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

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

1. LA UBIQUITINA LIGASA FBW7 REGULA ELS NIVELLS D'EGFR ALTERANT LA SEVA UBIQUITINITZACIÓ

És ben establert que la ubiquitinització induïda per lligand de l'EGFR és mitjançada per la E3 ubiquitina lligasa c-Cbl, sent un pas essencial per a la degradació del receptor (Levkowitz et al., 1998; Longva et al., 2002), però també ho és la ubiquitinització sostinguda del receptor, presumptament duta a terme per una E3 lligasa desconeguda (Mosesson et al., 2003; Huang et al., 2006). Com i quina lligasa regula aquests mecanismes de multiubiquitinització de l'EGFR és encara desconegut. S'ha descrit prèviament que l'homòleg de presenilina en *C.elegans sel-12* interacciona amb la ubiquitina lligasa *sel-10/Cdc4/Fbw7* (Wu et al., 1998), tanmateix la funció biològica de la interacció PS/Fbw7 en mamífers roman desconeguda. Així, ens vam plantejar examinar la possibilitat que PS reguli l'estabilitat, ubiquitinització i senyalització de l'EGFR mitjançant l'alteració de l'activitat o els nivells de Fbw7.

1.1. La sobreexpressió de Fbw7 produeix un increment dels nivells, estabilitat i fosforilació de l'EGFR

En primer lloc varem analitzar un possible paper de Fbw7 en la regulació dels nivells de l'EGFR. La sobreexpressió de Fbw7 α en cèl·lules 203T va produir un marcat increment en la ubiquitinització de l'EGFR seguit d'una ràpida deubiquitinització induïda pel tractament amb EGF (Figura R-9A). Notablement, el patró d'ubiquitinització en cèl·lules que sobreexpressen Fbw7 és molt similar a l'alteració de la ubiquitinització de l'EGFR en absència de PS (Figura R-8). Consistent amb un paper de Fbw7 en estabilitzar l'EGFR, l'expressió de Fbw7 α en cèl·lules 293T va produir un increment en els nivells d'EGFR mentre que el mutant

dominant-negatiu dnFbw7^{WD} (Welcker et al., 2004b) els va disminuir (Figura R-9B). A més, el tractament amb EGF en cèl·lules 293T transfectades amb Fbw7 α va mostrar un increment en l'estabilitat i fosforilació de l'EGFR així com una alteració en la inactivació de la via de senyalització de l'EGFR evidenciada per la fosforilació sostinguda durant 1 hora de tractament d'ERK1/2 en comparació amb cèl·lules transfectades amb el vector buit (Figura R-10).

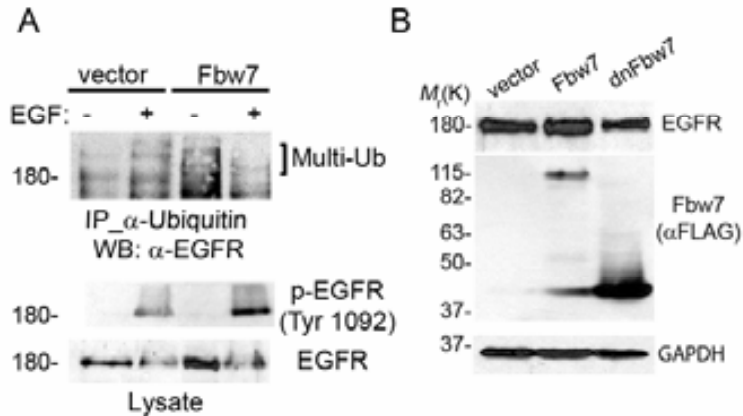


Figura R-9: La sobreexpressió de Fbw7 modifica el patró d'ubiquitinització de l'EGFR.

Cèl·lules 293T van ser transfectades transitòriament amb pCDNA o Flag-Fbw7 α durant 24 h. Passat aquest temps es van incubar en absència (-) o presència (+) d'EGF en gel durant 15 minuts. Part del lisat cel·lular obtingut es van sotmetre a immunoprecipitació amb un anticòs α -ubiquitina i resolt mitjançant electroforesi per a detectar les formes ubiquitinitzades del receptor. A més, es van detectar l'EGFR total i fosforilat en el lisat total. El resultat indica un increment en les formes ubiquitinitzades en absència d'EGF que ràpidament desapareixen en afegir el lligand quan Fbw7 és sobreexpressat. A més es destaca un increment en els nivells totals i fosforilats d'EGFR en comparació amb cèl·lules transfectades amb el vector buit. **B)** Cèl·lules 293T van ser transfectades transitòriament amb vector buit o Flag-Fbw7 α o un dominant negatiu de Fbw7 (Flag-dnFbw7^{WD}). La detecció per WB de l'EGFR mostra com la sobreexpressió de Fbw7 produeix un increment en els nivells de l'EGFR que contrasta amb l'expressió del dominant negatiu, que els disminueix. Les imatges que es mostren són representatives de tres experiments independents.

