante los cambios en el entorno. Los desórdenes en los diversos mecanismos de regulación de estas vías de señalización son el origen de diversas patologías cutáneas, principalmente de carácter inflamatorio y proliferativo (De Bosscher y cols., 2003; Franke y col 2003; Hayden y Ghosh, 2004).

7.1. PI3K/Akt

7.1.1. Importancia biológica de Akt

Akt, también denominada proteína quinasa B (PKB), es el homólogo del oncogén retroviral v-akt. Akt juega un papel central en la promoción de la proliferación y supervivencia celular en muchos sistemas diferentes; una de las principales funciones de su activación en la célula es la inhibición de los programas de muerte celular a través de distintos mecanismos. Una de las primeras dianas de Akt identificadas, que participan en la regulación de la apoptosis, es el miembro de la familia Bcl-2, BAD. Posteriormente, se ha

descrito que Akt controla la supervivencia celular a través de múltiples mecanismos que incluyen, entre otros, una regulación directa de la apoptosis (a través de BAD y caspasa-9) o por su interferencia con vías de activación de factores de transcripción implicados en este proceso (NF- κ B, p53 y JNK entre otros) (Song y cols., 2005)

Se ha descrito que Akt está amplificado en distintos tipos de tumores humanos (Franke y cols., 2003) y se encuentra constitutivamente activado en el proceso de carcinogénesis química en piel de ratón; además, la sobreexpresión de Akt en queratinocitos aumenta su potencial tumorigénico (Segrelles y cols., 2002). La transformación oncogénica mediada por Akt puede deberse a distintos mecanismos. La de-regulación de Akt debida a un aumento de su actividad (vía PI3K o ras, por mutaciones o por un aumento de su expresión) o a un descenso de los mecanismos reguladores (mutaciones en *pten*), puede desembocar en la supresión de la apoptosis y la diferenciación. Algunos de estos cambios en la vía de señalización por encima de Akt (por ejemplo la activación de ras), también pueden afectar a otras vías como NF- κ B, contribuyendo al proceso de tumorigénesis (Franke y cols., 2003).

Se han descrito 3 isoformas de Akt, que se activan del mismo modo, con una especificidad similar por los mismos sustratos. Los ratones transgénicos deficientes en cualquiera de las 3 isoformas no presentan ningún tipo de alteración, por lo que se asume que cumplen funciones redundantes. Akt es activada por mitógenos y citoquinas como TNF- α y su principal inductor es PI3K (Franke y cols., 2003). PI3K está compuesta por las subunidades catalíticas p110 α , p110 β y por la subunidad reguladora p85 y juega un papel importante en la regulación del ciclo celular, diferenciación, supervivencia, angiogénesis, invasión y metástasis (Roymans y Slegers, 2001). Se han detectado mutaciones de p85 en algunos tipos de cáncer humanos, donde también son frecuentes las mutaciones en el gen supresor de tumores *pten*; PTEN es, además, el principal inhibidor de PI3K () y resulta crítico para la determinación de la actividad Akt (Vivanco y Sawyers, 2002; Franke y cols., 2003). Las mutaciones que inactivan el gen *pten*, producen un aumento de la

actividad de Akt, que desemboca en un incremento de la resistencia a la apoptosis inducida por distintos estímulos y un aumento de la proliferación y de la transformación celular. Esto explica la actividad de PTEN como supresora de tumores, ya que puede contrarrestar los efectos pro-oncogénicos de PI3K disminuyendo los niveles de moléculas mediadoras de la activación de Akt (Paramio y cols., 1999; Simpson y Parsons, 2001). PTEN media sus efectos anti-proliferativos provocando la parada del ciclo celular. Las células *pten*^{-/-} son menos sensibles a la apoptosis inducida por TNF- α , mientras que su sobreexpresión, provoca una disminución en la fosforilación de Akt, de una forma dependiente de su dominio fosfatasa (Simpson y Parsons, 2001).

Trabajos recientes de nuestro grupo de investigación, han demostrado que la activación de Akt juega un papel crucial en el proceso de carcinogénesis epidérmica en ratón, ya que la actividad de Akt se ve aumentada durante el proceso de carcinogénesis química por un aumento previo de la actividad PI3K, concomitantemente con un aumento en los niveles de la subunidad p85 de PI3K y de los complejos activos PI3K (p85/p110), mientras que la actividad de la fosfatasa PTEN, disminuye ligeramente en SCCs, posiblemente debido a mutaciones en este gen oncosupresor (Segrelles y cols., 2002). Además, han demostrado que la sobreexpresión de Akt en queratinocitos aumenta su potencial tumorigénico, ya que su inyección en ratones desnudos produce un alto porcentaje de aparición de tumores mientras que, cuando se inyectan queratinocitos sin transformar, el porcentaje es bajo. Además, estos tumores están bien diferenciados, mientras que los generados por inyección de queratinocitos con niveles elevados de Akt, presentan características malignas, con una menor tasa de apoptosis y un aumento de la proliferación (Segrelles y cols., 2002).

7.1.2. Regulación de Akt

No conocemos en detalle los mecanismos de activación de PI3K, pero sabemos que durante el proceso, se generan productos intermedios como el fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), que atraen a diversas proteínas hacia la membrana celular, donde son activadas. De esta manera, PI3K media la

fosforilación de los residuos Thr308 y Ser473 de Akt, responsables de la activación de la quinasa. PTEN defosforila los productos intermedios de PI3K, evitando la activación de Akt. Las mutaciones que inactiven el gen *pten*, llevan a un aumento en la célula de estos metabolitos intermedios de PI3K, produciéndose un incremento de la fosforilación de Akt (Cantley, 2002; Franke y cols., 2003).

Akt media sus funciones fosforilando substratos que, o bien reducen la actividad de proteínas pro-apoptóticas, o estimulan factores anti-apoptóticos. Existe una alta complejidad en la señalización a través de Akt y se han encontrado docenas de substratos fosforilados por esta quinasa *in vitro* e *in vivo*. Uno de los primeros substratos descritos fue la glucógeno sintasa quinasa 3- β (GSK3 β) que, tras la fosforilación directa en la Ser9 de su extremo N-terminal, presenta una actividad severamente reducida en respuesta a la activación de PI3K por la insulina (Cross y cols., 1995; van Weeren y cols., 1998).

7.1.3. Función de GSK3 β

GSK3 β se describió por primera vez en la ruta metabólica de la síntesis de glucógeno, aunque posteriormente se ha visto que es una enzima crucial para la regulación de múltiples funciones celulares (Frame y Cohen, 2001). Su actividad está cuidadosamente regulada mediante una combinación de eventos de fosforilación, localización subcelular, y diversas interacciones con otras proteínas (Jope y Johnson, 2004). Al contrario de lo que ocurre tras la fosforilación de GSK3 β en el residuo Ser9 por Akt, la fosforilación en el residuo Tyr216, probablemente por auto-fosforilación, conlleva un incremento en la actividad de la quinasa (Hugues y cols., 1993; Cole y cols., 2004).

GSK3 β interviene, no solamente en el control de la respuesta metabólica, sino también de las vías de señalización involucradas en proliferación y apoptosis. Sus funciones principales sobre estos procesos se basan en su participación en un complejo multiproteico con APC, Axina y β -catenina. En él, GSK3 β fosforila directamente a la β -catenina, marcándola para

su degradación por la vía del proteosoma. De esta forma, GSK3 β participa en un complejo supresor de tumores que controla los niveles de la oncoproteína β -catenina (Doble y Woodgett, 2003). La β -catenina está involucrada en la adhesión célula-célula y, además, a través de la vía de Wnt, es un regulador transcripcional que en el núcleo, unido a los factores de transcripción TCF (factor de células T) y LEF (factor “enhancer” linfoide), estimula la expresión génica. En queratinocitos, la β -catenina modula el potencial proliferativo de una manera independiente de sus funciones en la adhesión celular (Zhu y Watt, 1999). Cuando se activa la vía de Wnt, se inhibe la fosforilación de la oncoproteína dependiente de GSK3 β , lo que provoca una acumulación de la β -catenina, estimulando la expresión de genes involucrados en proliferación y diferenciación, como *c-myc* y *cycD1* (Polakis, 2000). Además, como mecanismo de control adicional, GSK3 β puede fosforilar la ciclina D1 (CycD1) en el núcleo, regulando su transporte al citoplasma y mediando su degradación por la vía del proteosoma, provocando la parada del ciclo celular (Diehl y cols., 1998). Ante un estímulo mitogénico, inductor de Wnt/ β -catenina/LEF-TCF y PI3K/Akt, se produce una inactivación de GSK3 β que lleva a un aumento de la expresión y estabilidad de CycD1, constituyendo uno de los mecanismos pro-proliferativos de PI3K/Akt. Pero GSK3 β también contribuye al equilibrio entre la vida y la muerte de la célula, ya que su mera sobreexpresión puede inducir apoptosis y, además, su activación mediante la inhibición de PI3K/Akt, también conduce a un aumento de la muerte celular, aunque de una manera independiente de la β -catenina (Frame y Cohen, 2001). Sin embargo, GSK3 β también es esencial para la supervivencia celular, ya que su delección en ratones transgénicos (*gsk3 β ^{-/-}*), conlleva mortalidad embrionaria por apoptosis hepática mediada por TNF- α , recordando al fenotipo de los animales deficientes en p65, IKK β e IKK γ (Hoeftlich y cols., 2000). Posteriormente se demostró que GSK3 β era necesaria para los efectos anti-apoptóticos de NF- κ B tras un estímulo con TNF- α , ya que la inhibición de la quinasa incrementaba los efectos citotóxicos inducidos por la citoquina. Recientemente también se ha visto que GSK3 β puede fosforilar y activar varias proteínas de la familia NF- κ B/I κ B, entre las que se encuentran p65, p105 y BCL-3. Probablemente,

muchos de estos mecanismos también sean específicos de tipo celular, aunque quizás sea necesaria una actividad basal mínima de GSK3 β para evitar la apoptosis (Polakis, 2000; Jope y Johnson, 2004).

7.1.4. Akt y NF- κ B

En los últimos años se han acumulado evidencias que demuestran la interacción entre las vías de señalización mediadas por Akt e IKK/NF- κ B y el impacto de dichas interacciones en las respuestas inducidas por distintos efectores de manera específica de tipo celular. Así, Akt también es capaz de mediar la activación de NF- κ B por TNF- α a través de diversos mecanismos: 1) La activación de Akt (vía PI3K), tras la administración de TNF- α , media la fosforilación de IKK α , estimulando la función de NF- κ B (Ozes y cols., 1999). 2) El potencial de transactivación de p65 se ve aumentado tras el tratamiento con TNF- α e IL-1, a través de un mecanismo en el cual ha sido implicado Akt (Madrid y cols., 2000). 3) La activación de PI3K a través de ésteres de forbol, LPS, el ligando de CD40, IL-1 o proteínas G, puede mediar la activación de NF- κ B. Sin embargo, la inducción de PI3K por TNF- α en células endoteliales humanas, protege a las células de la apoptosis, aunque de una manera independiente de la activación de NF- κ B, parece así que la importancia de esta comunicación -y sus mecanismos de acción- son específicos de tipo celular. Se ha descrito que esta especificidad depende de los niveles relativos de IKK α e IKK β en la célula, existiendo una correlación entre niveles elevados de IKK α y una mayor sensibilidad a la regulación de NF- κ B por la vía PI3K/Akt. Además, dada la importancia de PTEN como modulador negativo de PI3K, sus niveles relativos en los distintos tipos celulares van a determinar, en gran medida, la actividad de Akt; así, unos niveles elevados de PTEN, pueden bloquear la inducción de NF- κ B por TNF- α a través de la vía Akt (Gustin y cols., 2004). Resultados previos demuestran que la sobreexpresión de la queratina K10 en queratinocitos produce una inhibición de la actividad Akt, con una disminución de la actividad NF- κ B debida, probablemente, al descenso en la expresión de IKK β e IKK γ (Santos y cols., 2002).

Por otro lado, también se ha demostrado que NF- κ B es capaz de estimular la expresión y fosforilación de Akt y, en algunos tipos celulares, se ha visto que la estimulación de Akt por TNF- α ocurre tras la activación de NF- κ B. Además, la inhibición farmacológica de NF- κ B, puede bloquear la fosforilación de Akt dependiente de TNF- α ; de manera inversa, la sobreexpresión de p65 provoca un aumento de la activación de Akt (vía PI3K) aún en ausencia de estímulo, mientras que la sobreexpresión de I κ B α , la reduce (Meng y cols., 2002; Meng y D'Mello, 2003).

7.2. GR

7.2.1. Importancia biológica de GR

Los glucocorticoides (GCs) son hormonas de naturaleza esteroide que median numerosas funciones vitales en el metabolismo, desarrollo, neurobiología y apoptosis de los vertebrados, siendo además, potentes supresores del sistema inmune (Yudt y Cidlowski, 2002). Los GCs se sintetizan en la corteza adrenal y se liberan a la circulación sanguínea en respuesta a diversos estímulos de estrés, de forma regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA). Los GCs endógenos mayoritarios, en humanos, son el cortisol y la cortisona y, en roedores, la corticosterona y desoxicorticosterona. Además de sus funciones en la fisiología animal, los GCs poseen una tremenda importancia en su vertiente terapéutica, siendo los compuestos más eficaces y empleados en el control de la inflamación. Existen diversos compuestos sintéticos análogos de los GCs, entre los cuales la dexametasona (Dex) es el más utilizado en experimentación. Los efectos de los GCs en la célula están mediados a través de su receptor hormonal, el receptor de GCs (GR), que actúa como un factor de transcripción dependiente de ligando (McKay y Cidlowsky, 1999; De Bosscher y cols., 2003). Los ratones deficientes en GR mueren perinatalmente, debido a defectos en la surfactación del epitelio alveolar, y muestran diversas alteraciones en los órganos del eje HPA. Sin embargo, los ratones con una mutación puntual en el residuo Ala458 de GR, que impide su dimerización (GR dim) y, por tanto, la regulación transcripcional, son viables (Reichardt y cols., 1998) y constituyen una demostración fehaciente

de la separación de funciones de “transactivación” y transrepresión” de GR (ver más adelante).

Los GC son también los fármacos más prescritos para el tratamiento de muchas patologías cutáneas. En la piel, son unos potentes inhibidores de la proliferación de los queratinocitos así como de la inflamación epidérmica y se emplean en el tratamiento de numerosas patologías dermatológicas hiperproliferativas e inflamatorias (Ahluwalia, 1998). En nuestro grupo de investigación se ha demostrado que la sobreexpresión de GR en ratones, específicamente en la capa basal epidérmica (K5-GR), tiene efectos inhibitorios sobre la proliferación de los queratinocitos y, además, produce alteraciones severas en el desarrollo embrionario de la piel y otros derivados ectodérmicos (Pérez y cols., 2001; Cascallana y cols., 2003; Cascallana y cols., 2005). Los ratones transgénicos K5-GR, también presentan una inducción defectuosa de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 ante un estímulo hiperproliferativo como el TPA, siendo además resistentes a la carcinogénesis epidérmica (Pérez y cols., 2001; Budunova y cols., 2003).

7.2.2. Mecanismos moleculares de la acción de GR

GR pertenece a la superfamilia de receptores nucleares hormonales y funciona como un factor de transcripción dependiente de ligando. GR consta de tres dominios funcionales: 1) el dominio de transactivación N-terminal (TAD), que contiene una función activadora independiente de hormona (AF-1); 2) el dominio central que contiene el dominio de dedos de Zinc para la unión al ADN (DBD), dos señales de localización nuclear (NLS) y un motivo de dimerización y 3) el dominio C-terminal que incluye el dominio de unión a ligando (LBD) y una función transcripcional activadora adicional (AF-2). Existen dos isoformas, denominadas GR α y GR β ; en algunos tipos celulares, se ha postulado que GR β ejerce funciones como inhibidor de GR α , sin embargo, la existencia de esta isoforma en ratones es controvertida. GR, en ausencia de ligando, permanece inactivo en el citoplasma, en un complejo formado por chaperonas (entre otras, Hsp90); tras su unión con la hormona, el receptor se activa por una serie de mecanismos, que incluyen su fosforilación. GR “activado”, se une

en el núcleo a las secuencias reguladoras de sus genes diana, a través de elementos de respuesta a glucocorticoides, para inducir (GRE) o reprimir (nGRE) su transcripción. Otro mecanismo, mediante el cual GR puede reprimir la expresión génica, es a través de su interferencia, directa o indirecta, con otros factores de transcripción como NF- κ B o AP-1, denominándose función de “transrepresión”. Una parte importante de la regulación de la respuesta inmune, de la proliferación celular y de los efectos sobre la inflamación que ejercen los GCs, se realiza a través de estos mecanismos adicionales. Una regulación anormal de estas interacciones, puede desembocar en patologías de carácter inflamatorio, autoinmune o proliferativo (McKay y Cidlowsky, 1999; De Bosscher y cols., 2003).

Gran parte de los efectos de los GCs en la regulación de la inflamación y de la proliferación, se basan en la regulación negativa de citoquinas pro-inflamatorias a través de la inhibición de NF- κ B; se han postulado diversos mecanismos de interacción entre estos dos factores de transcripción: 1) GR y NF- κ B pueden interaccionar físicamente, resultando en una inhibición mutua de su actividad transcripcional. Los datos indican que la interacción se realiza a través del DBD de GR y el RDH de p65 y p50. 2) Otro mecanismo propuesto es la inducción transcripcional de I κ B α a través de GR. El aumento de los niveles del inhibidor, retendría a NF- κ B inactivo en el citoplasma. Sin embargo, este mecanismo parece ser muy dependiente de tipo celular. 3) Durante mucho tiempo, se ha postulado un modelo de interferencia a través de la competencia entre GR y NF- κ B por cofactores y coactivadores generales de la transcripción, como CBP/p300 que, mediante la acetilación/deacetilación de histonas, dan lugar a una remodelación de la cromatina. Sin embargo, este mecanismo se debate actualmente dado que se han descrito mutantes de GR, así como agonistas de GR, capaces de discriminar la transrepresión entre GR y NF- κ B o GR y AP-1 (De Bosscher y cols., 2003; Schoneveld y cols., 2004).

Recientemente, se ha descrito que algunos de los efectos rápidos anti-inflamatorios de los GCs están mediados a través de la interacción entre GR y la vía de señalización PI3K/Akt, también descrita para otros miembros de la

superfamilia de receptores nucleares (Simoncini y cols., 2000; De Bosscher y cols., 2003). Dicha interferencia es dependiente de la asociación entre GR y la subunidad reguladora p85 α del complejo PI3K, e independiente de la acción transcripcional de GR (Hafezi-Moghadam y cols., 2002; Limbourg y Liao, 2003).

GR se expresa de forma ubicua por todo el organismo, pero sus efectos pleiotrópicos hacen suponer que muchos de los mecanismos de regulación e interacciones funcionales del receptor, sean específicos de tipo celular. Nuestros estudios previos han demostrado que la sobreexpresión de GR en la epidermis de ratones transgénicos K5-GR inhibe las respuestas hiperproliferativa, inflamatoria y tumoral, al menos en parte, a través de la inhibición de la actividad NF- κ B (Pérez y cols., 2001; Budunova y cols., 2003). Se ha demostrado en la epidermis de ratones GR dim, que el receptor defectivo en transactivación es capaz de mediar respuestas anti-proliferativas a través de la inhibición de la actividad AP-1 (Tuckerman y cols., 1999).

OBJETIVOS

1. Dado que IKK γ es imprescindible para la función del complejo IKK y la activación de NF- κ B, y teniendo en cuenta la importancia de este factor de transcripción en numerosos procesos celulares, pretendemos elucidar los mecanismos funcionales de IKK γ en el control de la apoptosis, proliferación y diferenciación en queratinocitos en cultivo. Para ello, emplearemos una estrategia de dominante negativo de la función NF- κ B en la línea celular de queratinocitos no transformados PB, a través del mutante de delección IKK γ - Δ N97.

2. Pretendemos, asimismo, abordar el estudio funcional de IKK γ en epidermis *in vivo*, mediante la generación de ratones transgénicos que expresan el mutante de delección IKK γ - Δ N97 en las células basales de la epidermis -y otros epitelios estratificados- bajo el control del promotor de la queratina K5 (ratones K5-IKK γ - Δ N97), con el fin de estudiar las implicaciones de IKK γ en la morfogénesis y diferenciación epidérmicas, así como en la respuesta inflamatoria cutánea.

3. Dada la importancia de PI3K/Akt y NF- κ B sobre el control de la proliferación y apoptosis en queratinocitos y teniendo en cuenta que se activan de manera secuencial durante el proceso de carcinogénesis epidérmica, pretendemos estudiar la expresión, localización y actividad de GSK3 β durante este proceso, como parte de los mecanismos proliferativos de Akt.

4. Teniendo en cuenta la relevancia de los GCs como tratamiento en diversas patologías cutáneas, pretendemos estudiar la interferencia entre GR y PI3K/Akt/IKK/NF- κ B en epidermis, y su relevancia en la fisiología de este tejido y en procesos patológicos como la carcinogénesis epidérmica.

MATERIALES

1. Productos

1.1. Reactivos químicos

Los productos y reactivos empleados en el laboratorio, fueron suministrados por las siguientes casas comerciales: Amresco, Biorad, Biotools, Fluka, Gibco, Merck, Peprotech, Pharmacia, Prolabo, Promega, Scharlau, Serva y Sigma.

1.2. Productos de Biología Molecular

Los enzimas de restricción, así como los reactivos de biología molecular, fueron suministrados por Amersham Pharmacia Biotech, Bio-Rad, Calbiochem, Fermentas, Life Technologies, MIB, Promega, Quiagen y Roche. Los oligonucleótidos fueron adquiridos a TIB-MolBiol Roche.

1.3. Material Radioactivo

Los compuestos radioactivos empleados: [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (10mCi/ml) y [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (10mCi/ml), fueron suministrados por Amersham Pharmacia Biotech.

2. Cultivos celulares

2.1. Materiales:

El material de plástico empleado en los cultivos de células, fue suministrado por Sarstedt y Falcon. Los medios de cultivo DMEM y EMEM, suero fetal de ternera (FBS), L-Glutamina, antibióticos y tripsina fueron suministrados por Bio-Whittaker y Gibco. Previamente a los tratamientos con Dex, el suero se trató con carbón activo (FBS-Charcoal) para extraer las hormonas esteroides. Para el cultivo de queratinocitos primarios y queratinocitos 3PC, tratamos previamente el suero con resina Chelex 100 (C-7901, Sigma) para quelar el calcio siguiendo las especificaciones del fabricante.

2.2. Líneas celulares utilizadas

-Cos7: línea celular de fibroblastos de mono, derivados de la línea CV-1 por transformación con un mutante SV40. Esta línea se mantuvo en medio DMEM, suplementado con 10% de FBS, 20mM de L-Glutamina, y antibióticos (1000 u/ml de Penicilina G y 1mg/ml de Estreptomicina), a 37°C y 5% de CO₂.

-PB: línea celular de queratinocitos de ratón inmortalizados, que provienen de papilomas. No poseen mutaciones en el gen de ras, ni una expresión elevada del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Yuspa y col, 1986). Esta línea se mantuvo en medio DMEM, suplementado con un 10% de FBS, 20mM de L-Glutamina, y antibióticos (1000 u/ml de Penicilina G y 1mg/ml de Estreptomicina), a 37°C y 5% de CO₂.

-3PC: línea celular de queratinocitos de ratón no transformados y se mantuvo en medio EMEM, suplementado con un 10% de FBS-Chelex, 20mM de L-Glutamina, y antibióticos (1000 u/ml de Penicilina G y 1mg/ml de Estreptomicina), a 37°C y 5% de CO₂.

2.3. Tratamientos

-TNF- α : el medio de cultivo se cambió 24 h antes de realizar el tratamiento con TNF- α humano recombinante (Sigma) a una concentración final en el medio de cultivo de 10ng/ml durante los tiempos indicados para estudiar la activación de NF- κ B, ó 100ng/ml durante 16 h para los estudios de citotoxicidad.

-IL-1 α : el medio de cultivo se cambió 24 h antes de realizar el tratamiento con IL-1 α humano recombinante (Peprotech) a una concentración final en el medio de cultivo de 10ng/ml durante 20 min.

-MG132: el medio de cultivo se cambió 24 h antes de realizar los tratamientos con MG132 (Sigma), que se utiliza a una concentración final de 25 μ M en el medio de cultivo durante 2 h.

-NBP: las células fueron pretratadas con el péptido permeable de unión a NEMO (H-DRQIKIWFQNRRMKWKK-TSLDWSWLQTE-OH, Calbiochem) a una concentración final en el medio de 150 μ M durante 2 h, previas al tratamiento con TNF- α .

-Dex: el medio de cultivo se cambió 16 h antes de realizar el tratamiento, por un medio con FBS-Charcoal 10%, a continuación se trataron las células con Dex (Sigma) a una concentración final en la placa de cultivo de 1 μ M durante los tiempos indicados en cada caso.

-RU486: el medio de cultivo se cambió 16 h antes de realizar el tratamiento, por un medio con FBS-Charcoal 10%, y se trataron las células con RU486 (Biomol Research Laboratories) a una concentración final en el medio de cultivo de 10 μ M durante 1 h.

-ActD: el tratamiento con ActD (Sigma) se realizó 30 min antes de la administración de Dex, a una concentración final de 1 μ M.

3. Animales

La experimentación animal se realizó en los estabularios autorizados del CIEMAT (Centro de Investigaciones Energéticas, Medio-Ambientales y Tecnológicas, Madrid), IBV-CSIC (Instituto de Biomedicina, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia) y CIPF (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia) de acuerdo con la normativa vigente y respetando los procedimientos de manejo y sacrificio recomendados por la legislación española y europeas vigentes (RD 951/1997 del Ministerio de Presidencia, RD 233/1988 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, y Convenio Europeo1-2-3 del 18/3/1986).

En los experimentos con ratones transgénicos K5-GR y K5-IKK γ - Δ N97, se utilizaron como controles los hermanos de camada.

3.1. Cepas de ratón empleadas

-K5-GR: ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de GR (rata) bajo el control del promotor de la queratina K5, descritos anteriormente (Pérez y col, 2001). La línea de ratones transgénicos utilizada en este trabajo (línea 285) se mantiene en un fondo genético mixto B6D2. En los experimentos que se describen, hemos utilizado ratones transgénicos heterocigotos (Ht) y homocigotos (Hm) de la línea 285.

-B6D2F1/J: animales *wild-type* de fondo genético mixto, suministrados por Harlan Interfauna Ibérica.

-nu/nu: animales inmunodeficientes (atímicos) sin pelo (desnudos), con el gen autosómico recesivo (*nude*) en homocigosis, en fondo genético BALB/c, suministrados por Harlan Interfauna Ibérica.

-SENCAR: cepa de ratones sensibles (SEN) a carcinogénesis (CAR), facilitados por NCI, *Frederick Cancer Research Facility*.

3.2. Tratamientos

Para realizar los tratamientos tópicos que se indican, se afeitó 48h antes el lomo de los ratones utilizando una rasuradora. Para el tratamiento tópico con Dex (análogo sintético de los glucocorticoides) y RU486 (antagonista competitivo de la progesterona y glucocorticoides), utilizamos ratones hembra K5-GR y B6D2F2, de 8 a 10 semanas de edad y aplicamos las dosis indicadas de Dex (Sigma), RU486 (Biomol) o acetona como vehículo.

Para realizar los tratamientos con el éster de forbol 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA), utilizamos ratones transgénicos K5-IKK γ - Δ N97 y no transgénicos de la misma camada, y les aplicamos 12 μ g de TPA o acetona como vehículo. Las muestras se recogieron 48 horas después del tratamiento.

4. Anticuerpos

4.1. Anticuerpos primarios

Empleamos anticuerpos suministrados por Santa Cruz *Biotechnology* frente a p65 (sc 372; dilución 1:1000 para WB y 1:75 para IF), I κ B α (sc 371; dilución 1:1000 para WB y 1:75 para IF), IKK α (sc 7182; dilución 1:1000 para WB), IKK γ (sc 8330; dilución 1:250 para WB y 1:25 para Co-IP), PTEN (sc 6818, dilución 1:1000 para WB), Lamina A (sc 6214; dilución 1:1000 para WB) y GR (sc 1004; dilución 1:1000 para WB), todos ellos policlonales obtenidos en conejo; frente a Akt 1/2 (sc 1619; dilución 1:1000 para WB), p-GSK3 β -Ser9 (sc 11757; dilución 1:1000 para WB y 1:200 para IH) y PTEN (sc 6818; dilución 1:1000 para WB), policlonales obtenidos en cabra.

El anticuerpo frente a GSK3 β (dilución 1:2500 para WB), monoclonal obtenido en ratón, fue suministrado por *Transduction Laboratories*.

El anticuerpo frente a HA (HA.11; dilución 1:500 para WB) monoclonal obtenido en ratón, y los anticuerpos frente a K5 (MK5, dilución 1:2000 para IH), Filagrina (AF111; dilución 1:1000 para IH) y Loricrina (AF62; dilución 1:2000 para IH) policlonales obtenidos en conejo, fueron suministrados por Covance-Babco.

El anticuerpo frente a K10 (K8.60; dilución 1:2000 para IH), monoclonal obtenido en ratón, fue suministrado por Sigma.

Los anticuerpos frente a p-Akt-Ser473 (9271; dilución 1:500 para WB) y p-p65-Ser536 (3031; dilución 1:500 para WB), policlonales obtenidos en conejo, fueron obtenidos de *Cell Signaling Technology*.

Los anticuerpos frente a p85 α (05-212; dilución 1:1000 para WB y 1:100 para Co-IP) y CycD1 (05-815; dilución 1:200 para IH), monoclonales obtenidos en ratón, fueron suministrados por *Upstate biotechnology*

El anticuerpo frente a p-I κ B α -Ser32 (400002; dilución 1:500 para WB) policlonal obtenido en conejo, fue suministrado por Calbiochem.

El anticuerpo frente a GSK3 β -Tyr216 (dilución 1:1000 para WB y 1:400 par IH) policlonal obtenido en conejo, fue obtenido de *Transduction Laboratories*.

El anticuerpo frente a IKK β (IMG-129; dilución 1:500 para WB) monoclonal obtenido en ratón, fue suministrado por Imgenex.

El anticuerpo frente a Actina (A2066; dilución 1:1000 para WB) policlonal obtenido en conejo, fue suministrado por Sigma.

El anticuerpo frente a BrdU (1170376; dilución 1:25 para IH) monoclonal obtenido en ratón, fue suministrado por Roche.

Los anticuerpos fueron diluidos en PBS-BSA 0.1% para IH e IF y diluidos en PBS-5% de leche desnatada para WB.

4.2. Anticuerpos secundarios

Los anticuerpos secundarios frente a ratón, conjugados con peroxidasa (715035151; dilución 1:1000) o conjugados con biotina (715065151; dilución 1:2000), fueron suministrados por *Jackson ImmunoResearch*.

Los anticuerpos secundarios frente a conejo, conjugados con biotina (711065152; dilución 1:1000), o con Fluoresceína (711095152; dilución 1:100), fueron suministrados por *Jackson ImmunoResearch*.

Los anticuerpos secundarios frente a conejo conjugados con peroxidasa (NA934; dilución 1:1000), fueron suministrados por Amersham *Biosciences*.

Los anticuerpos frente a cabra conjugados con peroxidasa (sc 2020; dilución 1:1000) fueron suministrados por Santa Cruz *Biotechnology*.

Los anticuerpos fueron diluidos en PBS-BSA 0.1% para IH e IF y diluidos en PBS-5% de leche desnatada para WB.

5. Plásmidos y vectores de expresión

-pBSK-bK5: plásmido que contiene un caset de expresión con 5.2 Kb del promotor de la queratina 5 bovina (bK5), 0.5 Kb del intrón de la b-globina y 1.2 Kb de una señal de poliadenilación, clonados en un vector de expresión bluescript (pBSK; Ramírez y cols., 1994).

-pCMV-HA-IKK γ - Δ N97: plásmido que contiene la secuencia del epítipo de la hemaglutinina (HA; 14 aa) y una versión del gen *nemo/ikk γ* de ratón, con una delección de los primeros 97 aa del extremo N-terminal (IKK γ - Δ N97), que se digirió con Apol/XbaI y se clonó en el sitio EcoRI/XbaI del vector de expresión con un promotor mínimo del citomegalovirus (pCMV-HA; Döffinger y cols., 2001).

-pCMV-HA-IKK γ -wt: plásmido que contiene la secuencia del epítipo de la hemaglutinina (HA; 14 aa) y una versión del gen *nemo/ikk γ* de ratón, (IKK γ -wt), clonados en el vector de expresión con un promotor mínimo del citomegalovirus (pCMV-HA; Döffinger y cols., 2001).

-pCMV-GR: plásmido que contiene la secuencia del gen *gr* de rata (GR), clonado en un vector de expresión con un promotor mínimo del citomegalovirus (pCMV; Miesfeld y cols., 1986).

-pCMV-GR-LS7: plásmido que contiene una versión del gen *gr* de rata mutado, con dos substituciones aminoacídicas adyacentes, en la segunda mitad del segundo dedo de zinc (Pro493 y Ala494 por Arg y Ser respectivamente), de forma que pierde su actividad transcripcional (GR-LS7), clonado en un vector de expresión con un promotor mínimo del citomegalovirus (pCMV; Helmberg y cols., 1995).

-pCEFL-HA-Akt: plásmido que contiene el gen *akt/pkb*, clonado en un vector de expresión pCEFL (Murga y col, 1998).

-8xκB-CAT: plásmido que contiene 8 repeticiones de la secuencia Igκ-*enhancer* NF-κB (8xκB) clonadas en el vector de expresión pBL2CAT.

-MMTV-CAT: plásmido que contiene el promotor del virus tumoral mamario de ratón (MMTV), que a su vez contiene secuencias de respuesta a glucocorticoides (GRE) que controlan la expresión de la enzima cloramfenicol-acetil-transferasa (CAT)

-pcDNA3: vector de expresión que contiene una secuencia mínima del promotor del citomegalovirus y un caset de expresión que confiere resistencia a geneticina (*Invitrogen life technologies*).

-RSV0: vector de expresión que contiene una secuencia LTR del virus del sarcoma de Rous y una señal de poliadenilación del SV40.

MÉTODOS

1. Transfecciones

1.1. Transfecciones transitorias

1.1.1. Transfección con fosfato cálcico

Las transfecciones transitorias en células PB se realizaron por el método de precipitación de ADN con fosfato cálcico (Chen y Okayama, 1987). 2 h antes, se cambió el medio de cultivo a las células, que se encontraban entre el 40 y 50% de confluencia en placas p100. Se añadieron 15µg de ADN total por transfección, en un volumen de 1ml en tampón HBS (NaCl 0.14M; HEPES 25mM; Na₂HPO₄ 0.75mM, pH 7.05) con Cl₂Ca 125mM. Tras 12 h de incubación a 37°C y en atmósfera del 5% de CO₂, las células se lavaron dos veces con tampón fosfato (PBS) y, a continuación, se añadió medio fresco completo.

1.1.2. Transfección con lipofectamina

Las transfecciones transitorias en células 3PC, se realizaron por el método de introducción de ADN en liposomas utilizando lipofectamina (*Invitrogen Life technologies*) siguiendo las indicaciones del proveedor. Diluímos el ADN a transfectar en 25 µl de medio Opti-MEM (*Invitrogen Life technologies*) en ausencia de suero y posteriormente añadimos la lipofectamina. Tras incubar la mezcla 30 min a temperatura ambiente, la diluímos en 1ml de medio sin suero e incubamos con ella las células (al 60% de confluencia) durante 8 h. Transcurrido ese tiempo, retiramos el medio de transfección y lo cambiamos por medio de cultivo.

1.2. Transfecciones estables

Para la generación de transfectantes estables, empleamos el método de precipitación de ADN con fosfato cálcico, cotransfectando el plásmido de interés junto con el plásmido de selección, en una relación de 5:1. Se asume que bajo estas condiciones, las células que hayan integrado el plásmido que confiere resistencia al antibiótico geneticina (G418), también han integrado el

plásmido de interés (Ausubel y cols., 1987). Tras 12 h de incubación a 37°C y en atmósfera del 5% de CO₂, las células se lavaron dos veces con tampón fosfato (PBS) y se añadió medio fresco completo. 24 h más tarde, comenzó la selección de los clones transfectantes estables con G418 (0.5 mg/ml; Fluka Biochemical) durante 3-4 semanas. Terminado este período, trabajamos con un conjunto de clones que mantuvimos en medio de crecimiento suplementado con 0.2 mg/ml de G418.

2. Cinética del crecimiento celular

Las células se sembraron en placas p60 a una densidad inicial de 25.000 células por placa y se mantuvieron en medio de cultivo completo a 37°C y en atmósfera del 5% de CO₂. A los tiempos indicados, se tripsinizaron las células y se contaron en una cámara de Neubauer. Los experimentos de cinética de crecimiento se realizaron por triplicado. Para la representación gráfica se realizó la media estadística de los valores obtenidos y la desviación estándar.

3. Estudios de Apoptosis

Para los estudios de apoptosis, las células se sembraron en multiplacas de 24 pocillos sobre cristales adherentes y, al llegar a subconfluencia, se trataron con TNF- α 100ng/ml durante 16 h. Transcurrido este tiempo, los cristales con las células se lavaron en PBS y se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 min; tras lavarlos de nuevo con PBS, se bloqueó la fijación con glicina 10mM a pH 8.5. Posteriormente, teñimos la cromatina nuclear con el colorante Hoechst 33258 (Sigma) a una concentración de 100ng/ml durante 5 min y montamos los cristales sobre un portaobjetos con un medio de montaje polivinil-alcoholico (Fluka). Observamos las muestras bajo un microscopio de fluorescencia Leica DM RXA2 y contamos los núcleos con características apoptóticas (500 células por campo, 3 campos por muestra, en dos experimentos independientes; Sigala y col, 2004). La gráfica representa la media estadística más la desviación estándar.

4. Extracción de proteínas

4.1. Obtención de extractos totales de proteína (WCE)

Los extractos totales de proteínas se obtuvieron tras la recolección de las células en PBS a 4°C, o a partir de tejido fresco pulverizado en un mortero en N₂ líquido. Lisamos las muestras en tampón C (HEPES 20mM pH 7.9; NaCl 0.4M; EDTA 1mM; EGTA 1mM y 25% de glicerol) con inhibidores (DTT 1mM; PMSF 100μM; 3μg/ml aprotinina; 3μg/ml leupeptina), mediante tres ciclos de congelación en N₂ líquido y descongelación a 37°C, añadiendo el detergente NP40 a una concentración final del 1% y centrifugando a 10.000 rpm. durante 20 min. La concentración de proteínas se midió en un kit *Biorad DC Protein Assay*, a una absorbancia de 595 nm en un lector de placas *Biorad Microplate Reader Mod. 550*, empleando albúmina sérica bovina (BSA) para realizar la curva patrón.

4.2. Fraccionamiento celular

Los extractos de proteínas citoplásmicas se obtuvieron tras la recolección de las células en PBS a 4°C, o a partir de tejido fresco pulverizado en un mortero en N₂ líquido. Lisamos las muestras en tampón A (HEPES 10mM pH 7.9; KCl 10mM; EDTA 0.1mM; EGTA 0.1mM) con inhibidores (DTT 1mM; PMSF 100μM; 3μg/ml aprotinina; 3μg/ml leupeptina), mediante tres ciclos de congelación en N₂ líquido y descongelación a 37°C, añadiendo el detergente NP40 a una concentración final del 1%. Recogimos el sobrenadante (extractos citoplásmicos) tras la centrifugación a 2.500 rpm. Los extractos nucleares se realizaron añadiendo tampón C con inhibidores sobre el *pellet* del paso anterior, incubando con agitación durante 15 min y centrifugando a 4.000 rpm durante 5 min. La concentración de proteínas se midió de manera similar a los WCE.

5. Inmunodetección de proteínas (*Western Blot*)

5.1. Geles de acrilamida y transferencia a membrana

Separamos las cantidades indicadas de proteínas por electroforesis, previa desnaturalización en tampón de carga con SDS (6%) y 2-mercapto-etanol (1%) a 95°C durante 10 min, en geles de poliacrilamida-SDS a los porcentajes indicados en cada caso, siguiendo los protocolos estándar (Sambrook y col, 1989), durante 2.5 h a 12 mA.

Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham), empleando el método semi-seco, con un aparato *Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* de Biorad, durante 1h a 0.8mA/cm², con una fuente *Power Pac 3000* de Biorad. Posteriormente, se comprobó la eficiencia de la transferencia de proteínas mediante la tinción de la membrana con una solución rojo Ponceau (0.1% Ponceau-S, 5% ácido acético glacial; Sigma).

5.2. Bloqueo e incubación con los anticuerpos

Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, se bloquearon las membranas durante un mínimo de 2 h en tampón PBS con 0.1% de Tween y un 5% de leche desnatada, en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en solución de bloqueo, durante 12 h a 4°C. Tras tres lavados de 10 min con PBS-Tween 0.1%, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa, también diluido en tampón de bloqueo, durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 10 min con PBS-Tween 0.1% a temperatura ambiente.

La detección de la señal se realizó empleando el sistema ECL (*Enhanced ChemiLuminescence*, Amersham), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las membranas se expusieron con películas Hyperfilm (Amersham) y se revelaron en un aparato AGFA *Curix 60*.

6. Determinación de la actividad CAT

Para determinar la actividad de la enzima Cloramfenicol-Acetil-Transferasa (CAT) en las transfecciones con los plásmidos reportadores (MMTV-CAT y 8xκB-CAT), empleamos un *kit* CAT-ELISA (Roche Molecular Biochemicals), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método está basado en la técnica de ELISA tipo sándwich, donde los anticuerpos anti-CAT se encuentran prefijados en los pocillos donde se realizará la detección. Tras la adición de las muestras (150μg de WCE), se incubaron con anticuerpos anti-CAT conjugados con digoxigenina (anti-CAT-DIG), y posteriormente con anticuerpos frente a la digoxigenina conjugados con peroxidasa (anti-DIG-POD), y tras la adición del sustrato, medimos la reacción colorimétrica a 415 nm en un lector de placas *Biorad Microplate Reader Mod. 550*.

7. Ensayos de cambio de movilidad electroforética en gel (EMSA)

1 pmol del oligonucleótido de cadena doble correspondiente a la secuencia palindrómica κB (en recuadro), fue marcado con [α^{32} P]-dCTP empleando la enzima Klenow de la ADN polimerasa y purificado empleando una columna Sephadex G-25.

5' TCG ACA GAG GGG ACT TTC CCA GAG GC 3' 3' GT CTC CCC TGA AAG GGT CTC CGT CGA 5'
--

Los ensayos de EMSA se realizaron a partir de WCE (15μg) o extractos nucleares (3μg), incubándolos con el oligonucleótido marcado radiactivamente durante 20 min a temperatura ambiente, en un volumen final de 20 μl (20mM HEPES pH 7.9; 100mM NaCl, 0.1mM EDTA; 1mM DTT; 20% Glicerol; 0.1% NP-40; 2μg poli-[dl-dC]). Para los ensayos de super-retardo en gel, se pre-incubaron las muestras con 3μl del anticuerpo correspondiente (p50 o p65) durante 15 min a 4°C.

Los complejos proteína-ADN resultantes, se corrieron en geles de acrilamida:bisacrilamida 29:1 al 5.5%, en condiciones no desnaturizantes en tampón TBE 0.25X (22.5 mM Tris; 22.5mM ácido Bórico; 0.25mM EDTA), a 14mA durante 4 h. Posteriormente, secamos los geles a 80°C durante 45 min en un *Gel Dryer Mod. 583* de Biorad. Finalmente, se autoradiografiaron exponiéndolos con una película *Konica X-Ray film AX* (Sakura) a -80°C y se revelaron en un aparato *Curix-60* de AGFA. Además, los geles se expusieron en un *Phosphorimager* (Biorad) para su cuantificación, utilizando el programa de software *ImageGauge* (Fuji PhotoFilm).

8. Ensayos de Co-inmunoprecipitación (Co-IP)

Preincubamos 150µg de extractos totales de proteína con *IgG beads* (50µl, eBioscience) durante 30 min a 4°C y, posteriormente, incubamos las muestras con 3µg del anticuerpo correspondiente durante, al menos, 3 h a 4°C, en una plataforma orbital y en un volumen final de 0.5 ml en tampón RIPA (50mM Tris-HCl pH 8; 150mM NaCl; 1% NP-40). Finalmente, añadimos 50µl de *IgG beads* durante 1 h a 4°C y las lavamos tres veces con tampón RIPA. Posteriormente, las muestras fueron hervidas en condiciones desnaturizantes y cargadas en un gel SDS-PAGE.

9. Ensayos de actividad quinasas

Para determinar la actividad quinasas de Akt, GSK3β e IKK, inmunoprecipitamos 40µg de extractos totales de proteína con los anticuerpos correspondientes a cada caso (1µl de anticuerpo/25µg de proteína): Akt, anticuerpo frente Akt (Santa Cruz *Biotechnology*); GSK3β, anticuerpo frente a GSK3β (*Transduction Laboratories*); IKK, mezcla de anticuerpos frente a IKKα (Santa Cruz *Biotechnology*) e IKKβ (Santa Cruz *Biotechnology*) durante, al menos, 3 h a 4°C, en una plataforma orbital y en un volumen final de 0.5 ml en tampón quinasas (20mM HEPES pH 7.5; 10mM MgCl₂; 10mM MnCl₂; 0.02% TX-100) con inhibidores (DTT 1mM; PMSF 1mM; 3µg/ml aprotinina; 3µg/ml

leupeptina; 20mM NaF; 1mM Na₃VO₄) seguido de *proteína-A-sepharose* (Pharmacia) durante 2 h a 4°C. El inmunoprecipitado se lavó e incubó en presencia de [γ ³²P]-ATP con los sustratos indicados: Histona H2B (H2B, Roche Molecular Biochemical) para determinar la actividad Akt; Glucógeno Sintasa-1 (GS-1, Sigma), para determinar la actividad GSK3 β ; I κ B α (Santa Cruz Biotechnology), para determinar la actividad IKK. Resolvimos las muestras en geles de acrilamida al 10%, determinamos el producto de la reacción por autoradiografía y lo cuantificamos empleando un *Phosphorimager* (Biorad).

Para determinar la actividad PI3K, incubamos 150 μ g de extractos totales de proteína en presencia de [γ ³²P]-ATP, empleando L- α -fosfatidilinositol (Sigma) como sustrato. Paramos la reacción con HCl 1N, y extrajimos la fracción lipídica con metanol:cloroformo (1:1). Las muestras se resolvieron mediante cromatografía en capa fina sobre placas de sílice (Silicagel, Merk) y los productos de la reacción fueron visualizados por autoradiografía y cuantificados empleando un *Phosphorimager* (Biorad).

10. Inmunofluorescencias (IF)

Para los estudios de IF se crecieron las células, hasta llegar a subconfluencia, sobre cristales cubreobjetos de vidrio. Tras los tratamientos correspondientes, lavamos los cristales con tampón PBS y los fijamos con PFA al 4% en PBS, bloqueando posteriormente la fijación con glicina 10mM. Permeabilizamos la membrana celular con Triton-X-100 (0.2%) y, tras bloquear las muestras con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% durante 15 min, incubamos las muestras con los anticuerpos primarios correspondientes (1 h a temperatura ambiente, diluidos en PBS-BSA 0.1%) y con los secundarios marcados con un fluorocromo (1 h a temperatura ambiente, diluciones 1:100-1:300). Deshidratamos y montamos las muestras sobre portaobjetos con polivinil-alcohol (Fluka) y las visualizamos en un microscopio de fluorescencia Leica DM RXA 2, con los filtros correspondientes para cada fluorocromo.

11. Clonaje

Subclonamos el plásmido pCMV-HA-IKK γ - Δ N97, en un vector de expresión pBSK-bK5 (Ramírez y cols., 1994). Extrajimos el inserto HA-IKK γ - Δ N97 mediante digestión parcial con la enzima de restricción Pst1 y lo separamos por electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Biotools) al 0.5%. Cortamos y purificamos el fragmento mediante extracciones con fenol:cloroformo y lo introdujimos en el vector pBSK-K5 linearizado con la enzima de restricción SnaB1, obteniendo el plásmido pBSK-bK5-HA-IKK γ - Δ N97 (denominado K5-IKK γ - Δ N97).

12. Generación e identificación de los animales transgénicos

El fragmento de microinyección se preparó a partir del plásmido K5-IKK γ - Δ N97, mediante digestión con la enzima de restricción Not1. Lo separamos por electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% y cortamos y purificamos el fragmento en columnas Elutip (Schleicher y Schuell, Alemania). Posteriormente, el ADN fue microinyectado en embriones de 1 día extraídos quirúrgicamente de hembras C57BL/6J x DBA/2J, a las que previamente se les indujo una super-ovulación con un tratamiento hormonal con PMS (*pregnant mare's serum*) y hCG (gonadotropina coriónica humana) siguiendo el protocolo de Hogan y colaboradores (1994). Seguidamente se implantaron quirúrgicamente en los oviductos (20 embriones por animal) de hembras receptoras B6D2F1 que habían sido montadas por machos vasectomizados 24 horas antes (pseudo-preñadas).

Para identificar los animales portadores del transgén, extrajimos ADN genómico a partir de biopsias de cola de los ratones nacidos a partir de los embriones microinyectados y transferidos, entre los días 8-12 tras su nacimiento. Digerimos la muestra con proteinasa K (1.5mg/ml; Roche) y obtuvimos el ADN por extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.

Realizamos, a partir de estas muestras, un análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando como cebadores un oligonucleótido en 5' del intrón de la β -globina (β -glob 5') y otro en 3' correspondiente a los nucleótidos 355-376 del gen *nemo/ikk γ* (Nemo376 3'; en recuadro).

β -glob 5': 5'-TGC ATA TAA ATT CGT GCT GGC G-3'
Nemo376 3': 5'-CCT GTT CCC TCT GAC TCC GAA G-3'

Con estos cebadores y con las siguientes condiciones de reacción: 10-20ng de ADN, 1.5mM de Cl_2Mg (Roche), 0.3mM dNTPs (Fermentas), 1.75ng/ μl de cada oligonucleótido y 0.5 unidades de Taq polimerasa (Biotools) en un volumen final de 20 μl , empleando el siguiente programa en un termociclador (Eppendorf):

94°C 2 min	
94°C 1 min	} X 30 ciclos
55°C 1 min	
72°C 1 min	
72°C 5 min	

amplificamos un fragmento de 420 pb, detectable únicamente en los animales transgénicos. El producto de la PCR se resolvió por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, en tampón TAE (Tris-acetato pH8.3 40mM; EDTA 1mM) con bromuro de etidio (Amresco) 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Como control de la calidad de la extracción del ADN, amplificamos, bajo las mismas condiciones experimentales, el gen endógeno de la TSH (hormona estimulante de la tiroides o tirotrópica) empleando los siguientes cebadores:

TSH 5': 5'-GTA ACT CAC TCA TGC AAA GT-3'

TSH 3': 5'-TCC TCA AAG ATG CTC ATT AG-3'

y amplificamos un fragmento de 380 pb, detectables en todos los animales. El producto de la PCR se resolvió por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, en tampón TAE con bromuro de etidio, de igual manera que para la detección del transgén.

13. Estudio histológico

13.1. Preparación de las muestras

Fijamos los tejidos a estudiar durante no menos de 48 h en formol al 10% tamponado en PBS o en alcohol al 70%, y, posteriormente, se incluyeron en parafina (Panreac), previa deshidratación por sucesivos pases en concentraciones crecientes de etanol y xileno (Merk), en un centro de inclusión EC-350 (Microm). Posteriormente, se obtuvieron cortes de 4µm en un microtomo de rotación HM-340E (Microm).

13.2. Tinción con Hematoxilina y Eosina

Desparafinamos e hidratamos las muestras mediante pases sucesivos en xileno, alcoholes decrecientes y agua, y las teñimos con hematoxilina de Harris (Panreac) y Eosina amarilla (Shandon). Posteriormente, las muestras se deshidrataron por sucesivos pases en alcoholes crecientes y xileno, y se montaron con una resina sintética (DePeX, BHD). Las preparaciones se

visualizaron y microfotografiaron en un microscopio de campo claro Leica DM1000.

13.3. Inmunohistoquímica (IH)

Desparafinamos e hidratamos las muestras mediante pases sucesivos en xileno, concentraciones decrecientes de etanol y agua. Lavamos en PBS, y bloqueamos la actividad peroxidasa endógena con Metanol:H₂O₂ (29:1). En el caso de la IH frente a BrdU, incubamos previamente las muestras en HCl 1N durante 1h. Bloqueamos con suero de caballo o cabra al 5% e incubamos con el anticuerpo primario correspondiente a cada caso durante 3 h a 37°C. Lavamos en PBS e incubamos con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con biotina durante 1 h a 37°C. Revelamos las preparaciones con el kit estreptavidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vectastain) y di-amino-benzidina (DAB), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las preparaciones se visualizaron en un microscopio de campo claro Leica DM1000.

14. Extracción de queratinocitos primarios de ratón

Sacrificamos los ratones recién nacidos (día P0) en una atmósfera saturada de CO₂. Posteriormente los introducimos en la cabina de cultivos celulares en condiciones estériles y separamos la piel (epidermis, dermis e hipodermis) del resto del animal, por métodos quirúrgicos. Estiramos cada muestra en una placa de cultivo p35, con la hipodermis en contacto con tripsina 0.25% durante 18 h a 4°C. Posteriormente retiramos la dermis e hipodermis y disgregamos la epidermis por métodos físicos. Filtramos y contamos los queratinocitos obtenidos y los sembramos a una densidad inicial de 2x10⁶ células (en conjuntos de animales tg y no tg) en placas p60, en un medio de cultivo de plaqueo, con una concentración de Cl₂Ca 0.2mM y un 4% de suero, al que previamente retiramos el calcio con un tratamiento con resina Chelex-100 (Sigma). 18 h más tarde, se cambiaron a un medio de cultivo de crecimiento, con una concentración de 0.05mM de Cl₂Ca, suplementado con el factor de crecimiento epidérmico (EGF, 10 ng/ml). Las células se visualizaron con un microscopio de contraste de fases Leica DM-IL.

15. Carcinogénesis química en piel de ratón

Aplicamos el protocolo estándar de carcinogénesis en dos pasos en piel de ratón (Slaga y cols., 1996). Para ello, afeitamos el dorso de hembras de ratón SENCAR, en la fase de descanso del ciclo del pelo (8-10 semanas de edad). 3 días más tarde, aplicamos una dosis del iniciador tumoral 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA, 2.5µg en 200µl de acetona). 2 semanas después iniciamos la promoción con 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA, 2µg en 200µl de acetona), que se repitió dos veces por semana y continuó durante 50 semanas. Recolectamos los tumores entre 10 y 50 semanas tras la iniciación y tomamos muestras para histología y extracción de proteína.

16. Ensayos de tumorigénesis *in vivo*

Los clones de queratinocitos PB que expresan de forma estable pcDNA3 y Akt han sido descritos previamente (Segrelles y cols., 2002). Los clones de queratinocitos PB que expresan de forma estable GR o GR + Akt se generaron para este estudio mediante el protocolo previamente descrito (apartado 1.2). Los clones indicados se crecieron en cultivo y, tras tripsinizarlos y contarlos, se diluyeron en PBS (1.10^6 células/0.1ml) e inyectaron subcutáneamente en ratones atímicos nu/nu (hembras de 5-6 semanas de edad). Cada animal recibió dos inyecciones de 0.1ml, una en cada flanco (PB-pcDNA3 (derecha) y PB-Akt (izquierda); PB-pcDNA3 (derecha) y PB-GR (izquierda); PB-Akt (derecha) y PB-GR/Akt (izquierda)). El número de animales inyectados fue de 12-18 por grupo de transfección y la incidencia y el tamaño de los tumores se registraron dos veces por semana. Estimamos el volumen de cada tumor mediante la fórmula $\pi/6 \times ab^2$, donde a y b son los ejes mayor y menor del tumor respectivamente. Los animales fueron sacrificados 6-9 semanas más tarde, dependiendo del tamaño de los tumores. La toma de muestras se realizó entre los días 39-64 posteriores a la inyección.

1. Descripción del mutante de delección IKK γ - Δ N97

La subunidad reguladora IKK γ (NEMO) se asocia a las subunidades catalíticas IKK α e IKK β a través de su extremo amino terminal. La delección de los 100 primeros aa de IKK γ es suficiente para impedir su unión a las subunidades catalíticas, bloqueando la correcta formación y actividad de los complejos IKK (Ye y cols., 2000). Para nuestro estudio hemos empleado los plásmidos pCMV-HA-IKK γ -wt y pCMV-HA-IKK γ - Δ N97 que contienen, respectivamente, la secuencia completa del gen de ratón que codifica para IKK γ y una delección amino-terminal de 97 aa del mismo (aa 97-412), marcados con el epítipo de la hemaglutinina, bajo el control de un promotor mínimo de citomegalovirus (Figura. 5; Döffinger y cols., 2001).

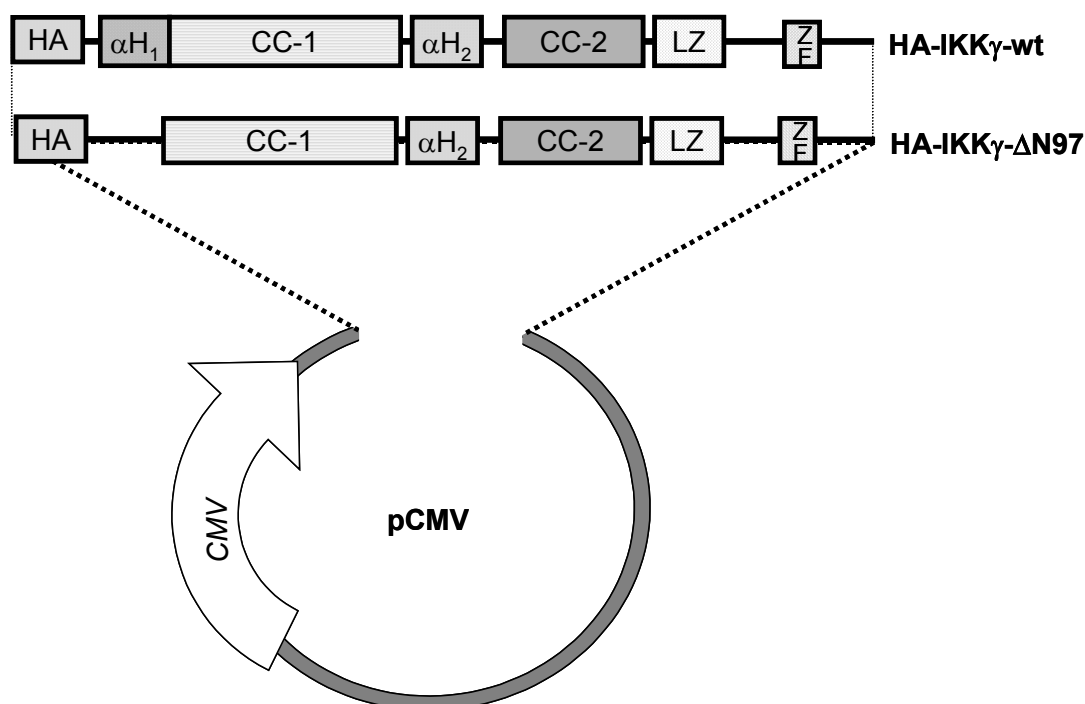


FIGURA 5: Representación esquemática de los plásmidos pCMV-HA-IKK γ -wt y pCMV-HA-IKK γ - Δ N97. Estructura del plásmido pCMV, donde se señala la situación del promotor mínimo de citomegalovirus (CMV), con la orientación de los insertos HA-IKK γ -wt y HA-IKK γ - Δ N97. HA: epítipo mínimo de la hemaglutinina; α H: hélice alfa; C-C (coiled-coil): espiral enrollada; LZ (leucine zipper): cremallera de leucina; ZF (zinc finger): dedo de zinc.

2. IKK γ - Δ N97 actúa como un dominante negativo de la función NF- κ B en queratinocitos

Se ha descrito que IKK γ - Δ N97 actúa como una forma dominante negativa de la función de NEMO en la línea celular 293T, inhibiendo parcialmente la actividad NF- κ B inducida por diversos estímulos (Döffinger y cols., 2001). Teniendo en cuenta la variedad de respuestas específicas de tipo celular de esta vía de señalización (Hayden y Ghosh., 2004), decidimos determinar si este mutante actuaba de manera análoga en queratinocitos. Para ello, hemos utilizado la línea celular derivada de queratinocitos de ratón denominada línea celular PB. Está descrito que las células PB no poseen mutaciones en el gen *ras*, ni una expresión elevada del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Yuspa y cols., 1986).

En estos experimentos, transfectamos transitoriamente las células PB mediante la técnica del fosfato cálcico (ver materiales y métodos), utilizando distintos vectores de expresión que codifican para un vector “vacío” (RSVO), la subunidad IKK γ “wild-type” (wt) (pCMV-HA-IKK γ -wt), el mutante de delección amino-terminal Δ N97 (pCMV-HA-IKK γ - Δ N97) o ambas (HA-IKK γ -wt/HA-IKK γ - Δ N97). A continuación, estudiamos los niveles de expresión de IKK γ utilizando extractos totales de proteína y mediante técnicas de *western-blot* (WB), utilizando anticuerpos específicos frente a IKK γ . En todos los casos detectamos la proteína endógena IKK γ que migra con un peso molecular de 48 Kda, acorde con lo descrito previamente (Yamaoka y cols., 1998; Figura 6, carriles 1-4). Además, en las células que habían sido transfectadas con la subunidad wt, detectamos una banda que migraba por encima de la proteína endógena (correspondiente al cambio de movilidad esperado para HA-IKK γ ; Figura 6, carriles 2 y 4), mientras que los extractos procedentes de queratinocitos transfectados con el mutante Δ N97 presentaban una banda que migraba por debajo de la endógena (correspondiente al cambio de movilidad esperado para la proteína deleccionada; Figura 6, carriles 2 y 3). Los queratinocitos que fueron trasfectados con ambas, mostraron las dos bandas

de mayor (HA-IKK γ -wt) y menor (HA-IKK γ - Δ N97) peso molecular respecto a la proteína endógena IKK γ -wt (Figura 6, carril 4).

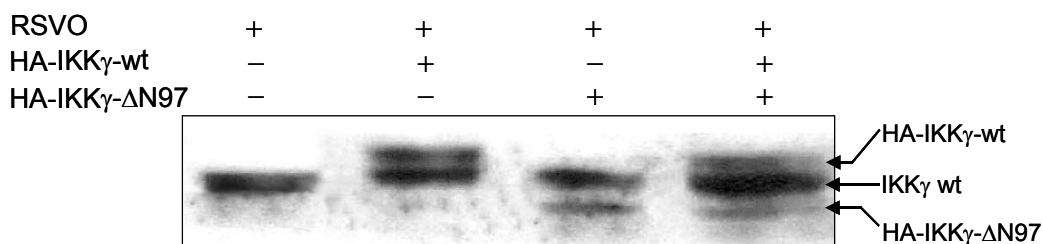


FIGURA 6: Niveles de expresión de IKK γ -wt, HA-IKK γ -wt y HA-IKK γ - Δ N97 en transfecciones transitorias en queratinocitos PB. Los queratinocitos PB fueron transfectados transitoriamente con 5 μ g de un vector vacío (RSVO), además de HA-IKK γ -wt (5 μ g) o HA-IKK γ - Δ N97 (5 μ g), o ambos (10 μ g de ADN total). Los extractos totales de proteína (35 μ g) se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10% y se determinaron los niveles de IKK γ endógeno (IKK γ -wt) y transfectado (IKK γ - Δ N97) con anticuerpos específicos por *western-blot* (WB).

2.1. La fosforilación de I κ B α inducida por TNF- α se inhibe en los queratinocitos que expresan IKK γ - Δ N97 de forma transitoria

Con objeto de evaluar las consecuencias de la expresión de HA-IKK γ - Δ N97 (abreviadamente, IKK γ - Δ N97) en queratinocitos PB, examinamos los niveles de fosforilación del inhibidor I κ B α tras el tratamiento con TNF- α mediante WB (Figura 7A).

En primer lugar, examinamos la cinética de fosforilación de I κ B α tras un estímulo con TNF- α en células transfectadas con RSVO. TNF- α indujo un incremento en los niveles de fosforilación del inhibidor en la serina 32 (I κ B α -P-Ser32) a los 10 min del tratamiento, que además se mantenía elevado hasta 30 min tras la administración de la citoquina. Los niveles de I κ B α fosforilada disminuyeron a partir de los 30 min tras la inducción con TNF- α (Figura 7A).

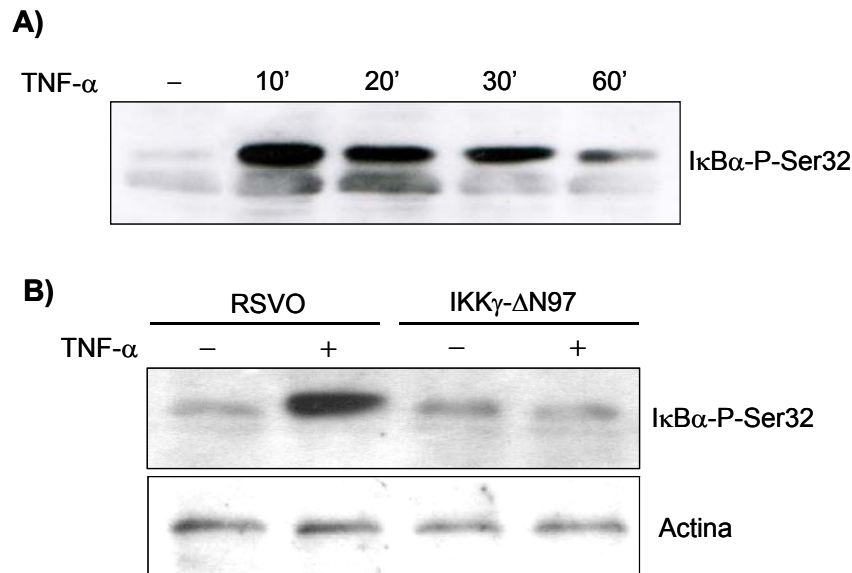


FIGURA 7: Estudio de la fosforilación del inhibidor IkB α inducida por TNF- α en queratinocitos. A) cinética de fosforilación de IkB α : Las células PB transfectadas transitoriamente con RSVO, fueron tratadas con TNF- α 10ng/ml o vehículo a los tiempos indicados. Los extractos totales de proteína (35 μ g) se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10% y se determinaron los niveles de IkB α fosforilada en el residuo Serina 32 (IkB α -P-Ser32) con anticuerpos específicos por WB. **B) IKK γ - Δ N97 bloquea la fosforilación de IkB α inducida por TNF- α en queratinocitos:** Las células PB-RSVO y PB-IKK γ - Δ N97, fueron tratadas con TNF- α 10ng/ml o vehículo durante 30 min. Se determinaron los niveles de IkB α -P-Ser32 y actina (control de carga) por WB como en el apartado A.

En las células PB transfectadas de manera transitoria con el vector vacío RSVO y tratadas con TNF- α durante 30 min, se indujo un incremento notable en los niveles de IkB α -P-Ser32 (Figura 7B, comparar carriles 1 y 2). Sin embargo, en las células que expresaban la forma delecionada de IKK γ , no pudimos apreciar ningún cambio en la fosforilación de IkB α tras el estímulo con esta citoquina pro-inflamatoria (Figura 7B, comparar carriles 3 y 4).

De esta forma, podemos afirmar que IKK γ - Δ N97 bloquea la fosforilación de IkB α en el residuo Ser32 inducida por TNF- α en queratinocitos en cultivo.

2.2. La fosforilación de p65 tras un estímulo con TNF- α se inhibe en los queratinocitos que expresan IKK γ - Δ N97 de forma transitoria

A continuación estudiamos si la expresión transitoria de IKK γ - Δ N97 en células PB alteraba la capacidad de TNF- α de fosforilar el residuo serina 536 (Ser-536) del dominio de transactivación (TAD) de p65, relevante para la actividad transcripcional inducible de NF- κ B, acorde con lo descrito en otros tipos celulares (Sakurai y cols., 1999). Para ello, empleamos extractos totales de proteína procedentes de queratinocitos PB transfectados transitoriamente con RSVO o con IKK γ - Δ N97 y tratados o no con TNF- α , los cuales analizamos mediante técnicas de WB con anticuerpos específicos frente a p65 y p65 fosforilada en el residuo Ser-536 (p65-P-Ser-536).

Los niveles totales de p65 fueron similares en los queratinocitos transfectados con RSVO y los que expresan IKK γ - Δ N97, en ausencia y presencia de TNF- α (Figura 8, comparar carriles 1-4). En los queratinocitos control, detectamos p65 fosforilada a los 30 min tras el tratamiento con TNF- α (Figura, 8, carriles 1 y 2). En contraste, las células que expresan el mutante de delección IKK γ - Δ N97 no mostraron cambios en los niveles de fosforilación de p65-P-Ser-536 tras la inducción con TNF- α , indicando que el mutante N-terminal de IKK γ bloquea la fosforilación de p65, inducible por TNF- α (Figura 8, carriles 3 y 4).

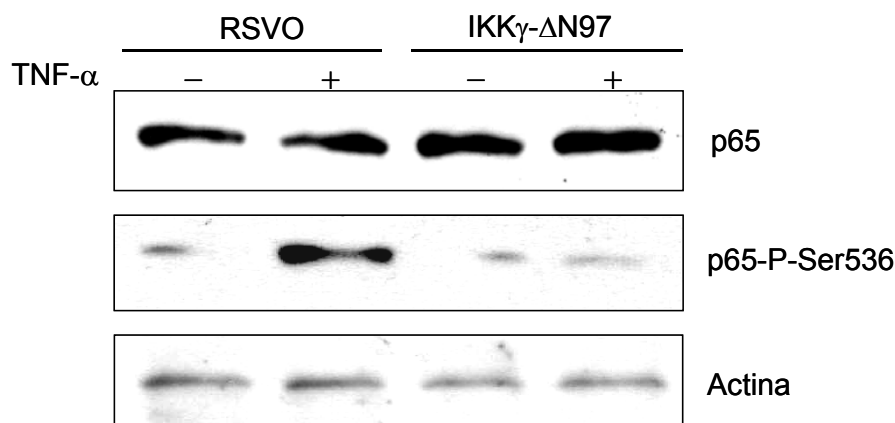


FIGURA 8: IKK γ - Δ N97 inhibe la fosforilación de p65 en el residuo Ser-536 tras un estímulo con TNF- α . Las células PB-RSVO y PB-IKK γ - Δ N97, fueron tratadas con TNF- α 10ng/ml o vehículo durante 30 min. Los extractos totales de proteína (35 μ g) se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10% y se determinaron los niveles de p65, p65 fosforilado en el residuo serina 536 (p65-P-Ser536) y actina (control de carga) con anticuerpos específicos por WB.

2.3. IKK γ - Δ N97 reduce la unión de los dímeros NF- κ B al ADN inducida por TNF- α

Analizamos si existían diferencias en la formación de complejos NF- κ B unidos al ADN como respuesta a TNF- α entre los queratinocitos control y los que expresaban la versión truncada de IKK γ . Empleamos para ello extractos totales de proteína, procedente de transfecciones transitorias de células PB con un vector vacío (RSVO) o con el mutante IKK γ - Δ N97, en presencia o ausencia de TNF- α . Con estas muestras realizamos ensayos de retardo de movilidad electroforética en gel (EMSA) utilizando un oligonucleótido correspondiente a la secuencia consenso κ B.

Como muestra la figura 9, la tasa de unión de los dímeros NF- κ B al ADN aumenta de forma drástica tras un estímulo con TNF- α (Figura 9, comparar los carriles 1 y 2). En condiciones basales (sin estimular), las células que expresan IKK γ - Δ N97 muestran una capacidad de unión de los dímeros NF- κ B al ADN similar a las controles (Figura 9, comparar los carriles 1 y 3). Sin embargo, cuando estimulamos estas células con TNF- α , la capacidad de unión de NF- κ B al ADN se encuentra reducida en un 20% con respecto a los controles (Figura 9, comparar los carriles 3 y 4). Hay que tener en cuenta que, en estas

condiciones experimentales, la población testada comprende un bajo porcentaje de células transfectadas con el mutante de delección, por lo que la inhibición de la actividad de unión NF- κ B observada se encuentra diluída debido al alto porcentaje de queratinocitos que no han integrado el plásmido (Colosimo y cols., 2000), lo que sugiere un mayor efecto relativo del mutante. Por lo tanto, en queratinocitos en cultivo, IKK γ - Δ N97 es capaz de bloquear parcialmente la unión inducible por TNF- α , de los dímeros NF- κ B al ADN.

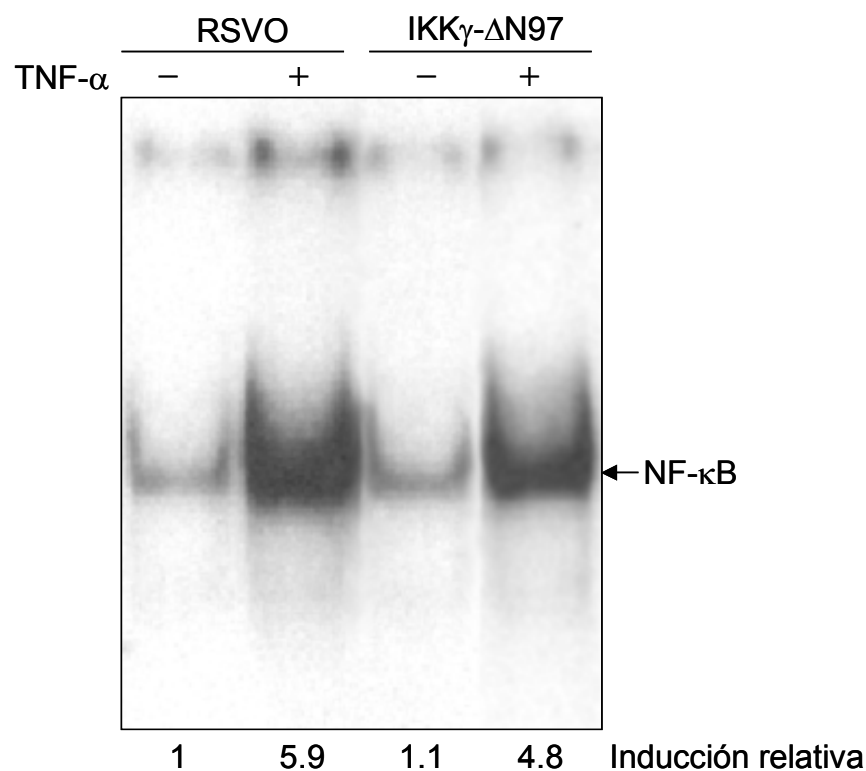


FIGURA 9: IKK γ - Δ N97 reduce los niveles de unión de NF- κ B al ADN inducidos por TNF- α . Las células PB-RSVO y PB-IKK γ - Δ N97, fueron tratadas con TNF- α 10ng/ml o vehículo durante 30 min. Realizamos ensayos de EMSA, incubando los extractos totales de proteína (15 μ g) con un oligonucleótido κ B marcado radioactivamente, los complejos proteína-ADN se resolvieron en un gel de acrilamida al 5.5% y se detectaron mediante autoradiografía. Los complejos fueron cuantificados utilizando el software *ImageGauge* (*Fuji Photo Film*).

2.4. IKK γ - Δ N97 reduce los niveles de transactivación de NF- κ B inducidos por TNF- α

Dado que la unión de NF- κ B al ADN, inducible por TNF- α , se encuentra reducida en los queratinocitos PB transfectados transitoriamente con el mutante de delección IKK γ - Δ N97, examinamos la capacidad de transactivación de NF- κ B en estas células. Para ello, realizamos co-transfecciones utilizando un plásmido “reportador” que posee sitios de unión κ B ligados al gen de la cloranfenicol-acetil transferasa (8x κ B-CAT) y determinamos en extractos totales la actividad CAT mediante ensayos ELISA.

En las células control, tras un estímulo con TNF- α , observamos un incremento de la actividad CAT, de aproximadamente 6 veces en comparación con los queratinocitos sin estimular (Figura 10). Sin embargo, en las células que expresaban el dominante negativo de IKK γ , tan solo apreciamos un aumento de la actividad CAT de aproximadamente 3 veces tras el estímulo con TNF- α . Estos resultados muestran que los queratinocitos que expresan el mutante de delección poseen una capacidad reducida, aproximadamente en un 50%, en la transactivación de genes κ B-dependientes.

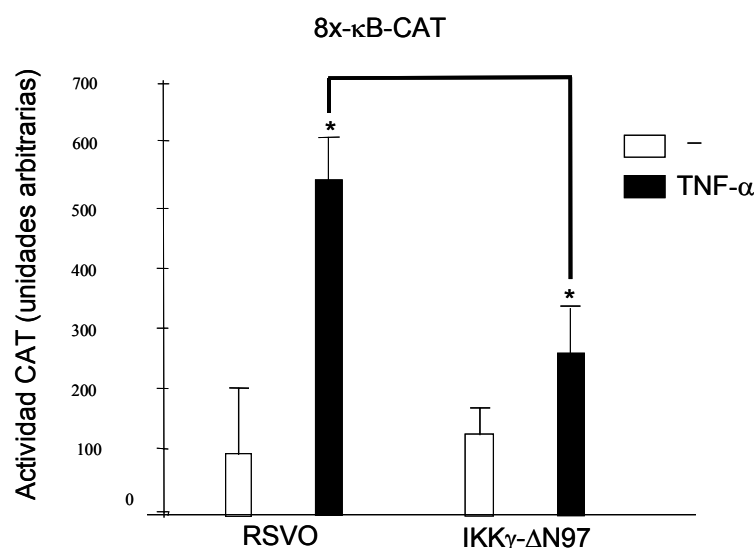


FIGURA 10: IKK γ - Δ N97 reduce los niveles de transactivación NF- κ B tras un estímulo con TNF- α . Las células PB fueron transfectadas transitoriamente con un vector vacío (RSVO), o con IKK γ - Δ N97 (10 μ g de ADN) así como con un plásmido “reportador” de la actividad CAT (8 $\times$ κ B-CAT, 2 μ g). 24 h después fueron tratadas con TNF- α 10ng/ml o con vehículo durante 30 min, y se midió la actividad CAT mediante ensayos ELISA sobre extractos totales de proteína (100 μ g). *:p<0.01.

En conjunto, estos datos indican que la delección de los 97 primeros aa de IKK γ en ensayos de transfección transitoria, ejerce un efecto dominante negativo de la función NF- κ B en queratinocitos puesto que: 1) bloquea de forma efectiva la fosforilación de la proteína inhibidora I κ B α , impidiendo su degradación tras un estímulo pro-inflamatorio como TNF- α ; 2) impide la fosforilación de p65 en el residuo Ser-536; 3) reduce la capacidad de los dímeros NF- κ B para unirse al ADN, y 4) reduce la tasa de transactivación de un plásmido “reportador” de la actividad κ B tras un estímulo con TNF- α .

3. Expresión de IKK γ - Δ N97 de forma estable en queratinocitos de ratón

Con objeto de realizar un examen exhaustivo de los efectos que produce IKK γ - Δ N97 sobre la vía de señalización que conduce a la activación de NF- κ B, generamos líneas de queratinocitos de ratón (PB) que expresaban de manera estable la subunidad IKK γ -wt (PB-IKK γ -wt), el mutante de delección (PB-IKK γ - Δ N97) o ambas (PB-IKK γ -wt/IKK γ - Δ N97).

3.1. La expresión estable de IKK γ - Δ N97 provoca cambios morfológicos y un retraso en la cinética de crecimiento de los queratinocitos

Dado que NF- κ B está implicado en el control de la proliferación, apoptosis y diferenciación en queratinocitos (McKenzie y Sabin, 2003) y que diversas citoquinas y factores de crecimiento median, al menos en parte, su acción proliferativa a través de la activación de NF- κ B (Aggarwal, 2004), decidimos estudiar la cinética de crecimiento de los clones generados.

Para ello, se sembraron 1.25×10^5 células de los clones estables: PB-pcDNA3, PB-IKK γ -wt, PB-IKK γ - Δ N97, o PB-IKK γ -wt/IKK γ - Δ N97; las células se recogieron cada 2 días y se contaron con una cámara de Neubauer, tras lo cual representamos la curva de crecimiento celular mediante una gráfica (Figura 11).

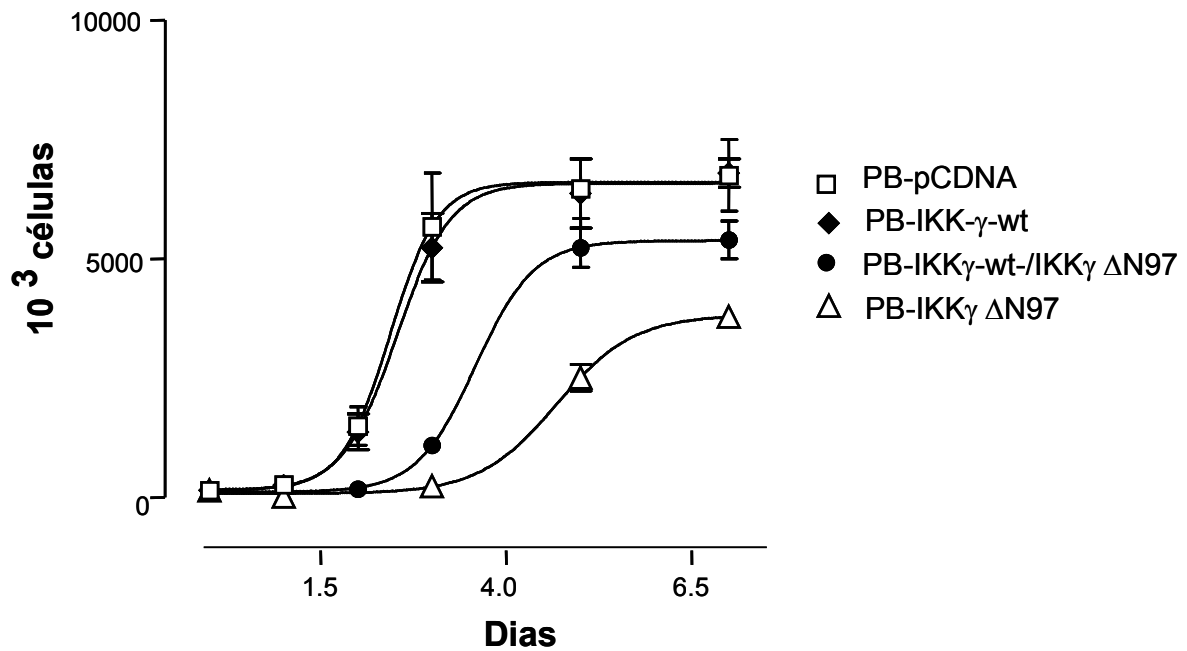


FIGURA 11: Los queratinocitos PB-IKK γ -ΔN97 presentan un retraso en su cinética de crecimiento respecto a los queratinocitos controles. Se sembraron 1.25×10^5 células de los siguientes clones estables: PB-pcDNA3, PB-IKK γ -wt, PB-IKK γ -ΔN97, o PB-IKK γ -wt/IKK γ -ΔN97. Las células se recogieron a los tiempos indicados y se contaron con una cámara de Neubauer. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Nuestras observaciones iniciales indicaron que las células PB-IKK γ -ΔN97 crecían siguiendo una cinética tremendamente retrasada con respecto a sus controles (PB-pcDNA3) de manera que, 5-6 días después de la siembra, las células control se habían duplicado 5-6 veces, mientras que las PB-IKK γ -ΔN97 tan solo se habían duplicado 2 veces (Figura 11). Las células PB-IKK γ -wt exhibieron una cinética de crecimiento indistinguible de las células control. En cambio, las células PB-IKK γ -wt/IKK γ -ΔN97, presentaban una cinética de crecimiento intermedia, sugiriendo que es la proporción relativa entre el mutante de delección y la proteína wt (endógena o transfectada), la que determina la función del complejo IKK en la proliferación de los queratinocitos (Figura 11).

Las células PB presentaban una morfología típica de queratinocito, con forma poligonal regular y núcleo central, que en cultivo crecían por expansión en monocapa (Figura 12). Sin embargo, los queratinocitos que expresaban IKK γ -ΔN97 de forma estable, perdían la forma poligonal típica, adoptando

formas irregulares y, en ocasiones, características morfológicas de células en ayuno (Figura 12A, asterisco). Además, observamos la pérdida de los límites intercelulares (llevando en ocasiones a la formación de sincitios y células multinucleadas) y células apoptóticas (Figura 12A, flechas), así como diversas irregularidades nucleares, como núcleos condensados (Figura 12A, puntas de flecha).

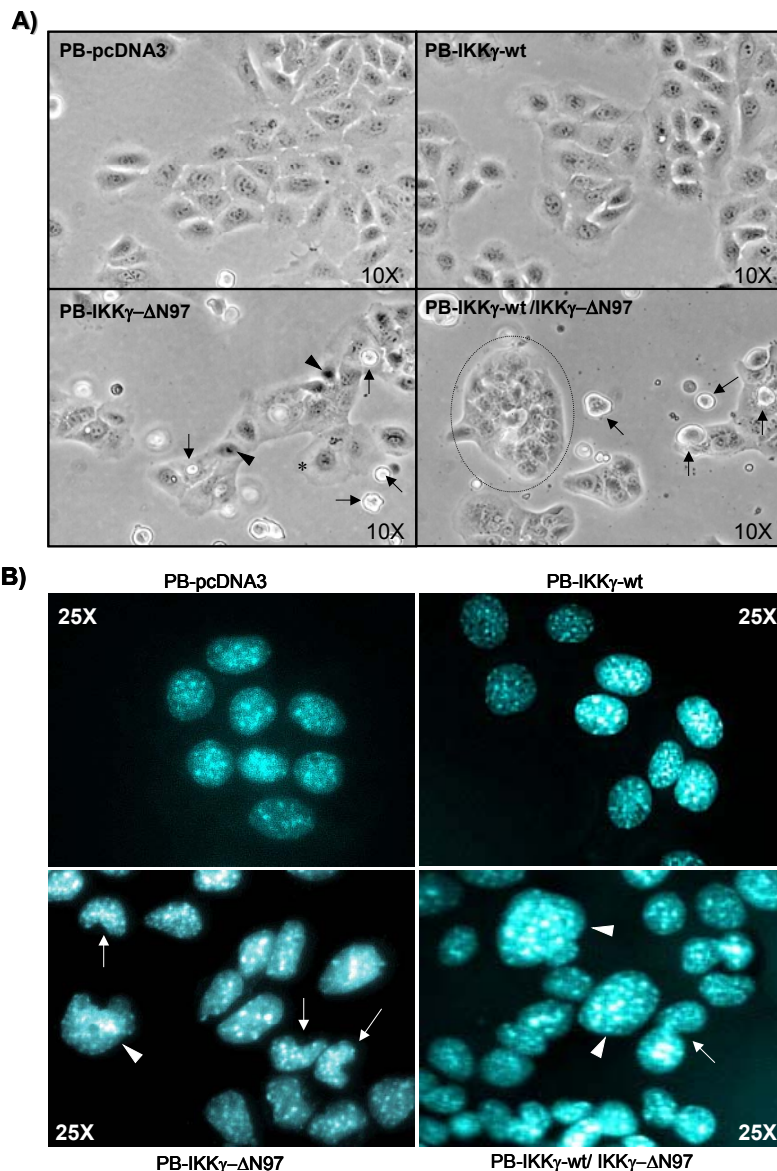


FIGURA 12: Cambios morfológicos en queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97. Los clones de células PB-pcDNA3, PB-IKK γ -wt, PB-IKK γ - Δ N97, o PB-IKK γ -wt/ Δ N97 se cultivaron hasta subconfluencia. **A)** Las células se microfotografiaron con un microscopio de contraste de fases Zeiss Axiovert 25 a 10X. Flecha: células en apoptosis. Punta de flecha: núcleos condensados. Asterisco: morfología de célula en ayuno. Línea de puntos: Colonia aislada. **B)** Tras la fijación de las células, sus núcleos se tiñeron con Hoechst 33258. Posteriormente se microfotografiaron en un microscopio de fluorescencia Leica DM-RXA2 a 25X. Flecha: núcleos arriñonados. Punta de flecha: núcleos gigantes.

En las células PB-IKK γ - Δ N97 y PB-IKK γ -wt/IKK γ - Δ N97, utilizando un microscopio de fluorescencia, tras la tinción con Hoechst 33258, pudimos apreciar la presencia de núcleos arriñonados (Figura 12B, flecha) y núcleos gigantes (Figura 12B, punta de flecha). En contraste con las células control, que crecían por expansión en monocapa, los clones PB-IKK γ - Δ N97 y, sobre todo, los PB-IKK γ -wt/IKK γ - Δ N97, crecían formando colonias aisladas, estratificándose antes de llegar a su confluencia (Figura 12A, línea de puntos).

3.2. IKK γ - Δ N97 provoca un aumento considerable en la tasa de apoptosis en queratinocitos

NF- κ B ejerce funciones anti-apoptóticas en varios tipos celulares (Takada y cols., 2004a), incluyendo queratinocitos de ratón y humanos (Van Hogerlinden y cols., 1999; Basile y cols., 2003). Con estos antecedentes, teniendo en cuenta el elevado número de células en apoptosis en los clones que expresaban el mutante de delección de IKK γ , decidimos estudiar en detalle este proceso. Para ello, realizamos tratamientos citotóxicos con TNF- α (100mg/ml) durante 16 h y, tras fijar las células, realizamos tinciones con Hoechst 33258 y contamos los núcleos que presentaban características de apoptosis, calculando el porcentaje de los mismos tras el recuento de 500 células por campo (8 campos por muestra).

Como podemos observar en la figura 13, la tasa basal de apoptosis en queratinocitos en cultivo se aproxima al 2% y, el tratamiento con TNF- α no produce variaciones significativas (3%). La bibliografía demuestra que sólo en presencia de cicloheximida, la administración de dosis citotóxicas de TNF- α inducen un aumento significativo de la apoptosis, cuantificado alrededor del 15%, en queratinocitos (Weisfelner y Gottlieb, 2003). Las células PB-IKK γ -wt presentaron una tasa de apoptosis similar a la de los controles (Figura 13). Sin embargo, en los queratinocitos transfectados con el dominante negativo de IKK γ , la tasa de apoptosis basal se había incrementado considerablemente,

disparándose hasta el 28%. No obstante, el tratamiento con $\text{TNF-}\alpha$ en estas células, no indujo ningún incremento adicional de estos niveles (Figura 13). Al igual que sucedía con la cinética de crecimiento, cuando observamos los núcleos de las células PB-IKK γ -wt/IKK γ - Δ N97, apreciamos una recuperación parcial de la supervivencia celular con respecto a las células PB-IKK γ - Δ N97, alcanzando tasas de apoptosis, en presencia y ausencia de estímulo, del 7%.

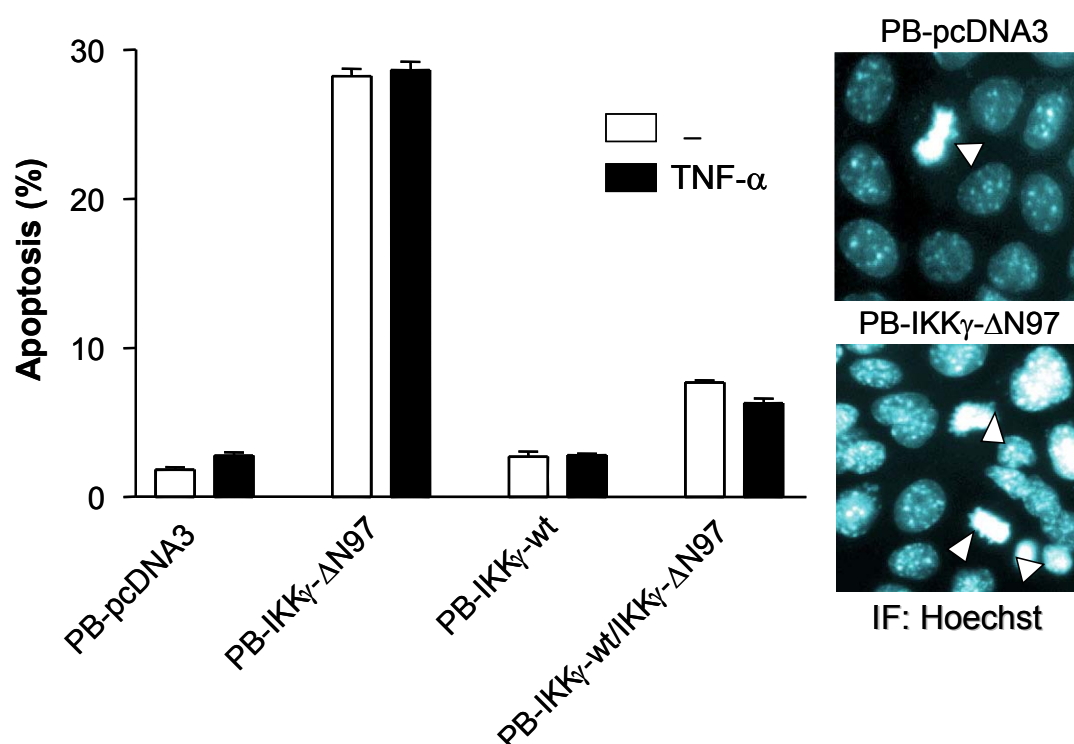


FIGURA 13: IKK γ - Δ N97 induce un aumento considerable en la tasa de apoptosis de los queratinocitos en cultivo: Las células PB-pcDNA3, PB-IKK γ -wt, PB-IKK γ - Δ N97, o PB-IKK γ -wt/ Δ N97 se cultivaron hasta llegar a subconfluencia y se trataron con $\text{TNF-}\alpha$ 100mg/ml durante 16 h. Posteriormente se tiñeron con Hoechst 33258 y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia Leica DM-RXA2. Se contaron 500 células por campo (8 campos por muestra) y se analizó el porcentaje de núcleos que presentaban características de apoptosis. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Con estos datos, podemos afirmar que el dominante negativo de función NF- κ B, IKK γ - Δ N97, induce la apoptosis de queratinocitos en cultivo, aún en ausencia de estímulos pro-apoptóticos, y de una manera dependiente de su estequiometría con respecto a la subunidad IKK γ -wt.

3.3. Alteraciones en la vía de activación de NF- κ B en queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97

Hemos visto con nuestros experimentos de transfecciones transitorias, que los queratinocitos de ratón que expresaban IKK γ - Δ N97, presentaban deficiencias en la activación de NF- κ B inducible por TNF- α . De manera similar, en los clones estables PB-pcDNA3 y PB-IKK γ - Δ N97, nos propusimos estudiar posibles alteraciones en la activación de esta vía de señalización inducida por citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 α , si bien la mayoría de los resultados presentados se refieren a TNF- α .

En primer lugar, estudiamos la expresión de IKK γ mediante técnicas de WB con anticuerpos específicos, en extractos totales de proteína (Figura 14). Tanto en las células PB-pcDNA3 como en las PB-IKK γ - Δ N97 detectamos la proteína endógena IKK γ que migra alrededor de 48 Kda (Yamaoka y col, 1998). En los queratinocitos transfectados con IKK γ - Δ N97, observamos además una banda de menor peso molecular, que se corresponde con la versión delecionada de IKK γ (Figura 14).

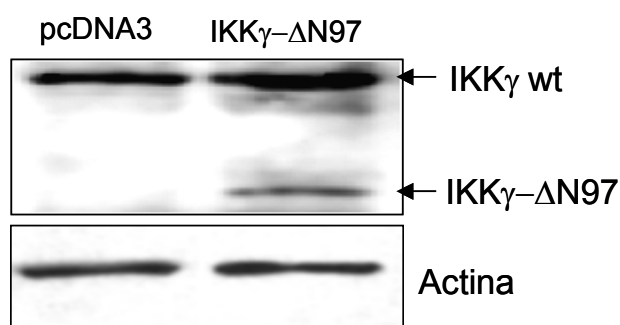


FIGURA 14: Expresión de IKK γ - Δ N97 en queratinocitos PB transfectados establemente. Se aislaron extractos totales de proteína a partir de células PB-pcDNA3 o PB-IKK γ - Δ N97 y se resolvieron 20 μ g en un gel SDS-PAGE al 8%; tras la transferencia a filtros de nitrocelulosa, se determinaron los niveles de IKK γ endógeno (IKK γ -wt) y transfectado (IKK γ - Δ N97) y actina (control de carga) mediante WB utilizando anticuerpos específicos

A continuación, analizamos los niveles de la proteína inhibidora $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en células no tratadas y tratadas con $\text{TNF-}\alpha$. En los queratinocitos control, observamos la degradación inducible de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ tras el tratamiento con la citoquina (Figura 15 comparar los carriles 1 y 2). Sin embargo, en las células que expresaban $\text{IKK}\gamma\text{-}\Delta\text{N97}$, $\text{TNF-}\alpha$ no era capaz de inducir la degradación del inhibidor (Figura 15, comparar los carriles 3 y 4). Las células PB-pcDNA3 y las PB- $\text{IKK}\gamma\text{-}\Delta\text{N97}$ no presentaban variaciones significativas en los niveles totales de p65, determinadas por WB (Figura 15).