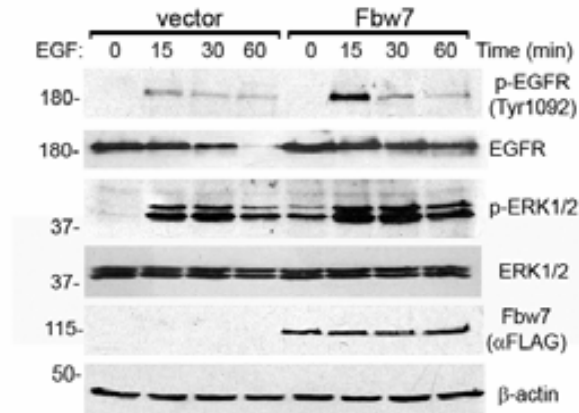


Figura R-10: La sobreexpressió de Fbw7 produeix un increment en els nivells, estabilitat i fosforilació de l'EGFR. A) Nivells d'EGFR total i fosforilat (Tyr 1092) i p-ERK1/2 després de tractar cèl·lules 203T transfectades transitòriament amb vector buit o Flag-Fbw7 α amb EGF. Fbw7 α incrementa la fosforilació d'EGFR i produeix una activació de la via de senyalització del receptor, exemplificada amb els nivells de fosforilació d'ERK1/2. Aquest experiment és representatiu de tres experiments independents.

1.2. La inactivació de Fbw7 produeix una disminució en els nivells de l'EGFR

Per corroborar el paper de Fbw7 en la regulació de l'estabilitat de l'EGFR varem inactivar genèticament l'expressió de Fbw7 utilitzant dues estratègies diferents: recombinació homòloga específica mitjançada per l'expressió de l'enzim Cre recombinasa i ARN d'interferència. Per una banda, es van utilitzar fibroblasts condicionals d'embrions de ratolí amb el gen de Fbw7 flanquejat per dues seqüències loxP (Fbw7 f/f) (Mao et al., 2004). La infecció amb un virus que expressa l'enzim Cre recombinasa va produir la deleció de Fbw7 visualitzada per Western blot, efecte que va dur a una disminució dosi dependent en els nivells d'EGFR en comparació a les cèl·lules control infectades amb virus contenint GFP (Figura R-11A). Per una altra banda mitjançant la tecnologia d'ARN d'interferència vam silenciar l'expressió de Fbw7 utilitzant el plàsmid retroviral pSuper siFbw7 prèviament descrit (Mao et al., 2004). L'expressió estable de Fbw7 siRNA en

cèl·lules epitelials (O'Neil et al., 2007) va ser comprovada mitjançant anàlisi per Western blot, observant també una reducció significativa en els nivells d'EGFR en comparació amb cèl·lules control infectades amb el plàsmid pSuper buit (Figura R-11B).

D'aquesta manera, el conjunt d'aquests resultats demostren per primera vegada que la ubiquitina lligasa Fbw7 regula positivament els nivells de l'EGFR alterant el seu procés d'ubiquitinització i deubiquitinització, promovent una estabilització en la degradació i en la senyalització del receptor induïda per EGF.

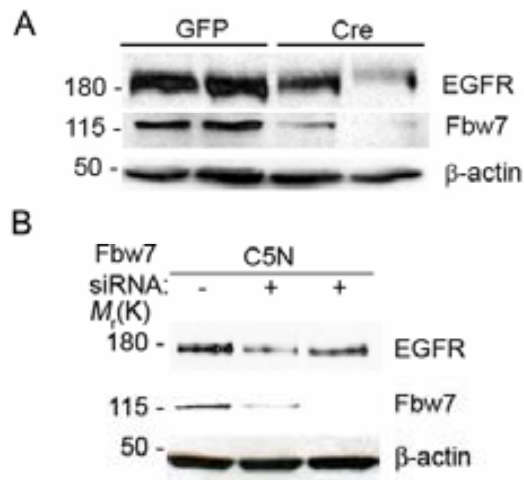


Figura R-11: La inactivació de Fbw7 disminueix els nivells d'EGFR. A) Disminució dels nivells d'EGFR en dues línies independents de fibroblast d'embrions de ratolí (MEF) *Fbw7* *ff* infectades amb virus que conté GFP o virus de la Cre recombinasa, la qual indueix la deleció per recombinació de *Fbw7*, tal com demostra l'anàlisi per WB. **B)** Dos clons de la línia epitelial humana C5N expressant establement el plàsmid pSuper *Fbw7* siRNA (+) mostren una menor expressió d'EGFR comparat amb cèl·lules que expressen el plàsmid pSuper buit (-).

2. L'ABSÈNCIA DE PRESENILINA INCREMENTA L'EXPRESSIÓ I L'ACTIVITAT DE Fbw7

La sorprenent similitud entre el patró d'ubiquitinització obtingut en cèl·lules PS-/- i en cèl·lules que sobreexpressen Fbw7 (Figura R-8 i Figura R-9) suggeria que PS podria estar regulant la ubiquitinització de EGFR alterant els nivells o l'activitat de Fbw7. L'anàlisi per Western blot dels nivells de Fbw7 i d'algunes de les seves dianes ens revelà un substancial increment dels nivells endògens de Fbw7 i una disminució en els substrats c-jun i el fragment C-terminal de Notch-4 (Mao et al., 2004) en fibroblasts deficients en PS (Figura R-12A).

Tal com s'ha demostrat prèviament (Welcker et al., 2004a), l'anàlisi per immunofluorescència visualitzada per microscòpia confocal demostra que Fbw7 es localitza majoritàriament en el nucli en fibroblasts control. En canvi, en fibroblasts PS-/- l'expressió de Fbw7 es troba incrementada tant en el compartiment citosòlic com en el compartiment nuclear (Figura R-12B). El marcatge per Fbw7 és altament específic ja que desapareix totalment en presència del pèptid bloqueig (Figura R-12B).