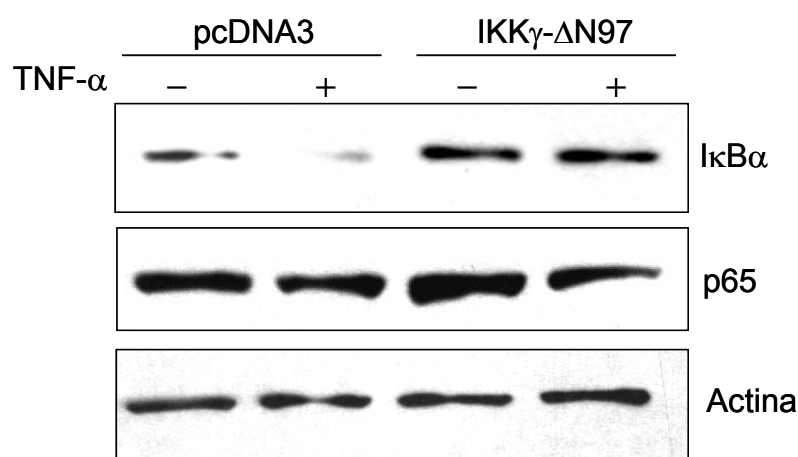


FIGURA 15: $\text{IKK}\gamma\text{-}\Delta\text{N97}$ bloquea la degradación inducible de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en queratinocitos en cultivo. Las células PB-pcDNA3 o PB- $\text{IKK}\gamma\text{-}\Delta\text{N97}$ se trataron con $\text{TNF-}\alpha$ 10ng/ml o se dejaron sin tratar. Los extractos totales de proteína (20 μg) se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 8% y se determinaron los niveles de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, p65 y actina (control de carga) con anticuerpos específicos por WB.

Además de bloquear la degradación inducida de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, la delección N-terminal de $\text{IKK}\gamma$ indujo una acumulación de esta proteína inhibidora en los queratinocitos no tratados, según indican los ensayos de WB (Figura 16, comparar carriles 1 y 3).

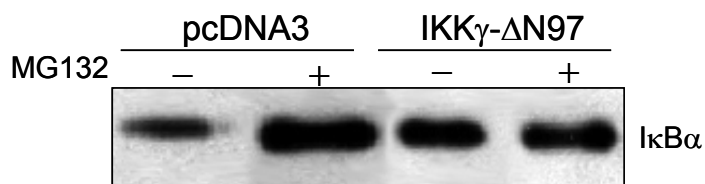


FIGURA 16: $\text{IKK}\gamma\text{-}\Delta\text{N97}$ induce la acumulación del inhibidor $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en queratinocitos en cultivo. Las células PB-pcDNA3 o PB- $\text{IKK}\gamma\text{-}\Delta\text{N97}$ se dejaron sin tratar (-) o se trataron con MG132 25 μM durante 2 h. Los extractos totales de proteína (35 μg) se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 8%, y, tras la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, se determinaron los niveles de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mediante WB con anticuerpos específicos.

El péptido aldehídico MG132 es un potente inhibidor farmacológico del complejo multiproteosoma, que media la degradación de un gran número de proteínas en la célula, entre ellas, I κ B α (Lee y Goldberg, 1998). En los queratinocitos control, el tratamiento con MG132 a una concentración de 25 μ M durante 2 h, producía la acumulación de I κ B α (Figura 16, comparar los carriles 1 y 2). Estos niveles de inhibidor eran equivalentes a los observados en los queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97 en condiciones basales (Figura 16, comparar los carriles 2 y 3). Sin embargo, cuando tratamos también con MG132 las células PB-IKK γ - Δ N97, no observamos un incremento adicional en los niveles de I κ B α con respecto a las mismas células sin tratar (Figura 16, comparar los carriles 3 y 4).

3.3.1. I κ B α se acumula tanto en el citoplasma como en el núcleo de los queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97

I κ B α se encuentra en equilibrio dinámico entre el núcleo y el citoplasma de las células, aunque es en este último compartimento donde se encuentra mayoritariamente (Hayden y Ghosh, 2004). Teniendo en cuenta que en nuestro sistema observamos una acumulación del inhibidor, decidimos estudiar en detalle la localización subcelular del I κ B α (Figura 17). Preparamos extractos fraccionados del citoplasma y núcleo de células PB-pcDNA3 y PB-IKK γ - Δ N97. A continuación analizamos mediante técnicas de WB los niveles del inhibidor I κ B α en estos compartimentos celulares (Figura 17A). En los queratinocitos control, encontramos que la proteína inhibidora se encontraba mayoritariamente en una localización citoplasmática, aunque también se detectaba en el núcleo de estas células (Figura 17A, carril, 1). De igual modo, al examinar los queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97, detectamos una distribución citoplásmico/nuclear de I κ B α similar a la de los queratinocitos control (Figura 17A, carril, 2).

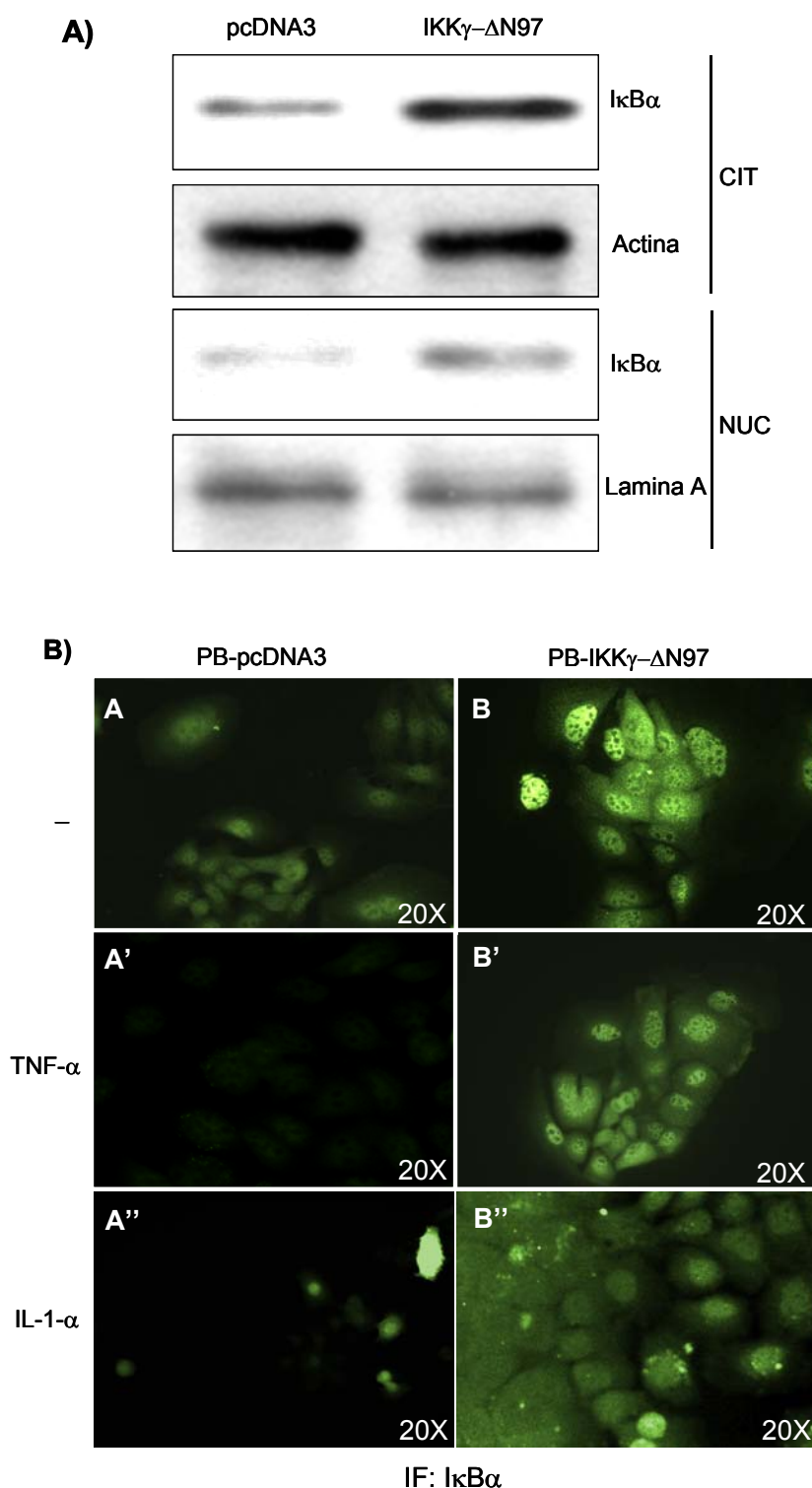


FIGURA 17: IKK γ - Δ N97 induce la acumulación del inhibidor IκB α tanto en el núcleo como en el citoplasma de los queratinocitos PB. A) Se prepararon extractos citoplasmicos (35 μ g) y nucleares (20 μ g) a partir de las células PB-pcDNA3 o PB-IKK γ - Δ N97, que se resolvieron en un gel SDS-PAGE 8%, y se determinaron los niveles de IκB α , actina (control de carga citoplásmica) y lamina A (control de carga nuclear) con anticuerpos específicos por WB. **B)** Las células PB-pcDNA3 o PB-IKK γ - Δ N97 se dejaron crecer hasta la subconfluencia y se mantuvieron sin tratar o se trataron con TNF- α (10ng/ml) durante 30 min, o con IL-1 α (10ng/ml) durante 20 min. Tras su fijación, se tiñeron con anticuerpos específicos frente a IκB α y se observaron y microfotografiaron bajo un microscopio de fluorescencia Leica DM-RXA2 a 20X.

Estos resultados nos indican que el dominante negativo de IKK γ produce una acumulación de I κ B α en queratinocitos PB, tanto en condiciones basales como inducidas por TNF- α . Estudiamos también la distribución subcelular del inhibidor mediante técnicas de inmunofluorescencia (IF), en presencia o ausencia de TNF- α e IL-1 α . Para ello, fijamos las células PB-pcDNA3 y PB-IKK γ - Δ N97, y las incubamos con anticuerpos específicos frente a I κ B α . La IF demostró que las células que expresaban el mutante de delección de IKK γ tenían unos niveles de expresión de I κ B α mayores que las células control (Figura 17B, comparar A y B). Cuando tratamos los queratinocitos PB-pcDNA3 con TNF- α , al igual que con IL-1 α , observamos una disminución en los niveles del inhibidor debida a su degradación inducida por las citoquinas (Figura 17B, comparar A, A' y A''). Sin embargo, en las células PB-IKK γ - Δ N97 tratadas con las citoquinas, los niveles de I κ B α detectados por IF fueron semejantes a los de las células control en ausencia de estímulo (Figura 17B, comparar B' y B'' con A).

3.3.2. La fosforilación y translocación nuclear de p65 está alterada en los queratinocitos que expresan de forma estable IKK γ - Δ N97

p65 se encuentra en equilibrio dinámico entre el núcleo y el citoplasma. En condiciones basales, p65 se sitúa mayoritariamente en el citosol pero su localización es preferentemente nuclear en presencia de efectores de NF- κ B (Hayden y Ghosh, 2004). Estudiamos la localización subcelular de p65 y su fosforilación en el residuo Serina 536 (p65-P-Ser536) inducida por citoquinas proinflamatorias, en queratinocitos control y PB-IKK γ - Δ N97.

En primer lugar, preparamos extractos citoplásmicos y nucleares a partir de células PB-pcDNA3 y PB-IKK γ - Δ N97, en presencia o ausencia de TNF- α , y las analizamos por WB utilizando anticuerpos específicos (Figura 18A). En los queratinocitos control sin estimular, detectamos p65 tanto en el núcleo como en el citoplasma, si bien era en éste último compartimento celular donde se localizaba mayoritariamente. En estas condiciones, apenas apreciamos niveles

detectables de p65-P-Ser536 (Figura 18A, carril 1). Tras el tratamiento con TNF- α , observamos un descenso evidente en la cantidad total de p65 citoplásmico, al mismo tiempo que aumentaba su localización nuclear. Nuestros datos muestran que el aumento en los niveles de p65 nuclear inducido por TNF- α se correlacionaba con un incremento en su fosforilación en la Ser-536 en la fracción nuclear (Figura 18A, carril 2).

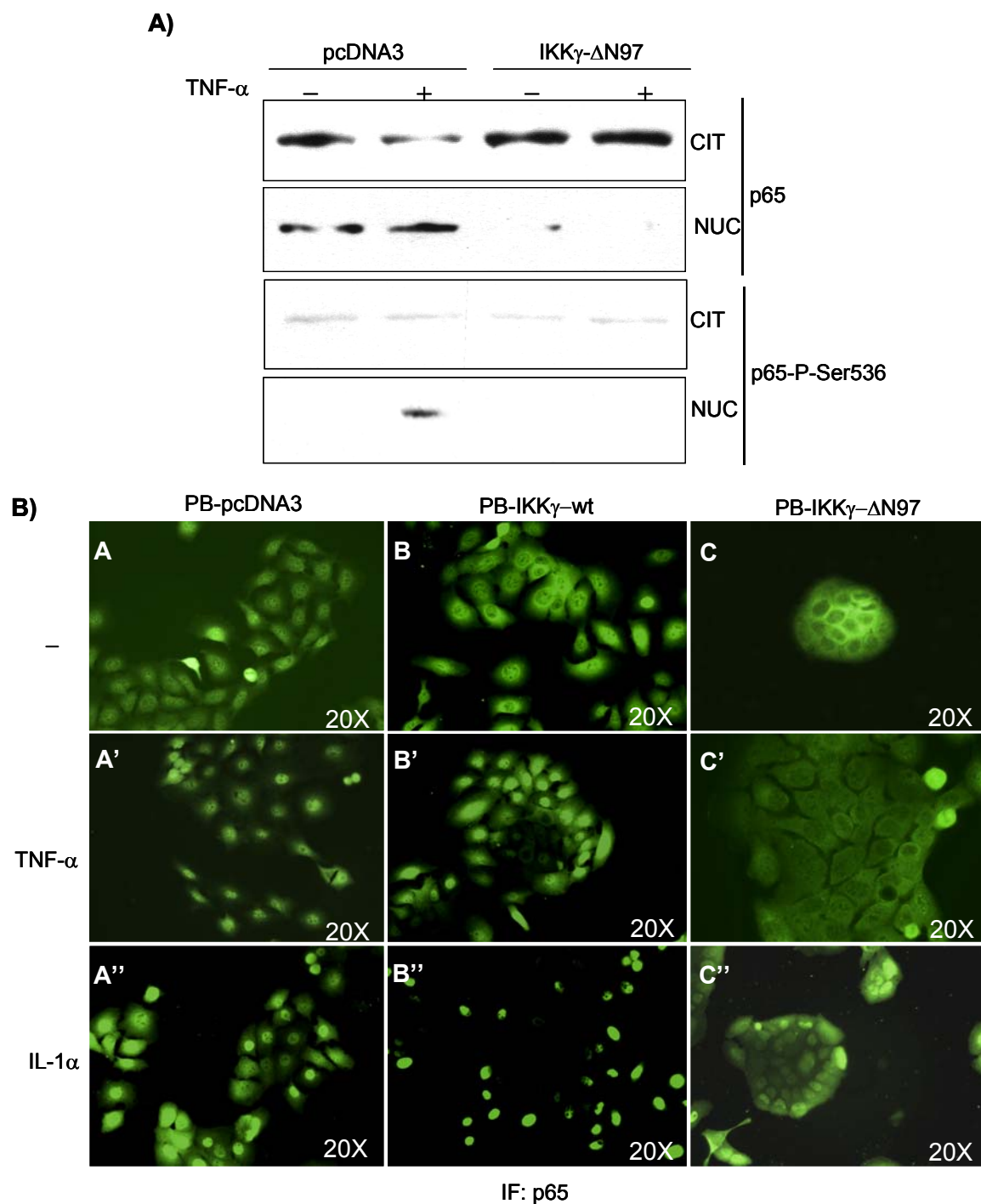


FIGURA 18: IKK γ - Δ N97 inhibe la fosforilación y la translocación nuclear de p65 inducida por TNF- α en queratinocitos en cultivo. A) Las células PB-pcDNA3 y PB-IKK γ - Δ N97, fueron tratadas con TNF- α (10ng/ml) o vehículo durante 30 min. Se prepararon extractos citoplásmicos (35 μ g) y nucleares (20 μ g) de proteína, que se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 8% y se determinaron los niveles de p65 y p65-P-Ser536 con anticuerpos específicos mediante WB. **B)** Las células PB-pcDNA3, PB-IKK γ -wt o PB-IKK γ - Δ N97 se trataron con TNF- α (10ng/ml) durante 30 min, IL-1 α (10 ng/ml), o vehículo durante 20 min. Tras su fijación, las células se tiñeron con anticuerpos específicos frente a p65 y se fotografiaron bajo un microscopio de fluorescencia Leica DM-RXA2 a 20X.

Cuando analizamos los mismos parámetros en los queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97, vimos que, en ausencia de estímulo, y a pesar de mantener unos niveles totales de p65 similares a los controles (Figura 15), la localización de p65 era casi exclusivamente citosólica (Figura 18A, carril 3). No apreciamos cambios en p65-P-Ser536 citosólica con respecto a las células control. Cuando las células PB-IKK γ - Δ N97 se trataron con TNF- α , no observamos translocación nuclear de p65, ni un aumento en su fosforilación (Figura 18A, carril 4).

Como en el caso anterior, también quisimos corroborar estos hallazgos mediante técnicas de IF, en presencia o ausencia de estímulo pro-inflamatorio. En esta ocasión, fijamos las células PB-pcDNA3, PB-IKK γ -wt y PB-IKK γ - Δ N97, tratadas o no con TNF- α o IL-1 α , y tras la incubación con anticuerpos específicos frente a p65, observamos su expresión y distribución subcelular.

En los queratinocitos control, detectamos la proteína p65 distribuida por toda la célula y, tras el tratamiento con TNF- α e IL-1 α , observamos la translocación nuclear de p65 (Figura 18B, comparar A y A'). Sin embargo, en las células PB-IKK γ - Δ N97 y en ausencia de estímulo, p65 se localizaba casi exclusivamente en el citosol (Figura 18B, comparar A y C) y el tratamiento con TNF- α e IL-1 α no fue capaz de inducir la translocación de p65 (Figura 18B, comparar C y C').

En los queratinocitos PB que sobreexpresaban la subunidad IKK γ -wt, detectamos p65 en una localización preferentemente citoplásmica en ausencia de estímulo pro-inflamatorio, mientras que tras el tratamiento con TNF- α , al igual que sucedía con las células control, se redistribuía mayoritariamente hacia el núcleo. En las PB-IKK γ -wt, el tratamiento con IL-1 α resultaba en una localización exclusivamente nuclear de p65 (Figura 18B, comparar B, B' y B'').

Nuestros resultados de WB e IF muestran que el dominante negativo de función de NF- κ B, IKK γ - Δ N97, interfiere con la translocación nuclear de p65,

tanto basal como inducida por TNF- α e IL-1 α , e impide la fosforilación inducible de p65-P-Ser536. La sobreexpresión de IKK γ -wt potencia la localización nuclear de p65 inducida por TNF- α e IL-1 α en queratinocitos PB.

3.3.3. La actividad inducible de unión al ADN de NF- κ B disminuye en las células PB-IKK γ - Δ N97

A continuación, analizamos mediante EMSA los niveles de unión de NF- κ B al ADN, en presencia o ausencia de TNF- α en los queratinocitos PB-pcDNA3 y PB-IKK γ - Δ N97 (Figura 19). Los niveles basales de unión de NF- κ B fueron similares en ambos casos. En las células PB-pcDNA3, el tratamiento con TNF- α inducía un aumento de la actividad de unión de 14 veces con respecto a la tasa basal, mientras que en las células PB-IKK γ - Δ N97, dicho incremento fue de, aproximadamente, 5 veces (Figura 19). Además, utilizamos como control adicional un tratamiento con el péptido *Nemo Binding Peptide* (NBP), el cual se une con alta afinidad a la región amino-terminal de IKK γ , bloqueando su capacidad de unión con las subunidades catalíticas α y β (May y cols., 2000). En las células control pre-incubadas con el péptido NBP y tratadas con TNF- α , observamos una tasa de unión al ADN de, aproximadamente, dos veces con respecto a la tasa de unión basal de NF- κ B (Figura 19). Nuestros datos muestran que IKK γ - Δ N97 inhibe más del 50% la actividad inducible de unión de NF- κ B al ADN en queratinocitos.

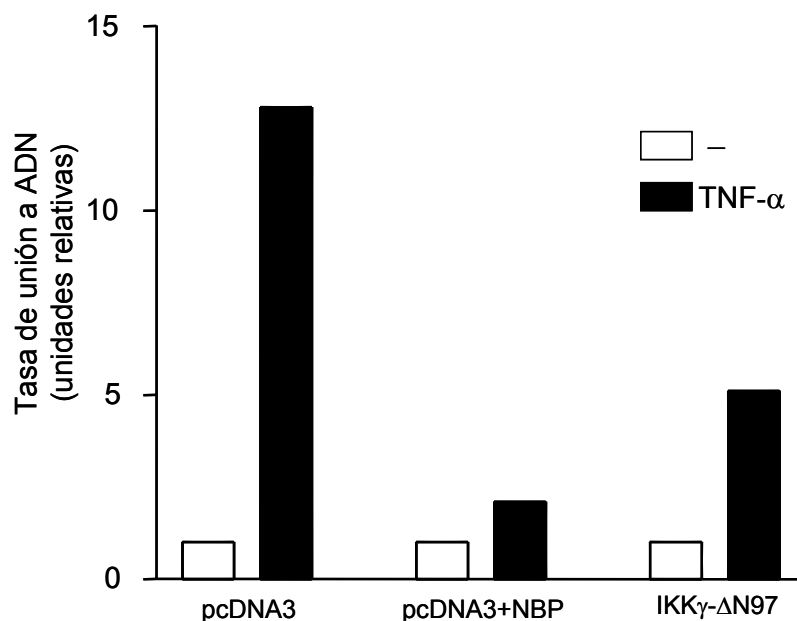


FIGURA 19: IKK γ - Δ N97 inhibe la actividad de unión de NF- κ B al ADN inducida por TNF- α en queratinocitos. Las células PB-pcDNA3 pretratadas o no con NBP (150 μ M) durante 2 h, y las células PB-IKK γ - Δ N97, se trataron o no con TNF- α (10ng/ml) durante 30 min. Los extractos nucleares de proteína (3 μ g) se incubaron con un oligonucleótido κ B marcado radiactivamente, se resolvieron en un gel de acrilamida al 5.5% y posteriormente se autoradiografiaron y cuantificaron. La gráfica muestra la tasa de unión al ADN de los dímeros NF- κ B (unidades relativas) cuantificada con el programa de *software Image Gauge (Fuji Photo Film)* y es representativa de tres experimentos independientes. NBP: *Nemo Binding Peptide*.

3.3.4. Los niveles de las subunidades catalíticas IKK α e IKK β están aumentados en los queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97

A pesar de que se desconoce en detalle la estequiometría del complejo IKK, resulta altamente probable que el hecho de introducir en los queratinocitos, de forma exógena, la versión con la delección N-terminal de IKK γ , pueda conducir a una modificación de los equilibrios del complejo. En primer lugar, estudiamos la expresión de las subunidades catalíticas α y β en extractos totales de las células PB-pcDNA3 y PB-IKK γ - Δ N97, en presencia o ausencia de TNF- α .

Mediante WB, observamos claramente la acumulación de IKK α en los queratinocitos que expresan IKK γ - Δ N97, independientemente del tratamiento (Figura 20, comparar carriles 1 y 2 con 3 y 4). Además, observamos un ligero incremento en los niveles de IKK β en estas células (Figura 20, comparar

carriles 1 y 2 con 3 y 4). En conjunto, estos datos muestran que la expresión de IKK γ - Δ N97 en queratinocitos da lugar a un aumento en los niveles de proteína correspondientes a las subunidades catalíticas IKK α e IKK β .

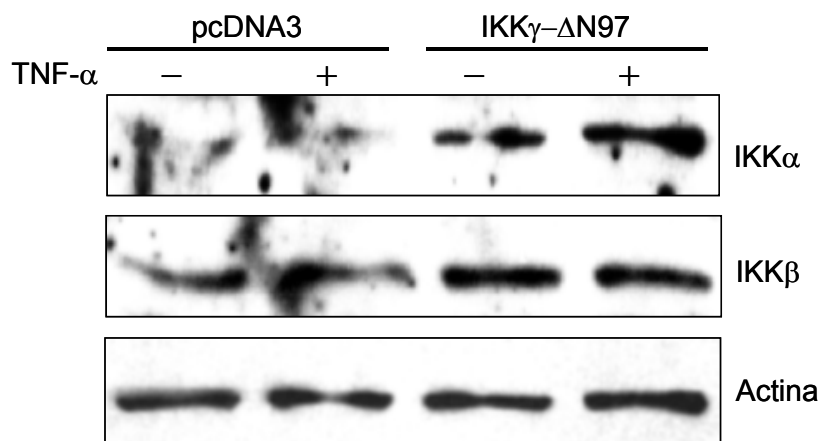


FIGURA 20: IKK γ - Δ N97 induce un aumento en los niveles de IKK α e IKK β en queratinocitos en cultivo. Las células PB-pcDNA3 o PB-IKK γ - Δ N97 se trataron con TNF- α (10ng/ml) durante 30 min. 35 μ g de extractos totales de proteína se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 8%, y se determinaron los niveles de IKK α , IKK β y actina (control de carga) con anticuerpos específicos por WB.

3.3.5. *IKK γ - Δ N97 altera el equilibrio del complejo IKK en queratinocitos PB*

Estudiamos la asociación entre IKK γ y las subunidades catalítica IKK α e IKK β mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) seguidos de WB, en extractos totales de proteína obtenidos a partir de células PB-pcDNA3 y PB-IKK γ - Δ N97. Para estos ensayos, utilizamos anticuerpos frente a IKK γ y examinamos los niveles de IKK β e IKK α en el inmunoprecipitado. Detectamos una pequeña fracción de IKK α e IKK β asociado a IKK γ en los queratinocitos control en ausencia de estímulo, que aumentaba significativamente tras la administración de TNF- α (Figura 21A). Las células PB-IKK γ - Δ N97 presentaron unos mayores niveles de asociación de IKK γ con las subunidades catalíticas en ausencia de estímulo, aunque esta asociación no se incrementaba cuando administrábamos la citoquina (Figura 21A). Determinamos la fracción de IKK β no asociada a IKK γ inmunoprecipitando el sobrenadante de la primera Co-IP

con anticuerpos específicos frente a IKK β , sin encontrar diferencias en los niveles de IKK β libre (Figura 21B). Estos resultados nos sugieren que el incremento de los niveles de IKK α e IKK β en los queratinocitos que expresan IKK γ - Δ N97 (Figura 20) repercute directamente en una mayor asociación con la subunidad reguladora endógena y que el mutante de delección de IKK γ impide el incremento de la formación de complejos IKK tras un estímulo con TNF- α . Según estos datos, IKK γ - Δ N97 interfiere en el equilibrio de formación de los complejos IKK, en presencia y ausencia de estímulo.

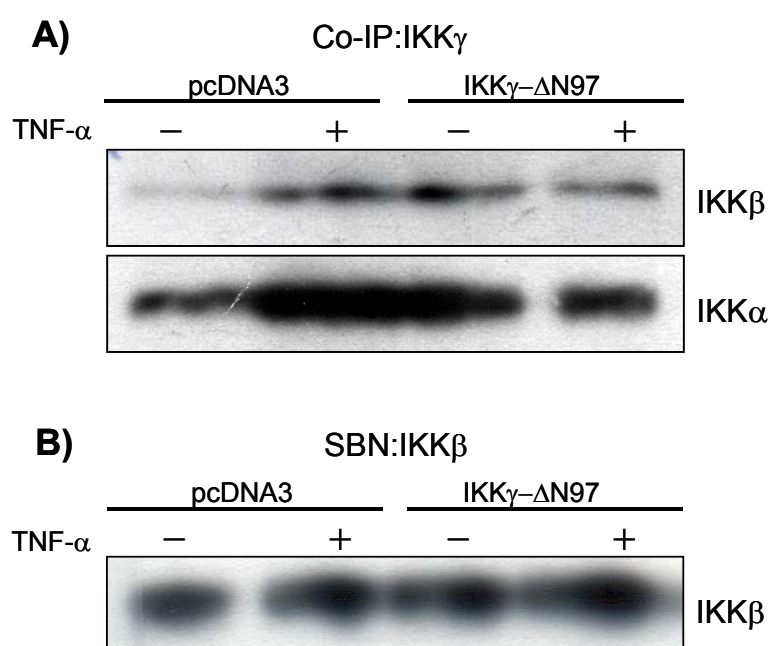


FIGURA 21: IKK γ - Δ N97 altera el equilibrio del complejo IKK en queratinocitos en cultivo.

A) A partir de extractos totales de proteína (100 μ g) de células PB-pcDNA3 y PB-IKK γ - Δ N97, en presencia o ausencia de TNF- α (10ng/ml, 30min), se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación con anticuerpos específicos frente a IKK γ (Co-IP:IKK γ), que se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10%. Determinamos los niveles de IKK α e IKK β asociados a IKK γ mediante WB con anticuerpos específicos. **B)** Determinación de la fracción de IKK β no asociada a IKK γ mediante inmunoprecipitación del sobrenadante de A) utilizando anticuerpos específicos frente a IKK β (SBN:IKK β), seguido de WB.

3.4. Alteraciones en otras vías inducidas por IKK γ - Δ N97 en queratinocitos

Teniendo en cuenta que el bloqueo de la vía NF- κ B utilizando la estrategia del dominante negativo de función IKK γ - Δ N97, produce una inducción considerable de la apoptosis en queratinocitos, decidimos estudiar si otras vías de señalización cruciales en este proceso estaban alteradas en nuestro sistema.

3.4.1. La tasa de fosforilación en la Serina 473 de Akt/PKB se encuentra disminuída en los queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97

La vía de señalización de PI3K/Akt está implicada en proliferación y supervivencia celular (Datta y cols., 1999) y se ha demostrado que tiene un papel esencial en la progresión tumoral en piel de ratón (Segrelles y cols., 2002). Dado que NF- κ B puede inducir tanto la expresión como la fosforilación de Akt en varios tipos celulares (Meng y D'Mello, 2003), decidimos estudiar los niveles de expresión y fosforilación de Akt en los queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97 por WB. Para ello empleamos extractos citoplásmicos y nucleares de células PB-pcDNA3 y PB-IKK γ - Δ N97 sin tratar, o tratadas con TNF- α (Figura 22).

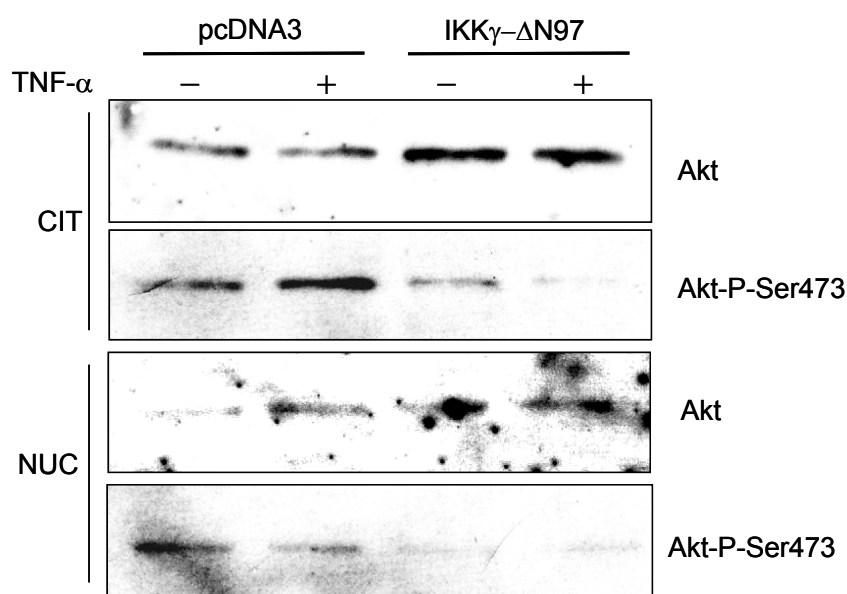


FIGURA 22: IKK γ - Δ N97 induce un aumento en los niveles totales de Akt pero reduce los niveles de fosforilación de Akt-P-Ser473 en queratinocitos en cultivo. Las células PB-pcDNA3 o PB-IKK γ - Δ N97 fueron tratadas con TNF- α (10ng/ml) durante 30 min. Los extractos de proteína citoplásmicos (35 μ g) y nucleares (20 μ g) se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 8%, y se determinaron los niveles de Akt y Akt fosforilada en el residuo serina 473 (Akt-P-Ser473) por WB con anticuerpos específicos.

En las células control, encontramos un aumento en la fosforilación de Akt en el residuo serina 473 (Akt-P-Ser473) tras el tratamiento con la citoquina (Figura 22, comparar carriles 1 y 2). Sorprendentemente, en las células que expresan la forma truncada de IKK γ encontramos un ligero aumento en los niveles totales de la quinasa Akt con respecto a los controles (Figura 22, carriles 1 y 2 frente a 3 y 4). No obstante, al comprobar su estado de fosforilación, observamos un descenso drástico en los niveles de Akt-P-Ser473, tanto en la fracción citoplásmica como en la nuclear (Figura 22, carriles 1 y 2 frente a 3 y 4). Así, la inhibición de NF- κ B mediante el dominante negativo de función IKK γ - Δ N97, induce un descenso importante en los niveles de fosforilación de Akt en queratinocitos.

3.4.2. La proteína supresora de tumores PTEN presenta niveles elevados en los queratinocitos PB- IKK γ - Δ N97

Recientemente se ha descrito que existe una regulación, compleja y mutua, entre p65 y PTEN, una proteína fosfatasa que actúa en oposición a

PI3K, defosforilando el fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP₃), un mensajero intracelular esencial para la activación de Akt (Vasudevan y cols., 2004). Teniendo en cuenta que la expresión de IKK γ - Δ N97 en queratinocitos inhibe la fosforilación de Akt, a la vez que promueve el proceso de apoptosis, decidimos estudiar la expresión y localización de PTEN en nuestro sistema.

Comprobamos los niveles de PTEN mediante ensayos de WB con anticuerpos específicos, utilizando extractos citoplásmicos y nucleares extraídos de células PB-pcDNA3 y PB-IKK γ - Δ N97 (Figura 23). Nuestros datos muestran que los niveles de PTEN estaban aumentados en las células que expresaban el dominante negativo de NEMO/IKK γ , tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figura 23), indicando que la inhibición de NF- κ B en queratinocitos PB induce un aumento en los niveles totales de la fosfatasa PTEN.

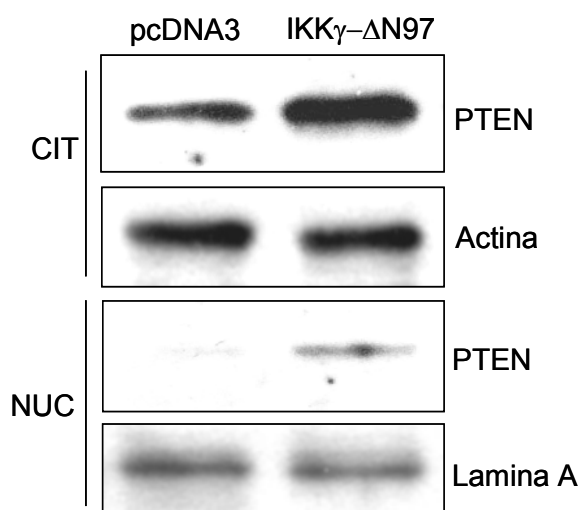


FIGURA 23: IKK γ - Δ N97 induce un aumento en los niveles de PTEN en queratinocitos PB en cultivo. Analizamos extractos citoplásmicos (35 μ g) y nucleares (20 μ g) obtenidos a partir de células PB-pcDNA3 o PB-IKK γ - Δ N97. Los extractos se resolvieron en un gel SDS-PAGE 8% y se determinaron los niveles de PTEN, actina (control de carga citoplásmica) y lamina A (control de carga nuclear) por WB con anticuerpos específicos.

4. Generación y ensayo funcional del plásmido K5-HA-IKK γ - Δ N97

Nuestros resultados anteriores indican que la versión truncada de NEMO IKK γ - Δ N97 actúa como un dominante negativo de función NF- κ B en queratinocitos. Con objeto de investigar las implicaciones de la pérdida de función parcial de NF- κ B en la piel en un modelo *in vivo*, abordamos la generación de un modelo animal que expresa IKK γ - Δ N97 en piel de ratón mediante el uso de secuencias reguladoras de la queratina K5. Se ha demostrado que dichas secuencias reguladoras dirigen la expresión de genes heterólogos a las células basales de la epidermis y otros epitelios estratificados (Ramírez y cols., 1994).

Para ello, y a partir del plásmido pCMV-HA-IKK γ - Δ N97 (Döffinger y cols., 2001), subclonamos la secuencia HA-IKK γ - Δ N97, que codifica para una versión truncada del gen *nemo* de ratón (aa 97-412), en un vector de expresión pBSK-bK5, que contiene 5.2 Kb del promotor de la queratina 5 bovina. Esta construcción se denomina K5-HA-IKK γ - Δ N97 (Figura 24A). En primer lugar, para comprobar la funcionalidad del transgén, realizamos ensayos de co-transfección transitoria en la línea celular de queratinocitos 3PC, utilizando distintos vectores de expresión que codifican para IKK γ -wt e IKK γ - Δ N97, junto con un plásmido “reportador” de la actividad CAT bajo el control de un tándem de secuencias repetidas κ B (8x κ B-CAT). La transfección con IKK γ -wt indujo la transactivación del plásmido “reportador” κ B-CAT (5.3 veces), mientras que con IKK γ - Δ N97 no se modificó significativamente (1.2 veces) la actividad κ B-CAT basal (Figura 24B). Sin embargo, la co-transfección de IKK γ - Δ N97 junto con IKK γ -wt, bloqueó la actividad CAT inducida por la sobreexpresión de la subunidad wt (Figura 24B) indicando que, también en queratinocitos 3PC y regulado por el promotor de K5, IKK γ - Δ N97 actúa como un dominante negativo de función IKK/NF- κ B.

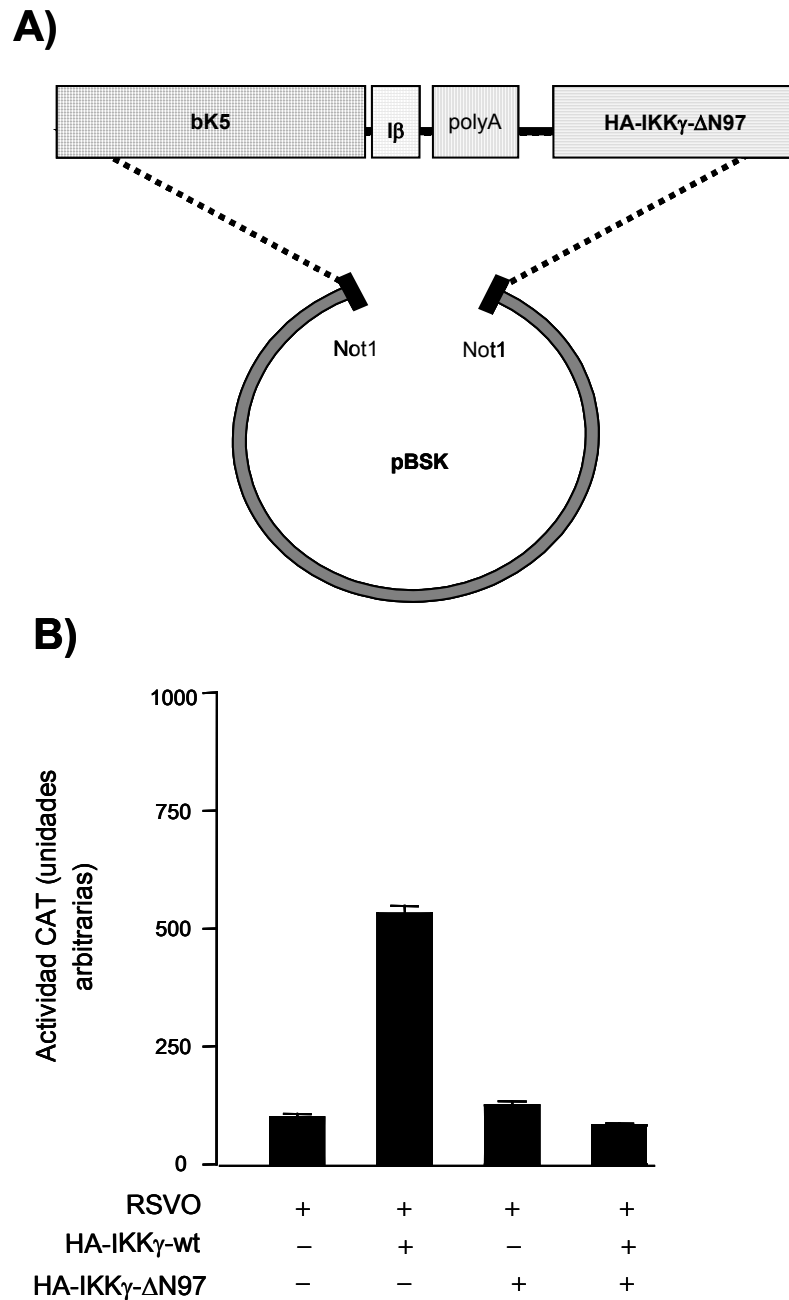


FIGURA 24: A) Esquema del plásmido K5-HA-IKK γ - Δ N97. bK5: promotor de la queratina 5 bovina. I β : intrón de la β -globina. PolyA: señal de poliadenilación de SV40. Not1: sitios de corte para la enzima de restricción Not1. **B) Ensayo funcional del plásmido K5-HA-IKK γ - Δ N97.** La línea celular de queratinocitos no transformados de ratón 3PC se transfectó con lipofectamina durante 6h, utilizando el plásmido “reportador” κ B-CAT (5 μ g) junto con los plásmidos indicados, hasta una cantidad final de 15 μ g ADN/transfección. 1) RSV0 (10 μ g), K5-HA-IKK γ -wt (10 μ g), K5-HA-IKK γ - Δ N97 (10 μ g), K5-HA-IKK γ -wt+K5-HA-IKK γ - Δ N97 (5 μ g/cada). Se prepararon extractos totales de proteína y se determinó la actividad CAT en 100 μ g de los extractos según el protocolo ELISA-CAT de Roche. La actividad CAT se expresa en unidades arbitrarias relativas a la actividad basal κ B-CAT.

5. Generación de los ratones transgénicos K5-IKK γ - Δ N97

El fragmento para la microinyección se preparó a partir del plásmido K5-HA-IKK γ - Δ N97, mediante digestión con Not1, obteniéndose el fragmento linearizado de aprox 9.7 Kb y el vector de aprox. 2.9 Kb (Figura 25). El fragmento para la microinyección contiene el promotor K5 (5.2 Kb), secuencias intrónicas del gen la β -globina (0.5 Kb), HA-IKK γ - Δ N97 (2.8 Kb) y secuencias de poliadenilación de SV40 (1.2 Kb). Realizamos varias rondas de microinyección con K5-HA-IKK γ - Δ N97 a una concentración de 2 ng/ μ l en embriones de ratones (C57BL/6J x DBA/2J) F1, siguiendo el protocolo de Hogan y colaboradores (1994). Tras la implantación de los embriones microinyectados en las hembras receptoras, obtuvimos 153 animales.

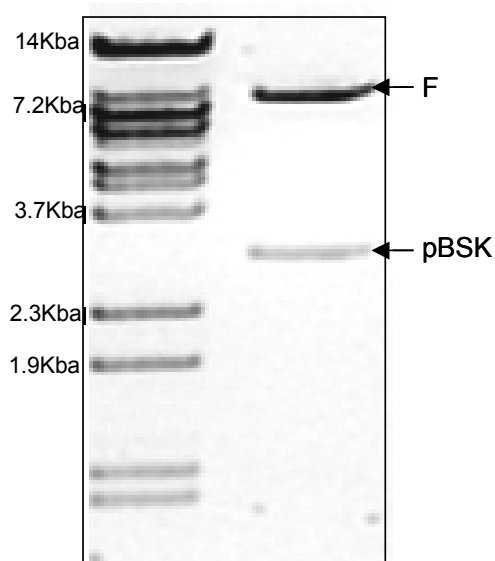


FIGURA 25: Digestión del plásmido K5-HA-IKK γ - Δ N97 con Not1 para la obtención del fragmento de microinyección. Digestión del plásmido con Not1, donde podemos apreciar una banda de 2.9Kba, correspondiente al vector pBSK linearizado, y otra de 9.7Kba, correspondiente al fragmento de microinyección (F).

El genotipado de los ratones generados se realizó mediante técnicas de PCR a partir de ADN extraído de la cola, amplificando un fragmento de 420 pb, tan solo detectable en los ratones transgénicos (Figura 26A). Como control adicional, realizamos la reacción de PCR a partir del fragmento de microinyección, obteniendo un producto de PCR de 420 pb, idéntico al

obtenido a partir del ADN genómico de los ratones transgénicos (Figura 26A, carril 4). De este modo identificamos 7 ratones transgénicos “fundadores” K5-IKK γ - Δ N97 resultantes de distintas tandas de microinyección, es decir, que habían integrado el transgén en su genoma (nº 95, 107, 112, 113, 118, 136 y 146). De estos 7 “fundadores”, 5 transmitieron el transgén a su descendencia, habiendo obtenido por tanto, 5 líneas transgénicas independientes K5-IKK γ - Δ N97 (nº 95, 107, 112, 113 y 136). Como control adicional amplificamos un fragmento de 380 pb del gen de la tirotropina (TSH; Figura 26B), detectable en todos los animales.

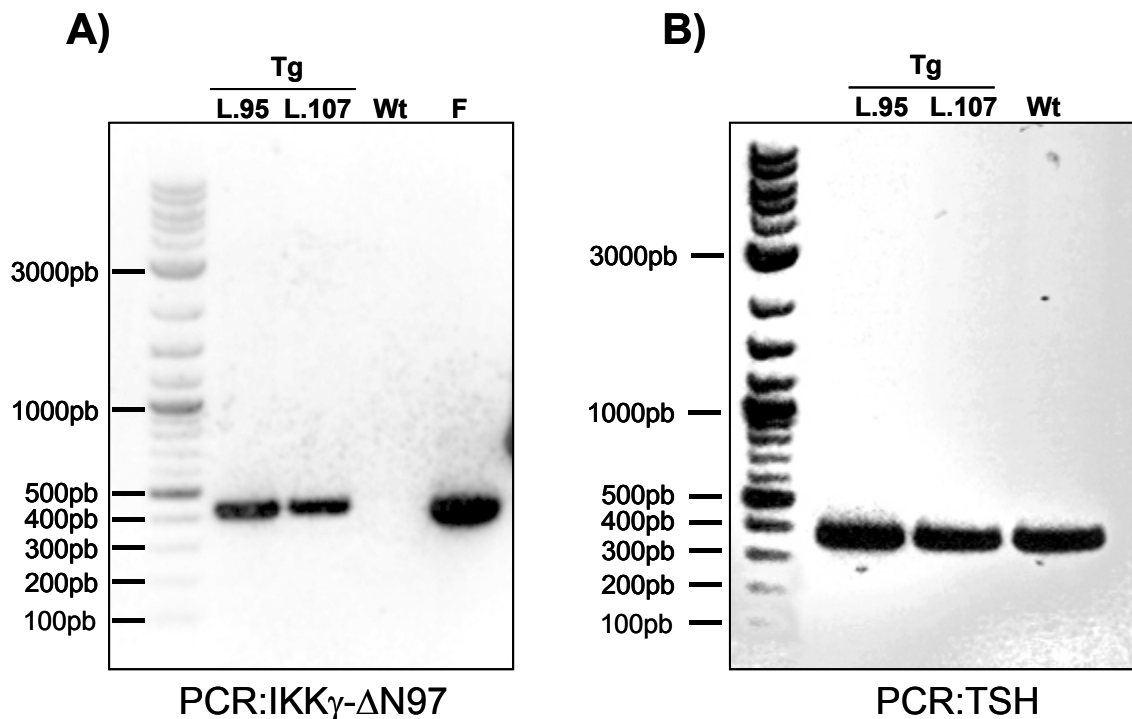


FIGURA 26: Detección del transgén por PCR: A partir de los ratones nacidos como resultado de la microinyección, realizamos una biopsia de cola y extrajimos ADN genómico para identificar: **A)** En los ratones transgénicos (Tg, nº 95 y 107) la reacción de PCR amplifica un producto de 420 pb, que no se detecta en los ratones no transgénicos (Wt). Como control adicional, presentamos el resultado de PCR a partir del fragmento de microinyección (F), que amplifica un producto idéntico al de los ratones. **B)** En todos los animales, la reacción de PCR amplifica un fragmento de 380 pb correspondiente al gen endógeno de la tirotropina (TSH) Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 1.5% conteniendo bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz UV.