L'expressió estable de PS1 humana en fibroblasts PS-/- va disminuir significativament els nivells de Fbw7 i de l'EGFR indicant que la regulació de Fbw7 i EGFR no és un efecte derivat de l'establiment de la línia cel·lular (Figura R-13A).

Un dels factors més importants en l'activitat d'una E3 ubiquitina lligasa és la regulació de la interacció amb els seus substrats. Recentment s'ha establert que la dimerització de Fbw7 intervé en la control de la seva activitat podent modificar la seva funció (Welcker and Clurman, 2007). Així, a continuació varem analitzar si l'increment dels nivells de Fbw7 causats per l'absència de PS pot alterar la seva capacitat de dimerització. La coexpressió de Fbw7-Flag i Fbw7-HA en fibroblasts control o PS-/- seguit de la immunoprecipitació per el *tag* HA i la immunodetecció utilitzant un anticòs α -FLAG ens permet detectar dímers de Fbw7 en ambdós tipus cel·lulars (Figura R-13B). Resulta interessant que en absència de PS es

produeixen un major nombre de dímers respecte a les cèl·lules control suggerint que existeix un increment de l'activitat de Fbw7 en absència de PS (Figura R-13B). El conjunt d'aquestes dades indica que PS regula negativament els nivells i l'activitat de Fbw7. Aquests resultats són molt sorprenents ja que Fbw7 és un gen supressor de tumors que en aquest cas promou una via de senyalització fortament implicada en proliferació.

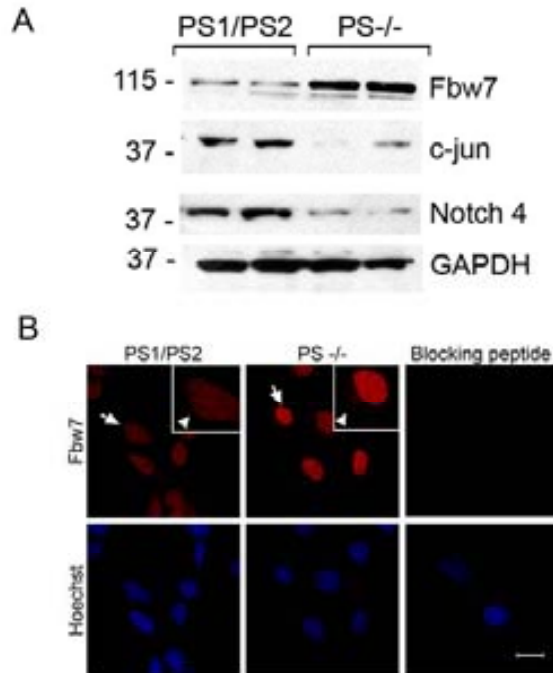


Figura R-12: L'absència de PS incrementa els nivells i activitat de Fbw7. **A)** L'anàlisi per WB de lisats proteics de fibroblast control i PS^{-/-} mostra un increment dels nivells endògens de Fbw7 així com una disminució en els substrats c-jun i fragment C-terminal de Notch-4 en absència de PS. **B)** Anàlisi per microscòpia confocal mostra un increment del Fbw7 endogen en el nucli i en el compartiment perinuclear (senyalat amb caps de fletxa) en fibroblasts PS^{-/-} en comparació als fibroblasts control. L'especificitat del marcatge de Fbw7 es va demostrar mitjançant l'ús del pèptid bloqueig (1 µg/ml) que mostra la desaparició total del marcatge. *Insert.* magnificació de les cèl·lules indicades amb fletxes. Barra d'escala: 20 µm.

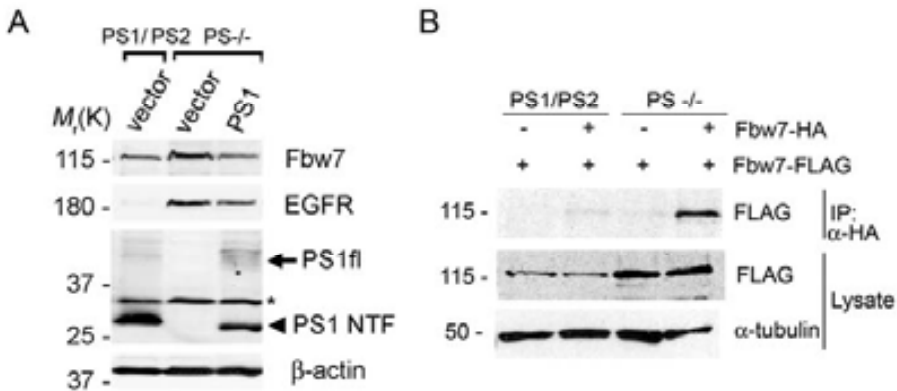


Figura R-13: Les PS regulen la dimerització de Fbw7. **A)** Es van generar fibroblasts control i PS-/- expressant estabiment pAG3 hPS1 per tal de descartar que els efectes observats fossin derivats de l'establiment de la línia cel·lular. L'anàlisi per WB de lisats proteics de fibroblasts hPS1; PS-/- mostra com la reexpressió de PS1 restaura els nivells de Fbw7 i EGFR. **B)** Es van realitzar assajos de coimmunoprecipitació en fibroblasts cotransfectats amb Flag-Fbw7 i HA-Fbw7 o vector buit. S'observa com en absència de PS els complexos Flag-Fbw7/HA-Fbw7 es troben incrementats. Es mostra un experiment representatiu de tres experiments.

3. PS REGULA ELS NIVELLS DE Fbw7 ALTERANT LA SEVA TRANSCRIPCIÓ GÈNICA A TRAVÉS D'UN MECANISME INDEPENDENT DE L'ACTIVITAT γ -SECRETASA

Després de la descripció que la PS regula els nivells i activitat de Fbw7 la pregunta lògica és saber a través de quin mecanisme es produeix aquest efecte. L'anàlisi transcripcional de l'expressió de Fbw7 per RT-PCR semiquantitativa mostra que existeix un increment significatiu en els transcrits d'ARNm en cèl·lules PS-/- (2.1 ± 0.4) comparat amb les cèl·lules control (1.0 ± 0.1 ; $p < 0.05$) (Figura R-14A). La inhibició de l'activitat γ -secretasa mitjançant l'ús de l'inhibidor DAPT en cèl·lules control no modifica els nivells de Fbw7 (Figura R-14B) indicant que l'activitat γ -secretasa no està implicada en la regulació dels nivells de Fbw7 per presenilina. Com a control de la correcta inhibició de l'activitat γ -secretasa es van

analitzar els nivells del fragment C-terminal de N-cadherina, substrat de PS, observant que existeix una acumulació dependent del temps d'aquest fragment en les cèl·lules tractades amb DAPT (Figura R-14B).

Així, PS regula els nivells de Fbw7 modificant la seva transcripció gènica a través d'un mecanisme independent de la seva activitat γ -secretasa.

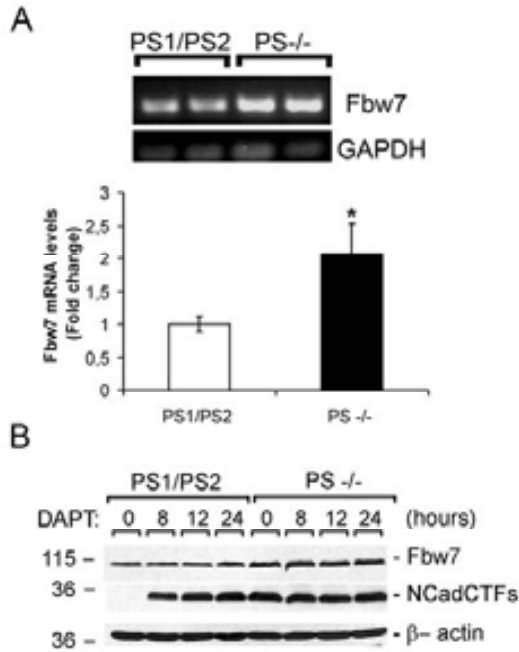


Figura R-14: PS regula els nivells de Fbw7 alterant la seva transcripció gènica a través d'un mecanisme independent de l'activitat γ -secretasa. A) L'anàlisi per RT-PCR semiquantitativa dels nivells d'ARNm en cèl·lules control (n=7) i PS^{-/-} (n=7) mostra un increment en l'expressió gènica de Fbw7 en absència de PS. Els valors d'expressió van ser normalitzats als nivells d'expressió de GAPDH. Les dades representen la mitja \pm s.e.m. * p < 0.05. **B)** La inhibició de l'activitat γ -secretasa mitjançant l'ús de l'inhibidor DAPT en fibroblasts control va produir l'acumulació dependent del temps del fragment CTF de N-cadherina però no va modificar els nivells proteics de Fbw7.

4. LES PRESENILINES REGULEN ELS NIVELLS D'EGFR I LA TRANSFORMACIÓ CEL·LULAR DEPENDENT DE L'EGFR A TRAVÉS DE Fbw7

4.1. Disminució de l'expressió i activitat de Fbw7 mitjançant l'ús d'ARN d'interferència en fibroblasts PS-/-

Els resultats mostrats fins el moment suggereixen que PS regula negativament l'expressió de Fbw7, el qual pot accelerar la degradació de l'EGFR. Si aquesta hipòtesi es correcta la disminució dels nivells de Fbw7 hauria de disminuir els nivells anormals d'EGFR en fibroblasts PS-/. Per examinar aquesta hipòtesi varem generar fibroblasts PS-/- que expressen establement ARN d'interferència per Fbw7 (*Fbw7* siRNA). L'expressió estable de *Fbw7* siRNA en fibroblasts PS-/- va causar una reducció significativa ($\approx 50\%$) en els nivells d'ARNm de *Fbw7* (1.12 ± 0.04) comparat amb PS-/- expressant el vector buit (1.5 ± 0.2) i similar a fibroblasts control expressant el vector buit (1.0 ± 0.05) (Figura R-15A).

Consistent amb un paper fisiològic de PS regulant l'estabilitat de l'EGFR a través de Fbw7, el silenciament del gen *Fbw7* va produir una disminució en els nivells proteics de Fbw7 i EGFR en absència de PS (Figura R-15A).