6. Análisis de los ratones transgénicos K5-IKK γ - Δ N97

6.1. Análisis de la expresión de IKK γ - Δ N97 en las líneas transgénicas generadas

Estudiamos, en primer lugar, los niveles de expresión del transgén en las distintas líneas de ratones transgénicos generadas. Para ello, preparamos extractos totales de proteína de piel de ratones adultos (8 semanas), tanto transgénicos como no transgénicos, que analizamos mediante técnicas de WB utilizando anticuerpos específicos. En todos los casos, detectamos una banda de 48 Kda que correspondía a IKK γ endógeno (Figura 27, carriles 1-4). En las líneas transgénicas detectamos una banda de menor peso molecular que se correspondía con el tamaño esperado para el mutante de delección IKK γ - Δ N97 (Figura 27, carriles 1-3). Adicionalmente, utilizamos un anticuerpo frente al epítipo HA, presente exclusivamente en los transgénicos; los ensayos de WB mostraron la presencia de HA en las líneas transgénicas. Atendiendo a estos niveles de expresión de HA, clasificamos las líneas transgénicas en líneas de baja expresión (L95), expresión media (L112), y alta expresión (L113) (Figura 27, carriles 1-3).

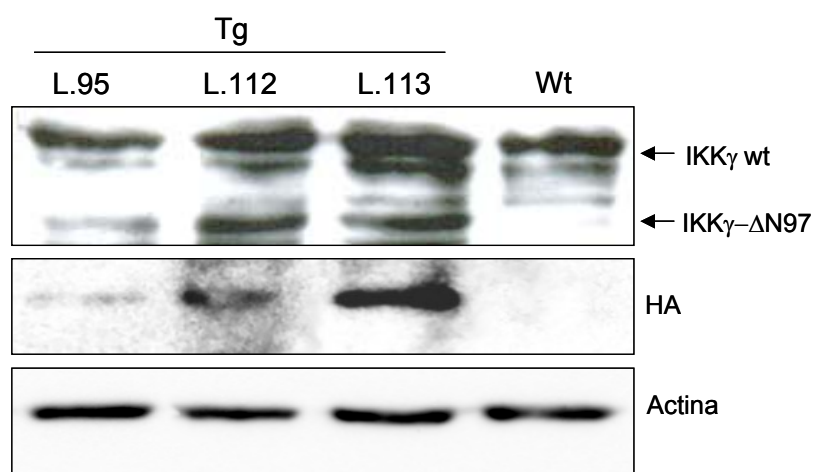


FIGURA 27: Expresión del transgén HA-IKK γ - Δ N97 en piel dorsal de las líneas transgénicas K5-HA-IKK γ - Δ N97. Preparamos extractos totales de proteína a partir de piel de lomo de ratones de 8 semanas, control (Wt) y transgénicos de las distintas líneas (L.95, L.112 y L.113). Los extractos (50 μ g) se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 8% y analizamos la expresión de IKK γ endógeno (IKK γ -wt), transgén (IKK γ - Δ N97), HA y Actina (control de carga) mediante técnicas de WB utilizando anticuerpos específicos.

Nuestros resultados en queratinocitos PB indican que la relación entre la cantidad de proteína IKK γ endógena y de la forma deleccionada, puede regir en gran medida los efectos de dominancia negativa de IKK γ - Δ N97. En el trabajo que presentamos a continuación, hemos centrado nuestro esfuerzo en la caracterización de dos de las líneas transgénicas que demostraron niveles altos (L.113) y bajos (L.95) de expresión del transgén, respectivamente, denominaciones que se realizan en términos relativos.

6.2. Estudio histopatológico

Para estudiar los posibles efectos de la expresión de IKK γ - Δ N97 en la homeostasis y desarrollo epidérmico *in vivo*, estudiamos por técnicas histológicas la piel de los ratones transgénicos de las líneas 95, 112 y 113 en individuos recién nacidos (P0, n=38) y adultos (6 meses, n=12). La tinción de las muestras con hematoxilina y eosina reveló que los ratones tg K5-IKK γ - Δ N97 tenían un retraso notable en la foliculogénesis a día P0, ya que en los animales wt, los folículos se encontraban mayoritariamente en fase 4-6 de desarrollo folicular según Davidson y Hardy (1952), mientras que en los tg encontramos animales con los folículos pilosos en fase 1, 2, ó 3 (Figura 28A, flechas). Además, en los transgénicos P0 encontramos focos de piel en los cuales se asocia hipergranulosis con gránulos de queratohialina muy gruesos e hiperqueratosis (Figura 28A, asterisco).

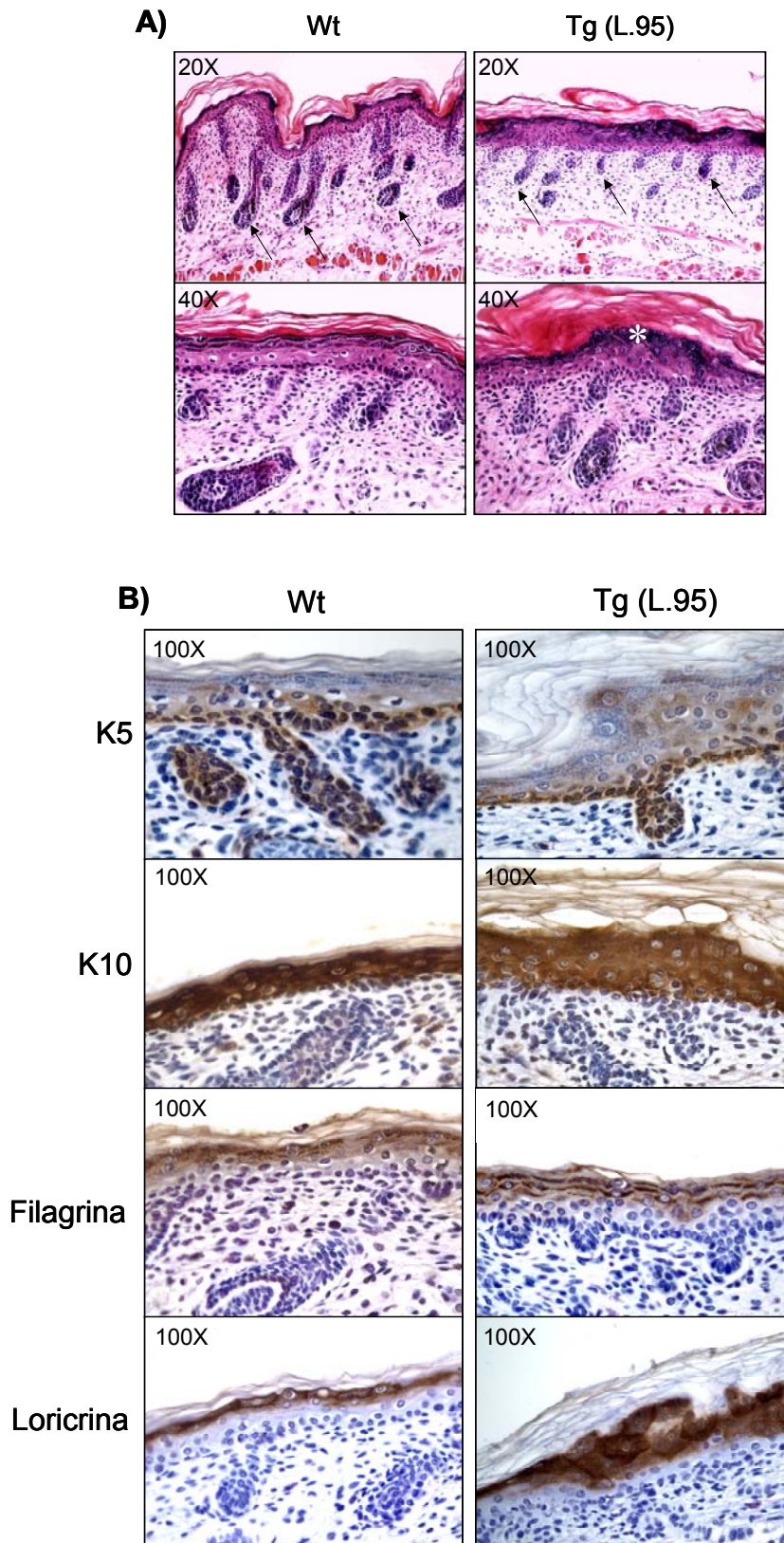


FIGURA 28: Tinción con hematoxilina/eosina y marcadores de diferenciación de piel de lomo de ratones transgénicos K5-IKK γ - Δ N97 (Tg, L95) y wild-type (wt) recién nacidos (n=38). Recogimos piel de lomo de animales a día P0 y tras ser fijadas en etanol al 70% e incluidas en parafina, realizamos **A)** tinciones con Hematoxilina y Eosina; **B)** inmunomarcaje con anticuerpos específicos frente a K5, K10, Filaggrina y Loricrina. Posteriormente se microfotografiaron en un microscopio Leica DM RXA2 a 20X, 40X y 100X.

Estudiamos el proceso de diferenciación epidérmica mediante técnicas inmunohistoquímicas en ratones P0 (Figura 28B,). No encontramos cambios en los patrones de expresión de las queratinas K5 (específica de la capa proliferativa) y K10 (capas suprabasales), ni de los marcadores de diferenciación terminal (filagrina y loricrina). No obstante, observamos un incremento en la expresión de K10 y loricrina asociado a los focos de hipergranulosis e hiperqueratosis de la epidermis de los animales transgénicos (Figura 28B). También hemos comprobado que el aumento de los niveles de loricrina es detectable mediante WB en extractos de piel procedentes de los ratones tg P0 (no mostrado). En conjunto, estos datos nos informan que IKK γ - Δ N97 produce alteraciones focales de la diferenciación epidérmica y un claro retraso en la morfogénesis folicular en ratones.

Cuando estudiamos la piel de los animales IKK γ - Δ N97 adultos (6 meses, n=12) observamos vesículas y fisuras de acantolisis basal (Figura 29A, flechas) y suprabasal, con la presencia en su interior de queratinocitos libres no unidos por desmosomas al resto del epitelio (acantocitos; Figura 29A, asterisco). Es importante señalar que se han descrito alteraciones en las uniones intercelulares y, en concreto, en las uniones desmosomales, tanto en ratones deficientes en IKK γ como en pacientes afectados por IP (Schmidt-Supprian, 2000). Teniendo en cuenta la relevancia de la actividad de NF- κ B en la inflamación epidérmica, analizamos la capacidad de respuesta de estos animales ante un estímulo pro-inflamatorio como el éster de forbol TPA. Aplicamos tópicamente TPA (12 μ g) en el lomo de ratones no transgénicos y transgénicos K5-IKK γ - Δ N97 y 48 h después, tomamos muestras de piel y las analizamos por técnicas histológicas. En los animales wt, el tratamiento produjo una marcada hiperplasia epidérmica, como reflejan las 5-6 capas celulares observadas en contraste con las 2-3 capas de la piel de adulto no transgénico sin tratar (Figura 29B, asterisco). En estos animales wt también encontramos asociados a la hiperproliferación pequeños focos inflamatorios tras la administración del TPA (no mostrado). Sin embargo, en los ratones que expresan la forma truncada de IKK γ observamos una inflamación severa,

asociada a folículos pilosos y plexo vascular de la dermis superficial (Figura 29B, flechas) con pequeños focos de hiperplasia no asociada a inflamación (no mostrado).

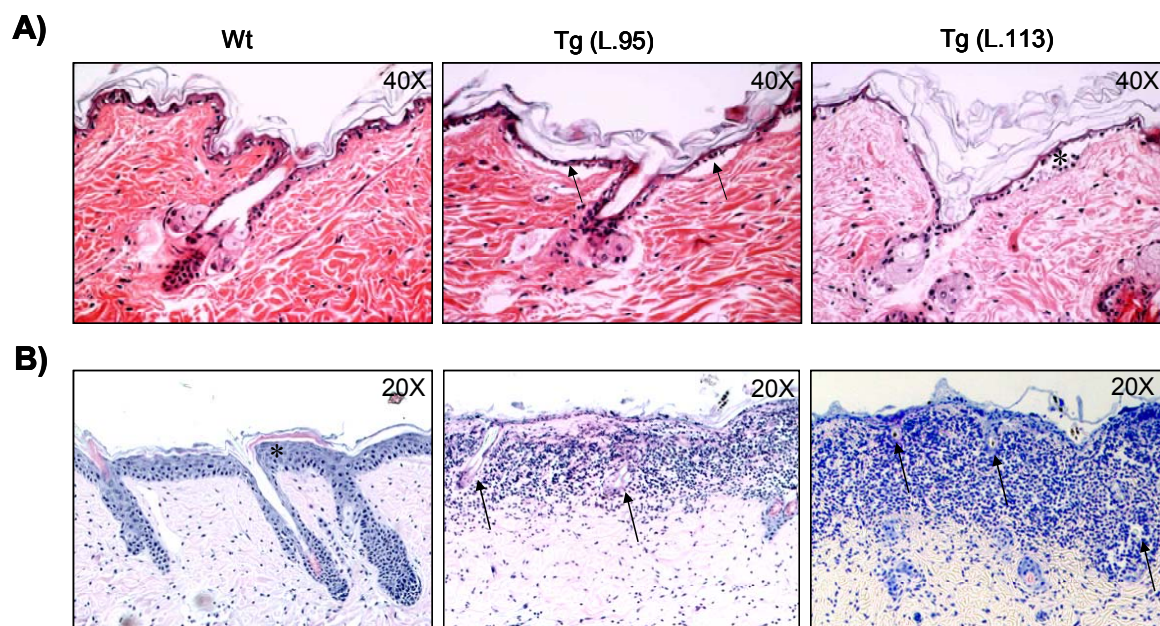


FIGURA 29: Tinción hematoxilina/eosina de piel de lomo de ratones transgénicos K5- $IKK\gamma$ - $\Delta N97$ (Tg, L95 y L113) y wild-type (wt) adultos (n=12). A) Recogimos piel de lomo de animales adultos (6 meses) y tras ser fijadas en etanol al 70% e incluidas en parafina, realizamos tinciones con Hematoxilina y Eosina. Posteriormente se microfotografiaron en un microscopio Leica DM RXA2 a 40X (Flechas: zonas de acantolisis; asterisco: acantocitos); B) Recogimos piel de lomo de animales adultos (6 meses) tratados durante 48h con TPA y tras ser fijadas en etanol al 70% e incluidas en parafina, realizamos tinciones con Hematoxilina y Eosina (Flechas: focos de inflamación asociados a folículos pilosos y plexo vascular; asterisco: hiperproliferación) Posteriormente se microfotografiaron en un microscopio Leica DM RXA2 a 20X.

Conviene subrayar que durante la primera fase de la IP se observan numerosos focos de lesión que contienen infiltrados inflamatorios en la epidermis, consistentes en su mayoría en granulocitos (Schmidt-Supprian, 2000). En conjunto, estos resultados, nos indican que la expresión de la versión dominante negativa de NEMO/ $IKK\gamma$ en piel de ratón causa un retraso en el proceso de morfogénesis folicular, altera la diferenciación epidérmica de manera focal y, como respuesta al TPA, produce una de-regulación del proceso inflamatorio cutáneo.

7. Los queratinocitos primarios de ratones transgénicos K5-IKK γ - Δ N97 presentan defectos en la activación de NF- κ B

Para comprobar si el efecto de dominancia negativa observada con los queratinocitos PB en cultivo, también tenía lugar *ex vivo*, aislamos y cultivamos queratinocitos primarios de ratones transgénicos K5-IKK γ - Δ N97.

Los queratinocitos procedentes de los animales de la línea 113, al igual que los queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97, presentaron una cinética de crecimiento más lenta que las células control y las de la línea 95 (no mostrado) y, un gran número de ellas, no lograban adherirse a la placa de cultivo. Además, la morfología de estas células estaba alterada. Muchas presentaban signos de apoptosis (Figura 30, flechas) mientras que otras tenían una apariencia de escamas (Figura 30, puntas de flecha), con pérdida del núcleo y aplanamiento. Entre 24-48 h después de su siembra, estas células se desprendían de la superficie de cultivo y morían, dejando el medio lleno de restos celulares (Figura 30, asterisco)

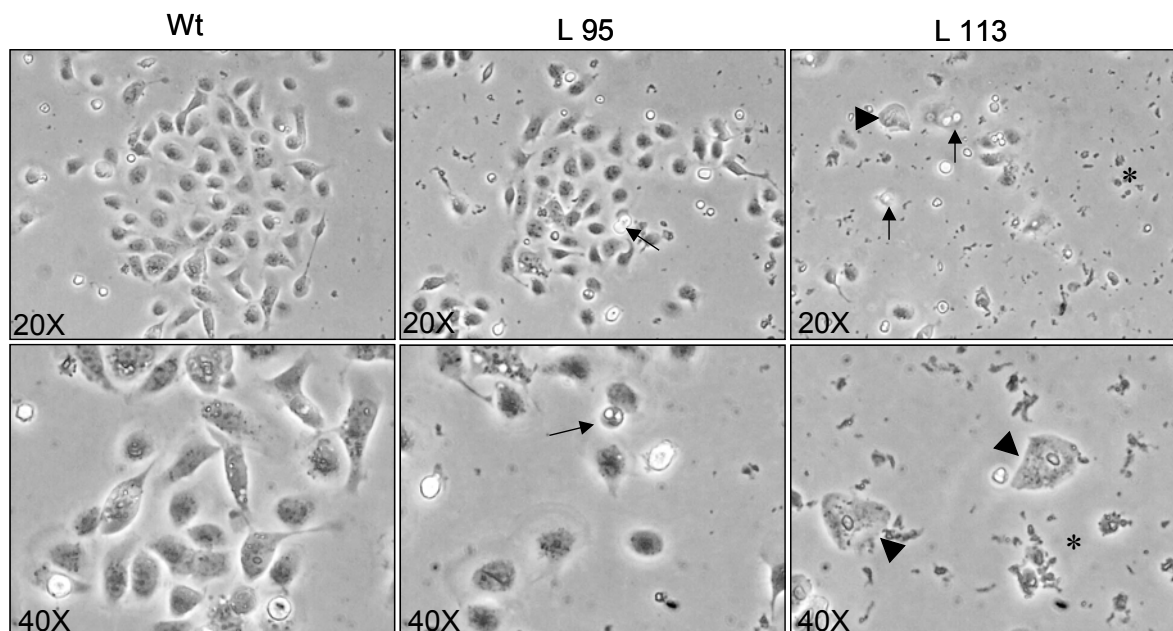


FIGURA 30: Cambios morfológicos inducidos por IKK γ - Δ N97 en queratinocitos primarios. Aislamos queratinocitos primarios de ratones wt y transgénicos K5-IKK γ - Δ N97 (L95 y L113). Las células se sembraron y microfotografiaron a 20X 36 h después, utilizando un microscopio de contraste de fases Zeiss Axiovert 25.

Comprobamos la expresión del transgén en los queratinocitos primarios en cultivo, a partir de extractos totales de proteína y utilizando anticuerpos específicos. Los ensayos de WB mostraron la expresión de IKK γ endógeno, (IKK γ -wt), en los queratinocitos aislados de ratones transgénicos y no transgénicos, y de IKK γ transgén (IKK γ - Δ N97) exclusivamente en los ratones transgénicos (Figura 31). Es importante señalar que los niveles del transgén resultaron claramente más elevados en queratinocitos primarios que en la piel completa (Figura 27), debido a que partimos de la población celular específica que expresa el transgén y evitamos el efecto dilución de la dermis y de los estratos suprabasales epidérmicos. Adicionalmente, comprobamos la expresión del transgén mediante la detección del epítipo HA mediante WB utilizando anticuerpos específicos. (Figura 31, carriles 4-9).

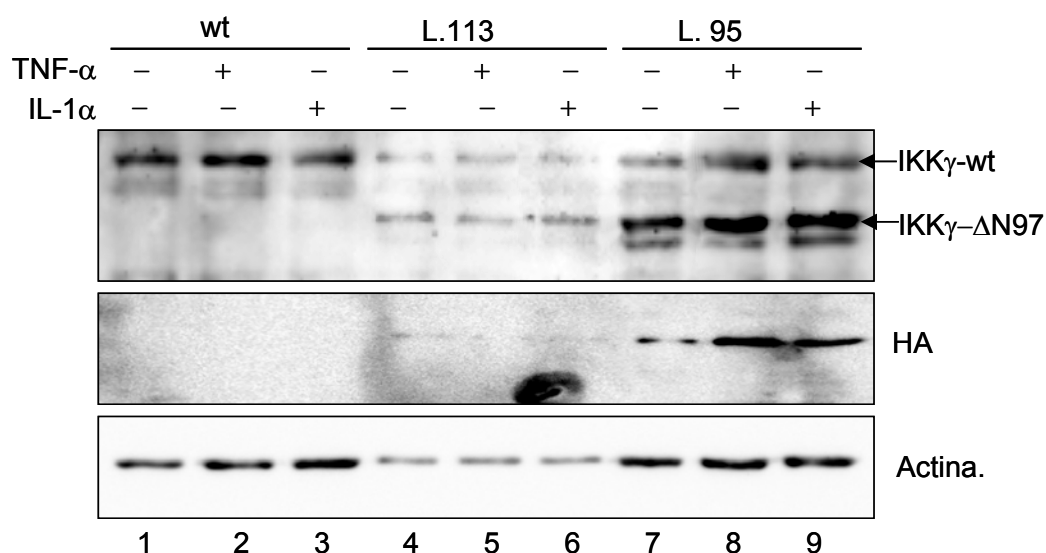


FIGURA 31: Expresión de IKK γ -wt e IKK γ - Δ N97 en queratinocitos primarios de ratones transgénicos K5-HA-IKK γ - Δ N97. Aislamos queratinocitos primarios a partir de ratones wt y transgénicos K5-HA-IKK γ - Δ N97 que se cultivaron hasta alcanzar subconfluencia. Los queratinocitos se trataron con TNF- α (10ng/ml) durante 30 min, IL-1 α (10ng/ml) durante 20 min o con vehículo. Se prepararon extractos totales de proteína y se determinó la expresión de IKK γ , HA y actina (control de carga) mediante WB utilizando anticuerpos específicos.

A continuación, evaluamos la actividad de unión de NF- κ B al ADN, basal e inducida, en los queratinocitos primarios procedentes de animales control y transgénicos de las líneas 95 y 113. Para ello, tratamos los queratinocitos primarios con las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 α , aislamos extractos totales de proteína y realizamos ensayos de EMSA utilizando un

oligonucleótido κ B marcado radiactivamente (Figura 32). En los queratinocitos control, tras el tratamiento con $\text{TNF-}\alpha$, observamos una inducción en la actividad de unión al ADN de NF- κ B de 1.7 veces, mientras que con el tratamiento con $\text{IL-1}\alpha$ dicha actividad aumentó 3 veces (Figura 32). En contraste, los queratinocitos procedentes de ratones transgénicos de la línea 113 no mostraron actividad de unión NF- κ B-ADN inducible, como resultado del tratamiento con ninguna de las citoquinas (Figura 32).

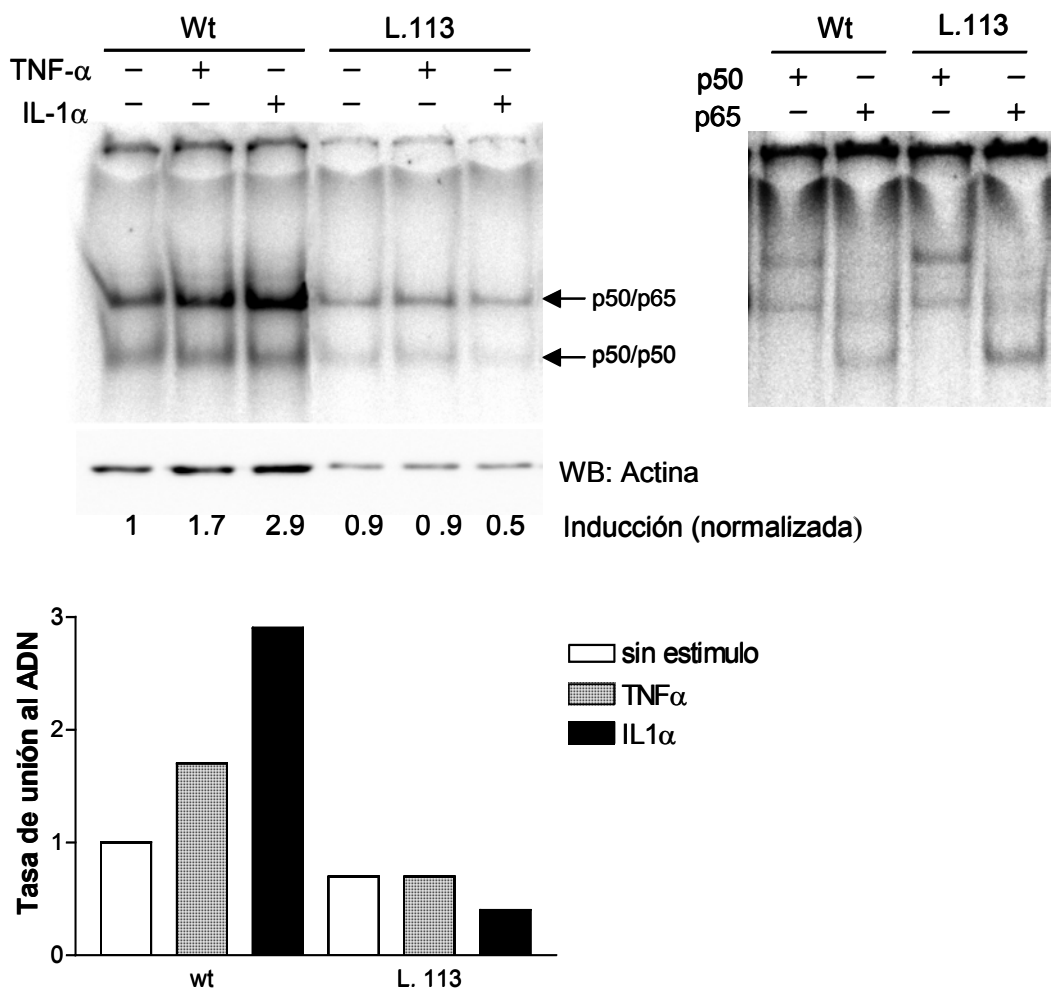


Figura 32: IKK γ - Δ N97 reduce los niveles de unión de NF- κ B al ADN inducidos por $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\alpha$. Aislamos queratinocitos primarios de ratones wt y transgénicos K5-IKK γ DN97 (L113) y se trataron con $\text{TNF-}\alpha$ (10ng/ml) durante 30 min, $\text{IL-1}\alpha$ (10ng/ml) durante 20 min o con vehículo. Se realizaron ensayos de retardo de movilidad (EMSA), utilizando extractos totales de proteína y un oligonucleótido marcado radiactivamente que contiene una secuencia palindrómica κ B. Como control de carga, realizamos WB con los mismos extractos e hibridamos los filtros con actina, normalizando la inducción de la actividad de unión κ B que se expresa relativa a la actividad basal del wt sin tratar. La gráfica muestra la tasa de unión al ADN de los dímeros NF- κ B (unidades relativas) cuantificada con el programa de *software Image Gauge (Fuji Photo Film)* y es representativa de tres experimentos independientes.

Determinamos la composición de los dímeros NF- κ B en nuestro sistema mediante preincubación con anticuerpos específicos, realizando ensayos de super-retardo en gel, demostrando que los dímeros prevalentes son heterodímeros formados por p65 y p50, así como los homodímeros p50/p50 (Figura 32, panel derecho). Estos datos muestran que los queratinocitos basales de los ratones que expresan altas dosis del dominante negativo de NEMO, fallan en la inducción de la actividad NF- κ B tras un estímulo con citoquinas proinflamatorias.

8. Expresión y fosforilación de GSK3 β durante la progresión tumoral en piel de ratón

Los resultados presentados en el presente apartado y el siguiente (puntos 8 y 9) han sido publicados previamente (Leis y cols., 2002).

Hemos comprobado la importancia de la interacción entre NF- κ B y PI3K/Akt en la supervivencia de los queratinocitos. En este contexto, sabemos que PI3K, Akt y NF- κ B se activan de manera secuencial durante el proceso de carcinogénesis epidérmica, confiriendo a los queratinocitos resistencia a la apoptosis (Budunova y cols., 1999; Segrelles y cols., 2002). Akt puede fosforilar e inactivar a GSK3 β que, como hemos citado anteriormente, modula negativamente la localización nuclear y la actividad de la β -catenina, la cual parece estar implicada en el proceso de carcinogénesis epidérmica mediada por el oncogén *Ha-ras*. A su vez, la β -catenina promueve la expresión de otras dos moléculas: c-myc y CycD1 (Behrens, 2000), bien conocidas por sus efectos oncogénicos en epidermis (Robles y Conti, 1995; Rodríguez-Puebla y cols., 1999; Pelengaris y cols., 1999). Por lo tanto, el papel de GSK3 β como regulador negativo de β -catenina, sugiere un posible efecto supresor de tumores para esta quinasa (Kim y Kimmel, 2000; Polakis, 2000). Por estas razones, y teniendo en cuenta que no existía una descripción detallada de la expresión y actividad de GSK3 β durante la progresión tumoral, decidimos estudiar estos parámetros en un modelo de carcinogénesis epidérmica.

Para ello, aplicamos el protocolo de carcinogénesis química en dos pasos en piel de ratón sobre hembras SENCAR y recogimos muestras de los tumores a diferentes tiempos y estadios de evolución. Estas muestras fueron procesadas para la extracción de proteína total y para su estudio histológico.

8.1. La actividad relativa de GSK3 β aumenta en papilomas tempranos

Estudiamos, en primer lugar, la actividad de GSK3 β mediante ensayos *in vitro* quinasa, utilizando Glucógeno Sintetasa-1 (GS-1) como sustrato. Previamente, los extractos totales de proteína, tanto de piel control como tratada con TPA, así como papilomas en distintos tiempos de promoción (12, 20 y 30 semanas) y carcinomas de células escamosas (SCCs), fueron inmunoprecipitados empleando anticuerpos específicos para GSK3 β . No encontramos diferencias de actividad en la piel tras el tratamiento con TPA (Figura 33A, comparar carriles 1 y 2). No obstante, hallamos un evidente incremento de la actividad GSK3 β en los papilomas de doce semanas (figura 33A, carriles 3-6), mientras que el incremento de actividad era moderado en los papilomas tardíos (20 y 30 semanas) y en los SCCs (Figura 33A, carriles 7-16).

Cuando estudiamos la expresión de GSK3 β en estos extractos por WB, encontramos un descenso significativo de los niveles de la quinasa en los papilomas de 12 semanas, en comparación con la piel control y tratada con TPA (Figura 33A, comparar carriles 1 y 2 con 3-6). Los niveles de proteína se recuperaban en los papilomas de 20 semanas (Figura 33A, carriles 7-9), mientras que en los papilomas más tardíos y en los carcinomas de células escamosas, la expresión de GSK3 β se encontraba aumentada con respecto a los controles (Figura 33A, comparar carriles 1 y 2 con 10-16).

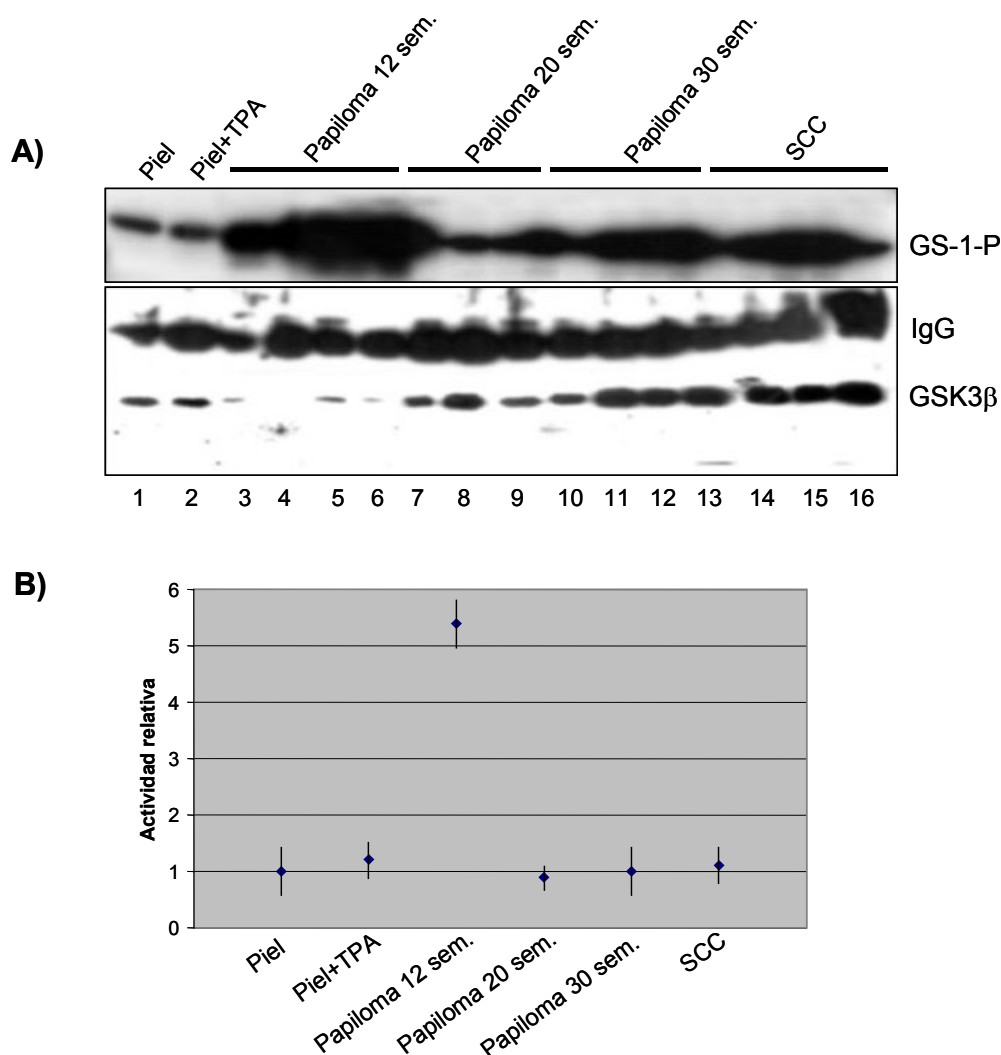


FIGURA 33: Expresión y actividad de GSK3 β durante la carcinogénesis epidérmica en ratón: realizamos extractos totales de proteína de piel control y tratada con TPA, papilomas a distintos tiempos de promoción (12, 20 y 30 semanas) y SCCs. **A)** Medimos la actividad quinasa tras la inmunoprecipitación de los extractos (50 μ g) con anticuerpos específicos frente a GSK3 β , empleando GS-1 como sustrato. Resolvimos 20 μ g de extractos en un gel SDS-PAGE al 10%, y se determinaron los niveles de GSK3 β mediante técnicas de WB con anticuerpos específicos. **B)** Representación gráfica de la cuantificación de la actividad quinasa de GSK3 β , normalizada con respecto a la actividad de la piel control.

De este modo, la actividad de GSK3 β se encontraba aumentada en todos los tumores analizados, especialmente durante las primeras fases de promoción (Figura 33A, panel superior). Mientras tanto, los niveles de la proteína disminuían, precisamente, durante estas primeras etapas de la progresión tumoral, recuperándose e incluso incrementándose, a medida que avanzaba el proceso carcinogénico (Figura 33A, panel inferior).

Estos hallazgos nos indican que la actividad relativa de GSK3 β se encuentra aumentada durante las primeras fases de la progresión tumoral

(papilomas de 12 semanas), donde hallamos un incremento de la actividad en paralelo con un descenso en los niveles totales de la proteína. (Figura 33B). Así también, la actividad relativa en los papilomas tardíos y en los SCCs sería equiparable a la de la piel control y a la de la piel tratada con TPA (Figura 33B).

8.2. La actividad de GSK3 β está controlada por procesos de fosforilación y defosforilación

La fosforilación reversible es uno de los mecanismos por los cuales se puede modular la actividad de las proteínas. La actividad de GSK3 β se regula principalmente mediante dos mecanismos de este tipo: por un lado, la fosforilación en el residuo tirosina 216 (GSK3 β -P-Tyr216) es necesaria para que la quinasa sea funcional (Hugues y cols., 1993) y, por el otro, la fosforilación en el residuo serina 9 (GSK3 β -P-Ser9) es capaz de bloquear la actividad de GSK3 β ante distintos sustratos (Shaw y cols., 1997; van Weeren y cols., 1998; Chen y cols., 2001). Por estas razones, teniendo en cuenta los hallazgos presentados anteriormente, estudiamos los distintos estados de fosforilación en los que se encuentra GSK3 β durante el proceso de carcinogénesis de piel.

Analizamos, mediante técnicas de WB con anticuerpos específicos, la expresión de las distintas formas fosforiladas de GSK3 β , en extractos totales de proteína de piel control y tratada con TPA, en papilomas en distintos tiempos de promoción (12, 20 y 30 semanas) y en SCCs. En primer lugar, observamos niveles similares de GSK3 β -P-Tyr216 tanto en piel control y tratada con TPA, como en los papilomas en diferentes estadios de evolución (Figura 34, carriles 1-12). Sin embargo, en los carcinomas de células escamosas encontramos un marcado descenso de esta forma fosforilada (Figura 34, comparar carriles 1-12 con 13-16).

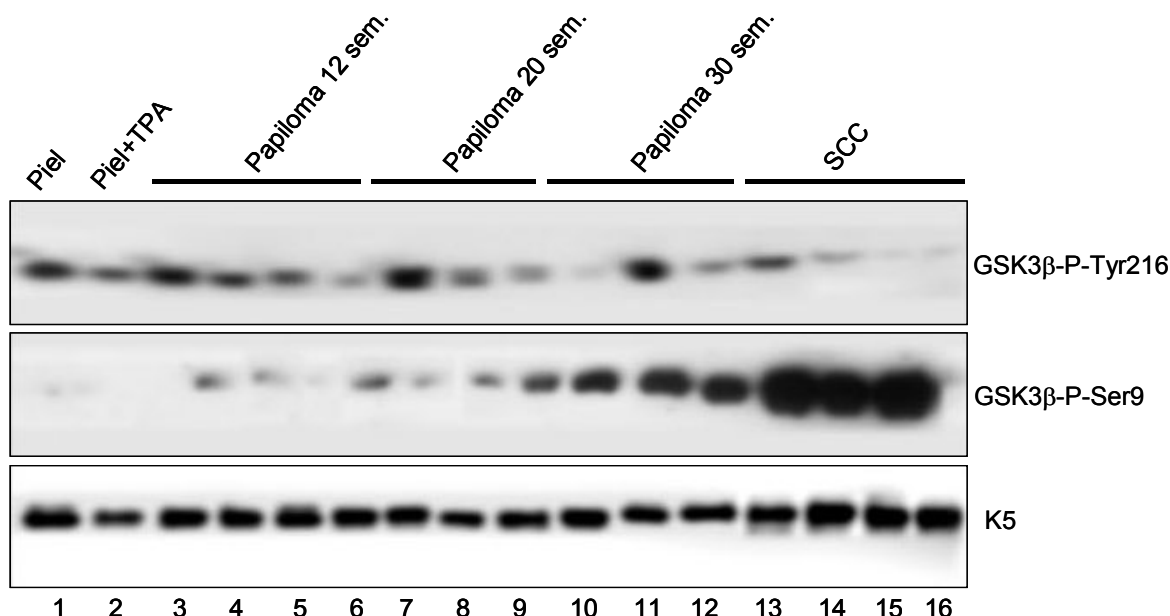


FIGURA 34: Estados de fosforilación de GSK3 β durante la carcinogénesis epidérmica en ratón: realizamos extractos totales de proteína de piel control y tratada con TPA, papilomas a distintos tiempos de promoción (12, 20 y 30 semanas) y SCCs. Resolvimos 20 μ g de extractos en un gel SDS-PAGE al 10% y, se determinaron los niveles de GSK3 β fosforilada en el residuo serina 9 (GSK3 β -P-Ser9) o tirosina 216 (GSK3 β -P-Tyr216) y K5 con anticuerpos específicos mediante técnicas de WB.

En segundo lugar, cuando analizamos la expresión de GSK3 β -P-Ser9, no encontramos niveles detectables por WB ni en la piel control, ni en la piel tratada con TPA (Figura 34, carriles 1 y 2), mientras que en los papilomas de 12 y 20 semanas estos niveles eran bajos (Figura 34, carriles 3-9). No obstante, los papilomas de 30 semanas mostraron unos niveles elevados de la quinasa fosforilada en el residuo serina 9 (Figura 34, carriles 10-12), siendo este aumento más acentuado en los SCCs (Figura 34, carriles 13-16).

Estos datos nos indican claramente que, durante las últimas fases de la progresión tumoral, GSK3 β es inactivada tanto por procesos de fosforilación en el residuo serina 9, como mediante defosforilación en el residuo tirosina 216. Sin embargo, el incremento de la actividad de GSK3 β durante las primeras fases de la carcinogénesis epidérmica, parece estar controlado por un descenso en los niveles de proteína, pero con un incremento relativo a los niveles totales de proteína, de la fosforilación en el residuo Tyr216.

8.3. Relación entre la fosforilación de GSK3 β y la localización subcelular de la Ciclina D1

La Ciclina D1 (CycD1) es esencial para el proceso de carcinogénesis en piel de ratón y se sobreexpresa ya en las primeras etapas de este proceso (Rodríguez-Puebla y cols., 1999). Además, teniendo en cuenta que la fosforilación de CycD1 mediada por GSK3 β promueve su redistribución del núcleo al citoplasma, y media su degradación por la vía de la ubiquitina-proteosoma (Diehl y cols., 1998; Alt y cols., 2000), decidimos investigar a continuación de qué manera influía la expresión de las distintas formas fosforiladas de GSK3 β , en relación a la expresión y a la localización de CycD1 durante la progresión tumoral. Para ello empleamos técnicas de IH en muestras de papilomas en las primeras fases de promoción y en SCCs.

Como hemos descrito en el punto anterior, encontramos niveles elevados de GSK3 β -P-Tyr216 y bajos de GSK3 β -P-Ser9 en los papilomas (Figuras 35A' y 35A''). En estas muestras, CycD1 se encontró tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células tumorales. Además, en algunas de estas células CycD1 se encontró ausente del núcleo (Figura 35A''').

De modo similar, los carcinomas mostraron niveles prácticamente indetectables de GSK3 β -P-Tyr216 mediante estas técnicas histológicas (Figura 35B'). También comprobamos que la forma fosforilada en el residuo Ser9 se encontraba abundantemente en el citoplasma de las células de los SCCs (Figura 35B''). Cuando estudiamos la localización de CycD1 en estos carcinomas, la encontramos casi exclusivamente en el núcleo de las células malignas (Figura 35B'''). Consecuentemente, la localización nuclear de CycD1 está relacionada con un aumento de los niveles de fosforilación en el residuo Ser9 de GSK3 β , así como con un descenso en la fosforilación del residuo Tyr216. De igual forma, en papilomas tempranos, donde la elevada actividad de la quinasa está relacionada con altos niveles de GSK3 β -P-Tyr216 y bajos de

GSK3 β -P-Ser9, encontramos CycD1 también en el citoplasma, e incluso en algunos casos, ausente del núcleo.

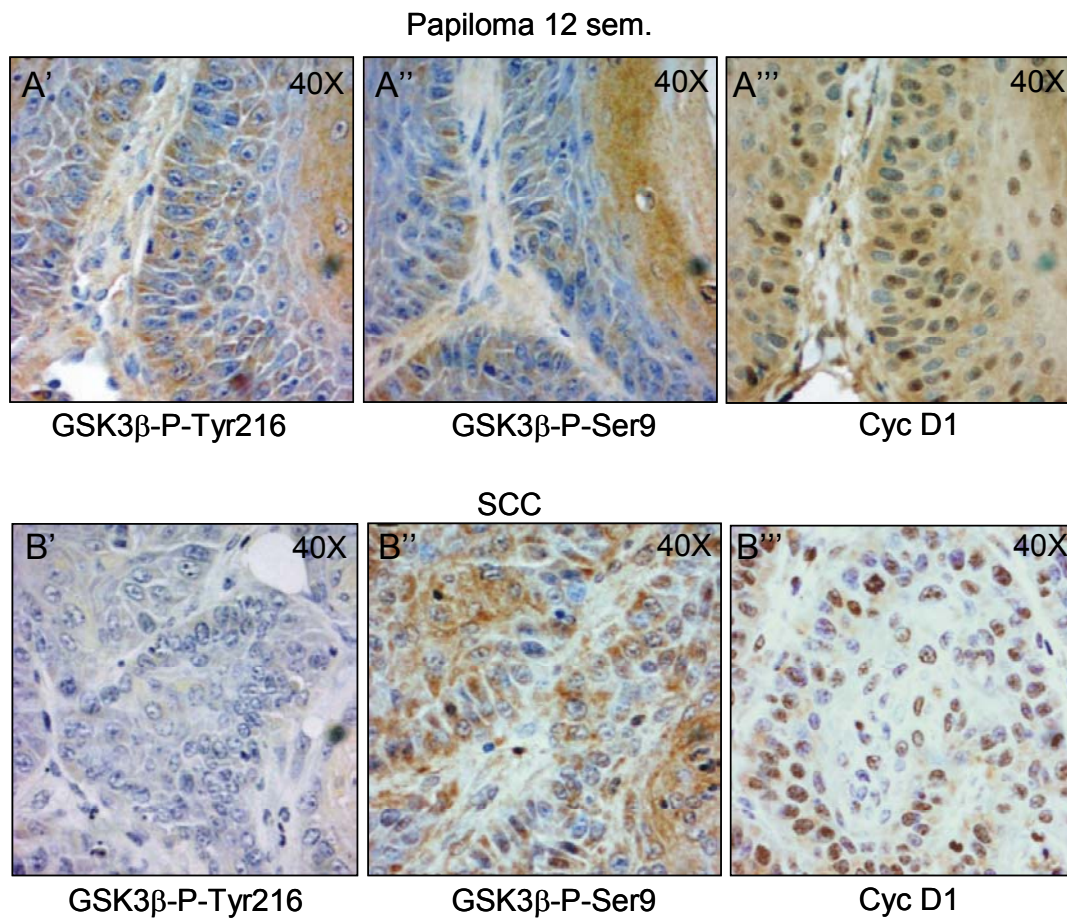


FIGURA 35: Localización subcelular de GSK3 β en tumores de piel de ratón: muestras de papilomas de 12 semanas (A) y SCCs (B), fijadas en etanol al 70% e incluidas en parafina, que se inmunomarcaron con anticuerpos específicos frente a GSK3 β -P-Ser9, GSK3 β -P-Tyr216 y CycD1. Posteriormente se microfotografiaron en un microscopio Leica DM RXA2 a 40X.

9. La quinasa Akt regula el estado de fosforilación de GSK3 β en tumores epidérmicos

La quinasa Akt/PKB regula negativamente a GSK3 β en determinadas circunstancias (Cross y cols., 1997) y, además, estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron un papel fundamental de Akt durante la carcinogénesis en piel de ratón (Segrelles y cols., 2002). Por estos motivos, decidimos estudiar en profundidad las implicaciones de Akt en la inactivación parcial de GSK3 β durante la progresión tumoral en epidermis.

Para ello, realizamos una aproximación mediante xenotransplantes tumorales. La línea de queratinocitos PB es poco tumorigénica tras su inyección subcutánea en ratones *nu/nu*, los cuales no poseen mutaciones en el gen *ras*, ni una expresión elevada del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Yuspa y cols., 1986). Sin embargo, datos previos de nuestro grupo indicaron que la sobreexpresión en estas células de la forma salvaje de Akt, que conlleva un aumento de su actividad, se correspondía con un incremento en la tasa de crecimiento y el potencial tumorigénico de las células PB (Segrelles y cols., 2002). Además, los queratinocitos PB transformados con Akt, muestran un aumento en la proliferación, así como un descenso en la tasa de apoptosis y una menor diferenciación, en paralelo con un aumento de la angiogénesis tumoral (Segrelles y cols., 2002, 2004). Dado que tan sólo un cambio (la expresión de Akt) es capaz de promover la tumorigénesis, consideramos a este sistema válido para el estudio de los posibles efectos de Akt sobre el estado de fosforilación de GSK3 β durante la tumorigénesis de piel.

9.1. La fosforilación de GSK3 β en el residuo Ser9 se encuentra aumentada en tumores que sobreexpresan Akt

Analizamos muestras de distintos tumores generados por inyección subcutánea de queratinocitos PB control y transformados con Akt.

Comprobamos la expresión de Akt y de las distintas formas fosforiladas de GSK3 β por WB, sobre extractos totales de proteína.

Como muestra la figura 36, los tumores procedentes de células PB-Akt presentaban unos niveles de esta quinasa sensiblemente superiores a los tumores procedentes de células PB sin transformar. El estudio de estas muestras nos indicó que, tanto los tumores generados por queratinocitos PB, como los tumores generados con células PB que sobreexpresaban Akt, tenían unos niveles similares tanto de GSK3 β total, como de GSK3 β -P-Tyr216. Sin embargo, cuando estudiamos los niveles de GSK3 β -P-Ser9, apreciamos que los tumores generados con queratinocitos PB-Akt poseían unos niveles sensiblemente superiores a los tumores control (Figura 36).

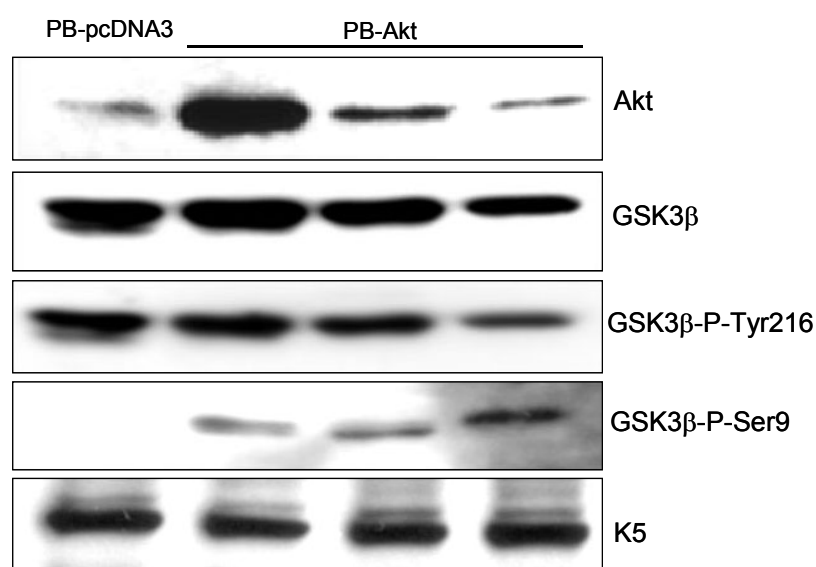


FIGURA 36: Estados de fosforilación de GSK3 β en tumores que sobreexpresan Akt: realizamos extractos totales de proteína de tumores generados por inyección subcutánea de queratinocitos control (PB-pcDNA) o transformados con Akt (PB-Akt). Resolvimos 20 μ g de extractos en un gel SDS-PAGE al 10% y determinamos los niveles de GSK3 β total o fosforilada en el residuo Ser9 o Tyr216, Akt y K5 con anticuerpos específicos mediante técnicas de WB.

De esta forma, un aumento en la expresión de Akt se relaciona directamente con un aumento en la fosforilación de GSK3 β en el residuo Ser9, sin influir sobre la cantidad total de GSK3 β ni sobre su fosforilación en el residuo Tyr216.

9.2. Las actividades Akt y GSK3 β están relacionadas en tumores que sobreexpresan Akt

Teniendo en cuenta que la fosforilación en el residuo Serina 9 de GSK3 β conlleva una disminución en su actividad, y que los tumores generados con queratinocitos PB que sobreexpresan Akt presentan unos niveles elevados de esta forma fosforilada, quisimos investigar si estos tumores con cantidades elevadas de Akt, tenían una actividad GSK3 β disminuída. Para ello, realizamos ensayos *in vitro* quinasas sobre extractos de los tumores generados.

En primer lugar, utilizando la Histona 2B (H2B) como sustrato, analizamos la actividad Akt. Tal y como estaba descrito (Segrelles y cols., 2002), encontramos un aumento considerable de la actividad Akt en las muestras procedentes de tumores generados con queratinocitos PB-Akt, en relación a los tumores generados por inyección de células PB sin transformar (Figura 37).

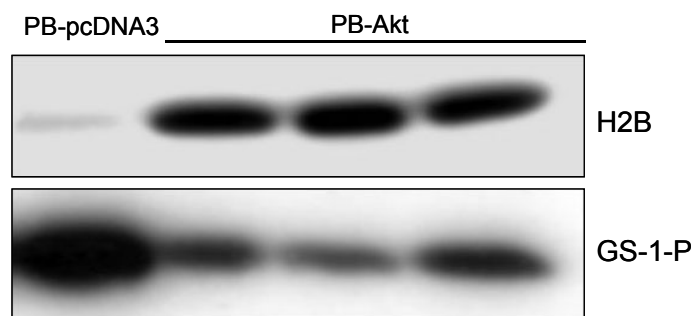


FIGURA 37: Actividad de Akt y GSK3 β en tumores que sobreexpresan Akt: realizamos extractos totales de proteína de tumores PB-pcDNA y PB-Akt. Medimos la actividad quinasas tras la inmunoprecipitación de los extractos (40 μ g) con anticuerpos específicos frente a Akt o GSK3 β , empleando H2B o GS-1 como sustrato respectivamente.

En segundo lugar, estudiamos la actividad GSK3 β en estas mismas muestras, empleando GS-1 como sustrato. Los niveles de actividad de GSK3 β se encontraron significativamente disminuidos en los tumores PB-Akt cuando los comparábamos con los controles. (Figura 37). En consecuencia, la actividad Akt se relaciona de manera inversamente proporcional con la actividad GSK3 β , en los tumores generados por inyección de queratinocitos PB.

9.3. Localización subcelular de CycD1 en tumores que sobreexpresan Akt

Teniendo en cuenta la relación observada entre la fosforilación de GSK3 β y la localización subcelular de CycD1 en el modelo de carcinogénesis química en piel de ratón, decidimos comprobar en nuestro sistema de xenotransplantes, si el aumento en la fosforilación de GSK3 β -P-Ser9 en los tumores PB-Akt, se correspondía con una mayor distribución nuclear de CycD1. Analizamos mediante técnicas inmunohistoquímicas, con anticuerpos específicos, la localización subcelular de CycD1 en muestras de tumores generados por inyección de células PB y PB-Akt (Figura 38).

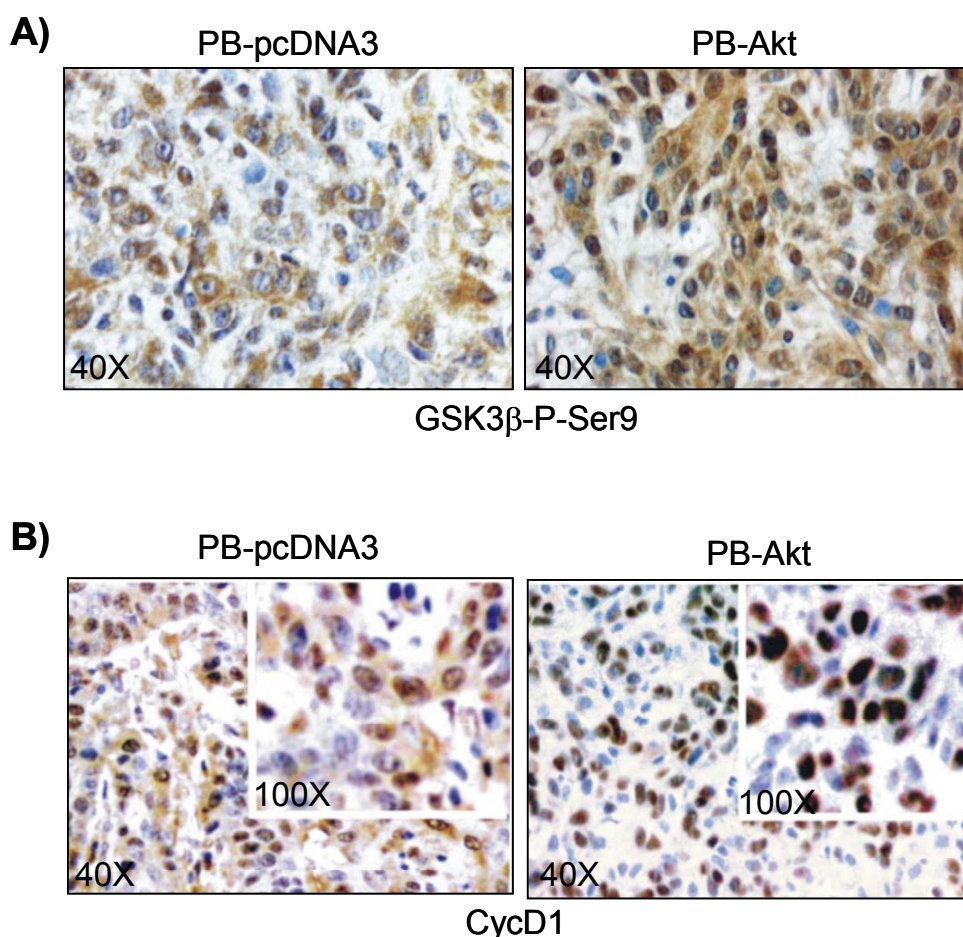


Figura 38: Localización subcelular de GSK3 β -P-Ser9 y CycD1 en tumores que sobreexpresan Akt: secciones de tumores generados por inyección subcutánea de queratinocitos no transformados (PB) o transformados con Akt (PB-Akt) inmunomarcadas con anticuerpos específicos frente a GSK3 β fosforilado en el residuo Ser9 (A) o CycD1 (B). Posteriormente se microfotografiaron en un microscopio Leica DM-RXA2 a 40X y 100X.

Comprobamos que, de acuerdo con nuestras observaciones anteriores, los tumores generados con queratinocitos PB transformados con Akt, presentaban unos niveles significativamente mayores de GSK3 β -P-Ser9 que los no transformados (Figura 38A). Al mismo tiempo, la CycD1, presentaba una mayor localización nuclear en los tumores con una actividad Akt elevada con respecto a los obtenidos de queratinocitos PB no transformados (Figura 38B).

De este modo, podemos afirmar que la sobreexpresión de Akt en queratinocitos provoca un aumento de la fosforilación en el residuo Serina 9 de GSK3 β , bloqueando parcialmente su actividad, y que esta disminución de la actividad de GSK3 β se correlaciona con un incremento en la localización nuclear de CycD1.

10. La sobreexpresión del receptor de glucocorticoides (GR) en queratinocitos de ratón interfiere con la vía PI3K/Akt

Los resultados presentados en el presente apartado y el siguientes (puntos 10-13) han sido publicados previamente (Leis y cols., 2004).

GR regula la expresión génica a través de mecanismos dependientes e independientes de su unión al ADN (Beato y cols., 1995). Recientemente, se ha descrito que en algunos tipos celulares, los glucocorticoides (GCs) ejercen acciones rápidas anti-inflamatorias mediante la interacción entre GR y la vía de señalización PI3K/Akt (Hafezi-Moghadam y cols., 2002); estas acciones son independientes de la actividad transcripcional de GR.

Para evaluar la posible interacción entre GR y PI3K/Akt en queratinocitos de ratón en cultivo y sus consecuencias, realizamos ensayos de cotransfección transitoria en células PB. Utilizamos un plásmido “reportador” de la actividad transcripcional que posee en su promotor elementos de respuesta a glucocorticoides (MMTV-CAT), junto con un vector de expresión vacío (pcDNA3), un vector que codifica para GR *wt* o un mutante de GR defectivo en transcripción (GR-LS7; Helmborg y cols., 1995). En primer lugar, confirmamos los niveles de expresión de GR endógeno y transfectado mediante WB (Figura 39A) y su funcionalidad mediante ensayos de actividad CAT (Figura 39B). La sobreexpresión de GR en queratinocitos indujo un aumento de su actividad transcripcional tras el tratamiento con Dexametasona (Dex) de aproximadamente cinco veces (figura 39B). Sin embargo, el mutante GR-LS7 fue incapaz de provocar un aumento de la actividad CAT en queratinocitos tras el tratamiento con Dex, de acuerdo con lo esperado (Figura 39B).

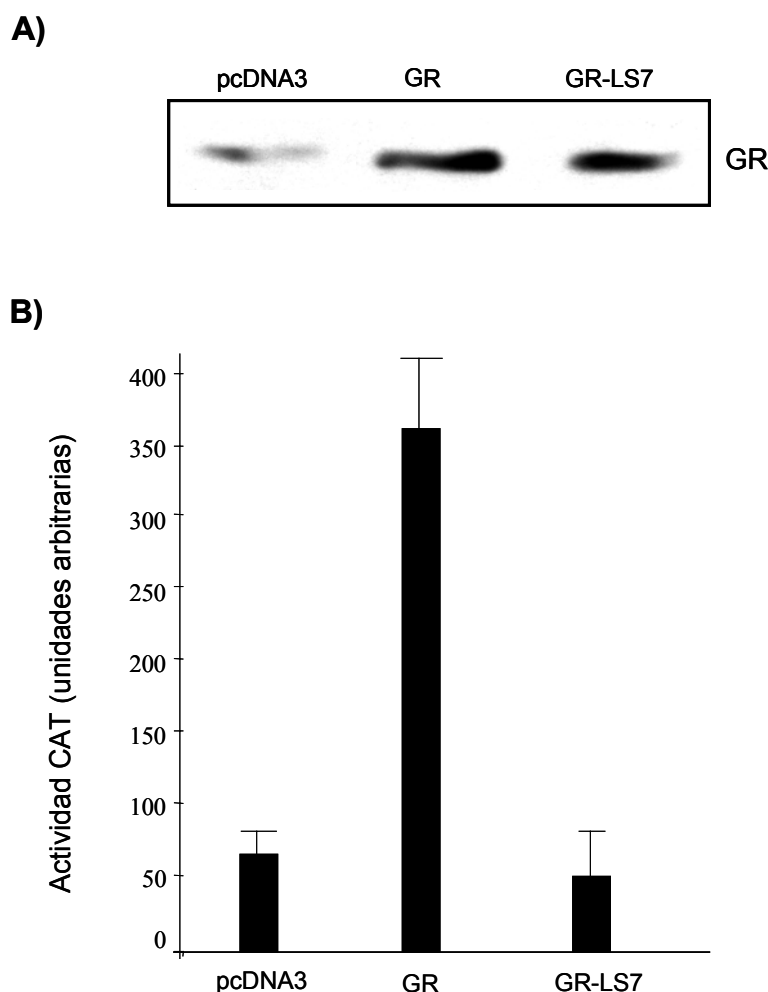


FIGURA 39: Estudio de la capacidad transcripcional de queratinocitos transfectados con GR. Transfectamos transitoriamente queratinocitos PB utilizando vectores de expresión para GR, GR-LS7 o un vector vacío (pcDNA3), junto con un plásmido “reportador” de la actividad MMTV-CAT. Tras la deplección de los GCs endógenos, tratamos las células con Dex 1 μ M durante 6 h y preparamos extractos totales de proteína. **A)** Los extractos de proteína (30 μ g) se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10% y los niveles de GR se determinaron por WB utilizando anticuerpos específicos **B)** Determinación de la actividad CAT en los extractos de proteína (150 μ g) indicados en A) mediante ensayos ELISA. La gráfica es representativa de tres experimentos independientes.

10.1. El tratamiento con Dex induce un aumento de la asociación entre GR y la subunidad p85 α de PI3K

Se ha descrito que la interacción entre GR y PI3K está mediada por la asociación entre la subunidad p85 α /PI3K y GR unido a ligando (Hafezi-Moghadam y cols., 2002, Limbourg y cols., 2002). Para evaluar la asociación entre estas proteínas en queratinocitos, realizamos ensayos de

inmunoprecipitación utilizando anticuerpos contra la subunidad p85 α de PI3K, seguidos de WB con anticuerpos anti-GR. En la figura 40, mostramos que existe una asociación entre GR y p85 α en queratinocitos no tratados y que la administración de Dex induce un incremento en dicha asociación. Estos resultados indican que la activación del receptor por el ligando favorece la formación de complejos GR/ p85 α .

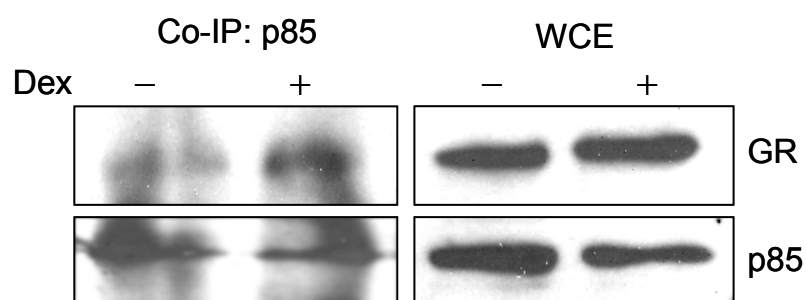


FIGURA 40: El tratamiento con Dexametasona induce la asociación GR/p85 en queratinocitos. Los queratinocitos PB transfectados transitoriamente con GR, tras la deplección de los GCs endógenos del medio de cultivo, se trataron con Dex 1 μ M durante 6 h. Los extractos totales de proteína (WCE, 35 μ g) se utilizaron para realizar ensayos de co-inmunoprecipitación con anticuerpos específicos frente a p85 α (Co-IP, 150 μ g) y se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10%. Tras su transferencia a una membrana de nitrocelulosa, se determinó la cantidad de GR y p85 α con anticuerpos específicos por WB.

10.2. La asociación GR/p85 α disminuye la actividad PI3K y la fosforilación de Akt, independientemente de su actividad transcripcional

Con objeto de determinar si la actividad PI3K se encontraba afectada en los queratinocitos tras el tratamiento con Dex, realizamos ensayos de actividad quinasa *in vitro*, empleando L- α -phosphatidylinositol como sustrato. En los queratinocitos que sobreexpresaban GR, tras el tratamiento con Dex, detectamos un claro descenso de la actividad PI3K, que no se modificaba como consecuencia del pre-tratamiento de las células con actinomicina D (ActD; Figura 41A). Además, la actividad PI3K también disminuía en queratinocitos que sobreexpresaban el mutante GR-LS7, tras el tratamiento con Dex (Figura 41A). En conjunto, estos datos muestran que la activación de

GR produce un descenso de la actividad PI3K, independientemente de la actividad transcripcional de GR.

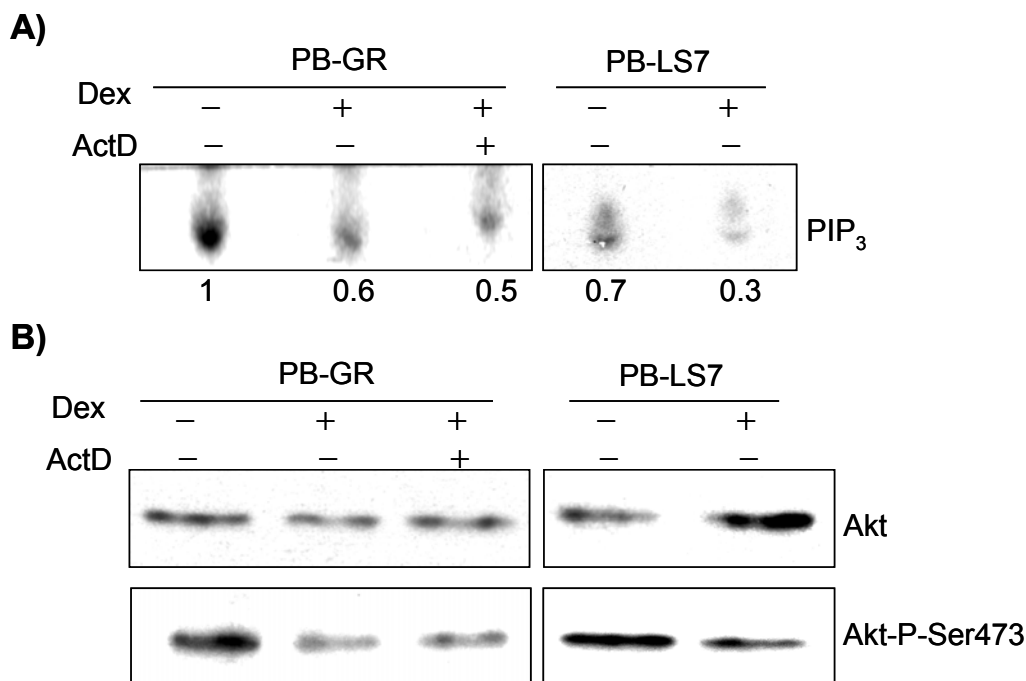


FIGURA 41: El tratamiento con Dex induce un descenso de la actividad PI3K y reduce la fosforilación de Akt en queratinocitos transfectados transitoriamente con GR. Realizamos extractos totales de queratinocitos PB transfectados transitoriamente con GR o LS7, tratados o no con Dex 1 μ M durante 6 h. El tratamiento con Actinomicina D (ActD) 1 μ M se realizó 30 min antes del tratamiento con Dex. **A)** Medimos y cuantificamos la actividad PI3K mediante ensayos quinasa, empleando L- α -phosphatidylinositol como sustrato, cuantificando el producto generado (PIP₃) **B)** Los extractos indicados en A) se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10%, y determinamos los niveles de Akt y Akt-P-Ser473 mediante WB utilizando anticuerpos específicos

A continuación, evaluamos los niveles de expresión de Akt total, así como los niveles de Akt fosforilada en el residuo Ser473 (Akt-P-Ser473) en estos grupos experimentales (Figura 41B). Aunque en las células PB-GR no había cambios en la expresión de Akt total tras el tratamiento con Dex o con Dex más ActD, los niveles de Akt-P-Ser473 disminuían en ambos casos. De igual manera, la fosforilación de Akt disminuía en los queratinocitos que expresaban GR-LS7, tras la administración de Dex (Figura 41B).

Estos resultados nos indican que la activación de GR en queratinocitos en cultivo, interfiere con la vía PI3K/Akt a través de la formación de complejos GR/p85 α .

11. La sobreexpresión de GR en queratinocitos de ratón disminuye la capacidad tumorigénica de Akt *in vivo*

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la vía PI3K/Akt juega un papel esencial en la progresión y conversión tumoral en los modelos de carcinogénesis epidérmica en ratón (Segrelles y cols., 2002), y que GR actúa como un supresor tumoral en piel *in vivo* (Budunova y cols., 2003). Teniendo en cuenta que GR interfiere funcionalmente con PI3K en queratinocitos, decidimos estudiar las consecuencias de la interferencia entre GR y Akt en un modelo de tumorigénesis *in vivo*.

Para ello, realizamos transfecciones estables de queratinocitos PB utilizando vectores de expresión que codifican para un vector vacío (PB-pcDNA3), GR wt (PB-GR), Akt (PB-Akt) o ambos (PB-GR/Akt). Tras la selección de los clones, testamos la eficiencia de la transfección realizando ensayos de WB sobre extractos totales de proteína obtenidos a partir de las distintas líneas estables (Figura 42). Los queratinocitos transfectados con Akt mostraron unos niveles de Akt-P-Ser473 mayores que los transfectados con el vector control (Figura 42, comparar carriles 1 y 4), de acuerdo con nuestros datos previos (Segrelles y cols., 2002). El tratamiento con Dex produjo un descenso en los niveles de Akt fosforilada (Figura 42, carriles 4 y 5) y, el tratamiento conjunto con Dex y el antagonista hormonal RU486, revirtió este efecto (Figura 42, carril 6). En conjunto, nuestros resultados indican que la disminución en los niveles de fosforilación de Akt es una acción mediada específicamente por GR.

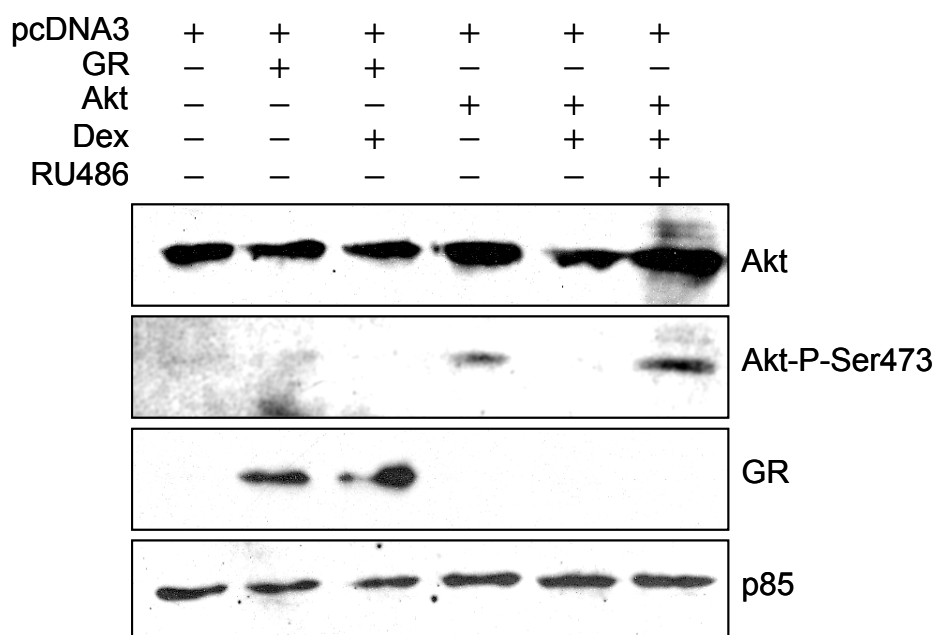


FIGURA 42: El tratamiento con Dex reduce la fosforilación de Akt-P-Ser473 en queratinocitos transfectados de forma estable con GR. Se trataron queratinocitos PB-pcDNA3, PB-GR o PB-Akt, con Dex (1 μ M) sólo o conjuntamente con RU486 (10 μ M) durante 1 h. Se prepararon extractos totales de proteína y se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10% (35 μ g). Determinamos los niveles de Akt, Akt fosforilado en el residuo Serina 473 (Akt-P-Ser473), GR y p85 α por WB utilizando anticuerpos específicos.

11.1. GR disminuye el número y el tamaño de los tumores inducidos por Akt

Para analizar las consecuencias de la interferencia entre GR y Akt en el proceso de carcinogénesis epidérmica, inyectamos subcutáneamente los clones de queratinocitos PB-pcDNA3, PB-GR, PB-Akt o PB-GR/Akt en ratones *nu/nu*. En primer lugar, evaluamos el porcentaje de tumores aparecidos como consecuencia de la inyección de cada una de las líneas celulares y su tasa de crecimiento (Figura 43). Los tumores “control”, PB-pcDNA3, eran visibles macroscópicamente a partir del día 28 tras la inyección y se evaluó la progresión tumoral hasta el día 56. El porcentaje de tumores aparecidos se determinó contando aquellos tumores de más de 3 mm a partir del día 28. La inyección de queratinocitos PB-pcDNA3 indujo la aparición de tumores en un 22% de los animales (n=18) y los queratinocitos PB-GR lo hicieron en un 17% (n=12) (Figura 43A). Como esperábamos, las células PB transfectadas con Akt

provocaron un elevado incremento en la aparición de tumores (79%, n=19). Sin embargo, en las células PB-GR/Akt el número de tumores se redujo de forma considerable (23%, n=13), demostrando que GR puede revertir los efectos de Akt sobre el crecimiento tumoral.

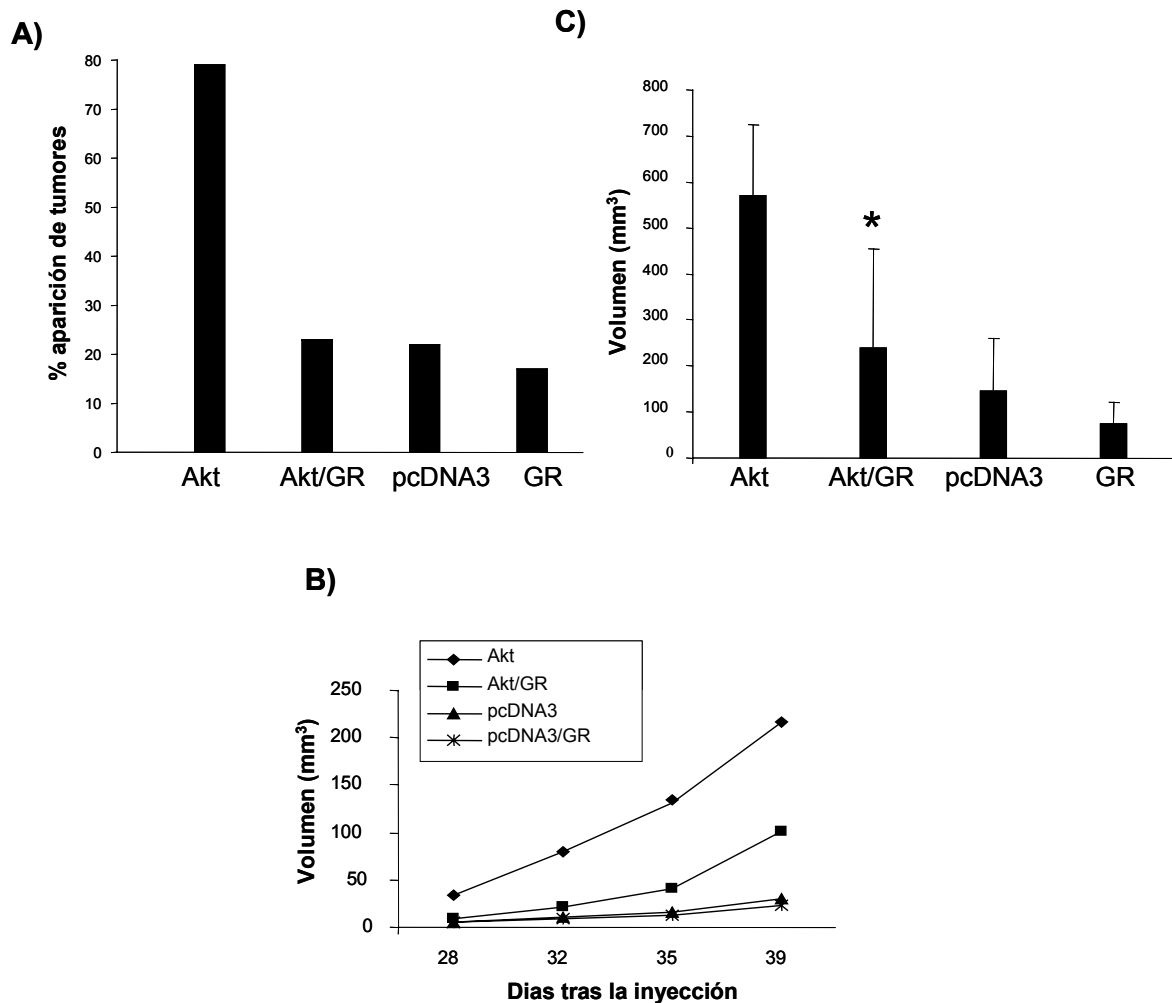


FIGURA 43: La sobreexpresión de GR en queratinocitos contrarresta los efectos tumorigénicos inducidos por Akt. Los queratinocitos PB-pcDNA3, PB-GR, PB-Akt o PB-GR/Akt se inyectaron en ratones nu/nu (12-18 animales por grupo) y evaluamos **A)** Porcentaje de aparición de tumores que resultan de la inyección de cada línea de transfectantes estables indicada **B)** Cinética de crecimiento de los tumores de los días 28 al 39 tras la inyección **C)** Volumen medio de los tumores que resultan de la inyección de cada línea de transfectantes estables indicada. Se indica la media $\pm$ la desviación estándar. Asterisco: diferencia estadísticamente significativa relativa a los tumores Akt ($p < 0.05$).

A continuación, determinamos el volumen medio de los tumores y su cinética de crecimiento durante los días 28 al 39 tras la inyección (Figura 43B y 43C). En los tumores producidos por la inyección de PB-GR/Akt, la tasa de crecimiento se encontraba retrasada aproximadamente una semana en

comparación con los producidos por PB-Akt, siendo este resultado estadísticamente significativo en este estadio ($p < 0.05$; Figura 43B). La tasa de crecimiento en los tumores producidos por la línea PB-GR era muy similar a la de los tumores producidos por PB-pCDNA3. El volumen medio de los tumores producidos por PB-GR/Akt se redujo a casi la tercera parte en comparación con los producidos por PB-Akt ($p < 0.01$; Figura 43C).

En conjunto, estos datos nos indican que GR antagoniza los efectos tumorigénicos ejercidos por Akt, tanto en la promoción tumoral (aparecen menos tumores y más tarde), como en su crecimiento.

11.2. GR disminuye la capacidad proliferativa inducida por Akt

Teniendo en cuenta que GR ejerce un efecto antiproliferativo en la epidermis (Ahluwalia, 1998; Pérez y cols., 2001), mientras que Akt ha sido descrito como un modulador positivo de la proliferación (Datta y cols., 1999), examinamos si los efectos anti-tumorales de GR en nuestro modelo de carcinogénesis, se debían a que el receptor contrarrestaba el efecto proliferativo de Akt. Mediante experimentos de incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina-5-monofosfato (BrdU) *in vivo*, estudiamos la tasa de proliferación mediante marcaje inmunohistoquímico de los tumores.

Los tumores procedentes de la inyección de PB-Akt presentaron un incremento de la proliferación del 232% con respecto a las células PB-pcDNA3. Sin embargo, los tumores procedentes de la cotransfección de GR y Akt, presentaron un incremento de su tasa proliferativa de un 152% (Figura 44). De esta forma, la sobreexpresión de GR contrarresta en buena parte los efectos sobre la proliferación ejercidos por Akt durante la carcinogénesis epidérmica de ratón.

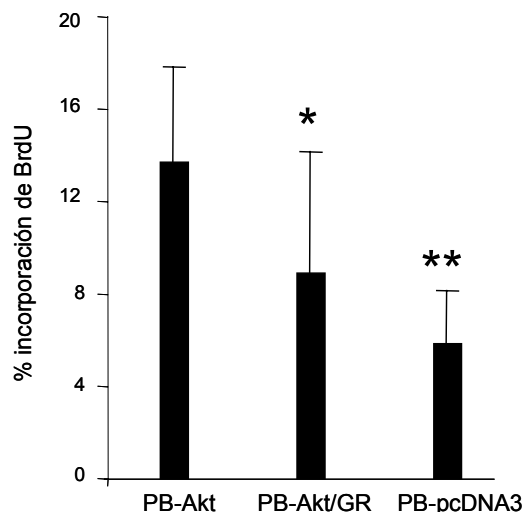


FIGURA 44: La sobreexpresión de GR en queratinocitos contrarresta los efectos proliferativos inducidos por Akt. Los queratinocitos PB-pcDNA3, PB-GR, PB-Akt o PB-GR/Akt se inyectaron en ratones nu/nu (12-18 animales por grupo) y, 6-8 semanas después de la inyección, estudiamos el porcentaje de incorporación de BrdU mediante marcaje inmunohistoquímico con un anticuerpo específico anti-BrdU. Se indica la media $\pm$ la desviación estándar. Asterisco: diferencia estadísticamente significativa relativa a los tumores Akt (*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$).

11.3. GR disminuye la tasa de fosforilación de Akt

Para elucidar los mecanismos moleculares que median la acción anti-tumoral de GR sobre la tumorigénesis inducida por Akt, analizamos el estado de fosforilación de Akt, en extractos de proteína procedentes de los tumores generados a distintos tiempos después de la inyección.

La mayoría de los tumores procedentes de células PB-Akt presentaban unos niveles elevados de Akt-P-Ser473 (Figura 45, carriles 3-5), mientras que la co-expresión con GR redujo significativamente estos niveles en 2 de cada 3 tumores analizados (Figura 45, carriles 6-8). Los tumores procedentes de queratinocitos PB-GR o PB-pcDNA3, no tenían niveles detectables de Akt-P-Ser473. No apreciamos cambios en los niveles de p85 α en ninguno de los tumores (Figura 45).

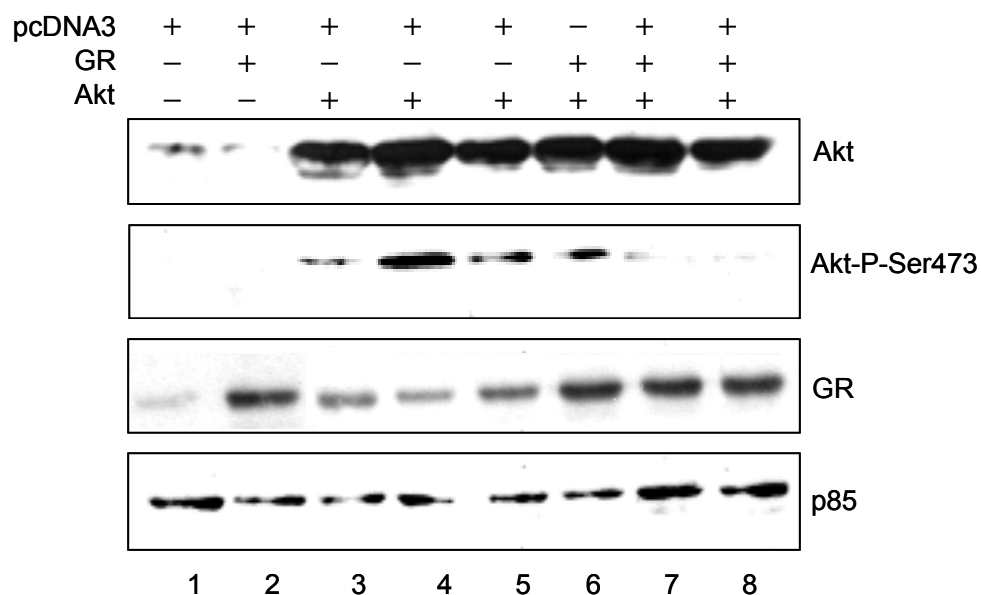


FIGURA 45: GR disminuye la tasa de fosforilación de Akt en tumores. Extractos totales de proteína (35µg) de tumores PB-pcDNA3, PB-GR, PB-Akt o PB-GR/Akt, se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10% y se determinaron los niveles de Akt, Akt fosforilado en el residuo Serina 473 (Akt-P-Ser473), GR y p85α por WB utilizando anticuerpos específicos.

Estos datos indican que GR disminuye en gran medida el crecimiento tumoral inducido por Akt en la piel, a través de la interferencia con la vía de señalización PI3K/Akt.

12. La sobreexpresión de GR en la piel de ratón interfiere con la vía PI3K/Akt: uso del modelo transgénico K5-GR

En los experimentos de tumorigénesis *in vivo* descritos en los apartados anteriores, demostramos la interferencia entre GR y PI3K/Akt en queratinocitos en cultivo y sus consecuencias en la aparición y progresión tumoral en la piel. A continuación, quisimos confirmar si dicha interferencia sucedía también en la epidermis *in vivo*, así como sus efectos en la señalización mediada por PI3K/Akt. Para ello, empleamos los ratones transgénicos K5-GR, que sobreexpresan el receptor hormonal en la capa basal de la epidermis y otros epitelios estratificados (Pérez y cols., 2001).

12.1. La sobreexpresión de GR en la piel aumenta su asociación con p85

En primer lugar, examinamos extractos totales de piel de ratones transgénicos K5-GR y no transgénicos y analizamos, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, la interacción entre GR y p85 α /PI3K. Para ello, inmunoprecipitamos los extractos de proteína con anticuerpos frente a p85 α y a continuación determinamos, mediante WB, la presencia/ausencia de GR en el inmunoprecipitado, utilizando anticuerpos específicos. Tanto en la piel de ratones transgénicos K5-GR como en la de los animales no transgénicos, existía una interacción física entre GR y p85 α (Figura 46). Sin embargo, a pesar de que la cantidad de p85 α es similar en transgénicos y no transgénicos, en la piel de los ratones K5-GR detectamos una mayor cantidad de GR asociada con p85 α , indicando que la mera sobreexpresión de GR en la epidermis *in vivo* favorece la interacción entre estas dos proteínas (Figura 46).

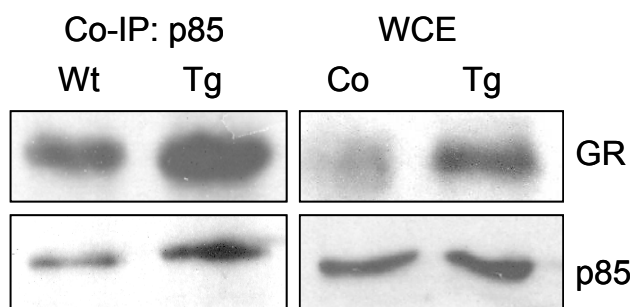


FIGURA 46: GR se asocia con p85/PI3K en piel de ratón. Se utilizaron extractos totales de proteína (WCE, 50µg) de ratones control (Wt) o transgénicos K5-GR (Tg) para realizar ensayos de co-inmunoprecipitación con anticuerpos específicos frente a p85 α (Co-IP, 150µg) y se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10%. Se determinó la cantidad de GR y p85 α mediante WB utilizando anticuerpos específicos.

12.2. La sobreexpresión de GR en la piel disminuye la actividad de Akt

Estudiamos si la interacción entre GR y PI3K/Akt *in vivo*, se traducía en una modulación de la actividad de Akt, tal y como sucedía en nuestro modelo de sobreexpresión en queratinocitos en cultivo. Analizamos por WB extractos de pieles no transgénicas y transgénicas y determinamos los niveles de Akt y Akt-P-Ser473 (Figura 47). La sobreexpresión de GR en la piel de ratón no altera los niveles totales de proteína Akt en este tejido. Sin embargo, en las pieles transgénicas, los niveles de Akt-P-Ser473 se encontraban sensiblemente disminuidos con respecto a las no transgénicas (Figura 47). Esto demuestra que existe una relación inversa entre la cantidad de GR y la fosforilación de Akt. Para determinar la actividad Akt sobre estas mismas muestras, realizamos ensayos *in vitro* quinasa empleando H2B como sustrato. Las pieles procedentes de ratones transgénicos K5-GR presentaban una reducción en la actividad Akt quinasa cercana al 60%, con respecto a las pieles no transgénicas (Figura 47). Estos datos indican que la sobreexpresión de GR *in vivo* interfiere con la señalización mediada por PI3K/Akt, promoviendo un descenso en la fosforilación y actividad de Akt.

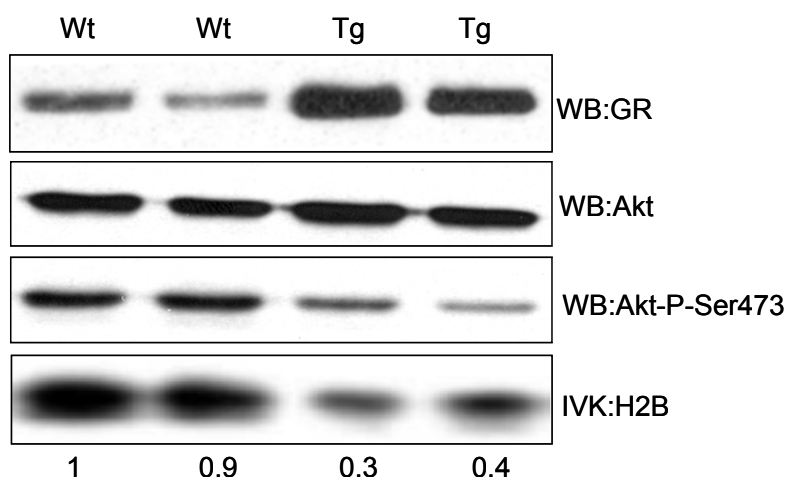


FIGURA 47: La sobreexpresión de GR en piel, se correlaciona con un descenso en la fosforilación y actividad de Akt. Se resolvieron extractos totales de proteína (WCE 50μg) de ratones control (Wt) o transgénicos K5-GR (Tg) en un gel SDS-PAGE al 10% y se determinó la cantidad de GR, Akt, y Akt-P-Ser473 mediante WB utilizando anticuerpos específicos. La actividad Akt quinasa se determinó tras la inmunoprecipitación de los extractos (40μg) con anticuerpos frente a Akt, empleando histona H2B (IVK: H2B) como sustrato.

12.3. El tratamiento con Dex disminuye la fosforilación de Akt en la piel de ratón

Hemos visto que la mera sobreexpresión de GR en la piel de ratón produce un descenso en la fosforilación y actividad de Akt. Quisimos comprobar si la activación del receptor de glucocorticoides inducida por su ligando, podía reproducir este efecto sobre la vía de señalización PI3K/Akt. Para ello, realizamos un estudio de dosis-respuesta con Dex, que se administró mediante tratamientos tópicos a animales adultos *wild type* durante 30 min. Tras la extracción de proteína total, analizamos las muestras por WB utilizando anticuerpos específicos y no apreciamos variaciones, ni en los niveles totales de Akt ni en los de p85 (Figura 48A). Sin embargo, detectamos que la activación del receptor por el ligando, inducía un marcado descenso en los niveles de fosforilación de Akt y que, además, éste era un efecto dosis-dependiente, siendo la dosis más efectiva 1.6 μg/ratón (Figura 48A, comparar carriles 2 y 3). Este efecto era específico del ligando, puesto que el tratamiento combinado de Dex junto con el antagonista hormonal RU486 revertía el efecto de la administración de Dex sobre la fosforilación de Akt (Figura 48A, comparar carriles 2-4).

El estudio de la cinética del efecto de la Dex (1.6 μ g/ratón) aplicada tópicamente en la piel de ratón (Figura 48B), evidenció que el descenso de Akt-P-Ser473 era detectable tras 15 min de tratamiento, produciéndose la máxima disminución a los 30 min de la aplicación de Dex (Figura 48B, comparar carril 1 con 2 y 3). 1 h después, los niveles de Akt fosforilada se recuperaban hasta sus valores normales (Figura 48B, carril 4). De nuevo, la aplicación combinada de Dex y el antagonista RU486, eliminaba los efectos de la Dex sobre Akt-P-Ser473 a los 30 min de tratamiento (Figura 48B, carril 5).

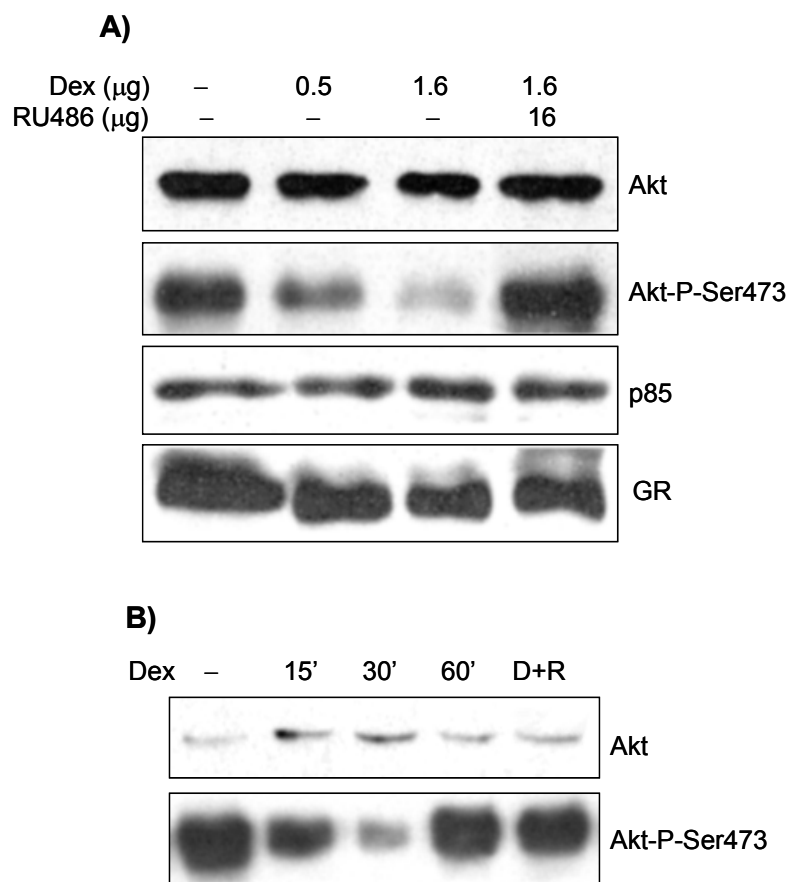


FIGURA 48: El tratamiento tópico con Dex reduce la actividad de Akt en la piel de ratón.
A) La piel dorsal de ratón se trató con Dex (0.5 μ g y 1.6 μ g) o Dex (1.6 μ g)+RU486 (16 μ g) durante 30 min. Preparamos extractos totales de proteína y se resolvieron 50 μ g en un gel SDS-PAGE al 10%. Determinamos los niveles de Akt, Akt-P-Ser473, p85 y GR mediante WB utilizando anticuerpos específicos **B) Cinética del efecto de la Dex sobre la fosforilación de Akt.** La piel dorsal de ratón se trató con Dex (1.6 μ g) a los tiempos indicados, o Dex (1.6 μ g) más RU486 (16 μ g) durante 30 min. Determinamos los niveles de Akt y Akt-P-Ser473 mediante WB utilizando anticuerpos específicos, del mismo modo que en A).