La disminució mitjançant siRNA dels nivells de Fbw7 es correspon amb una disminució en la seva activitat ja que s'observa un increment en els nivells d'alguns substrats de Fbw7 analitzats, com és c-jun i el fragment C-terminal de Notch-4 (Figura R-15B). A més, la disminució en els nivells de Fbw7 es va traduir amb un increment en l'estabilitat del fragment intracel·lular de Notch-1 (NICD) (Figura R-15C). Aquests resultats mostren una inactivació eficient de l'activitat de Fbw7 en cèl·lules PS-/. A més, degut a la similitud dels nivells de Fbw7 entre cèl·lules control i cèl·lules PS-/- siFbw7 observats per RT-PCR evitem un possible efecte tòxic degut a una disminució excessiva en els nivells de Fbw7 retornant així les cèl·lules deficientes en PS a un estat dins la normalitat.

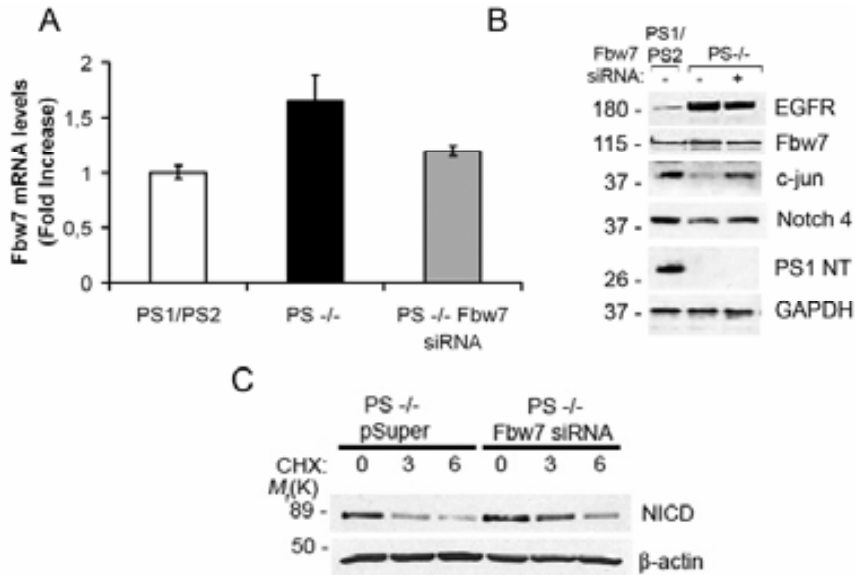


Figura R-15: A) El silenciament de *Fbw7* mitjançant la tecnologia pSuper d'ARN d'interferència produeix una disminució en els nivells de *Fbw7* i dels seus substrats. A) Es va analitzar per RT-PCR semiquantitativa l'expressió del gen *Fbw7* per tal d'avaluar l'efectivitat del *Fbw7* siRNA en fibroblasts control i fibroblasts PS^{-/-} expressant establenent *Fbw7* siRNA o el plàsmid buit. S'observa aproximadament un 50% de silenciament, assolint nivells d'expressió molt similars als existents en cèl·lules control. Els valors es van referenciar al gen de GAPDH. Les dades es mostren com a mitja \pm s.e.m. (n=3). B) Fibroblasts control i PS^{-/-} expressant establenent *Fbw7* siRNA van ser analitzats mitjançant Western blot per detectar *Fbw7*, EGFR, c-jun, Notch-4 i PS1 (NTF). La disminució dels nivells de *Fbw7* produeix una disminució dels nivells d'EGFR i un increment en els substrats de *Fbw7* analitzats. C) Fibroblasts PS^{-/-} expressant establenent vector buit o *Fbw7* siRNA van ser transfectats transitòriament amb Myc-NICD i tractats amb CHX durant 0, 3 i 6 hores. L'anàlisi de l'estabilitat de NICD es va realitzar per WB utilitzant l'anticòs 9E10, demostrant que la inactivació de *Fbw7* produeix un increment en l'estabilitat del fragment citoplasmàtic de Notch (NICD).

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

Els resultats presentats en el punt anterior validen l'ús del model basat en el *Fbw7* siRNA per avaluar si la regulació de la via de senyalització de l'EGFR per PS és dependent de Fbw7. Hem vist anteriorment que la disminució dels nivells de Fbw7 en fibroblasts PS^{-/-} produeix una disminució dels nivells de l'EGFR (Figura R-15). En presència d'EGF, la inactivació de Fbw7 en fibroblasts PS^{-/-} causa una disminució significativa de l'expressió i estabilitat de l'EGFR així com de la fosforilació d'ERK1/2 en comparació amb cèl·lules PS^{-/-} expressant el vector buit (Figura R-16A). Així, la inactivació de Fbw7 ens permet revertir la regulació anormal que exerceix PS sobre l'EGFR, que inclou increment en els seus nivells, estabilitat i activació sostinguda de la via de senyalització tal com s'ha descrit en el capítol I.

Finalment, per tal de comprovar que Fbw7 efectivament contribueix a la transformació cel·lular produïda en fibroblasts PS^{-/-} mitjançada per l'EGFR vam analitzar la capacitat de creixement independentment del substrat de fibroblasts control i PS^{-/-} amb inactivació de Fbw7. El silenciament de Fbw7 produeix una reducció significativa en el nombre de colònies formades en medi semi-sòlid, sent molt similar al nombre obtingut en bloquejar la via de senyalització de l'EGFR mitjançant l'ús de l'inhibidor de l'EGFR PD168393 (Figura R-16B). Aquests resultats suporten la hipòtesi que l'increment en els nivells de Fbw7 produeix transformació cel·lular mitjançada per la via de senyalització de l'EGFR en cèl·lules deficientes en PS.

El conjunt de tots els resultats presentats indiquen que PS actua com a regulador negatiu de la via de senyalització de l'EGFR mitjançant la reducció de l'activitat de Fbw7. Aquesta troballa és important per que per primer cop es demostra un *crossstalk* entre l'EGFR i el gen supressor de tumors Fbw7 regulant proliferació cel·lular. Això dona lloc a la possibilitat d'un paper dual de Fbw7 en tumorigènesi dependent del context fisiològic i cel·lular regulant negativament (ciclina E, c-myc,

Aurora-A, c-Jun, Notch 4 i m-tor) o positivament (EGFR o altres) l'expressió de proteïnes oncogèniques.

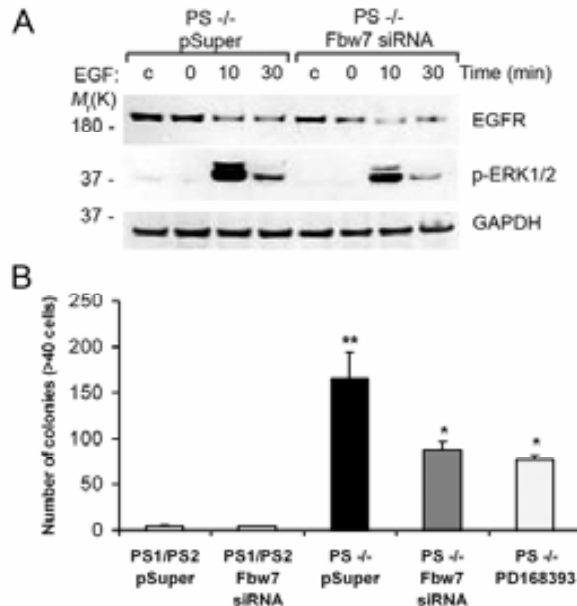


Figura R-16: Les presenilines regulen els nivells, senyalització i estabilitat d'EGFR i la transformació cel·lular dependent d'EGFR a través de Fbw7. A) Fibroblasts PS^{-/-} expressant establement *Fbw7* siRNA o vector buit van ser incubats en absència (c) o presència d'EGF durant 0-30 minuts a 37°C. L'anàlisi per WB mostra com la inactivació de Fbw7 produeix una reducció en els nivells i l'estabilitat de l'EGFR així com una disminució en l'activació d'ERK1/2 induïda per EGF en absència de PS. **B)** Fibroblasts control o deficients en presenilina que expressen establement el vector buit pSuper o pSuper *Fbw7* siRNA (n=3) i fibroblasts PS^{-/-} en presència d'un inhibidor de l'EGFR (PD168393) van ser cultivats en medi semisòlid i el nombre de colònies es va quantificar després de 15 dies de creixement a 37°C. Tant la inactivació de Fbw7 i la inhibició de l'EGFR en fibroblasts PS^{-/-} aboleix l'efecte transformant induït per l'absència de PS. Es mostra la mitja ± s.e.m. **p* < 0.05, comparat amb cèl·lules PS^{-/-} pSuper; ***p* < 0.001, comparat amb cèl·lules PS1/PS2 pSuper.

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

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

1. GENERACIÓ DE RATOLINS CONDICIONALS ePS cDKO

La deleció de PS1 durant l'estadi embrionari produeix mort perinatal causa defectes esquelètics, hemorràgies cerebrals i augment de la diferenciació neuronal, produïts presumiblement per una desregulació de la via de senyalització de Notch (Shen et al., 1997; Wong et al., 1997). En canvi, ratolins deficientes en PS2 són viables i no exhibeixen un fenotip clar (Donoviel et al., 1999). La deleció simultània de PS1 i PS2 durant l'estadi embrionari és letal degut a severes defectes en el desenvolupament temprà incloent alteracions pèrdua de la segmentació dels somites i desorganització del tronc ventral del tub neural (Donoviel et al., 1999). Per poder estudiar la funció fisiològica de presenilina postnatalment s'han utilitzat estratègies genètiques alternatives basades en models animals condicionals. En referència al paper de PS en el manteniment de l'homeòstasi epitelial, la deleció de les dues PS en teixits d'origen endodèrmic durant l'embriogènesi produeix la mort postnatal dels ratolins degut a un desordre limfoproliferatiu de les cèl·lules T (Demehri et al., 2008; Pan et al., 2004), mentre que la deleció parcial de PS causa hiperplàsia i efectes autoimmunes en l'adult (Tournoy et al., 2004; Xia et al., 2001). Per tal d'estudiar el paper d'ambdues PS en la carcinogènesi epitelial, vam dissenyar una estratègia de deleció condicional de PS1 i PS2 específicament en pell de ratolins. Un ratolí en el que els exons 2-3 del gen PS1 es troba flanquejat per dues seqüències loxP en un *background* PS2^{-/-} (Saura et al., 2004) es va creuar amb un ratolí transgènic que expressa el gen Cre recombinasa sota el promotor de la queratina 14 (K14-Cre-ER^{T2}) (Li et al., 2000) (Figura R-17A). Aquest promotor permet obtenir un model de deleció regulable en el temps i en l'espai ja que conté un domini mutat d'unió al lligand del receptor humà d'estrògens (ER^{T2}), sent únicament actiu en presència de 4-hidroxitamoxifé (OHT) (Figura R-17B). A més, la deleció és regió específica ja que té lloc on s'expressa el