13. La sobreexpresión de GR en la piel de ratón interfiere con la vía NF- κ B in vivo

Se ha descrito que la función de transrepresión de GR se ejerce a través de la interferencia con otros factores de transcripción como NF- κ B (McKay y Cidlowski, 1999). Dado que la sobreexpresión de GR en piel de ratón reduce la actividad de Akt, y que PI3K/Akt es capaz de regular NF- κ B activando el complejo IKK (Madrid y cols., 2001), decidimos estudiar si la interferencia entre GR y PI3K/Akt era capaz modular la función de IKK/NF- κ B en nuestro modelo.

13.1. La sobreexpresión de GR en la piel de ratón se correlaciona con una disminución de la actividad IKK

En primer lugar, analizamos si existían diferencias en la actividad IKK en extractos de piel de animales transgénicos K5-GR y no transgénicos, tanto adultos como recién nacidos. Para ello, realizamos ensayos *in vitro* quinasas empleando I κ B α como sustrato, tras la inmunoprecipitación de los extractos utilizando una mezcla de anticuerpos anti-IKK α y anti-IKK β . Como podemos observar en la figura 50, el aumento en los niveles de expresión de GR en las pieles transgénicas se correlacionaba con un descenso de la actividad IKK, en comparación con los ratones no transgénicos (figura 49).

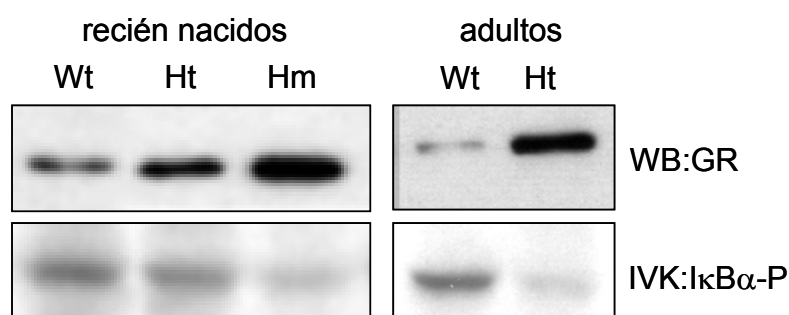


FIGURA 49: La sobreexpresión de GR en piel de ratón disminuye la actividad I κ B quinasas. Preparamos extractos totales de proteína, a partir de la piel dorsal de ratones no transgénicos (Wt) o transgénicos K5-GR heterocigotos (Ht) u homocigotos (Hm), tanto adultos como recién nacidos. Tras la inmunoprecipitación de los extractos (150 μ g) utilizando una mezcla de anticuerpos anti- IKK α y anti-IKK β , realizamos el ensayo *in vitro* quinasas empleando I κ B α como sustrato (IVK: I κ B α -P) Las muestras (50 μ g) se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10% y determinamos los niveles de GR mediante WB utilizando anticuerpos específicos.

13.2. La sobreexpresión de GR en la piel de ratón se relaciona con una disminución de los niveles de la subunidad IKK γ

Estudiamos a continuación los niveles de proteína de las distintas subunidades pertenecientes al complejo IKK en estas mismas muestras (Figura 50). Cuando comparamos la piel de ratones transgénicos K5-GR y no transgénicos, no apreciamos cambios en los niveles de IKK α ni de IKK β (Figura 50). Sin embargo, observamos que los niveles de la subunidad reguladora del complejo IKK γ /NEMO, se encontraban sensiblemente reducidos en la piel de ratones K5-GR con respecto a los no transgénicos (Figura 50, comparar carriles 1 con 2 y 3).

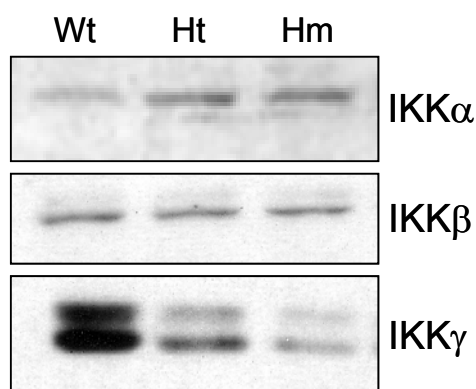


FIGURA 50: La sobreexpresión de GR en la piel de ratón disminuye los niveles de IKK γ . Preparamos extractos totales de proteína partir de piel dorsal de ratones no transgénicos (Wt) o transgénicos K5-GR heterocigotos (Ht) u homocigotos (Hm) recién nacidos. Las muestras se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10%, y determinamos los niveles de IKK α , IKK β e IKK γ mediante WB utilizando anticuerpos específicos

13.3. La sobreexpresión de GR en la piel de ratón, produce una disminución de la tasa de unión de NF- κ B al ADN

Dada la menor actividad IKK observada en la piel de ratones transgénicos K5-GR, evaluamos si se producía además un descenso en la unión de los dímeros NF- κ B al ADN. Para ello, realizamos EMSA utilizando extractos totales de proteína de piel de animales transgénicos K5-GR y no transgénicos. Como podemos apreciar en la figura 51, observamos un claro

descenso en la tasa de unión de los dímeros NF- κ B al ADN en la piel de los ratones transgénicos, en comparación con los no transgénicos (Figura 51, comparar carriles 1 con 2 y 3). Los complejos NF- κ B consisten en dímeros p50/p65 y p50/p50, según hemos determinado mediante ensayos de super-retardo en gel (no mostrado).

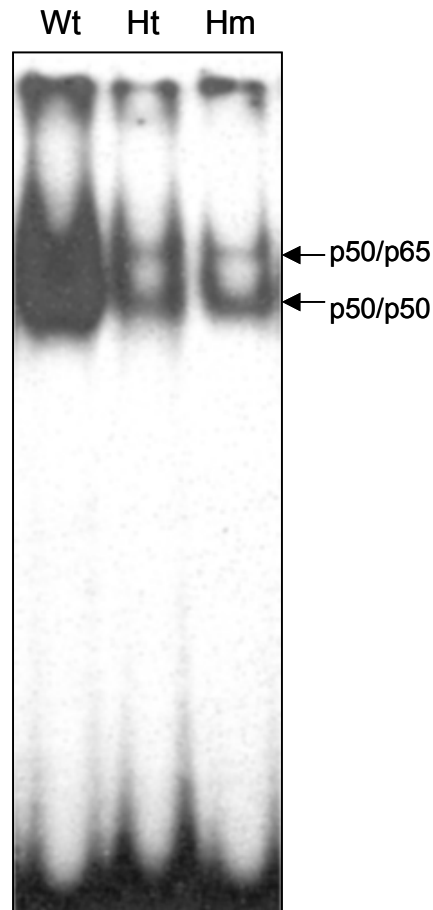


FIGURA 51: La sobreexpresión de GR en piel de ratón disminuye los niveles de unión de NF- κ B al ADN. Se prepararon extractos totales de proteína, a partir de la piel dorsal de ratones control (Wt) o transgénicos K5-GR heterocigotos (Ht) u homocigotos (Hm) recién nacidos, que se incubaron con un oligonucleótido κ B marcado radiactivamente. Los complejos proteína-ADN se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 5.5%, como muestra la autorradiografía.

Tomados en conjunto, estos datos nos indican que la sobreexpresión de GR en la piel de ratón, interfiere con la unión de NF- κ B al ADN. Estos efectos se deben parcialmente a un descenso de la actividad IKK, que ocurre como consecuencia de una disminución en los niveles de la subunidad reguladora del complejo IKK, IKK γ .

NF- κ B, PI3K/Akt y GR son moléculas esenciales que participan, de una manera conjunta y coordinada, en el control de procesos celulares vitales. Ejercen acciones importantes sobre el desarrollo embrionario, la homeostasis celular, la respuesta inmune y la inflamación, y su regulación constituye uno de los mecanismos básicos de control de la apoptosis y la proliferación. Existe una enorme complejidad en los mecanismos de regulación que gobiernan estos procesos y, además, numerosas evidencias en la literatura indican que muchos de los mecanismos vigentes son específicos de estímulo y tipo celular (De Bosscher y cols., 2003; Franke y cols., 2003; Hayden y Ghosh, 2004). La importancia biomédica que deriva del conocimiento detallado de estas vías de señalización se refleja en el hecho de que, las alteraciones en cualquiera de ellas, pueden desembocar en el desarrollo de numerosas patologías humanas. En epitelios, estas patologías son habitualmente de carácter inflamatorio o neoplásico, o bien afectan a la morfogénesis de los mismos.

Por su situación como barrera entre el organismo y el medio ambiente, la piel está expuesta a un gran número de agresiones, tanto físicas como químicas, mecánicas y biológicas, muchas de las cuales inducen la actividad de PI3K y NF- κ B. Entre este ingente número de estímulos, se encuentran citoquinas y quimioquinas, productos bacterianos y virales, mitógenos, estrés, radiación UV y agentes carcinogénicos entre otros. Diversas citoquinas pro-inflamatorias y, de manera destacada, TNF- α , ejercen una función crucial en la piel, aumentando su síntesis por los queratinocitos de forma considerable como consecuencia de numerosos estímulos que inducen un daño epitelial. TNF- α , a su vez, estimula la activación de PI3K y NF- κ B, produciéndose un efecto de retro-alimentación positivo (Franke y cols., 2003; Banno y cols., 2005). En este trabajo, hemos abordado el estudio de la interferencia entre distintas vías de señalización, cuya activación o inhibición resulta en alteraciones en la expresión y función de NF- κ B. Específicamente, nos hemos centrado en el estudio funcional de la subunidad reguladora IKK γ del complejo IKK, clave en el proceso de activación de NF- κ B, en la epidermis y apéndices cutáneos.

1. IKK γ - Δ N97 actúa como un dominante negativo de la función NF- κ B en los queratinocitos

1.1. La inhibición del complejo IKK

NF- κ B juega un papel esencial y complejo en el control de los procesos de inflamación, proliferación, diferenciación y apoptosis en epidermis (Aggarwal 2004). Teniendo en cuenta que los defectos en la regulación de distintas vías que conducen a su activación son responsables de numerosas patologías cutáneas (Smahi y cols., 2002), se han venido desarrollando en los últimos años numerosas estrategias de inhibición de esta vía de señalización, a distintos niveles (Karin y cols., 2004). No obstante, dado el amplio abanico de efectos mediados por la activación de NF- κ B, se hace necesario conocer en detalle los mecanismos de regulación de la actividad de estos factores de transcripción para garantizar el desarrollo de nuevas terapias más específicas.

El complejo IKK tiene un papel central en la regulación de la actividad NF- κ B y, numerosas señales extracelulares e intracelulares, convergen en él (Hayden y Ghosh, 2004; Aggarwal 2004); dentro de las múltiples estrategias de inhibición de NF- κ B desarrolladas, la más efectiva y selectiva es a través del uso de inhibidores de la actividad IKK (Karin y cols., 2004). El complejo IKK media las señales que protegen de la apoptosis inducida por TNF- α , principalmente a través de IKK β e IKK γ (Karin y Delhase, 2000), aunque no conocemos las funciones específicas de cada una de las subunidades en la regulación de este proceso en los queratinocitos. Sin embargo, parece que IKK α ejerce una función en la diferenciación epidérmica independientemente de la actividad quinasa del complejo IKK, a través de la producción del factor soluble KDIF (Hu y cols., 2001). También se ha descrito que tanto IKK α como IKK γ , pueden modular la actividad NF- κ B en el núcleo de manera independiente del complejo. Así, IKK α en asociación con p65 y CBP, puede activar la expresión génica, a través de un mecanismo que incluye la fosforilación de histonas (Yamamoto y cols., 2003), mientras que IKK γ en el

núcleo, compite con IKK α y p65 para unirse a CBP, inhibiendo la activación transcripcional (Verma y cols., 2004). Los mecanismos nucleares de acción de las subunidades IKK, constituyen un paso adicional en la regulación de la actividad transcripcional dependiente de NF- κ B por lo que, estudios posteriores, deberán elucidar el peso específico de esta regulación en el contexto celular de nuestro sistema modelo.

1.2. Estequiometría del complejo IKK

La formación y composición de los complejos IKK es un tema todavía sin resolver. Las tres subunidades del complejo IKK (α , β y γ) están fuertemente asociadas y la co-inmunoprecipitación con anticuerpos frente a una de ellas, resulta en el aislamiento de las otras dos. En condiciones basales, NEMO/IKK γ se encontraría en forma monomérica y un estímulo inductor de NF- κ B induciría su oligomerización a través de su extremo C-terminal y del dominio LZ vía RIP; sin embargo, es probable que este proceso sea específico de estímulo y/o tipo celular (Poyet y cols., 2000; Israël, 2004; Agou y cols., 2004). Otros trabajos describen la existencia de trímeros o tetrámeros IKK γ en el complejo IKK (Israël, 2004; Tegethoff y cols., 2003). Aunque IKK γ actúa como subunidad reguladora del complejo IKK a través de la unión con las subunidades catalíticas, y es necesaria para la inducción de NF- κ B tras un estímulo con TNF- α , se han descrito complejos formados únicamente por IKK α e IKK β , aunque no se conocen sus funciones biológicas.

IKK γ media, implicando a varios dominios de la proteína, la formación y activación de los complejos clásicos. Los 100 primeros aa del extremo N-terminal de IKK γ son esenciales para la formación de los complejos funcionales IKK, ya que en ellos reside su capacidad de unión con las subunidades catalíticas IKK α e IKK β (May y cols., 2000). Posteriormente, se describió un mutante de delección IKK γ - Δ N86 que tampoco era capaz de acoplarse a IKK α ni a IKK β (May y cols., 2002; Tegethoff y cols., 2003). Además, la capacidad de

oligomerización de IKK γ permanece inalterada en los mutantes de delección N-terminal descritos (Ye y cols., 2000; May y cols., 2002; Tegethoff y cols., 2003).

Döffinger y colaboradores, en el año 2001, generaron el mutante de delección IKK γ - Δ N97 y comprobaron, mediante cotransfección de este mutante junto con un plásmido “reportador” de la actividad luciferasa bajo el control de NF- κ B (IgK-luc), que las células 293T fallaban en la inducción de la actividad luciferasa tras un tratamiento con TNF- α . Se demostró así que, en este sistema, IKK γ - Δ N97 actúa como una forma dominante negativa de función de NEMO/IKK γ , inhibiendo parcialmente la actividad NF- κ B tras un estímulo inductor (Döffinger y cols., 2001). Con objeto de estudiar las implicaciones de IKK γ en la homeostasis de los queratinocitos, empleamos el mutante de delección de NEMO/IKK γ (IKK γ - Δ N97) en transfecciones transitorias y estables. El mutante IKK γ - Δ N97 mantiene íntegros los dominios implicados en la oligomerización, pudiendo formar parte de los complejos endógenos con IKK γ wt, y permite la activación de IKK mediada por su extremo C-terminal. La función de dominancia negativa de IKK γ - Δ N97 reside en su capacidad de participar de los complejos endógenos, aunque sin aportar las subunidades catalíticas. En este trabajo, hemos comprobado mediante ensayos de Co-IP, que la expresión de la forma deleccionada de IKK γ en queratinocitos PB, provoca un incremento en la formación de los complejos IKK en ausencia de estímulo (Figura 21). Este incremento no se corresponde con un aumento de la actividad de unión de NF- κ B basal (Figura 19) y, sorprendentemente, se correlaciona con una acumulación del inhibidor I κ B α (Figuras 15-17). Además, los ensayos de Co-IP nos indican que el aumento en los niveles de IKK α e IKK β en los queratinocitos que expresan IKK γ - Δ N97 (Figura 20; ver mas adelante) repercute directamente en la formación de complejos. Estos datos nos indican que la funcionalidad de estos complejos IKK se encuentra alterada, aunque es necesario realizar ensayos de actividad quinasa en estas células, así como estudiar el estado de fosforilación de las subunidades del complejo, clave para la correcta función del mismo. El hecho de que tras un estímulo con TNF- α aumente la tasa de unión de NF- κ B al ADN, indica que el mutante de

delección de NEMO/IKK γ permite, parcialmente, la activación inducida de NF- κ B, aunque ésta se produzca sin que observemos un incremento de la formación de los complejos inducido por la citoquina.

En este modelo, cobra gran importancia la relación entre los niveles de expresión de IKK γ - Δ N97 con respecto a los niveles de expresión de la subunidad reguladora endógena (IKK γ -wt), ya que cuanto más intervenga la subunidad deleccionada en los complejos IKK, se logrará un mayor efecto inhibitorio sobre su actividad. La proporción observada en las líneas de queratinocitos PB generadas de IKK γ endógeno:IKK γ - Δ N97 es, aproximadamente, de 2:1 y 1:1 (Figuras 6 y 14) y, de hecho, hemos comprobado que al incrementar los niveles de la subunidad IKK γ -wt, mediante cotransfección junto con el mutante de delección, se revierten parte de los efectos de IKK γ - Δ N97 en queratinocitos (ver más adelante).

El uso del péptido NBP produce un bloqueo en la formación de complejos IKK que da lugar a una inhibición significativa de la respuesta NF- κ B inducible a nivel de su unión al ADN (Figura 19; May y cols., 2000, 2002). En nuestro estudio, hemos comprobado que los queratinocitos que expresan la delección N-terminal de IKK γ , responden a la inducción de la actividad NF- κ B mediada por citoquinas pro-inflamatorias de una manera sensiblemente menos eficaz que sus controles, con una reducción de aproximadamente el 50%, en la tasa de unión de NF- κ B al ADN tras un estímulo con TNF- α (Figuras 9 y 19). Los mecanismos de actuación son similares en ambos casos. Así, el péptido NBP impide la participación de IKK α e IKK β en los complejos, bloqueando el dominio de unión con la subunidad reguladora endógena, al igual que ocurre con IKK γ - Δ N97, incapaz de formar complejos activos con las subunidades catalíticas. Resulta probable que la menor inhibición relativa en la tasa de unión de NF- κ B al ADN observada en los queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97, en comparación con el efecto de NBP, sea debida a que las “transfectantes” poseen cierto nivel de actividad basal del complejo IKK, como consecuencia del ensamblaje de complejos IKK funcionales con la proteína IKK γ endógena.

También es posible especular acerca de una función residual de los oligómeros formados por las proteínas IKK γ endógena e IKK γ - Δ N97.

1.3. IKK γ - Δ N97 actúa como dominante negativo de la función NF- κ B en los queratinocitos

El complejo IKK activo media la fosforilación, y la consecuente degradación, del inhibidor I κ B α por la vía del complejo multiproteosoma, liberando los dímeros NF- κ B y primando su localización nuclear (Hayden y Ghosh, 2004). Hemos demostrado que la expresión de la forma delecionada de IKK γ en células PB, en ensayos de transfección transitoria, ejerce un efecto dominante negativo de la función IKK en queratinocitos, ya que es capaz de bloquear de forma efectiva la fosforilación de la proteína inhibidora I κ B α tras un estímulo pro-inflamatorio como TNF- α , e impide la fosforilación de p65 en el residuo Ser-536 (Figuras 7 y 8). Además, nuestros datos muestran que IKK γ - Δ N97 inhibe, aproximadamente en un 50%, tanto la actividad inducible de unión de NF- κ B al ADN, como la tasa de transactivación de un plásmido “reportador” de la actividad κ B en queratinocitos (Figuras 9,10 y 19). En la línea celular 293T, IKK γ - Δ N97 es capaz de inhibir considerablemente la transactivación de genes κ B-dependientes como respuesta a TNF- α (Döffinger y cols., 2001). Sin embargo, la tasa de inhibición que produce IKK γ - Δ N97 en los queratinocitos es menor que la obtenida con la misma dosis de TNF- α en células 293T, diferencias que pueden ser atribuibles a mecanismos específicos del tipo celular. Además, el mutante de deleción es capaz de bloquear la inducción de un gen “reportador” de la actividad κ B inducida por la sobreexpresión de IKK γ -wt en queratinocitos 3PC (Figura 24), proporcionándonos una nueva evidencia de que IKK γ - Δ N97 actúa como un dominante negativo de IKK γ .

Auque son numerosos los factores que afectan a la eficacia de la transfección, se calcula que aproximadamente el 15% de las células de

mamíferos que son transfectadas transitoriamente, expresan el plásmido introducido. De todos modos, muy pocas llegan a integrarlo en su ADN, de forma que la mayoría de las células pierden el plásmido al poco tiempo de la transfección (Colosimo y cols., 2000). Esto provoca que los efectos observados en este sistema estén “diluidos” por el alto porcentaje de células sobre las que no se ha actuado. Por este motivo, y para estudiar en profundidad los efectos de IKK γ - Δ N97 en nuestro sistema, generamos líneas de queratinocitos que expresan de forma estable IKK γ - Δ N97, IKK γ -wt, o ambas.

Hemos comprobado, con los experimentos de transfección transitoria, que IKK γ - Δ N97 actúa como un dominante negativo de la función NF- κ B en los queratinocitos, bloqueando la fosforilación inducible por TNF- α de I κ B α y p65, y, reduciendo significativamente, la tasa de unión de NF- κ B al ADN y la transactivación de genes “reportadores” de la actividad κ B. En los clones estables PB-IKK γ - Δ N97, observamos que el dominante negativo de IKK γ produce una acumulación de I κ B α , aún en ausencia de estímulo (Figuras 15-17) y a pesar del aumento de la formación de complejos IKK (Figura 21). De hecho, en queratinocitos senescentes, con un incremento de la actividad NF- κ B, también se observan unos niveles elevados de I κ B α (Bernard y cols., 2004). Hay que tener en cuenta que I κ B α es un gen diana de la regulación transcripcional que ejerce NF- κ B, por lo que el aumento de la actividad NF- κ B se correlaciona con unos mayores niveles de la proteína inhibidora en un lapso de tiempo relativamente corto. Esta función de I κ B α supone un papel esencial del inhibidor en la terminación de la respuesta NF- κ B inducida por distintos efectores, destinada a controlar de manera rápida los niveles de activación de NF- κ B. Nuestros resultados con el inhibidor del proteosoma MG132 sugieren que, la acumulación de I κ B α , se debe a un bloqueo en su degradación basal e inducida, más que a unos niveles de expresión incrementados en los clones IKK γ - Δ N97, indicando una función esencial del extremo N-terminal de NEMO en la degradación, tanto basal como inducible, de I κ B α (Figura 16).

Muy recientemente, ELKS ha sido propuesto como miembro del complejo IKK, donde regularía la entrada del inhibidor para ser marcado a degradación (Sigala y cols., 2004). Dicho trabajo no clarifica si la función de ELKS está implicada en la degradación basal o inducible de I κ B α , ni si depende de su unión con IKK γ para realizar su actividad. La disrupción del extremo N-terminal de la subunidad reguladora podría interferir con este proceso, permitiendo la acumulación de I κ B α . Es más, también se ha descrito que NEMO/IKK γ puede regular esta entrada del inhibidor hacia el complejo, aunque no se conocen los dominios de la proteína implicados en este proceso. Nuestros datos permiten especular que la delección del extremo N-terminal de IKK γ , podría interferir en la entrada de I κ B α al complejo IKK, ya sea directamente o interfiriendo con la función de ELKS.

En un sistema tan exquisitamente modulado, además, no es de extrañar que al introducir de forma exógena una proteína (IKK γ - Δ N97), que está modificando los equilibrios del complejo IKK, punto central de la activación de NF- κ B, se produzca la regulación de la expresión de uno o varios de los componentes de la vía de señalización IKK/I κ B/NF- κ B. Así, la expresión de IKK γ - Δ N97 en queratinocitos, da lugar a un aumento en los niveles de proteína correspondientes a las subunidades catalíticas IKK α e IKK β , aunque preferentemente de la primera, repercutiendo directamente en una mayor asociación con IKK γ endógena (Figuras 20 y 21). Es probable que la expresión de la subunidad IKK γ truncada modifique el equilibrio funcional del complejo y, consecuentemente, la función NF- κ B. El aumento en los niveles de las subunidades catalíticas y su asociación con la subunidad reguladora en estas células no repercute en un incremento de la actividad NF- κ B, lo que sugiere que responde a una compensación funcional. Teniendo en cuenta que la fosforilación cruzada de los componentes del complejo es necesaria para su correcta funcionalidad, los datos nos sugieren que IKK γ , a través de su extremo N-terminal, puede estar implicada en este proceso.

Aunque la activación post-traducciona l de NF- κ B, como consecuencia de la degradación del inhibidor I κ B α , es condición necesaria para la liberación del

complejo y su translocación nuclear, actualmente se reconocen formas alternativas para la regulación de la actividad del complejo NF- κ B (Hayden y Ghosh, 2004). Entre ellas, la fosforilación de diversas proteínas I κ B/NF- κ B ocupa un lugar central. Se han descrito diversas quinasas con capacidad para fosforilar el TAD de p65, potenciando su actividad de transactivación (Viatour y cols., 2005). En un principio se describió que el mismo complejo IKK podía mediar la fosforilación de p65 en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio (Sakurai y cols., 1999) y, posteriormente, se demostró que tanto IKK α como IKK β , podían realizar esta función en respuesta a distintos estímulos, aunque no se conoce si esta fosforilación es dependiente de la formación del complejo IKK, ni de posteriores fosforilaciones de sus componentes (Viatour y cols., 2005). Nuestros resultados de WB e inmunofluorescencia, muestran que el dominante negativo de función de NF- κ B, IKK γ - Δ N97, interfiere con la translocación nuclear de p65, tanto basal como inducida por TNF- α e IL-1 α , e impide la fosforilación inducible de p65-P-Ser536 (Figuras 8 y 18). Además, hemos observado que la sobreexpresión de IKK γ -wt potencia la localización nuclear de p65 inducida por TNF- α e IL-1 α en queratinocitos PB (Figura 18). Los queratinocitos que expresan la delección N-terminal de IKK γ , responden deficientemente a la inducción de la actividad NF- κ B con citoquinas pro-inflamatorias, con una reducción de, aproximadamente, el 50%, en la tasa de unión de NF- κ B al ADN tras un estímulo con TNF- α (Figura 19).

En conjunto, estos datos demuestran que en los queratinocitos que expresan IKK γ - Δ N97, se produce una pérdida de función parcial de la actividad de NF- κ B inducida por TNF- α , sin afectar significativamente a su actividad basal. Nuestros resultados muestran que la expresión del mutante de delección IKK γ - Δ N97 interfiere con el ensamblaje normal del complejo IKK, pre-requisito para su correcto funcionamiento y, consecuentemente, inhibe parcialmente la actividad de unión al ADN inducible de los dímeros NF- κ B. Es importante subrayar que hemos centrado este trabajo, en gran parte, en el estudio de la regulación del heterodímero prototípico p50/p65 y su translocación nuclear como consecuencia de la degradación de I κ B α . Sin embargo, nuestro grupo y otros grupos han descrito que los queratinocitos expresan todos los miembros

de las familias NF- κ B/I κ B (Pérez y cols., 2000; Hinata y cols., 2003). Dado que estas proteínas se regulan a través de mecanismos alternativos a la degradación de I κ B α y que la formación de múltiples homo- y heterodímeros es posible, es lógico suponer que otros complejos NF- κ B ejerzan funciones no redundantes en queratinocitos. Nuestros datos preliminares indican que existe una expresión alterada de p105 y c-Rel (no mostrado). En este contexto, uno de nuestros principales objetivos se centra en identificar si existe una regulación diferencial de genes diana de la actividad NF- κ B, específicamente, aquellos implicados en apoptosis, proliferación y diferenciación, procesos claramente alterados en los queratinocitos que expresan IKK γ - Δ N97.

1.4. Consecuencias de la inhibición parcial de NF- κ B en queratinocitos PB

NF- κ B ha sido implicado en el control de la proliferación en queratinocitos, aunque su función en este proceso es muy compleja y no está resuelta totalmente. En nuestro estudio hemos observado que, la inhibición de NF- κ B en los queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97, provoca un retraso evidente en la cinética de crecimiento de las células (Figura 11). Las funciones de NF- κ B sobre la proliferación son controvertidas. En nuestro modelo, las diferencias observadas en la cinética de crecimiento de los queratinocitos que expresan IKK γ - Δ N97, pueden ser atribuidas a la elevada tasa de apoptosis de las células, más que a una proliferación alterada (ver mas adelante). El crecimiento de los queratinocitos que sobreexpresan la subunidad IKK γ -wt, no presenta variaciones con respecto a los controles, mientras que las células PB-IKK γ -wt/IKK γ - Δ N97 presentan una cinética de crecimiento intermedia, sugiriendo que es la proporción relativa entre el mutante de delección y la proteína wt (endógena o transfectada) la que determina los efectos inhibitorios de IKK γ - Δ N97 sobre la proliferación de los queratinocitos (Figura 11). En nuestro trabajo, hemos comprobado que el dominante negativo de función IKK γ - Δ N97, produce un incremento notable de la tasa de apoptosis de los queratinocitos en cultivo. Hay que resaltar que este aumento de la muerte celular se produce aún

en ausencia de estímulo y que este efecto se puede revertir parcialmente al aumentar los niveles relativos IKK γ -wt:IKK γ - Δ N97 mediante la cotransfección de la subunidad *wild-type* junto con la delecionada, mientras que la sobreexpresión de IKK γ -wt no produce cambios significativos en la tasa de apoptosis con respecto a los queratinocitos control (Figura 13). Estos datos nos indican que ambos efectos (sobre la proliferación y sobre la apoptosis) están relacionados directamente con la función alterada del complejo IKK en las células que expresan el dominante negativo IKK γ - Δ N97.

Los queratinocitos que expresan IKK γ - Δ N97 de forma estable, presentaron un alto número de células multinucleadas, así como otros defectos morfológicos, siendo fenotípicamente compatibles con una célula transformada. Los queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97 crecen formando clones aislados, tienen una adherencia reducida a la placa de cultivo y presentan diversas aberraciones nucleares (Figura 12). Pero a pesar de estas características de célula transformada, devienen rápidamente en apoptosis. Los efectos de IKK γ - Δ N97 sobre la morfología de los queratinocitos no se revierten aumentando la proporción de IKK γ -wt, con respecto a la subunidad mutante, indicando que estos efectos son independientes de la funcionalidad del complejo y, sugiriendo, que estos efectos pueden ser mediados por unos niveles incrementados de IKK γ . Es posible que los efectos de IKK γ en el núcleo, inhibiendo la transcripción génica dependiente de p65 y CBP, sean independientes de su extremo N-terminal. A este respecto, hemos detectado la forma delecionada de IKK γ tanto en el citoplasma, como en el núcleo de los queratinocitos PB transfectados (no mostrado). Es necesario un estudio más detallado, que nos revele los genes regulados específicamente a través de este mecanismo, aunque nuestros resultados de pérdida de adhesión celular sugieren que puedan estar relacionados principalmente con el citoesqueleto y las moléculas de adhesión en los queratinocitos.

NF- κ B ejerce un papel predominantemente anti-apoptótico en queratinocitos. Sin embargo, el control que ejerce sobre la proliferación,

continúa siendo materia de debate. Los ratones transgénicos deficientes en $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, con una mayor actividad NF- κB en epidermis, presentan lesiones hiperproliferativas en la piel, semejantes a las lesiones psoriáticas (Klement y cols., 1996) y, al mismo tiempo, la sobreexpresión de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en queratinocitos basales de ratones transgénicos (K14- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, así como de una forma superrepresora resistente a la degradación inducible (K5- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{SR}$), también conlleva la aparición de hiperplasia epidérmica (Seitz y cols., 1998; Duffey y cols., 1999). Según estos datos, tanto la pérdida como la ganancia de función de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ estarían causando un fenotipo de hiperplasia epidérmica. Para entender esta aparente contradicción tenemos que considerar que, estos modelos, no son completamente equiparables. En el ratón deficiente en $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ los estudios de inmunohistoquímica demostraron un aumento en la proliferación de los queratinocitos y una disminución en su diferenciación. Las lesiones observadas podrían ser secundarias al incremento observado en los niveles de TNF- α y otras citoquinas pro-inflamatorias. En cuanto a los transgénicos K14- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, conviene subrayar que $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ inhibe eficientemente la translocación nuclear de los dímeros p50/p65, pero muestra una afinidad relativa muy baja hacia otros dímeros NF- κB . Por tanto, la hiperproliferación se correlacionaría con una menor actividad p50/p65, si bien, no podemos descartar que sea debida a la actividad de otros complejos NF- κB .

Por otro lado, las pieles de los ratones deficientes en $\text{IKK}\alpha$, se muestran hiperproliferativas y mal diferenciadas (Takeda y cols., 1999). Además, estos animales presentan defectos morfogénicos en las zonas distales de las extremidades y el cráneo, aunque los efectos de $\text{IKK}\alpha$ sobre el desarrollo epidérmico son independientes de su actividad quinasa y, probablemente, también del complejo IKK (Cao y cols., 2001; Hu y cols., 2001). Por otro lado, la hiperproliferación epidérmica en ratones deficientes en $\text{IKK}\beta$ específicamente en queratinocitos, es un efecto secundario a la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y no se debe a un proceso autónomo celular (Pasparakis y cols., 2002). De manera análoga, los animales $ikk\gamma^{+/-}$ presentan lesiones hiperproliferativas acompañadas de una grave inflamación epidérmica. En

estos animales, la expresión de las citoqueratinas K5/K14 y K6, y los niveles de TNF- α e IL-1, están incrementados, probablemente por su secreción a partir del infiltrado granulocítico, siendo responsables de las características hiperproliferativas (Makris y cols., 2000; Schmidt-Supprian y cols., 2000). En este caso, los efectos observados son debidos a dos subpoblaciones de queratinocitos, unos con una actividad IKK normal, y otros con una deficiencia completa de IKK γ , responsables *a priori* del fenotipo epidérmico (ver más adelante). En nuestro caso, los queratinocitos que expresan el dominante negativo de función IKK, componen una población homogénea que muestra una deficiencia parcial en la activación NF- κ B.

En conjunto, los datos sugieren que, el retraso en la cinética de crecimiento de las células PB-IKK γ - Δ N97, se debe principalmente a un incremento en la tasa basal de apoptosis y a la dificultad de estas células para adherirse a la placa de cultivo, efectos que retrasarían el inicio de la fase exponencial de crecimiento en los queratinocitos. Además, hemos comprobado que ambos efectos (sobre la proliferación y sobre la apoptosis), se revierten parcialmente al aumentar la relación IKK γ -wt: IKK γ - Δ N97, demostrando que los dos efectos son dependientes de la correcta funcionalidad del complejo IKK. No obstante, es necesario realizar un estudio de la tasa de proliferación de las células PB-IKK γ - Δ N97 para descartar un efecto directo del extremo N-terminal de la subunidad reguladora sobre la proliferación de los queratinocitos.

NF- κ B está implicado en la progresión tumoral. La mayoría de los tumores de origen epitelial, incluidos los epidérmicos, presentan una activación constitutiva de NF- κ B (Budunova y cols., 1999). No obstante, también se ha descrito que una falta de función NF- κ B puede contribuir a la iniciación tumoral. La inhibición de NF- κ B en queratinocitos humanos en cultivo, provoca cambios en la organización del citoesqueleto, y la pérdida del contacto célula-célula, además de interferir en la regulación de las queratinas, aún cuando éstas no poseen sitios de unión κ B en sus promotores, a través de mecanismos independientes de su unión al ADN, mediante complejas interacciones con

otros factores de transcripción (Banno y cols., 2005). De hecho, la expresión de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{SR}$ específicamente en la epidermis, predispone a la aparición de SCCs (Duffey y cols., 1999). Además, los MEFs deficientes en p65 presentan características morfológicas de células transformadas, incluyendo una adherencia reducida a la placa de cultivo; estas células $p65^{-/-}$ tienen la capacidad de formar tumores en ratones inmunodeficientes (Gapuzan y cols., 2002). En concordancia, los queratinocitos PB-IKK γ - ΔN97 , con niveles elevados de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y una falta de localización nuclear de p65, también presentan características morfológicas de células transformadas y devienen rápidamente en apoptosis. De igual modo, la expresión de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{SR}$ en SCCs, disminuye la supervivencia de las células tumorales y los tumores generados a partir de MEFs $p65^{-/-}$ regresan espontáneamente, indicando la necesidad de otras mutaciones adicionales para la adquisición del fenotipo maligno. En conjunto, los datos sugieren que la acumulación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y la falta de localización nuclear de p65 en los queratinocitos transformados con el dominante negativo de función NF- κB IKK γ - ΔN97 , provoca modificaciones en el citoesqueleto y en la capacidad de adhesión de los queratinocitos, contribuyendo a la iniciación tumoral. No obstante, estas modificaciones causadas por IKK γ - ΔN97 , no son suficientes para la progresión tumoral, donde parece que una activación constitutiva de NF- κB sería necesaria para garantizar la resistencia a la apoptosis de las células fenotípicamente transformadas.

1.5. Funciones de IKK γ en apoptosis

TNF- α es la principal citoquina involucrada en la regulación de la respuesta inmune, diferenciación celular y apoptosis. La activación de TNFR por TNF- α desencadena la inducción, al mismo tiempo, de vías que señalizan tanto hacia apoptosis como hacia la supervivencia celular. El estado homeostático y el tipo celular, así como la intensidad en la señal y el tiempo de estimulación, van a determinar el desenlace final. La inducción equilibrada de ambas señales divergentes, lleva a la activación de las células, aunque si se bloquea NF- κB , y por consiguiente los mecanismos preferentemente anti-apoptóticos dependientes de su actividad, TNF- α se convierte en un potente

factor inductor de apoptosis (Hayden y Ghosh, 2004). Se ha demostrado en los últimos años que, el bloqueo farmacológico de NF- κ B, puede inducir apoptosis en varios tipos celulares (Takada y cols., 2004a). La administración de partenolida, un fármaco que bloquea NF- κ B impidiendo específicamente la degradación de I κ B α produce un aumento de la apoptosis mediada por TNF- α en queratinocitos humanos en cultivo (Banno y cols., 2005). Aunque no todos los miembros de la familia NF- κ B tienen el mismo peso específico en la regulación de la muerte celular mediada por TNF- α , sabemos, mediante aproximaciones de transgénesis, que la presencia de p65 en hepatocitos es indispensable para la protección ante la apoptosis a través de la vía TNFR, mientras que la presencia de c-Rel no es necesaria. También se ha descrito que otros miembros de la familia NF- κ B regulan preferentemente la apoptosis como respuesta a otros inductores de la actividad NF- κ B, jugando un papel importante la especificidad de tipo celular (Kucharczak y cols., 2003).

Si se bloquea la activación de NF- κ B a distintos niveles a lo largo de la vía de señalización, TNF- α aumenta su capacidad de inducir apoptosis rápidamente en la mayoría de los tipos celulares (Aggarwal y cols., 2003). Así, por ejemplo, se ha descrito que los MEFs obtenidos a partir de ratones *rip*^{-/-} mueren rápidamente tras un tratamiento con TNF- α debido a una activación deficiente de NF- κ B (Kelliher y cols., 1998). Es importante señalar que, distintos modelos animales que presentan una activación deficiente de NF- κ B, incluyendo los ratones deficientes en p65, IKK β , e IKK γ , exhiben el mismo fenotipo de muerte embrionaria por apoptosis hepática mediada por TNF- α (Li y cols. 1999b, 1999c; Tanaka y cols., 1999; Makris y cols., 2000; Schmidt-Supprian y cols., 2000; Rudolph y cols., 2000).

El tratamiento citotóxico con TNF- α en queratinocitos apenas provoca un aumento de la apoptosis (alrededor del 2%), mientras que si las células se pretratan con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, la citoquina provoca un incremento de la apoptosis que se eleva al 15% (Weisfelner y Gottlieb, 2003). Los MEFs de ratones *nemo/ikk* γ ^{+/-}, al igual que los *ikk* β ^{-/-}, apenas presentan variaciones en la tasa basal de apoptosis. Sin embargo,

presentan una elevada citotoxicidad inducida por TNF- α , aún en ausencia de cicloheximida (aproximadamente un 45% en los deficientes en NEMO y un 20% en los deficientes en IKK β ; Schmidt-Supprian y cols., 2000). En conjunto, estos datos sugieren que la activación de NF- κ B a través de los complejos IKK, con participación de NEMO/IKK γ como subunidad reguladora, es responsable en gran medida de los efectos anti-apoptóticos de NF- κ B como respuesta a TNF- α . En este sentido, nuestros resultados en queratinocitos PB muestran que la expresión forzada de IKK γ - Δ N97 se correlaciona con un incremento en la tasa basal de apoptosis (Figura 13), sugiriendo que NEMO/IKK γ cumple funciones esenciales para la supervivencia celular aún en ausencia de estímulo.

La importancia de la localización nuclear de NF- κ B para el mantenimiento de la supervivencia celular ha sido demostrada en varios sistemas y, además, sabemos que la presencia de p65 es necesaria para la resistencia a la apoptosis vía TNFR (Kucharczak y cols., 2003). En concordancia, nuestros hallazgos demuestran que la localización nuclear de p65 es necesaria para el mantenimiento de la supervivencia de los queratinocitos, aún en ausencia de estímulo citotóxico y que, a través de su extremo N-terminal, IKK γ es responsable, al menos en parte, de esta localización nuclear de p65. Nuestros datos indican que en las células PB-IKK γ - Δ N97, p65 está excluido del núcleo y además, en estas células, no detectamos p65-P-Ser536 en ausencia o presencia de estímulos inductores de NF- κ B (Figuras 8 y 18). p65 en el núcleo de las células puede regular la transcripción génica a través de interacciones complejas con otros factores y cofactores de transcripción, independientemente de su unión al ADN (Hayden y Ghosh, 2004). Las células PB-IKK γ - Δ N97 no presentan cambios significativos en la tasa basal de unión de NF- κ B al ADN, sugiriendo que el control que ejerce p65 sobre la supervivencia de los queratinocitos sin estimular, se produce por mecanismos independientes de su unión al ADN, pero dependientes de su localización nuclear.

En nuestro sistema modelo aún no hemos determinado si IKK γ - Δ N97 ejerce una función nuclear a través de su interacción con el coactivador

CBP/p300, como se describe en otros tipos celulares (Verma y cols., 2004). En dicho trabajo se describe que IKK γ puede localizarse en el núcleo y que, la delección de los 100 primeros aa de su extremo N-terminal, no interfiere con esta capacidad. Una vez en el núcleo, IKK γ (al igual que IKK α), interacciona con el extremo N-terminal de CBP (aunque no se conocen los dominios de NEMO/IKK γ implicados en esta interferencia), para inhibir la transcripción génica dependiente de IKK α y p65 (Verma y cols., 2004). Esta función nuclear de IKK γ - Δ N97 supone un nivel adicional de regulación independiente de la actividad quinasa del complejo IKK, al igual que ocurre con las funciones de IKK α independientes de IKK, cruciales para la morfogénesis epitelial.

Parte de los efectos citotóxicos de TNF- α están mediados a través de la quinasa de Jun activada por estrés, JNK. JNK provoca la muerte celular por la vía mitocondrial aunque, dependiendo del contexto celular, también puede señalar hacia la supervivencia. En queratinocitos, se ha demostrado que la supervivencia celular mediada por NF- κ B como respuesta a TNF- α , requiere de una activación transitoria de JNK; en ausencia de NF- κ B, la activación de JNK inducida por TNF- α es persistente y realza la apoptosis (Zhang y cols., 2004). No obstante, no conocemos si esta inhibición de JNK se produce también en ausencia de estímulo por lo que se hace necesario investigar si, en las células PB-IKK γ - Δ N97, se produce una activación persistente de JNK que pueda justificar el incremento en la tasa basal de apoptosis de los queratinocitos.

2. Importancia de NEMO/IKK γ en patologías

En los últimos años, se han descrito diversas mutaciones en distintas moléculas que convergen en la activación de NF- κ B, incluyendo NEMO/IKK γ , que son susceptibles de provocar un grupo de patologías congénitas en humanos, denominadas displasias ectodérmicas (ED) por sus efectos sobre el desarrollo de la piel y de otros derivados ectodérmicos (Orange y Geha, 2003). La ED es un síndrome clínicamente muy heterogéneo, caracterizado por el desarrollo anormal de las estructuras derivadas del ectodermo (piel, pelo, ojos, dientes, uñas y glándulas sudoríparas). Se han descrito más de 170 formas de ED, algunas de ellas fruto de distintas mutaciones en los elementos de control a lo largo de la vía de activación de NF- κ B (Smahi y cols., 2002). Las mutaciones en el extremo C-terminal de NEMO, que impiden la correcta activación de los complejos IKK, así como las mutaciones en I κ B α que evitan su correcta degradación, impiden una activación eficiente de NF- κ B durante el desarrollo embrionario, afectando principalmente a la maduración del ectodermo. Teniendo en cuenta la importancia de NF- κ B en el control de la respuesta inmune, no es de extrañar que, en ocasiones, algunas mutaciones que causan ED también estén asociadas con distintos grados de inmunodeficiencia (Puel y cols., 2004). El hecho de que el gen NEMO/IKK γ , que se localiza en el cromosoma X en humanos y ratones, se haya identificado como causante de la enfermedad denominada *Incontinentia Pigmenti* (IP), ha supuesto un punto de inflexión en el estudio de la función del complejo IKK y, en concreto, de la subunidad reguladora IKK γ en epitelios estratificados.

La IP es un tipo de ED que se caracteriza por lesiones en la piel que sufren distintos estadios denominados vesicular o inflamatorio, verrugoso, hiperpigmentario y de cicatrización. La incontinencia del pigmento (melanina) se produce como consecuencia de la destrucción de los queratinocitos del folículo piloso, liberando la melanina del interior de las células, que acaba depositandose como pigmento libre, o en el interior de los macrófagos epidérmicos (Landy y Donnai, 1993). Las mujeres con IP presentan un patrón de inactivación somática del cromosoma X no al azar, que deriva de la

selección negativa de las células portadoras del cromosoma X con el gen de *nemo* mutado, lo que conduce a la resolución espontánea de las lesiones. Aunque no es frecuente, se han descrito recidivas en un porcentaje de pacientes con IP, que tan solo puede explicarse como consecuencia de la persistencia de algunos queratinocitos que contienen el gen de *nemo* mutado (Parrish y cols., 1996). En algunas biopsias de pacientes IP se ha descrito una tasa elevada de la apoptosis de los queratinocitos. Los datos derivados del estudio histopatológico de pacientes, unidos al análisis del modelo animal *nemo/ikky^{+/-}*, subrayan el papel crucial de la subunidad reguladora del complejo IKK en la supervivencia de los queratinocitos.

En nuestro estudio, el manejo experimental de los queratinocitos que expresaban en gen *nemo/ikky* mutado (PB-IKK γ - Δ N97), resultó complejo. Además del retraso en la cinética de crecimiento y su elevada tasa de apoptosis, tras 8-10 pases en cultivo, las células supervivientes perdían progresivamente sus características, asemejándose de nuevo a los queratinocitos control y llegando a recuperar los niveles normales de inducción de NF- κ B tras un estímulo con TNF- α (no mostrado). Los datos sugieren que los clones con mayor expresión de IKK γ - Δ N97 se seleccionan negativamente, en un proceso similar al que ocurre durante la patología humana IP (Parrish y cols., 1996). Berlin y colaboradores, en 2002, plantearon una hipótesis según la cual, parte del fenotipo observado en las pacientes con IP podía explicarse a partir de este fenómeno. En concreto, los autores proponen que la lisis de las células *nemo⁻* conlleva la liberación al entorno de moléculas mediadoras (por ejemplo Hsp90) que estimulan a las células *nemo⁺* con una activación normal de NF- κ B. Como respuesta, éstas, a su vez, expresan y liberan citoquinas y quimioquinas (TNF- α , IL-1, eotaxina, etc.), atrayendo a los eosinófilos que infiltran la epidermis y liberan proteasas, lo que provoca la degradación de tonofilamentos y desmosomas, estimulando de nuevo a los queratinocitos *nemo⁺* en un circuito autoamplificable. Por lo tanto, parte del fenotipo cutáneo de estos pacientes (como la hiperproliferación), puede deberse a este fenómeno inflamatorio dependiente de los queratinocitos *nemo⁺* (Berlin y cols., 2002).

NEMO/IKK γ es esencial para la correcta transducción de distintos estímulos que activan NF- κ B en epidermis a través del complejo IKK. Los ratones transgénicos deficientes en esta subunidad reguladora, mueren durante la etapa embrionaria, por lo que no nos informan sobre los efectos de su falta de función en la piel *in vivo* (Makris y cols., 2000; Schmidt-Supprian y cols., 2000; Rudolph y cols., 2000). Por otro lado, debido a la localización del gen *nemo* en el cromosoma X en humanos y ratones, los ratones macho *nemo*^{+/-}, mueren con el mismo fenotipo de apoptosis hepática que los animales *nemo*^{-/-} y, de manera análoga, los varones con IP que presentan mutaciones en *nemo*, no superan la etapa embrionaria (Orange y Geha, 2003). Los ratones hembra *nemo*^{+/-} desarrollan una patología cutánea similar a la de las pacientes con IP. Histológicamente se caracterizan por presentar hiperplasia epidérmica al nacimiento, con microvesículas repletas de eosinófilos y neutrófilos, así como un gran número de queratinocitos apoptóticos y espongirosis. Estos animales presentan tonofilamentos anormales y un reducido número de uniones desmosómicas entre sus queratinocitos (Makris y cols., 2000; Schmidt-Supprian y cols., 2000).

2.1. Modelo animal K5- IKK γ - Δ N97

Tanto en pacientes como en el modelo animal, como consecuencia de la inactivación somática del cromosoma X, se generan dos subpoblaciones de queratinocitos: una con el gen *nemo* funcional y otra con el mutado (Parrish y cols., 1996). Por este motivo, se hace difícil discernir entre los efectos debidos a la ausencia de IKK γ en queratinocitos (*nemo*⁻), que inhabilita la formación del complejo funcional IKK y, por tanto, la correcta activación de NF- κ B, de aquellos efectos secundarios causados por la subpoblación de queratinocitos con una copia silvestre del gen *nemo* (*nemo*⁺). Con objeto de estudiar en detalle la función de IKK γ en la epidermis *in vivo*, y para elucidar los mecanismos funcionales de IKK γ en el control de la apoptosis, proliferación y diferenciación de los queratinocitos, generamos los ratones transgénicos K5-

IKK γ - Δ N97, que expresan el dominante negativo de función de NEMO específicamente en la capa basal epidérmica.

La embriogénesis y la diferenciación epidérmica parecen estar reguladas principalmente desde IKK α , de una manera independiente del complejo IKK. No obstante, el análisis de embriones tardíos (no mostrado) y neonatos K5-IKK γ - Δ N97 demuestra que la expresión del mutante de delección IKK γ - Δ N97 en células basales de la epidermis da lugar a alteraciones focales en el desarrollo de la epidermis interfolicular, con zonas de hipregranulosis asociadas a un aumento en la expresión de los marcadores de diferenciación K10 y loricrina (Figura 28). Estos resultados sugieren un patrón de expresión del transgén no homogéneo. Es necesario realizar un estudio detallado de la expresión y localización de IKK γ en la epidermis de estos ratones transgénicos. Por otro lado, se ha descrito que la actividad de NF- κ B aumenta durante el proceso de diferenciación epidérmica, con un incremento de la localización nuclear de p65 en las capas suprabasales, con respecto a las basales (Seitz y cols., 1998). Es razonable pensar que la expresión de IKK γ - Δ N97, aunque dirigida al estrato basal, afecte principalmente a los estratos suprabasales, donde la correcta actividad de NF- κ B es necesaria para la diferenciación y senescencia de los queratinocitos. Además, se ha descrito recientemente que la sobreexpresión de IKK α en células procedentes de SCCs altera la expresión de la loricrina (Nakayama y cols., 2005). Los queratinocitos PB transformados con IKK γ - Δ N97, están morfológicamente indiferenciados y, en el modelo *in vivo*, observamos una alteración en el proceso de diferenciación epidérmica. Sin embargo, los queratinocitos basales procedentes de los ratones K5-IKK γ - Δ N97 *ex vivo*, presentan características de queratinocitos diferenciados, aplanados, sin núcleo, y opacos (Figura 30). Es probable que las señales provenientes de la dermis jueguen un papel importante en la compensación de la deficiencia de función de NEMO en la epidermis.

A pesar de que las funciones de IKK α sobre la embriogénesis parecen ser independientes del complejo IKK, los datos obtenidos con las líneas de queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97, sugieren que la delección del extremo N-terminal

de NEMO/IKK γ actúa indirectamente sobre los niveles de IKK α a través de varios mecanismos que coexisten. Una posibilidad es que el descenso en la localización nuclear de p65 causado por IKK γ - Δ N97, conlleve un aumento en los niveles de PTEN, regulando negativamente la comunicación cruzada entre Akt e IKK α (ver mas adelante), afectando a la función de esta última en el desarrollo de la piel. No obstante, es necesario un estudio más detallado para delimitar los efectos del transgén a este respecto. Sin embargo, hemos demostrado que la inhibición parcial de la activación de NF- κ B durante la embriogénesis, altera el desarrollo de la piel y el pelo (Figuras 28 y 29), siendo uno de nuestros objetivos prioritarios el estudio del desarrollo de otros derivados ectodérmicos (dientes, cavidad oral, epitelio corneal y epitelio del párpado) que se encuentran afectados en modelos animales de ED (Smahi y cols., 2002; Cascallana y cols, 2003, 2005). De manera análoga a los animales *nemo*^{+/-} y a las células PB-IKK γ - Δ N97, hemos detectado problemas de adhesión en los queratinocitos basales que expresan la versión truncada de NEMO/IKK γ , probablemente por defectos en las uniones desmosómicas y hemidesmosómicas (Figura 29). Estos datos, en conjunto, indican una función esencial de la subunidad reguladora del complejo IKK en el control de las moléculas de adhesión en queratinocitos.

A pesar de que el mutante de delección IKK γ - Δ N97 ejerce un efecto promotor de la apoptosis basal en la línea celular de queratinocitos de ratón en cultivo PB transfectados de forma estable, los queratinocitos de los ratones transgénicos K5-IKK γ - Δ N97 no exhibían una mayor tasa de apoptosis *in vivo* (no mostrado). Varios grupos de investigación, empleando modelos transgénicos, han certificado que la inhibición selectiva de NF- κ B en piel de ratón (específicamente en las células de la capa basal epidérmica), a través de la sobreexpresión de I κ B α o de la expresión de I κ B α SR (Duffey y cols., 1999; Van Hogerlinden y cols., 1999), así como la delección de IKK β (Pasparakis y cols., 2002), provoca un aumento en la tasa de apoptosis inducida con citoquinas proinflamatorias. En los ratones transgénicos *nemo*^{+/-}, la epidermis presenta un incremento tanto en la proliferación, como en la apoptosis de los queratinocitos, además de una marcada reacción inflamatoria (Makris y cols.,

2000; Schmidt-Supprian y cols., 2000). En nuestro modelo, no hemos encontrado un incremento de la inflamación en ausencia de estímulo. No obstante, los animales K5-IKK γ - Δ N97 presentan una inflamación severa en la piel tras un estímulo pro-inflamatorio tópico, de manera análoga a otros modelos animales de falta de función NF- κ B en epidermis. Nuestro trabajo futuro, se centrará en la caracterización detallada de este proceso en los ratones transgénicos generados, para elucidar las funciones de IKK γ , dependientes e independientes del complejo IKK, en la regulación de la inflamación cutánea.

Se ha descrito que las pieles de los ratones *nemo*^{+/-}, de manera similar a los ratones *ikk α* ^{-/-}, presentan un descenso en las uniones célula-célula, (Hu y cols., 1999; Makris y cols., 2000; Schmidt-Supprian y cols., 2000). En concordancia, los queratinocitos procedentes de los ratones transgénicos K5-IKK γ - Δ N97, también tienen problemas de adhesión en cultivo (*ex vivo*), indicando una función esencial del complejo IKK en la expresión de moléculas de adhesión diana de NF- κ B. Nuestros datos demuestran que los queratinocitos basales de los ratones que expresan altas dosis del dominante negativo de NEMO, fallan en la inducción de la actividad de unión de NF- κ B al ADN tras un estímulo con citoquinas proinflamatorias (Figura 32), aunque la tasa basal se mantiene sin cambios. Esto es análogo a lo que sucedía en los queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97, sugiriendo que los efectos observados en ausencia de estímulo se deben a otros factores, independientes de la actividad transcripcional de NF- κ B, tales como la acumulación de I κ B α o el bloqueo de la localización nuclear de p65, de manera similar a los queratinocitos PB. No obstante, son necesarios estudios más profundos para determinar la causa de las diferencias experimentales observadas.

Consideramos que los ratones transgénicos K5-IKK γ - Δ N97 son una herramienta excepcional para analizar los efectos de la falta de función parcial de NF- κ B en epidermis. Es necesario profundizar en el estudio del fenotipo de estos animales durante el desarrollo, y completar la caracterización analizando la expresión diferencial de genes en la epidermis y otros derivados

ectodérmicos de estos animales, en comparación con individuos no transgénicos. Asimismo, queremos profundizar en la respuesta NF- κ B ante estímulos pro-inflamatorios en la piel de estos ratones, para lograr discernir los efectos de la inhibición parcial de NF- κ B en piel *in vivo*, y elucidar las funciones de NF- κ B dependientes e independientes del complejo IKK en la homeostasis de los queratinocitos, así como en procesos patológicos como el cáncer de piel.

3. Interacción cruzada entre IKK/NF- κ B y PI3K/Akt/PTEN

El proceso de apoptosis es uno de los mecanismos fisiológicos que regula la homeostasis y regeneración de la piel; su control, se considera esencial para el mantenimiento de la integridad de este tejido. Aunque NF- κ B es uno de los principales responsables de la regulación de este proceso en epidermis, existen otras vías de señalización implicadas (Weisfelner y Gottlieb 2003). Entre ellas, se encuentra la vía de PI3K/Akt, que cumple funciones esenciales en el control de la apoptosis y la proliferación en queratinocitos (Segrelles y cols., 2002). Una parte de las funciones anti-apoptóticas de Akt se deben a su cooperación con NF- κ B; además, Akt es necesaria para la inducción de NF- κ B por TNF- α (Ozes y cols., 1999) y suprime la muerte celular estimulando el potencial transactivador de p65 (Madrid y cols., 2000).

Akt es capaz de mediar la activación de NF- κ B en distintos sistemas a través de múltiples mecanismos (Gustin y cols., 2004) por lo que una parte de sus acciones sobre la supervivencia de los queratinocitos, podrían estar mediadas a través de su interacción con la vía de señalización IKK/I κ B/NF- κ B. TNF- α promueve la fosforilación de p65 en el residuo Ser536 mediada por IKK β (Viatour y cols., 2005). Además, a través de la vía PI3K/Akt, la citoquina también es capaz de estimular la fosforilación en el TAD de p65, aunque de una manera dependiente de IKK α (Sizemore y cols., 2002). Los hallazgos de Gustin y colaboradores sugieren que existe una correlación entre aquellos tipos celulares con niveles elevados de IKK α y una mayor sensibilidad en la regulación de la actividad NF- κ B a través de Akt. Los mismos autores muestran que los niveles de PTEN, críticos para determinar la actividad PI3K/Akt, también son determinantes para la interacción cruzada entre Akt y NF- κ B (Gustin y cols., 2004). PTEN regula negativamente la supervivencia celular dependiente de Akt (Stambolic y cols., 1998) y NF- κ B inhibe la apoptosis regulando negativamente a PTEN, de una forma dependiente de la localización nuclear de p65, aunque independientemente de su actividad transcripcional, a

través de un mecanismo de competición por co-activadores transcripcionales como CBP/p300 (Vasudevan y cols., 2004).

Sin embargo, NF- κ B también puede estimular la fosforilación de Akt en algunos sistemas, donde la sobreexpresión de p65 activa Akt aún en ausencia de estímulo, mientras que la sobreexpresión de I κ B α , reduce su fosforilación (Meng y cols., 2002; Meng y D'Mello, 2003). La activación o sobreexpresión de p65 da lugar a la transactivación de genes κ B-dependientes, entre los que se encuentran citoquinas como TNF- α que, una vez liberadas, activan a PI3K. El aumento de la expresión de p65 también conduce a una disminución en los niveles de expresión de PTEN, permitiendo la activación de Akt mediada por PI3K. Por otro lado, la proteína supresora de tumores PTEN, es capaz de bloquear la transactivación de genes dependiente de p65 tras un estímulo con TNF- α de manera independiente de su localización nuclear, a través de la defosforilación de p65 (Mayo y cols., 2002). El complejo IKK constituye un punto central en la regulación de NF- κ B y multitud de estímulos y vías de señalización convergen en él para modular su actividad. Sin embargo, aunque no conocemos en detalle la estequiometría del complejo, su formación y activación probablemente también juegue un papel crítico en la determinación de la interacción entre Akt y NF- κ B (Hayden y Ghosh, 2004). Por estos motivos, para estudiar el papel de la interacción cruzada entre NF- κ B y Akt en nuestro sistema, decidimos estudiar el estado de actividad de Akt (a través de su fosforilación en la serina 473) y los niveles de expresión de PTEN en los queratinocitos que expresaban el dominante negativo de función IKK γ - Δ N97.

Nuestros datos sugieren que el dominante negativo de función IKK γ - Δ N97 interfiere en la interacción entre estas vías de señalización, produciendo, en consecuencia, un incremento de la apoptosis en nuestro sistema. Las células PB-IKK γ - Δ N97, a pesar de mostrar un aumento en la expresión de IKK α y Akt (Figuras 20 y 22), presentan un descenso importante en los niveles de fosforilación de Akt en el residuo Ser473, concomitantemente con un incremento en la expresión de PTEN, aún en ausencia de estímulo (Figuras 22 y 23). Todos los datos sugieren que la inhibición de la localización nuclear de

p65 en los queratinocitos PB-IKK γ - Δ N97, se correlaciona con niveles aumentados de PTEN, disminuyendo la fosforilación de Akt, y bloqueando la fosforilación de p65 a través de la vía Akt/IKK. Podríamos especular que la ausencia de p65 nuclear en nuestro sistema, en condiciones basales, eliminaría la inhibición que ejerce sobre la transcripción de PTEN a través de la competición por CBP/p300, promoviendo su expresión. No podemos descartar que el fenómeno ocurra adicionalmente en la otra dirección, es decir, que el incremento en la expresión de PTEN sea causa directa de la falta de fosforilación de p65, como se describe en otros tipos celulares (Mayo y cols., 2002). El hecho de que estos efectos ocurran aún en ausencia de estímulo, demuestra la importancia fisiológica de la interacción entre PTEN/Akt e IKK/NF- κ B en el mantenimiento de la supervivencia de los queratinocitos.

En conjunto, nuestros datos indican que la interacción cruzada entre Akt y NF- κ B es esencial para la supervivencia de los queratinocitos, incluso en ausencia de estímulos citotóxicos, siendo el complejo IKK, como punto central en la regulación de NF- κ B, mediador en gran medida de esta interacción cruzada. En queratinocitos PB es necesario un equilibrio adecuado en la formación de los complejos IKK para la degradación basal de I κ B α y para la localización nuclear de p65, así como para el control de la expresión de PTEN y, consecuentemente, de la actividad de Akt. A su vez, el incremento de los niveles de PTEN podría ser el responsable del descenso en la fosforilación de p65, ya sea directamente, o a través del eje Akt/IKK.

Hemos resaltado la importancia de Akt y NF- κ B en el mantenimiento de la supervivencia en queratinocitos, así como su implicación en la carcinogénesis epidérmica (Budunova y cols., 1999; Segrelles y cols., 2002). En este trabajo, hemos demostrado que la interacción cruzada entre Akt y NF- κ B a través de IKK γ , resulta esencial para el control de la apoptosis en queratinocitos; por ello, la inhibición de la formación de los complejos IKK se considera un mecanismo eficaz en el diseño de nuevas terapias antitumorales. La inhibición de NF- κ B puede sensibilizar a las células cancerígenas hacia la apoptosis inducida por fármacos quimioterapéuticos. En ese contexto, es

posible especular que la inhibición de Akt/NF- κ B, a través de IKK, sea un mecanismo eficaz que permita la inducción de la muerte celular la progresión tumoral de los queratinocitos.

4. Akt y GSK3 β en la progresión tumoral

En nuestro grupo de investigación, hemos descrito que NF- κ B se encuentra constitutivamente activo durante el proceso de carcinogénesis epidérmica en ratón, lo que confiere a las células tumorales diversas cualidades, como la resistencia a la apoptosis inducida por diversos fármacos quimioterapéuticos (Budunova y cols., 1999). De hecho, la inhibición de esta vía de señalización por diversos métodos, sensibiliza a las células cancerígenas a la apoptosis inducida farmacológicamente, aumentando la eficacia de los tratamientos antitumorales (Chawla-Sarkar y cols., 2003). A este respecto, se están obteniendo buenos resultados en estudios con inhibidores de NF- κ B en el cáncer de próstata en humanos (Muenchen y cols., 2002; Shukla y Gupta, 2004).

En estudios previos, nuestro grupo ha demostrado que PI3K, Akt y NF- κ B se activan de una manera secuencial durante el proceso de carcinogénesis química en la piel de ratón, destacando la importancia de Akt en la tumorigénesis epidérmica, la cual ejerce funciones principales en la estimulación de la proliferación y supervivencia de los queratinocitos (Budunova y cols., 1999; Segrelles y cols., 2002). Además, hemos visto que parte de los efectos anti-apoptóticos de Akt, se basan en su interacción con NF- κ B aunque, los efectos que ejerce esta interacción sobre la proliferación de los queratinocitos, se consideran un tema controvertido. La quinasa GSK3 β , una molécula implicada en el control de la proliferación y la apoptosis, puede ser inactivada mediante fosforilación en el residuo Ser9 a través de Akt (Shaw y cols., 1997; Van Weeren y col, 1998; Chen y cols., 2001) y se ha demostrado que la fosforilación en la Tyr216, es necesaria para su actividad (Hugues y cols., 1993). La importancia de la actividad de GSK3 β en el proceso de carcinogénesis radica en que, a través de la vía de Wnt/ β -catenina/TCF, modula negativamente la expresión de c-myc y CycD1, dos moléculas de especial relevancia durante el desarrollo tumoral; de ahí que GSK3 β haya sido propuesta como una proteína supresora de tumores (Kim y Kimmel, 2000). De hecho, la regulación de la vía de Wnt y GSK3 β , resulta de gran importancia

durante la carcinogénesis en distintos epitelios, especialmente en el colon (Polakis, 2000).

CycD1 es una proteína esencial para el desarrollo tumoral en la piel de ratón, elevándose sus niveles ya en las primeras etapas de este proceso (Rodríguez-Puebla y cols., 1999). La regulación de esta ciclina se produce a través de un único lugar de unión TCF en su promotor, coordinándose el proceso a través de diversas vías de señalización que a su vez regulan la ruta de β -catenina/TCF. Se ha demostrado recientemente que IKK α es necesaria para la expresión de CycD1 vía TCF. A este respecto, se ha descrito que la inducción por mitógenos de la expresión de CycD1, es dependiente de PI3K, pero también de IKK α (Albanese y cols., 2003), indicando que la comunicación entre Akt e IKK es un mecanismo importante en el desarrollo de la respuesta proliferativa y apoptótica de los queratinocitos. Así, esta conexión emerge como una posible diana terapéutica en el tratamiento de los tumores de origen epidérmico. También se ha descrito que la vía PI3K/Akt/IKK α puede regular la transcripción génica dependiente de β -catenina, y que una señalización aberrante del eje Akt/IKK α , puede regular e integrar NF- κ B y β -catenina para facilitar la progresión tumoral, controlando la expresión de genes implicados en anti-apoptosis, proliferación, angiogénesis y metástasis (Aggarwal y cols., 2004). Por otro lado, GSK3 β es capaz de fosforilar a CycD1, provocando su salida del núcleo y su degradación por la vía del proteosoma (Diehl y cols., 1998; Alt y cols., 2000). Por estos motivos, unido al hecho del desconocimiento de la localización y actividad de GSK3 β durante la carcinogénesis epidérmica, decidimos estudiar su expresión, su localización y su actividad durante este proceso.

Empleando el modelo de carcinogénesis química en dos fases en la piel de ratón encontramos que, durante las primeras etapas de promoción, la actividad relativa de GSK3 β aumentaba, debido probablemente a un mayor nivel de fosforilación en el residuo Tyr216. Comprobamos también que el posterior aumento de la actividad quinasa de Akt, se correspondía con un incremento significativo de la fosforilación inhibitoria en la Ser9 de GSK3 β , así

como con un descenso de la fosforilación en el residuo Tyr216 (Figuras 33-34). No obstante, hemos visto que otras quinasas susceptibles de inactivar GSK3 β , como ERK e ILK, también aumentan su actividad durante la progresión tumoral (Segrelles y cols., 2002), por lo que es difícil justificar el descenso de la actividad de GSK3 β únicamente por el incremento de la actividad de Akt. Nuestros datos indican que, durante las últimas fases de la progresión tumoral, GSK3 β es inactivada tanto por procesos de fosforilación en el residuo Ser9, como mediante defosforilación en el residuo Tyr216. Sin embargo, el incremento de la actividad de GSK3 β durante las primeras fases de la carcinogénesis epidérmica, parece estar controlado por un incremento de la fosforilación en el residuo Tyr216, relativo a los niveles de proteína. El estudio de los tumores generados mediante el protocolo de carcinogénesis química, también reveló que el aumento de GSK3 β -Ser9, y el consiguiente descenso de la actividad de GSK3 β en los SCCs, estaba relacionado con un incremento en la localización nuclear de CycD1 (Figura 35; Diehl y cols., 1999; Alt y cols., 2000). En conjunto, estos datos sugieren que el incremento en la actividad de GSK3 β durante las primeras fases de la carcinogénesis epidérmica, puede ejercer un mecanismo de control del desarrollo tumoral a través de la regulación negativa de CycD1, mecanismo que se pierde cuando el aumento de la actividad Akt, a partir de la segunda mitad de la promoción, inactiva a GSK3 β . Hay que destacar que la actividad quinasa de GSK3 β , al igual que sucede en los tumores de colon (Sparks y cols., 1998), no se pierde completamente ni en los papilomas tardíos ni en los SCCs (Figura 33), probablemente debido a un aumento en los niveles de expresión de la quinasa, indicando que una actividad basal de GSK3 β es imprescindible para el mantenimiento de la supervivencia celular (Polakis, 2000).

Los queratinocitos PB son poco tumorigénicos por inyección subcutánea en ratones *nu/nu* (Yuspa y cols., 1986). Para discriminar el efecto de Akt sobre GSK3 β durante la carcinogénesis epidérmica, generamos tumores mediante inyección subcutánea de queratinocitos PB transformados con Akt, los cuales hemos demostrado anteriormente que tienen una mayor capacidad tumorigénica, debido a un elevado potencial proliferativo, concomitantemente

con un descenso en la apoptosis y la diferenciación (Segrelles y cols., 2002). En este sistema, encontramos que el aumento de la actividad quinasa de Akt se correspondía con un aumento importante de la fosforilación de GSK3 β en el residuo Ser9, así como con un marcado descenso en su actividad, sin que esto repercutiera sobre la cantidad total de GSK3 β ni sobre su fosforilación en el residuo Tyr216 (Figuras 36-37). Estos resultados sugieren que la quinasa Akt es la responsable, al menos en parte, de la inactivación de GSK3 β durante el proceso de carcinogénesis epidérmica. Por otro lado, el análisis de los tumores generados por inyección de queratinocitos PB-Akt, con niveles elevados de GSK3 β -Ser9, reveló que una menor actividad quinasa GSK3 β , se relacionaba de nuevo con una mayor localización nuclear de CycD1 (Figura 38), por lo que la inactivación de GSK3 β mediada por Akt, es responsable, al menos en parte, de la acumulación nuclear de CycD1 en estos tumores.

Así, Akt contribuye a la progresión tumoral, permitiendo un incremento de la localización nuclear de CycD1 a través de la inhibición de GSK3 β . Sin embargo, una actividad basal de GSK3 β también es esencial para la supervivencia celular, por lo que la inhibición por Akt no llega a superar ciertos niveles que podrían ser perjudiciales para la célula. Si se elimina GSK3 β completamente, se incrementa la apoptosis mediada por TNF- α , a través de la vía NF- κ B. Los ratones transgénicos *gsk3 β ^{-/-}*, mueren durante el desarrollo embrionario con un fenotipo de apoptosis hepática similar al de los animales *p65^{-/-}*, *ikkb^{-/-}*, y *nemo/ikky^{-/-}* (Hoeftlich y cols., 2000). Posteriormente se describió que los MEFs defectivos en GSK3 β , tenían un bloqueo en la activación de NF- κ B y Akt (Takada y cols., 2004b), y se ha sugerido que GSK3 β participa en la activación de NF- κ B a través de la vía TNF- α en los hepatocitos, mediante la fosforilación de p65, en dos residuos diferentes de la Ser536. (Schwabe y Brenner, 2002). Los datos sugieren que la inhibición de GSK3 β por Akt contribuye a la tumorigénesis epidérmica regulando positivamente la CycD1, al mismo tiempo que es necesaria una actividad basal de GSK3 β para suprimir la apoptosis mediada por TNF- α , a pesar de la activación constitutiva de Akt y NF- κ B.

5. El receptor de glucocorticoides (GR) interfiere con las vías de señalización PI3K/Akt e IKK/NF- κ B en la epidermis

Hemos visto que las vías de PI3K/Akt y NF- κ B, y las interacciones entre ellas, tienen gran importancia en la regulación de la supervivencia celular, proliferación y diferenciación en queratinocitos. Además, ambas cooperan durante la carcinogénesis epidérmica para dotar a las células tumorales de algunas de sus características. Teniendo en cuenta la elevada prevalencia del cáncer de piel en nuestra sociedad, cobra un gran interés el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a estas interacciones, y la manera de poder intervenir en ellos con fines terapéuticos. Trabajos previos de nuestro grupo de investigación, han resaltado la importancia de GR como un potente inhibidor de la carcinogénesis epidérmica (Pérez y cols., 2001; Budunova y cols., 2003), siendo necesario profundizar en los mecanismos que ejerce el receptor durante este proceso patológico, con el fin de diseñar fármacos más específicos, más potentes y con menores efectos colaterales. Los GCs son los mayores mediadores de la anti-proliferación conocidos en la epidermis, aunque se desconocen en detalle los mecanismos moleculares que median su acción.

5.1. GR interfiere con PI3K/Akt

Una parte de los efectos anti-inflamatorios que los GCs ejercen a través del factor de transcripción GR, se deben a mecanismos independientes de su unión al ADN que, además, son los responsables de los efectos rápidos de los GCs (Losel y Wehling, 2003). Entre estos mecanismos no genómicos, se encuentra la interferencia de GR con la vía de señalización, PI3K/Akt (Hafezi-Moghadam y cols., 2002; Limbourg y cols., 2002). También se han descrito acciones no-genómicas de otras hormonas vitales, que actúan a través de receptores nucleares y cuyos análogos se utilizan habitualmente como tratamiento anti-inflamatorio y anti-tumoral: GCs, estrógenos, vit D, retinoides (McKay y Cidlowsky, 1999).

PI3K, compuesta por las subunidades catalíticas p110 α y β , y la subunidad reguladora p85, juega un papel importante en la regulación del ciclo celular, diferenciación, supervivencia, angiogénesis, invasión y metástasis (Roymans y Slegers, 2001). Se han detectado mutaciones de p85 en algunos tipos de cáncer humanos, donde también son frecuentes las mutaciones de pérdida de función de la proteína supresora de tumores PTEN, principal inhibidora de PI3K (Vivanco y Sawyers, 2002). No conocemos en detalle los mecanismos de activación de PI3K, pero sabemos que se generan productos intermedios como PIP₃, que atraen diversas proteínas hacia la membrana celular, donde son activadas, mientras que la fosfatasa PTEN inhibe estos productos intermedios, bloqueando los efectos de PI3K (Cantley, 2002). Muchos de los efectos biológicos de PI3K están mediados por Akt, y durante el proceso de carcinogénesis química en la piel de ratón, se produce una activación secuencial de estas dos quinasas (Segrelles y cols., 2002). Nos propusimos estudiar si GR y PI3K/Akt interferían fisiológicamente en la piel normal y durante el proceso de carcinogénesis epidérmica.

Nuestros datos sugieren que parte de los efectos antitumorales de los GCs en la piel, pueden estar mediados por la inhibición de la actividad quinasa PI3K/Akt (Figuras 43 y 44). Hemos comprobado mediante ensayos de Co-IP, que la activación del receptor por ligando favorece la formación de complejos GR/p85 α en queratinocitos PB, y que la mera sobreexpresión de GR en epidermis in vivo, también se corresponde con un incremento de la asociación entre GR y p85 α (Figuras 40 y 46). Además, tanto en queratinocitos PB en cultivo, como en la piel de los ratones transgénicos K5-GR, esta asociación se correspondía con un descenso en los niveles de fosforilación de Akt (Figuras 41-42 y 47-48). Asimismo, la rápida cinética de este efecto sugiere que se produce a través de acciones no genómicas de GR, y hemos demostrado que, además de ser dependiente de ligando, el efecto sobre la fosforilación de Akt, también es dependiente de la dosis de GCs administrada (Figuras 41 y 48).

La dosis terapéutica de los corticosteroides depende de cada tipo celular, debido probablemente a diferencias en sus mecanismos de acción (Limbourg y cols., 2002). Así, en algunos sistemas, una dosis farmacológica de corticosteroides, estimula la actividad de PI3K a través de la asociación del receptor hormonal con la subunidad $p85\alpha$ (Hafezi-Moghadam y cols., 2002), mientras que cuando se emplean dosis superiores a las fisiológicas de Dex, los niveles de Akt fosforilado no se ven alterados (Hafezi-Moghadam y cols., 2002; Limbourg y cols., 2002). En este trabajo, hemos demostrado que el uso de dosis fisiológicas de Dex en la piel de ratón *in vivo*, reduce tanto los niveles de fosforilación de Akt, como su actividad, a través de la asociación de GR con $p85\alpha$; este efecto puede ser revertido con el uso del antagonista RU486, demostrando ser un efecto dependiente de la unión de GR con su ligando (Figuras 42 y 28). Cuando analizamos los efectos de la administración de dosis altas de Dex ($40\mu\text{g}$), no observamos diferencias en los niveles de fosforilación de Akt, cuando los comparamos con pieles sin tratar (no mostrado), indicando la especificidad de una dosis terapéutica de GCs sobre estos efectos.

Además, nuestros datos sugieren que la interferencia observada entre GR y PI3K/Akt con dosis bajas de Dex, depende de factores específicos de tejido. Así, en el músculo esquelético, la Dex bloquea la fosforilación de Akt inducida por IGF-1, a través de un mecanismo transcripcional que supone un incremento en los niveles de $p85$ (Singleton y cols., 2000). El exceso de $p85$ compite con los dímeros $p85/p110$ (PI3K) por su unión con el sustrato del receptor de IGF, retrasando de esta forma la activación de PI3K (Yudt y Cidlowski, 2002). Sin embargo, en nuestro estudio no hemos observado este incremento en los niveles de $p85$ tras la administración de la Dex. También hemos demostrado que la asociación entre GR y PI3K es fisiológica en nuestro sistema, ya que se produce no solo mediante la expresión forzada de GR en la piel (K5-GR) y en los queratinocitos (PB-GR), sino también tras la administración de dosis fisiológicas de GCs en ratones wt. Además, como sugería la cinética de este efecto, hemos comprobado que la regulación de GR activado por su ligando, sobre la vía de PI3K/Akt, es independiente de la

actividad transcripcional del receptor, ya que tanto el inhibidor transcripcional ActD, como el mutante de GR defectivo transcripcional (GR-LS7), no evitan los efectos de la Dex sobre la actividad de PI3K, ni sobre la fosforilación de Akt (Figura 41; Hafezi-Moghadam y cols., 2002; Limbourg y cols., 2002).

5.2. GR altera la actividad IKK/NF- κ B

Akt puede activar a NF- κ B (Kane y cols., 1999) y NF- κ B está constitutivamente activo durante la segunda mitad del proceso de carcinogénesis epidérmica (Budunova y cols., 1999). En nuestro grupo de investigación, hemos demostrado recientemente, basándonos en un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa GR en la epidermis (K5-GR), que GR ejerce un papel supresor de tumores en este tejido, en parte a través de su interferencia con NF- κ B (Budunova y cols., 2003). La activación de NF- κ B por Akt se realiza a través de distintos mecanismos, tales como la activación del complejo IKK -con la consecuente degradación de I κ B α y la translocación nuclear de NF- κ B (Madrid y cols., 2001)- y la fosforilación directa de Akt de las subunidades p50 y p65 (Sizemore y cols., 2002). Nuestros datos indican que la interferencia de GR con PI3K/Akt en la piel de ratón, conlleva un descenso en la actividad del complejo IKK debido, al menos en parte, a un descenso en los niveles de IKK γ , acompañado de una disminución en la actividad de la unión de NF- κ B al ADN (Figuras 49-51). De manera análoga, nuestro grupo también ha descrito que los ratones transgénicos K5-K10, de modo semejante a los K5-GR, son resistentes a la carcinogénesis epidérmica, mostrando una activación defectuosa de Akt, lo que lleva a un descenso en la señalización de la vía NF- κ B. Esta disminución se produce, en parte, por un descenso en los niveles de las subunidades IKK β e IKK γ del complejo IKK (Santos y cols., 2003). Consideramos importante comentar que los ratones deficientes en TNF α tampoco responden a la inducción de la tumorigénesis cutánea (Moore y cols., 1999), destacando la importancia de esta citoquina, especialmente de sus efectos mediados por NF- κ B y PI3K, en el cáncer de piel. Los mecanismos de autorregulación de un sistema tan importante para la supervivencia celular

como NF- κ B, son muy complejos, como refleja el hecho de que el principal inhibidor de la actividad NF- κ B, I κ B α , se induzca transcripcionalmente por NF- κ B. En queratinocitos humanos, el tratamiento con TNF- α induce la transcripción de genes que codifican para proteínas de la vía NF- κ B e I κ B. Esta regulación tiene un impacto biomédico, puesto que TNF- α regula numerosos genes implicados tanto en la inflamación (citoquinas, quimioquinas,...) como en la resolución de la inflamación (inhibidores de proteasas, factores de coagulación, cicatrización...) (Banno y cols., 2005). Dado que actualmente se están realizando diversas terapias que utilizan anti-TNF- α para el tratamiento de algunas patologías cutáneas, como la psoriasis, es crucial precisar cuáles son los genes diana regulados por esta citoquina. En este sentido, el hecho de que entre los genes diana de la acción de TNF- α se encuentren genes que participan en el proceso de cicatrización, hace predecir que uno de los efectos secundarios de dichas terapias pueda derivar en problemas en el proceso de cicatrización.

GR y NF- κ B son funcionalmente antagónicos y se han descrito numerosos mecanismos de interferencia mutua, que incluyen la interacción física directa, la competición por cofactores transcripcionales y la regulación transcripcional de moléculas reguladoras (De Bosscher y cols., 2003). No todos los mecanismos propuestos tienen el mismo peso específico en cada tipo celular. En conjunto, los resultados sugieren que, en queratinocitos, la comunicación entre Akt y NF- κ B, a través del complejo IKK, resulta de vital importancia para la proliferación y el mantenimiento de la supervivencia celular, especialmente durante la carcinogénesis epidérmica; de hecho, una parte de los efectos antitumorales de los GCs en la epidermis se basan en la interacción negativa entre GR y NF- κ B, mediados a nivel no transcripcional por su interferencia con PI3K/Akt. No obstante, los resultados indican que GR interfiere con NF- κ B a distintos niveles y a través de múltiples mecanismos en los queratinocitos, no solo a través de PI3K/Akt.

De acuerdo con nuestras observaciones, otros grupos de investigación han descrito que algunos fármacos con actividad anticancerígena en la piel,

median sus efectos a través de la inhibición de PI3K/Akt y NF- κ B (Saleem y cols., 2004). Los mecanismos en los que se basan estas interacciones son específicos del tipo celular. Sin embargo, la observación de que en numerosos tumores sólidos NF- κ B está constitutivamente activo, está llevando al desarrollo de numerosas estrategias de inhibición de este factor de transcripción en distintos sistemas, como el cáncer de próstata, donde se ha comprobado que la inhibición de NF- κ B sensibiliza a las células tumorales frente a la apoptosis quimioterapéutica (Shukla y Gupta, 2004).

Los efectos de los GCs sobre la tumorigénesis, son también dependientes del tipo celular (Yudt y Cidlowski, 2002), ejerciendo efectos antitumorales en varios sistemas. Así, en gliomas de rata, el tratamiento con GCs desemboca en una pérdida del potencial tumorigénico de las células cancerosas, a lo que sigue una completa reversión del fenotipo; de hecho, el tratamiento con Dex es ya un procedimiento habitual en los pacientes humanos con glioma (Vedoy y Sogayar, 2002; Benedetti y cols., 2003). En el cáncer de próstata, los GCs potencian el efecto antitumoral de la vitamina D, a través de mecanismos que incluyen la reducción de la fosforilación de Akt, y ya se está comenzando a emplear un tratamiento combinado en ensayos clínicos sobre pacientes humanos con esta patología (Johnson y cols., 2002; Fakih y cols., 2002). Los GCs son inhibidores eficientes de la progresión tumoral en piel, si son aplicados de forma temprana durante las primeras etapas de la promoción (Ahluwalia 1998). Nuestros experimentos han resaltado la importancia de la interferencia entre GR y PI3K/Akt durante este proceso, ya que GR contrarresta los efectos proliferativos de Akt en los queratinocitos. Por ello, la inhibición de la interacción cruzada entre Akt y NF- κ B, de enorme importancia para la determinación de la proliferación y la apoptosis en queratinocitos, puede ser un mecanismo eficiente para aumentar la eficacia de los tratamientos antineoplásicos.

1. IKK γ - Δ N97 actúa como un dominante negativo de la función NF- κ B en los queratinocitos, produciendo una acumulación de la proteína inhibidora I κ B α y bloqueando la localización nuclear de p65. Tras un estímulo con TNF- α , IKK γ - Δ N97 bloquea de forma efectiva la fosforilación de I κ B α e impide la fosforilación de p65 en el residuo Ser-536, dando como resultado una inhibición parcial y dependiente de dosis, de la actividad NF- κ B inducible.

2. La expresión estable de IKK γ - Δ N97 en los queratinocitos origina graves alteraciones morfológicas, además de provocar en ellos un incremento importante en la tasa basal de apoptosis y un retraso en su cinética de crecimiento.

3. El desacoplamiento en la formación del complejo IKK inducido por IKK γ - Δ N97 da lugar a un descenso de la fosforilación de Akt, regula positivamente los niveles de PTEN y bloquea la fosforilación de p65, demostrando la importancia fisiológica de la interacción cruzada entre IKK/NF- κ B y PI3K/Akt en el mantenimiento de la supervivencia de los queratinocitos.

4. La expresión de IKK γ - Δ N97 en piel de ratón *in vivo*, origina un retraso en la morfogénesis folicular e interfiere en la regulación del proceso inflamatorio cutáneo. Los resultados también indican que el mutante negativo de función de IKK γ puede producir alteraciones focales de la diferenciación epidérmica.

5. Akt contribuye a la progresión tumoral de los queratinocitos a través de la inhibición parcial de GSK3 β , permitiendo la localización nuclear de CycD1 mediante diversos mecanismos que aumentan la expresión y estabilidad de la ciclina. Además, esta inhibición de GSK3 β durante la carcinogénesis epidérmica no llega a bloquear la actividad basal de la quinasa, esencial para la supervivencia celular.

6. La asociación entre GR y la subunidad reguladora p85 α del complejo PI3K es fisiológica en la epidermis de ratón, siendo dependiente de la unión de GR con su ligando e independiente de la actividad transcripcional del receptor. La interferencia de GR con PI3K/Akt en la piel de ratón reduce la actividad PI3K, disminuye tanto los niveles de fosforilación de Akt como su actividad y conlleva un descenso en la actividad del complejo IKK y de la actividad de unión de NF- κ B al ADN debido, al menos en parte, a un descenso en los niveles de IKK γ .
7. La interferencia entre GR y la vía de señalización PI3K/Akt inhibe significativamente la tumorigénesis de piel inducida por Akt en un modelo de tumorigénesis *in vivo*.

Ahluwalia, A. 1998. **Topical Glucocorticoids and the Skin-mechanisms of Action: an Update.** Mediators Inflamm 7:183-193.

Aggarwal, B. 2003. **Signalling Pathways of the TNF-Superfamily: A double-edged sword.** Nat Rev Immunol 3:745-756.

Aggarwal B. 2004 **Nuclear Factor-kappaB: the Enemy Within.** Cancer Cell 6(3):203-8.

Agou, F.; Traincard, F.; Vinolo, E.; Coirois, G.; Yamaoka, S.; Israël, A. and Veron, M. 2004. **The Trimerization Domain of NEMO is comprised of the Interacting C-terminal CC-2 and LZ coiled-coil subdomains.** J Biol Chem 279:27861-27869.

Albanese, C.; Kongming, W.; D'Amico, M.; Jarrett, C.; Joyce, D.; Hugues, J.; Hult, J.; Sakamaki, T.; Fu, M.; Ben-Ze'ev, A.; Bromberg, J.; Lamberti, C.; Verma, U.; Gaynor, R., Byers, S. and Pestell, R. 2003. **IKK α Regulates Mitogenic Signaling Through Transcriptional Induction of Cyclin D1 via Tcf.** Mol Biol Cell 14:585-599.

Alcamo, E.; Mizgerd, J.; Horwitz, B.; Bronson, R.; Beg, A.; Scott, M.; Doerschuk, C.; Hynes, R. and Baltimore, D. 2001. **Targeted Mutation of TNF receptor I rescues the Rel-A Deficient Mouse and Reveals a Critical Role for NF- κ B in Leukocyte Recruitment.** J Immunol 167:1592-1600.

Alt, J.; Cleveland, J.; Hannink, M. and Diehl, J. 2000. **Phosphorylation-dependent Regulation of Cyclin D1 nuclear export and Cyclin D1-dependent Cellular Transformation.** Genes Dev 14:3102-3114.

Angel JM, DiGiovanni J. 1999. **Genetics of Skin Tumor Promotion.** Prog Exp Tumor Res 35:143-57.

Ausubel, F.; Brent, R.; Kingston, R.; Moore, D.; Seidman, J.; Smith, J. and Struhl, K. 1987. In **Current Protocols in Molecular Biology**. Edited by Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School.

Balmain, A.; Ramsden, M.; Bowden, G. and Smith, J. 1984. **Activation of the Mouse Cellular Harvey-ras Gene in Chemically Induced Benign Skin Papillomas**. Nature 307(5952):658-660.

Banno, T.; Gazel, A. and Blumenberg, M. 2005. **Pathway-Specific Profiling Identifies the NF- κ B-Dependent TNF- α -Regulated Genes in Epidermal Keratinocytes**. JBC in press.

Basile, J.; Eichten, A.; Zacny, V. and Munger, K. 2003. **NF- κ B-Mediated Induction of p21^{Cip1/Waf1} by Tumor Necrosis Factor α Induces Growth Arrest and Cytoprotection in Normal Human Keratinocytes**. Mol Cancer Res 1:262-270.

Beato, M.; Herrlich, P. and Schutz, G. 1995. **Steroid Hormone Receptors: Many Actors in Search of a Plot**. Cell 83:851-857.

Beg, A.; Sha, W.; Bronson, R.; Ghosh, S. and Baltimore, D. 1995a. **Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B**. Nature 376(6536):167-170.

Beg, A.; Sha, W.; Bronson, R. and Baltimore, D. 1995b. **Constitutive NF-kappa B Activation, Enhanced Granulopoiesis, and Neonatal Lethality in I kappa B alpha-Deficient Mice**. Genes Dev 9(22):2736-46.

Behrens, J. 2000. **Control of beta-Catenin Signaling in Tumor Development**. Ann N Y Acad Sci 910:21-33.

Bell, S.; Degitz, K.; Quirling, M.; Jilg, N.; Page, S. and Brand, K. 2002. **Involvement of NF-kappaB Signalling in Skin Physiology and Disease**. Cell Signal 15(1):1-7.

Benedetti, S.; Pirola, B.; Poliani, P.; Cajola, L.; Pollo, B.; Bagnati, R.; Magrassi, L.; Tunici, P. and Finocchiaro, G. 2003. **Dexamethasone Inhibits the Anti-Tumor Effect of Interleukin 4 on rat experimental gliomas.** Gene Ther 10(2):188-92.

Ben-Neriah, Y. 2002. **Regulatory Functions of Ubiquitination in the Immune System.** Nat Immunol 3(1):20-26.

Berlin, A; Paller, A. and Chan, L. 2002. **Incontinentia pigmenti: a review and update on the molecular basis of pathophysiology.** J Am Acad Dermatol 47(2):169-187.

Bernard, D.; Gosselin, K.; Monte, D.; Vercamer, C.; Bouali, F.; Pourtier, A.; Vandenbunder, B. and Abbadie, C. 2004. **Involvement of Rel/Nuclear Factor- κ B Transcription Factors in Keratinocyte Senescence.** Cancer Res 64:472-481.

Bohuslav, J.; Chen, L.; Kwonk, H.; Mu, Y. and Greene, W. 2004. **p53 Induces NF- κ B Activation by an IkappaB Kinase-Independent Mechanism involving Phosphorylation of p65 by Ribosomal S6 Kinase 1.** J Biol Chem. 279(25):26115-26125

Bonizzi, G. and Karin, M. 2004. **The Two NF- κ B Activation Pathways and their Role in Innate and Adaptative Immunity.** Trends Immunol 25:280-288.

Budunova, I.; Pérez, P.; Vaden, V.; Spiegelman, V.; Slaga, T. and Jorcano, J. 1999. **Increased Expression of p50-NF- κ B and Constitutive Activation of NF- κ B Transcription Factors During Mouse Skin Carcinogenesis.** Oncogene 18:7423-7431.

Budunova, I.; Kowalczyk, D.; Pérez, P.; Yao, Y.; Jorcano, J. and Slaga, T. 2003. **Glucocorticoid Receptor Functions as a Potent Suppressor of Mouse Skin Carcinogenesis**. *Oncogene* 22(21):3279-3287.

Byrne, C.; Tainsky, M. and Fuchs, E. 1994. **Programming Gene Expression in Developing Epidermis**. *Development* 120:2369-2383.

Byrne, C. and Hardman, M. 2002. **Integumentary Structures**. In: *Mouse Development: patterning, morphogenesis and organogenesis*. Ed. Rossant, J., Tam, P. L. Academic Press, cop. San Diego, pp. 567-589.

Cantley, L. 2002. **The Phosphoinositide 3-kinase Pathway**. *Science* 296(5573):1655-1657.

Cao, Y.; Bonizzi, G.; Seagroves, T.; Greten, F.; Johnson, R.; Schmidt, E. and Karin, M. 2001. **IKK α Provides an Essential Link Between RANK Signaling and Cyclin D1 Expression During Mammary Gland Development**. *Cell* 107(6):763-775.

Cascallana, J.; Bravo, A.; Page, A.; Budunova, I.; Slaga, T.; Jorcano, J. and Perez, P. 2003. **Disruption of Eyelid and Cornea Development by Targeted Overexpression of the Glucocorticoid Receptor**. *Int J Dev Biol* 47(1):59-64.

Cascallana, J.; Bravo, A.; Donet, E.; Leis, H.; Lara, M.; Paramio, J.; Jorcano, J. and Perez, P. 2005. **Ectoderm-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor induces hypohidrotic ectodermal dysplasia**. *Endocrinology*, en prensa.

Chawla-Sarkar, M.; Bauer, J.; Lupica, J.; Morrison, B.; Tang, Z.; Oates, R.; Almasan, A.; DiDonato, J.; Borden, E. and Lindner, D. 2003. **Suppression of NF-kappa B Survival Signaling by Nitrosylcobalamin Sensitizes Neoplasms to the Anti-Tumor Effects of Apo2L/TRAIL**. *J Biol Chem* 278(41):39461-39469

Chen, M and Okayama, H. 1987. **High Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA**. Mol Cell Biol 7:2745-2752.