gen de la queratina K14, és a dir a la capa basal d'epitelis escamosos específicament en pell, epiteli bucal i esòfag (Vasioukhin et al., 1999). Tal com s'esperava, l'expressió de Cre recombinasa en ratolins ePS cDKO va produir la deleció del gen de PS1 juntament amb l'absència de PS2, fet que no ocorre en ratolins que no expressen Cre recombinasa (Figura R-17C). Es va analitzar l'especificitat de la deleció en diversos òrgans en els ratolins ePS cDKO observant-se únicament la deleció en la pell (Figura R-17C). A nivell proteic, es va analitzar l'expressió de PS1 en l'epidermis mitjançant immunohistoquímica evidenciant una disminució en els nivells de PS1 en els ratolins ePS cDKO en comparació a ratolins control (PS1/PS2) (Figura R-17D). Cal destacar que existeix certa expressió de PS1 en les cèl·lules suprabasals en els ratolins ePS cDKO (Figura R-17D), ja que el promotor de K14 és específicament actiu en queratinòcits proliferatius de la capa basal de l'epiteli (Vasioukhin et al., 1999). Per tant, podem concloure que hem obtingut un nou model animal amb deleció condicional en pell de PS1 i PS2 (ePS cDKO).

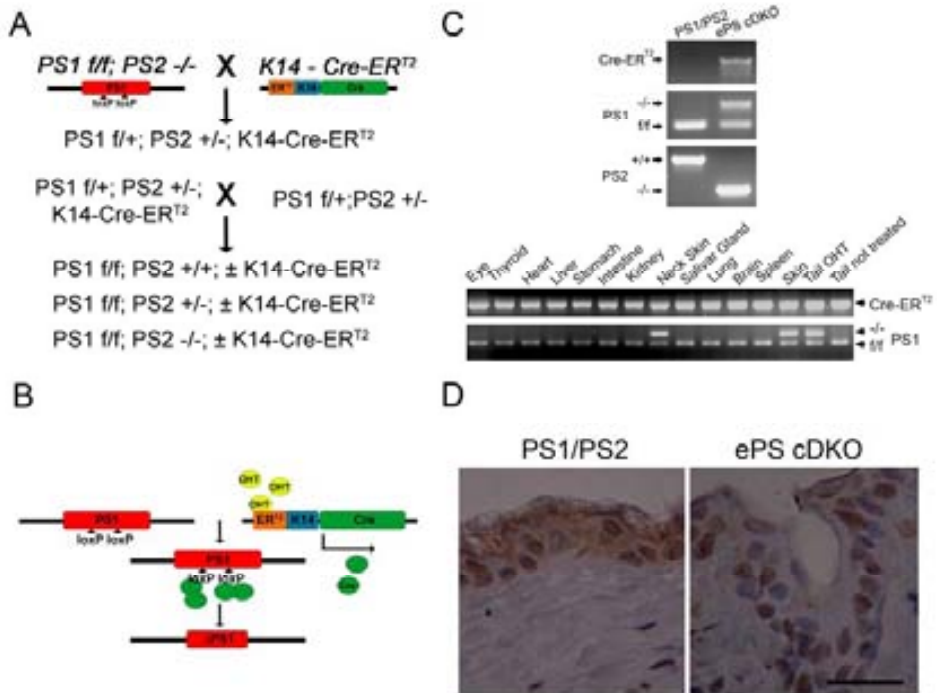


Figura R-17: Generació de ratolins condicionals induïbles doble *knockout* de PS1/PS2 en epidermis (ePS cDKO). **A)** Disseny dels creuaments per obtenir ratolins ePS cDKO (PS1f/f; PS2-/-; K14-Cre-ER^{T2}). Ratolins amb el gen de la PS1 endogen flanquejat per dues seqüències loxP (f/f) i amb absència de PS2 (PS2-/-) (Saura et al., 2004) es van creuar amb un ratolí transgènic que sobreexpressa Cre recombinasa sota el promotor induïble de la queratina K14 específic d'epidermis (Li et al., 2000). **B)** En presència de 4-hidroxitamoxifé (OHT) es produeix l'activació del promotor K14-Cre-ER^{T2} i expressió de Cre recombinasa que reconeix les seqüències loxP en el gen PS1, produint-se recombinació homòloga i deleció de PS1 (-/-). **C)** L'anàlisi d'ADN genòmic per PCR del gen Cre recombinasa i els gens endògens PS1 i PS2 en mostres de teixit de pell de ratolins control (PS1f/f; PS2+/+) i ePS cDKO (PS1f/f; PS2-/-; K14-Cre-ER^{T2}) mostra la deleció de PS2 i PS1 en presència de la Cre recombinasa. La deleció de PS1 es produeix específicament en pell, tal com mostra l'anàlisi d'ADN genòmic provinent de diferents òrgans d'un ratolí ePS cDKO. **D)** La immunodetecció de PS1 de mostres de pell englobades en parafina amb l'anticòs α -PS1 CTF (Calbiochem) demostra la disminució en l'expressió de PS1 citosòlica i de membrana en l'epidermis. El marcatge nuclear que s'observa és inespecífic. Barra d'escala: 30 μ m.