Chen, Z.; Parent, L. and Maniatis, T. 1996. **Site-specific Phosphorilation of I κ B α by a Novel Ubiquitination-Dependent Protein Kinase Activity**. Cell 84:853-862.

Chen, E.; Mazure, N.; Cooper, J. and Giaccia, A. 2001. **Hypoxia Activates a Plateled-derived Growth Factor Receptor/Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway that Results in Glycogen Syntase Kinase-3 Inactivation**. Cancer Res 61:2429-2433

Chen, G. Cao, P. and Goeddel, D. 2002. **TNF-induced Recruitment and Activation of the IKK complex Require Cdc37 and Hsp90**. Mol Cell 9:401-410.

Cheng, J.; Ryseck, R.; Attar, R.; Dambach, D. and Bravo, R. 1998. **Functional redundancy of the nuclear factor kappa B inhibitors I kappa B alpha and I kappa B beta**. J Exp Med 188(6):1055-1062.

Cole, A.; Frame, S. and Cohen, P. 2004. **Further Evidence that the Tyrosine Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) in Mammalian Cells is an Autophosphorylation Event**. Biochem J 277:249-255.

Colosimo, A.; Goncz, K.; Holmes, A.; Kunzelmann, K.; Novelli, G.; Malone, R.; Bennett, M. and Gruenert, D. 2000. **Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells**. Biotechniques 29(2):314-8, 320-2, 324.

Conti, C. 1984. **The Mouse Skin as a Model for Chemical Carcinogenesis**. In Handbook of mouse mutations with skin abnormalities, J.P. Sundberg (Ed). CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Cross, D.; Watt, P.; Shaw, M.; van der Kaay, J.; Downes, C.; Holder, J. and Cohen, P. 1995. **Insulin activates protein kinase B, inhibits glycogen synthase kinase-3 and activates glycogen synthase by rapamycin-insensitive pathways in skeletal muscle and adipose tissue.** FEBS Lett 406(1-2):211-215.

Danning, C.; Illei, G.; Hitchon, C.; Greer, M., Boumpas, D. and McInnes, I. 2000. **Macrophage-Derived Cytokine and Nuclear Factor kappaB p65 Expression in Synovial Membrane and Skin of Patients with Psoriatic Arthritis..** Arthritis Rheum 43:1244-1256.

Datta, S.; Brunet, A. and Greenberg, M 1999. **Cellular Survival: a Play in Three Akts.** Genes Dev 13:2905-2927.

Davidson, P. and Hardy, M. 1952. **The Development of Mouse Vibrissae in Vivo and in Vitro.** J Anat 86:342-356.

De Bosscher, K.; Vaden Berghe, W. and Haegeman, G. 2003. **The Interplay Between the Glucocorticoid Receptor and Nuclear Factor- κ B or Activator Protein-1: Molecular Mechanisms for Gene Represión.** Endocrine rews 24(4):488-522.

Delhase, M.; Hayakawa, M.; Chen, Y. and Karin, M. 1999. **Positive and Negative Regulation of κ B kinase Activity through IKK β subunit Phosphorylation.** Science 284:309-313.

Devin, A.; Cook, A.; Lin, Y.; Rodriguez, Y.; Kelliher, M. and Liu, Z. 2000. **The Distinct Roles of TRAF2 and RIP in IKK Activation by TNF-R1: TRAF2 Recruits IKK to TNF-R1 while RIP Mediates IKK Activation.** Immunity 12:419-429.

Devin, A.; Lin, Y.; Yamaoka, S.; Li, Z.; Karin, M. and Liu, Z. 2001. **The α and β Subunits of κ B kinase (IKK) Mediate TRAF2-Dependent IKK Recruitment**

to Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor 1 in Response to TNF. Mol Cell Biol 31:3986-3994.

DiDonato, J.; Hayakawa, M.; Rothwarf, D.; Zandi, E. and Karin, M. 1997. **A Cytokine-Responsive I κ B kinase that Activates the Transcription Factor NF- κ B.** Nature 388:548-554.

Diehl, J.; Cheng, M.; Roussel, M. and Sherr, C. 1998. **Glycogen Synthase Kinase-3 β Regulates Cyclin D1 Proteolysis and Subcellular Localization.** Genes Dev 12:34499-34511.

Doble, D. and Woodgett, J. 2003. **GSK3: Tricks of the Trade for a Multi-Tasking Kinase.** J Cell Sci 116:1175-1186.

Döffinger, R.; Smahi, A.; Bessia, C.; Geissmann, F.; Feinberg, J.; Durandy, A.; Bodemer, C.; Kenwrick, S.; Dupuis-Girod, S.; Blanche, S.; Wood, P.; Rabia, S.; Headon, D.; Overbeek, P.; Le Deist, F.; Holland, S.; Velan, K.; Kumararatne, D.; Fischer, A.; Shapiro, R.; Conley, M.; Reimund, E.; Kalhoff, H.; Abinun, M.; Munich, A.; Israel, A.; Courtois, G. and Casanova, J. 2001. **X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling.** Nat Genet 27(3):277-285.

Doi, T.; Marino, M.; Takahashi, T.; Yoshida, T.; Sakakura, T.; Old, L. and Obata, Y. 1999. **Absence of Tumor Necrosis Factor Rescues Rel-A Deficient Mice from Embryonic Lethality.** Proc Natl Acad Sci 96:2994-2999.

Duffey, D.; Chen, Z.; Dong, G.; Ondrey, F.; Wolf, J.; Brown, K.; Siebenlist, U. and Van Waes, C. 1999. **Expression of a Dominant-Negative Mutant Inhibitor-kappaB α of Nuclear Factor-kappaB in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Inhibits Survival, Proinflammatory Cytokine Expression, and Tumor Growth in Vivo.** Cancer Res 59(14):3468-74.

Duran, A.; Diaz-Meco, M. and Moscat, J. 2003. **Essential Role of RelA Ser311 Phosphorylation by zetaPKC in NF- κ B Transcriptional Activation.** EMBO J 22:3910-3918.

Fakih, M.; Johnson, C.; Trump, D.; 2002. **Glucocorticoids and Treatment of Prostate Cancer: a Preclinical and Clinical Review.** Urology 60(4):553-61.

Frame, S. and Cohen, P. 2001. **GSK3 Takes Centre Stage More than 20 Years After Its Discovery.** Biochem J 359:1-16.

Franke, T.; Hornik, C.; Segev, L.; Shostak, G. and Sugimoto, C. 2003. **PI3K/Akt and Apoptosis: Size Matters.** Oncogene. 2003 Dec 8;22(56):8983-98.

Fuchs, E. 1996. **The Cytoskeleton and Disease: Genetic Disorders of Intermediate Filaments.** Annu Rev Genet 30:197-231.

Fuchs E, Merrill BJ, Jamora C, DasGupta R. 2001. **At the Roots of a Never-ending Cycle.** Dev Cell 1:13-25.

Gapuzan, M.; Yufit, P. and Gilmore, T. 2002. **Immortalized Embryonic Mouse Fibroblasts Lacking the RelA Subunit of Transcription Factor NF-kappaB Have a Malignantly Transformed Phenotype.** Oncogene 21(16):2484-92.

Ghosh, S.; May, M. and Koop, E. 1998. **NF- κ B and Rel Proteins: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses.** Annu Rev Immunol 16:225-260.

Greten, F. and Karin, M. 2004. **The IKK/NF- κ B Activation Pathway: a Target for Prevention and Treatment of Cancer.** Cancer Lett 206:193-199.

Greten, F.; Eckmann, L.; Greten, T.; Park, J.; Li, Z.; Egan, L.; Kagnoff, M. and Karin, M. 2004. **IKKbeta Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer.** Cell 118:285-296.

Grossmann, M.; O'Reilly, L.; Gugasyan, R.; Strasser, A.; Adams, J. and Gerondakis, S. 2000. **The Anti-Apoptotic Activities of Rel and RelA Required During B-cell Maturation Involve the Regulation of Bcl-2 Expression.** EMBO J 19(23):6351-60.

Gustin, J.; Ozes, O.; Akca, H.; Pincheira, R.; Mayo, L.; Li, Q.; Guzman, J.; Korgaonkar, C. and Donner, D. 2004. **Cell type-specific expression of the I κ B kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF- κ B activation.** J Biol Chem 279(3):1615-1620.

Hatada, E.; Nieters, A.; Wulczyn, F.; Naumann, M.; Meyer, R.; Nucifora, G.; McKeithan, T. and Scheidereit, C. 1992. **The Ankyrin Repeat Domains of the NF- κ B Precursor p105 and the Protooncogene Bcl-3 Act As Specifics Inhibitors of NF- κ B DNA Binding.** Proc Natl Acad Sci 89:2489-2493.

Hafezi-Moghadam, A.; Simoncini, T.; Yang, Z.; Limbourg, F.; Plumier, J.; Rebsamen, M.; Hieh, C.; Chui, D.; Thomas, K.; Prorock, A.; Laubach, V.; Moskowitz, M.; French, B.; Ley, K. and Liao, J. 2002. **Acute Cardiovascular Protective Effects of Corticosteroids are Mediated by Non-transcriptional Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase.** Nat Med 8(5):473-479.

Hayden, M. and Ghosh, S. 2004. **Signaling to NF- κ B.** Genes Dev 18(18):2195-2224.

Helmberg, A.; Auphan, N.; Caelles, C. and Karin, M. 1995. **Glucocorticoid-induced Apoptosis of Human Leukemic Cells is Caused by the Repressive Function of the Glucocorticoid Receptor.** EMBO J 14(3):452-460.

Hinata, K.; Gervin, A.; Zhang, J. and Khavari, P. 2003. **Divergent Gene Regulation And Growth Effects By NF-Kappa B In Epithelial And Mesenchymal Cells Of Human Skin.** Oncogene 22(13):1955-1964.

Hoeflich, K.; Luo, J.; Rubie, A.; Tsao, M.; Jin, O. and Woodget, J. 2000. **Requirement of Glycogen Syntase Kinase-3 β in Cell Survival and NF- κ B Activation.** Nature 406:86-90.

Hoffmann, A.; Levchenko, A.; Scott, M. and Baltimore, D. 2002. **The I κ B-NF- κ B Signalling Module: Temporal Control and Selective Gene Activation.** Science 298:1241-1245.

Hogan, B.; Beddington, R.; Constantini, F. and Lacy, E. 1994. **Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Höler, T.; Freddy-Kruger, T.; Schneider, P.; Schopf, R.; Knop, J.; Rittner, C.; Meyer zum Buschenfelde, K. and Marker-Hermann-Monster, E. 1997. **A TNF- α Promoter Polymorphism is Associated with Juvenile Onset Psoriasis and Psoriatic Arthritis.** J Invest Dermatol 109:562-565.

Horwitz B.; Scott, M.; Cherry, S.; Bronson, R. and Baltimore, D. 1997. **Failure of Lymphopoiesis after Adoptive Transfer of NF-kappaB-Feficient Fetal Liver Cells.** Immunity 6(6):765-772.

Hu, H.; Xiong, J. and Goeddel, D. 1996. **The TNF Receptor 1-Associated Protein TRADD Signals Cell Death and NF-kappa B Activation.** Cell 81(4):495-504.

Hu, Y.; Baud, V.; Delhase, M.; Zhang, P.; Deerinck, T.; Ellisman, M.; Jonson, R. and Karin, M. 1999. **Abnormal Morphogenesis but Intact IKK Activation in Mice Lacking the IKK α Subunit of I κ B Kinase.** Science 284(5412):316-320.

Hu, Y.; Baud, V.; Oga, T.; Kim, K.; Yoshida, K. and Karin, M. 2001. **IKK α controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB.** Nature. 2001 Apr 5;410(6829):710-714.

Huang, T.; Kudo, N.; Yoshida, M. and Miyamoto, S. 2000. **A Nuclear Export Signal in the N-terminal Regulatory Domain of I κ B α Controls Cytoplasmic Localization of Inactive NF- κ B:I κ B Complexes.** Proc Natl Acad Sci 97:1014-1019.

Huang, T.; Wuerzberger-Davis, S.; Wu, Z. and Miyamoto, S. 2003. **Sequential Modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and Ubiquitin Mediates NF-kappaB Activation by Genotoxic stress.** Cell 115(5):565-576.

Hughes, K.; Nikolakaki, E.; Plyte, S.; Totty, N. and Woodgett, J. 1993. **Modulation of the Glycogen Synthase Kinase-3 Family by Tyrosine Phosphorylation.** EMBO J 12:803-808.

Huxford, T.; Huang, D.; Malek, S. and Ghosh, G. 1998. **The Crystal Structure of the I κ B α /NF- κ B Complexes Reveals Mechanisms of NF- κ B Inactivation.** Cell 95:759-770.

Israël, A. 2004. **Biochemical and Genetical Analysis of the NF- κ B Signalling Pathway.** In Keystone Symposium on NF- κ B: Biology and Pathology (eds A. Ulrich et al.) Keystone Symposia, Snowbird Resort, Snowbird, UT.

Jacobs, M. and Harrison, S. 1998. **Structure of an I κ B α /NF- κ B Complex.** Cell 95:749-758.

Jope, R. and Johnson, G. 2004. **The Glamour and Gloom of Glycogen Synthase Kinase-3.** Trends Biol Sci 29(2):95-102.

Jonhson, C.; Van Antwerp, D. and Jope, T. 1999. **An N-terminal Nuclear Export Signal is Required for the Nucleocytoplasmic Shuttling of I κ B α .** EMBO J 18:6682-6693.

Johnson, C.; Hershberger, P. and Trump, D. 2002. **Vitamin D-related Therapies in Prostate Cancer.** Cancer Metastasis Rev 21(2):147-58 30.

Kane, L.; Shapiro, V.; Stokoe, D. and Weiss, A. 1999. **Induction of NF- κ B by the Akt/PKB Kinase.** Curr Biol 9:601-604.

Karin, M. and Ben-neriah, Y. 2000. **Phosphorylation Meets Ubiquitination: the Control of NF- κ B activity.** Annu Rev Immunol 18: 621–663.

Karin, M. and Delhase, M. 2000. **The I κ B Kinase (IKK) and NF- κ B: Key Elements of Proinflammatory signalling.** Sem Immunol 12:85-98.

Karin, M.; Yamamoto, Y. And Wang, Q. 2004. **The IKK NF- κ B System: a Treasure Trove for Drug Development.** Nat Rev Drug Discov 3(1):17-26.

Kelliher, M.; Grimm, S.; Ishida, Y.; Kuo, F.; Stanger, B. and Leder, P. 1998. **The Death Domain Kinase RIP Mediates the TNF-Induced NF κ B-Signal.** Immunity 8:297-303.

Kim, L. and Kimmel, 2000. **GSK3, a Master Switch Regulating Cell-fate Specification and Tumorigenesis.** Curr Opin Genet Dev 10:508-514.

Klement, J.; Rice, R.; Car, B.; Abbondanzo, S.; Powers, G.; Bhatt, P.; Chen, C.; Rosen, C. and Steward, C. 1996. **I κ B α Deficiency Results in a Sustained NF- κ B Response and Severe Widespread Dermatitis in Mice.** Mol Cell Biol 16:2341-2349.

Kucharczak, J.; Simmons, M.; Fan, Y. and G  linas, C. 2003. **To be or not to be: NF- κ B is the Answer-Role of Rel/NF- κ B in the Regulation of Apoptosis.** Oncogene 22:8961-8982.

Landy SJ, Donnai D. 1993. **Incontinentia Pigmenti (Bloch-Sulzberger Syndrome).** J Med Genet 30(1):53-59.

Lawrence, T.; Gilroy, D.; Colville-Nash, P. and Willoughby, D. 2001. **Possible new Role for NF- κ B in the Resoution of Inflammation**. Nat Med 7(12):1291-1297.

Lawrence, T.; Bebien, M.; Liu, G.; Nizet, V. and Karin, M. 2005. **IKKalpha Limits Macrophage NF-kappaB Activation and Contributes to the Resolution of Inflammation**. Nature 434(7037):1138-1143.

Lee, D. and Goldberg, A. 1998. **Proteasome Inhibitors: Valuable new Tools for Cell Biologists**. Trends Cell Biol 8(10):397-403.

Leis, H.; Segrelles, C.; Ruiz, S.; Santos, M. And Paramio, J. 2002. **Expression, Localization and Activity of Glycogen Synthase Kinase 3 β During Mouse Skin Tumorigenesis**. Mol Carc 35:180-185.

Leis, H.; Page, A.; Ramírez, A.; Bravo, A.; Segrelles, C.; Paramio, J.; Baretino, D.; Jorcano, J. and Perez, P. 2004. **Glucocorticoid Receptor Counteracts Tumorigenic Activity of Akt in Skin through Interference with the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway**. Mol Endocrinol 18(2):303-311.

Li, Q.; Lu, Q.; Hwang, J.; Buscher, D.; Lee, K.; Izpisua-Belmonte, J. and Verma, I. 1999a. **IKK1-Deficient Mice Exhibit Abnormal Development of Skin and Skeleton**. Genes Dev 13(10):1322-1328.

Li, Q.; Van Antwerp, D.; Mercurio, F.; Lee, K. and Verma, I. 1999b. **Severe Liver Degeneration in Mice Lacking the I κ B Kinase 2 Gene**. Science 284(5412):321-5415.

Li, Z.; Chu, W.; Hu, Y.; Delhase, M.; Deerinck, T.; Ellisman, M.; Jonson, R. and Karin, M. 1999c. **The IKK β Subunit of I κ B Kinase (IKK) is Essential for**

Nuclear Factor κ B Activation and Prevention of Apoptosis. J Exp Med 189(11):1839-1845.

Li, Q. and Verma, I. 2002. **NF- κ B Regulation in the Immune System.** Nat Rev Immunol 2:725-734.

Limbourg, F.; Huang, Z.; Plumier, J.; Simoncini, T.; Fujioka, M.; Tuckermann, J.; Schütz, G.; Moskowitz, M. and Liao, J. 2002. **Rapid Nontranscriptional Activation of Endotelial Nitric Oxide Synthase Mediates Increased Cerebral Blood Flow and Stroke Protection by Corticosteroids.** J Clin Invest 110:1729–1738.

Limbourg, F. and Liao, J. 2003. **Nontranscriptional Actions of the Glucocorticoid Receptor.** J Mol Med 81(3):168-74.

Lind, M.; Rozell, B.; Wallin, R.; Van Hogerlinden, M.; Ljunggren, H.; Töftgard, R. and Sur, I. 2004. **Tumor Necrosis Factor Receptor 1-Mediated Signaling is Required for Skin Cancer Development Induced by NF- κ B inhibition.** PNAS 101(14):4972-4977.

Losel, R. and Wehling, M. 2003. **Nongenomic Actions of Steroid Hormones.** Nat Rev Mol Cell Biol 4(1):46-5615.

Luo, J.; Maeda, S.; Hu, L.; Yagita, H. and Karin, M. 2004. **Inhibition of NF- κ B in Cancer Cells Converts Inflammation-Induced Tumor Growth Mediated by TNF- α to TRAIL-Mediated Tumor Regression.** Cancer Cell 6(3):297-305

Madrid, L.; Wang, C.; Guttridge, D.; Schottelius, A.; Baldwin, A. Jr. and Mayo, M. 2000. **Akt Suppresses Apoptosis by Stimulating Transactivation Potential of the RelA/p65 subunit of NF- κ B.** Mol Cell Biol 20: 1626:1638.

Madrid, L.; Mayo, M.; Reuther, J.; Baldwin, A. Jr. 2001. **Akt Stimulates the Transactivation Potential of the RelA/p65 Subunit of NF- κ B Through**

Utilization Of the I κ B Kinase and Activation of the Mitogen-activated Protein Kinase p38. J Biol Chem 276(22):18934-18940.

Makris, C.; Godfrey, V.; Krähn-Senftleben, G.; Takahashi, T.; Roberts, J.; Scharz, T.; Feng, L.; Jonson, R. and Karin, M. 2000. **Female Mice Heterozygous for IKK γ /NEMO Deficiencies Develop a Dermatopathy Similar to the Human X-Linked Disorder Incontinentia Pigmenti.** Mol Cel 5:969-979.

Malek, S.; Chen, Y.; Huxford, T. and Ghosh, S. 2001. **I κ B β but not I κ B α , Functions as a Classical Cytoplasmic Inhibitor of NF- κ B Dimers by Masking Both NF- κ B Nuclear Localization sequences in Resting Cells.** J Biol Chem 276:45225-45235.

Malek, S.; Haung, D.; Huxford, T.; Ghosh, S. and Ghosh, G. 2003. **X-Ray Crystal Structure of an I κ B β x NF- κ B p65 Homodimer Complex.** J Biol Chem 278:23094-23100.

Mattioli, I.; Sebald, A.; Bucher, C.; Charles, R.; Nakano, H.; Doi, T.; Kracht, M. and Schmitz, M. 2004. **Transient and Selective NF-kappa B p65 Serine 536 Phosphorylation Induced by T Cell Costimulation is Mediated by I kappa B Kinase Beta and Controls the Kinetics of p65 Nuclear Import.** J Immunol 172(10):6336-6344.

May, M.; D'Acquisto, F.; Madge, L.; Glöckner, J; Pober, J and Ghosh, S. 2000. **Selective Inhibition of NF- κ B Activation by a Peptide That Blocks the Interacción of NEMO with the I κ B Kinase Complex.** Science 289:1550-1554.

May, M.; Marienfeld, R. and Ghosh, S. 2002. **Characterization of the I κ B-kinase NEMO Binding Domain.** J Biol Chem 277(48):45992-46000.

Mayo, M.; Madrid, L.; Westerheide, S.; Jones, D.; Yuan, X.; Baldwin, A. Jr. and Whang, Y. 2002. **PTEN Blocks Tumor Necrosis Factor-Induced NF- κ B-**

Dependent Transcription by Inhibiting the Transactivation Potential of p65. J Biol Chem. 277:11116-11125.

McKay, L. and Cidlowski, J. 1999. **Molecular Control of Immune/inflammatory Responses: Interactions Between Nuclear Factor- κ B and Steroid Receptor Signaling Pathways.** Endocr Rev 20(4):435-459.

McKenzie, R. and Sabin, E. 2003. **Aberrant Signalling and Transcription Factor Activation as an Explanation for the Defective Growth Control and Differentiation of Keratinocytes in Psoriasis: a Hypothesis.** Exp Dermatol 12(4):337-345.

Meng, F.; Liu, L.; Chin, P., and D'Mello, S. 2002. **Akt is a Downstream Target of NF-kappa B.** J Biol Chem. 277(33):29674-29680.

Meng, F. and D'Mello, S. 2003. **NF-kappaB Stimulates Akt Phosphorylation and Gene Expression by Distinct Signaling Mechanisms.** Biochim Biophys Acta 1630(1):35-40.

Mercurio, F.; Zhu, H.; Murray, B.; Shevchenko, A.; Bennet, B.; Li, J.; Young, D.; Barbosa, M.; Mann, Manning, A. and Rao, A. 1997. **IKK-1 and IKK2: Cytokine-Activated I κ B Kinases Essential for NF- κ B Activationn.** Science 278:860-866.

Miesfeld, R.; Rusconi, S.; Godowski, P.; Maler, B.; Okret, S.; Wikstrom, A.; Gustafsson, J. and Yamamoto, K. 1986. **Genetic Complementation of a Glucocorticoid Receptor Deficiency by Expression of Cloned Receptor cDNA.** Cell 46(3):389-399.

Moore, R.; Owens, D.; Stamp, G.; Arnott, C.; Burke, F.; East, N.; Holdsworth, H.; Turner, L.; Rollins, B.; Pasparakis, M.; Kollias, G. and Balkwill, F. 1999. **Mice Deficient in Tumor Necrosis Factor-alpha are Resistant to Skin Carcinogenesis.** Nat Med 5(7):828-831.

Muenchen, H.; Lin, D.; Walsh, M.; Keller, E. and Pienta, K. 2002. **Tumor Necrosis Factor- α -Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells through Inhibition of Nuclear Factor- κ B by an I κ B α "Super-Repressor"**. Clin Cancer Res. 2000 May;6(5):1969-77

Murphy, G. 2005. **Histology of the Skin**. In: Lever's Histopathology of the Skin. 9th ed, chapter 3. Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, pp. 1-55.

Murga, C; Laguinge, L.; Wetzker, R.; Cuadrado, A. and Gutkind, S. 1998. **Activation Of Akt/Protein Kinase B By G Protein-Coupled Receptors: A Role For α And $\beta\gamma$ Subunits Of Heterotrimeric G Proteins Acting Through Phosphatidylinositol-3-OH Kinase γ** . J Biol Chem 273(30):19080-19085.

Nakayama, H.; Ikebe, T. and Shirasuna, K. 2005. **Effects of I κ B Kinase on the Differentiation of Squamous Carcinoma Cells**. Oral Oncol, in press.

Naumann, M. and Scheidereit, C. 1994. **Activation of NF- κ B in vivo is Regulated by Multiple Phosphorylations**. EMBO J 13:4597-4607.

Orange, J. and Geha, R. 2003. **Finding NEMO: Genetic Disorders of NF- κ B Activation**. J Clin Invest 112:983-985.

Ozes, O.; Mayo, L.; Gustin, J.; Pfeffer, S.; Pfeffer, L. and Donner, D. 1999. **NF- κ B Activation by Tumour Necrosis Factor Requires the Akt serine-threonine kinase**. Nature 401(6748):82-85.

Pahl, H. 1999. **Activators and Target Genes of Rel/NF- κ B Transcription Factors**. Oncogene 18(49):6853-6866.

Pandolfi, F.; Tretin, L.; Boyle, L.; Stamenkovic, I.; Byers, H., Colvin, R. and Kurnick, J. 1992. **Expression of Cell Adhesion Molecules in Human Melanoma Cell Lines and their Role in Cytotoxicity Mediated by Tumor-Infiltrating Lymphocytes.** Cancer 69:1165-1173.

Paramio, J.; Navarro, M.; Segrelles, C.; Gomez-Casero, E. and Jorcano, J. 2001. **PTEN tumour suppressor is linked to the cell cycle control through the retinoblastoma protein.** Oncogene 1999 18(52):7462-7268.

Parrish, J.; Scheuerle, A.; Lewis, R.; Levy, M. and Nelson, D. 1996. **Selection Against Mutant Alleles in Blood Leukocytes is a Consistent Feature in Incontinentia Pigmenti type 2.** Hum Mol Genet 5(11):1777-1783.

Pasparakis, M.; Courtois, G.; Hafner, M., Schmidt-Supprian, M.; Nenci, A.; Toksoy, A.; Krampert, M.; Goebeler, M.; Gillitzer, R.; Israel, A.; Krieg, T.; Rajewsky, K. and Haase, I. 2002. **TNF-Mediated Inflammatory Skin Disease in Mice with Epidermis-Specific Deletion of IKK2.** Nature 417(6891):861-866.

Pelengaris, S.; Littlewood, T.; Khan, M.; Elia, G. and Evan, G. 1999. **Reversible Activation of c-Myc in Skin: Induction of a Complex Neoplastic Phenotype by a Single Oncogenic Lesion.** Mol Cell 3(5):565-577.

Perez, P.; Page, A. and Jorcano, J. 2000. **Role of phosphorylated p50-NF-kappaB in the ultraviolet response of mouse skin.** Mol Carcinog 27(4):272-279.

Pérez, P.; Page, A.; Bravo, A.; Del Río, M.; Gimenez-Conti, I.; Budunova, I.; Slaga, T. and Jorcano, J. 2001. **Altered Skin Development and Impaired Proliferative and Inflammatory Responses in Transgenic Mice Overexpressing the Glucocorticoid Receptor.** FASEB J 15:2030-2032.

Perkins, N. 2004. **NF-κB: Tumor Promoter or Suppressor?.** Trends Cell Biol 14(2):64-69.

- Polakis, P. 2000. **Wnt Signaling and Cancer**. Genes Dev 14:1837-1851.
- Poyet, J.; Srinivasula, S.; Lin, J.; Fernandes-Alnemri, T.; Yamaoka, S.; Tsichilis, P. and Alnemri, E. 2000. **Activation of the I κ B Kinases by RIP via IKK γ /NEMO-Mediated Oligomerization**. J Biol Chem 275:37966-37977.
- Puel, A.; Picard, C.; Ku, C.; Smahi, A. and Puel, A. 2004. **Inherited Disorders of NF- κ B-Mediated Immunity in Man**. Curr Opin Immunol 16:34-41.
- Ramírez, A.; Bravo, A.; Jorcano, J. and Vidal, M. 1994. **Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development**. Differentiation 58(1):53-64.
- Rayet, B. and Gelinas, C. 1999. **Aberrant rel/nf κ b Genes and Activity in Human Cancer**. Oncogene 18(49):6938-6947.
- Regnier, C.; Song, H.; Gao, X.; Goeddel, D.; Cao, Z. and Rothe, M. 1997. **Identification and Characterization of an I κ B Kinase**. Cell 90:373-383.
- Reichardt, H.; Kaestner, K.; Tuckermann, J.; Kretz, O.; Wessely, O.; Bock, R.; Gass, P.; Schmid, W.; Herrlich, P.; Angel, P. and Schutz, G. 1998. **DNA Binding of the Glucocorticoid Receptor is Not Essential for Survival**. Cell 93(4):531-541.
- Robles, A. and Conti, C. 1995. **Early overexpression of cyclin D1 protein in mouse skin carcinogenesis**. Carcinogenesis 16(4):781-786.
- Rodríguez-Puebla, M.; Robles, A. and Conti, C. 1999. **Activity and Cyclin D1 Expression: An Essential Mechanism of Mouse Skin Tumor Development**. Mol Carcinog 24:1-6.

Rothwarf, D.; Zandi, E.; Natoli, G. and Karin, M. 1998. **IKK-gamma is an Essential Regulatory Subunit of the IkappaB Kinase Complex.** Nature 395(6699):297-300.

Roymans, R. and Slegers, H. 2001. **Phosphatidylinositol 3-kinases in Tumor Progression.** Eur J Biochem 268:487-49815.

Rudolph, D.; Yeh, W.; Wakeham, A.; Rudolph, B.; Nallainathan, D.; Potter, J.; Elia, A. and Mak, T. 2000. **Severe Liver Degeneration and Lack of NF-kB Activation in NEMO/IKK γ -deficient Mice.** Genes Dev 14: 854-862.

Sakurai, H.; Chiba, H.; Miyoshi, H.; Sugita, T. and Toriumi, W. 1999. **IkappaB Kinases Phosphorylate NF-kappaB p65 Subunit on Serine 536 in the Transactivation Domain.** J Biol Chem 274(43):30353-30356.

Saleem, M.; Afaq, F.; Adhami, V. and Mukhtar, H. 2004. **Lupeol Modulates NF-kappaB and PI3K/Akt Pathways and Inhibits Skin Cancer in CD-1 Mice.** Oncogene 23(30):5203-5214.

Sambrook, J.; Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. **in Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press,** Cold Spring Harbor, New York.

Santos, M.; Paramio, J.; Bravo, A.; Ramírez, A. and Jorcano, J. 2002. **The Expresión of Keratin 10 in the Basal Layer of the Epidermis Inhibits Cell Proliferation and Prevents Skin Tumorigenesis.** J Biol Chem 277:19122-19130.

Santos, M.; Perez, P.; Segrelles, C.; Ruiz, S.; Jorcano, J. and Paramio, J. 2003. **Impaired NF-kappa B activation and increased production of tumor necrosis factor alpha in transgenic mice expressing keratin K10 in the basal layer of the epidermis.** J Biol Chem 278(15):13422-13430.

Schmidt-Supprian, M.; Bloch, W.; Courtois, G.; Addicks, K.; Israel, A.; Rajewsky, K. and Pasparakis, M. 2000. **NEMO/IKK γ -Deficient Mice Model Incontinentia Pigmenti**. Mol Cell 5:981-992.

Schmidt-Ullrich, R.; Aebischer, T.; Hulsken, J.; Birchmeier, W.; Klemm, U. and Scheidereit, C. 2001. **Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices**. Development. 128(19):3843-3853.

Schoneveld, O.; Gaemers, I. and Lamers, W. 2004. **Mechanisms of Glucocorticoid Signalling**. Bioch Bioph Acta 1680:114-128.

Schwabe, R. and Brenner, D. 2002. **Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in TNF- α Induced NF- κ B Activation and Apoptosis in Hepatocytes**. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 283:G204-211.

Segrelles, C.; Ruiz, S.; Perez, P.; Murga, C.; Santos, M.; Larcher, F.; Budunova, I.; Slaga, T.; Gutkind, J.; Jorcano, J. and Paramio, J. 2002. **Functional Roles of Akt in Mouse Skin Tumorigenesis**. Oncogene 21:53-64.

Segrelles, C.; Ruiz, S.; Santos, M.; Martinez-Palacio, J.; Lara, M. and Paramio, J. 2004. **Akt Mediates an Angiogenic Switch in Transformed Keratinocytes**. Carcinogenesis 25(7):1137-1147.

Seitz, C.; Lin, Q.; Deng, H. and Khavari, P. 1998. **Alterations in NF-kappaB Function in Transgenic Epithelial Tissue Demonstrate a Growth Inhibitory Role for NF-kappaB**. Proc Natl Acad Sci 95:2307-2312.

Seitz, C.; Deng, H.; Hinata, K.; Lin, Q. and Khavari, P. 2000. **Nuclear Factor κ B Subunits Induce Epithelial Cell Growth Arrest**. Cancer Res 60:4085-4092.

Sen, R. and Baltimore, D. 1986. **Inducibility of the Immunoglobulin Enhancer-Binding Protein NF- κ B by a Posttranslational Mechanism.** Cell 47:921-928.

Sha, W.; Liou, H.; Tuomanen, E. and Baltimore, D. 1995. **Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses.** Cell 80(2):321-330.

Shaw, M.; Cohen, P. and Alessi, D. 1997. **Further Evidence that Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 β by IGF-1 is Mediated by PDK1/PKB-induced Phosphorilation of Ser-9 and not by Dephosphorylation of Tyrosine-216.** FEBS Lett 416:307-311.

Shukla, S. and Gupta, S. 2004. **Suppression of Constitutive and Tumor Necrosis Factor alpha-Induced Nuclear Factor (NF)-kappaB Activation and Induction of Apoptosis by Apigenin in Human Prostate Carcinoma PC-3 cells: Correlation with Down-Regulation of NF-kappaB-Responsive Genes.** Clin Cancer Res 10(9):3169-3178.

Siegmund, D.; Hausser, A.; Peters, N.; Scheurich, P. and Wajant, H. 2001. **Tumor Necrosis Factor (TNF) and Phorbol Ester Induce TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) under Critical Involvement of NF-kappa B Essential Modulator (NEMO)/IKKgamma.** J Biol Chem 276(47):43708-48712.

Sigala, J.; Bottero, V.; Young, D.; Shevchenko, A.; Mercurio, F. and Verma, I. 2004. **Activation of Transcription Factor NF- κ B Requires ELKS, an I κ B Regulatory Subunit.** Science 304:1963-1967.

Sil, A.; Maeda, S.; Sano, Y.; Roop, D. and Karin, M. 2004. **I κ B Kinase- α Acts in the Epidermis to Control Skeletal and Creniofacial Morfogénesis.** Nature 428:660-664.

Silverman, N. and Maniatis, T. 2001. **NF- κ B Signalling Pathways in Mammalian and Insect Innate Immunity.** Genes Dev 15:2321-2342.

Simoncini, T.; Hafezi-Moghadam, A.; Brazil, D.; Leys, K.; Chin, W. and Liao, J. 2000. **Interaction of Oestrogen Receptor with the Regulatori Subunit of Phosphatidylinositol-3-OH Kinase.** Nature 407:538-541.

Simpson, L. and Parsons, R. 2001. **PTEN: Life as a Tumor Suppressor.** Exp Cell Res 264:29-41.

Singleton, J.; Baker, B. and Thorburn, A. 2000. **Dexamethasone Inhibits Insulin Growth Factor-1 Signaling and Potentiates Apoptosis in Myoblasts.** Endocrinology 141(8):2945-2950.

Sizemore, N.; Lerner, N.; Dombrowski, N.; Sakurai, H. and Stark, G. 2002. **Distinct Roles of the I κ B kinase α and β Subunits in Liberating Nuclear Factor κ B (NF- κ B) from I κ B and in Phosphorylating the p65 Subunit of NF- κ B.** J Biol Chem 277:3863-3869.

Smahi, A.; Courtois, G.; Vabres, P.; Yamaoka, S.; Heuertz, S.; Munnich, A.; Israël, A.; Heiss, N.; Klauck, S.; Kioschis, P.; Wiemann, S.; Poustka, A.; Esposito, T.; Bardaro, T.; Gianfrancesco, F.; Ciccodicola, A.; D'Urso, M.; Woffendin, H.; Jakins, T.; Donnai, D.; Stewart, H.; Kenwrick, S.; Aradhya, S.; Yamagata, T.; Levy, M.; Lewis, R. and Nelson, D. 2000. **Genomic Rearrangement in NEMO Impairs NF-kappaB Activation and is a Cause of Incontinentia Pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium.** Nature 405(6785):466-472.

Slaga, T.; Budunova, I.; Gimenez-Conti, I. and Aldaz C. 1996. **The Mouse Skin Carcinogenesis Model.** J Investig Dermatol Symp Proc 1(2):151-156.

Smahi, A.; Courtois, G.; Rabia, S.; Döffinger, R.; Bodemer, C.; Munich, A.; Casanova, J. and Israël, A. 2002. **The NF- κ B Signalling Pathway in Human Diseases: from Incontinentia Pigmenti to Ectodermal Dysplasias and Immune-deficiency Syndromes.** Hum Mol Gen 11(20):2371-2375.

Song, G.; Ouyang, G. and Bao, S. 2005. **The Activation of Akt/PKB Signaling Pathway and Cell Survival.** J Cell Mol Med 9(1):59-71.

Sparks, A.; Morin, P.; Vogelstein, B. and Kinzler, K. 1998. **Mutational Analysis of the APC/b-catenin/Tcf Pathway in colorectal cancer.** Cancer Res 58:1130-1134.

Stambolic, V.; Suzuki, A.; de la Pompa, J.; Brothers, G.; Mirtsos, C.; Sasaki, T.; Ruland, J.; Penninger, J.; Siderovski, D. and Mak, T. 1998. **Negative Regulation of PKB/Akt-dependent Cell Survival by the Tumor Suppressor PTEN.** Cell 95(1):29-39.

Sun, X.; Bratton, S.; Butterworth, M.; MacFarlane, M. and Cohen G. 2002. **Bcl-2 and Bcl-xL Inhibit CD95-Mediated Apoptosis by Preventing Mitochondrial Release of Smac/DIABLO and Subsequent Inactivation of X-linked Inhibitor-of-Apoptosis Protein.** J Biol Chem. 2002 277(13):11345-11351.

Sun, L.; Deng, L.; Ea, C.; Xia, Z. and Chen, Z. 2004. **The TRAF6 Ubiquitin Ligase and TAK1 Kinase Mediate IKK Activation by BCL-10 and MALT1 in Lymphocytes.** Mol Cell 14:289-301.

Tada, K.; Okazaki, T.; Sakon, S.; Koburai, T.; Kurosawa, K.; Yamaoka, S.; Hashimoto, H.; Mak, T.; Yagita, H.; Okumura, K.; Yeh, W. and Nakano, H. 2001. **Critical Role of TRAF2 and TRAF5 in Tumor Necrosis Factor-Induced NF- κ B Activation and Protection from Cell Death.** J Biol Chem 276:36530-36534.

Takada, Y.; Khuri, F and Aggarwal, B. 2004a. **Protein Farnesyltransferase Inhibitor (SCH 66336) Abolishes NF- κ B Activation Induced by Various Carcinogens and Inflammatory Stimuli Leading to Suppression of NF- κ B-Regulated Gene Expression and Up-regulation of Apoptosis.** J Biol Chem 279(25):26287-26299.

Takada, Y.; Fang, X.; Jamaluddin, S.; Boyd, D, and Aggarwal, B. 2004b. **Genetic Deletion of Glycogen Synthase Kinase-3 β Abrogates Activation of I κ B Kinase, JNK, Akt and p44/p42 MAPK but Potentiates Apoptosis Induced by TNF.** J Biol Chem 279:39541-30554.

Takeda, K.; Takeuchi, O.; Tsujimura, T.; Itami, S.; Adachi, O.; Kawai, T.; Sanjo, H.; Yoshikawa, K.; Terada, N. and Akira, S. 1999. **Limb and Skin Abnormalities in Mice Lacking IKK α .** Science. 284(5412):313-6. Tegethoff, S.; Behlke, J. and Scheidereit, C. 2003.

Tanaka, M.; Fuentes, M.; Yamaguchi, K.; Durnin, M.; Dalrymple, S.; Ardí, K. and Goeddel, D. 1999. **Embryonic Lethality, Liver Degeneration, and Impaired NF- κ B Activation in IKK- β -Deficient Mice.** Immunity 10(4):421-429.

Tang, G.; Minemoto, Y.; Dibling, B.; Purcell, N.; Li, Z.; Karin, M. and Lin, A. 2001. **Inhibition of JNK Activation through NF- κ B Target Genes.** Nature 414:313-317.

Tang, E.; Inohara, N.; Wang, C.; Nunez, G. and Guan, K. 2003. **Roles for Homotypic Interactions and Transautophosphorylation in I κ B kinase (IKK β) Activation.** J Biol Chem 278:38566-38570.

Tegethoff, S.; Behlke, J. and Scheidereit, C. 2003. **Tetrameric Tetrameric Oligomerization of I κ B Kinase γ (IKK γ) Is Obligatory for IKK Complex Activity and NF- κ B Activation.** Mol Cell Biol. 23(6):2029-2041

Tuckermann, J.; Reichardt, H.; Arribas, J.; Richter, K.; Schutz, G. and Angel, P. 1999. **The DNA-binding-independent Function of the Glucocorticoid Receptor Mediates Repression of AP-1-dependent Genes in Skin.** J Cell Biol 147:1365-1370.

Van Hogerlinden, M.; Lundh Rozell, B.; Åhrlund-Richter, L. and Töftgard, R. 1999. **Squamous Cell Carcinomas and Increased Apoptosis in Skin with Inhibited Rel/Nuclear Factor- κ B Signaling.** Cancer Res 59:3299-3303

Van Hogerlinden, M.; Auer, G. and Töftgard, R. 2002. **Inhibition of Rel/Nuclear Factor- κ B Signaling in Skin Results in Defective DNA Damage-Induced Cell Cycle Arrest and Ha-ras- and p53-Independent Tumor Development.** Oncogene 21(32):4969-4977.

Van Hogerlinden, M.; Rozell, B.; Töftgard, R. and Sundberg, J. 2004. **Characterization of the Progressive Skin Disease and Inflammatory Cell Infiltrate in Mice with Inhibited NF- κ B Signaling.** J Inv Derm 123(1):101-108.

Van Weeren, P.; de Bruin, K.; de Vries-Smits, A.; van Lint, J. And Burgering, B. 1998. **Essential Role for Protein Kinase B (PKB) in Insulin-induced Glycogen Synthase Kinase 3 Inactivation: Characterization of a Dominant-negative Mutant of PKB.** J Biol Chem 273:13150-13156.

Vasudevan, K.; Gurumurthy, S. and Rangnekar, V. 2004. **Supresión of PTEN Expresión by NF- κ B Prevents Apoptosis.** Mol Cell Biol 24(3):1007-1021.

Vedoy, C. and Sogayar, M. 2002. **Isolation and Characterization of Genes Associated with the Anti-Tumor Activity of Glucocorticoids.** Mol Brain Res 15;106(1-2):7-69.

Verma, U.; Yamamoto, Y.; Prajapati, S.; Gaynor, R. 2004. **Nuclear Role of I kappa B Kinase-gamma/NF-kappa B Essential Modulator (IKK gamma/NEMO) in NF-kappa B-Dependent Gene Expression.** J Biol Chem 279(5):3509-3515.

Vermeulen, L.; De Wilde, G.; Van Damme, P.; Vande Berghe, W. and Haegeman, G. 2003. **Transcriptional Activation of the NF- κ B p65 Subunit by Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase-1 (MSK1).** EMBO J 22:1313-1324.

Viatour, P.; Merville, M.; Bours, V. and Chariot, A. 2005. **Phosphorylation of NF-kappaB and I kappaB proteins: implications in cancer and inflammation.** Trends Biochem Sci 30(1):43-52.

Vivanco, I. and Sawyers, C. 2002. **The Phosphatidylinositol 3-kinase AKT Pathway in Human Cancer.** Nat Rev Cancer 2(7):489-501.

Wajant, H.; Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. 2003. **Tumor Necrosis Factor Signaling.** Cell Death Differ 10(1):45-65.

Weih, F.; Carrasco, D.; Durham, S.; Barton, D.; Rizzo, C.; Rysek, R.; Lira, S. and Bravo, R. 1995. **Multiorgan Immflammation and Hematopoietic Abnormalities in Mice with a Targeted Disruption of RelB, a member of the NF- κ B/Rel Family.** Cell 80:331-340.

Weisfelner, M. and Gottlieb, A.T 2003. **The Role of Apoptosis in Human Epidermal Keratinocytes.** J Drugs Dermatol 2003 2(4):385-391.

Woronicz, J.; Gao, X.; Cao, Z., Rothe, M. and Goeddel, D. 1997. **I κ B Kinase- β : NF- κ B Activation and Complex Formation with I κ B Kinase- α and NIK.** Science 278:866-869.

Yager, J. and Scott, D. **The skin and appendages**. In: Jubb, K., Kennedy, P. and Palmer, N. 1993. **Pathology of Domestic Animals**. 4thed. San Diego Academic, V.1. 747p. Cap. 5. p.447-538.

Yamamoto, Y.; Kim, D.; Kwak, Y.; Prajapati, S.; Verma, U. and Gaynor, R. 2001. **IKK γ /NEMO Facilitates the Recruitment of the I κ B Kinase Complex into the I κ B Kinase Complex**. J Biol Chem 276(39):36327-36336.

Yamamoto, Y.; Verma, U.; Prajapati, S.; Kwak, Y. and Gaynor, R. 2003. **Histone H3 Phosphorylation by IKK- α is Critical for Cytokine-Induced Gene Expression**. Nature 423:655-659.

Yamaoka, S.; Courtois, G.; Bessia, C.; Whiteside, S.; Weil, R.; Agou F.; Kirk, H.; Kay, R. and Israël, A. 1998. **Complementation Cloning of NEMO, a Component of the I κ B Kinase Complex Essential for NF- κ B Activation**. Cell 93:1231-1240

Ye, J.; Xie, X.; Tarassishin, L and Horwithz, M. 2000. **Regulation of The NF- κ B Activation Pathway by Isolated Domains of FIP3/IKK γ , a Component of the I κ B- α Kinase Complex**. J Biol Chem 275(13):9882-9889.

Yudt, M. and Cidlowski, J. 2002. **The Glucocorticoid Receptor : Coding a Diversity of Proteins and Responses Through a Single Gene**. Mol Endocrinol 16(8):719-1726.

Yuspa, S.; Morgan, D.; Lichti, U.; Spangler, E.; Michael D.; Kilkenney, A. and Hennings, H. 1986. **Cultivation and characterization of cells derived from mouse skin papillomas induced by an initiation-promotion protocol**. Carcinogenesis 7(6):949-958.

Zandi, E.; Rothwarf, D.; Delhase, M.; Hayakawa, M. and Karin, M. 1997. **The I κ B Kinase Complex (IKK) Contains Two Kinase Subunits, IKK α and IKK β , Necessary for I κ B Phosphorylation and NF- κ B Activation**. Cell 91:243-252.

Zandi, E.; Chen, Y. and Karin, M. 1998. **Direct Phosphorylation of I κ B by IKK α and IKK β : Discrimination Between Free and NF- κ B Bound Substrate.** Science 281:1360-1363.

Zhang, S.; Kovalenko, A.; Cantarella, G. and Wallach, D. 2000. **Recruitment of the IKK Signalosome to the p55 TNF Receptor: RIP and A20 Bind to NEMO (IKK γ) upon Receptor Stimulation.** Immunity 12:301-311.

Zhang, J.; Green, C.; Tao, S. and Khavari, P. 2004. **NF-kappaB RelA opposes epidermal proliferation driven by TNFR1 and JNK.** Genes Dev 18(1):17-22.

Zhong, H.; Su Yang, H.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P. and Ghosh, S. 1997. **The Transcriptional Activity of NF- κ B is Regulated by the I κ B-Associated PKAc Subunit through a cyclic AMP-independent Mechanism.** Cell 89:413-424.

Zhu, A. and Watt, F. 1999. **β -catenin Signalling Modulates Proliferative Potential of Human Epidermal Keratinocytes Independently of Intercellular Adhesión.** Development 126:2285-2298.