2. MORT DELS RATOLINS ePS cDKO ALS 2.5 MESOS D'EDAT

L'anàlisi fenotípic dels ratolins ePS cDKO (n=40) va mostrar que no presenten cap alteració fenotípica fins als 2 mesos d'edat, moment en el qual desenvolupen un ràpid deteriorament caracteritzat per pèrdua de pes, conduint a la mort de >95% animals als 2.5-3 mesos.

El seguiment de l'increment de pes en ratolins control mostra que els ratolins mascle pesen aproximadament un 25% més que les femelles de la mateixa edat. Entre un mes i dos mesos i mig d'edat els ratolins control mascle incrementen el seu pes en un 25% mentre que les femelles control ho fan únicament en un 10% (Figura R-18A). Ratolins ePS cDKO tan mascles com femelles presenten un pes mitjà inferior respecte els animals control a totes les edats observades (Figura R-18A). A partir dels dos mesos aquesta diferència és significativament major, especialment en els mascles, produint-se la mort de >95% dels animals als 2.5-3 mesos (Figura R-18A). Així, el conjunt dels ratolins ePS cDKO mascle i femella estudiats presenta un pes significativament inferior a partir dels 2 mesos d'edat en comparació amb animals control (Figura R-18B). Per a descartar un problema en la ingesta es va avaluar la ingestió d'aliments d'aquests animals i es va comprovar que els animals ePS cDKO ingereixen la mateixa quantitat de menjar que els ratolins control (Figura R-18C). La pèrdua de pes progressiva pot correspondre a un estat de caquèxia, que es defineix com un estat d'extrema desnutrició, atrofia muscular, fatiga i debilitat en pacients que no estan tractant activament de perdre pes. Pot ser símptoma de varies patologies com càncer, alguns desordres autoimmunes i algunes malalties infeccioses com tuberculosi i SIDA (Argiles et al., 2003).

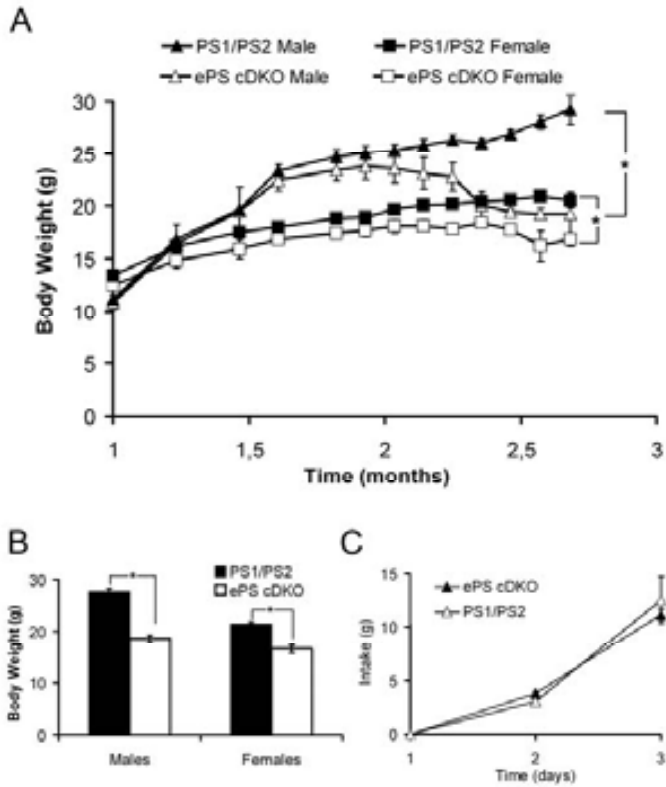


Figura R-18: Fenotip extern dels ratolins ePS cDKO. A partir dels dos mesos d'edat els ratolins ePS cDKO presenten una disminució del seu pes corporal progressiva fins a la mort de l'animal. **A)** Evolució del pes de mascles (n=4-14) i femelles (n=6-20) control (PS1/PS2) i mascles (n=4-8) i femelles (n=7-14) deficients en ambdues PS (ePS cDKO) al llarg del temps. **B)** Pes mitjà en grams de ratolins control i ePS cDKO entre 2 i 2.5 mesos. **C)** Ingesta d'animals control (n=3) i ePS cDKO (n=4) durant tres dies consecutius als 2 mesos d'edat. * $p < 0.001$.

Els ratolins ePS cDKO presenten externament mal aspecte físic, engrandiment de la mucosa periorbital i peribucaal així com lesions cutànies a la pell del coll. Anatòmicament s'observa un engrandiment de tots els nòduls limfàtics, esplenomegàlia i una disminució del greix corporal (Figura R-19). Els resultats anteriors demostren que existeix certa deleció espontània de PS1 degut a una expressió basal de Cre recombinasa també observada en aquests ratolins per altres autors a partir de les 12 setmanes d'edat (Stratis et al., 2006).

El tractament dels ratolins ePS1 cKO i ePS cDKO amb 4-hidroxitamoxifé (OHT) indueix la transcripció de la Cre recombinasa produint la deleció de presenilina en aquells teixits on s'expressa K14 (Figura R-17B i C). Per comprovar que el fenotip que observem és degut a la deficiència de PS administrarem OHT intraperitonealment tal com es descriu en la bibliografia (Indra et al., 1999). Ratolins control, ePS1 cKO o PS2^{-/-} injectats amb vehicle o OHT no van experimentar cap canvi fenotípic en els dies següents a les injeccions. En canvi, ratolins ePS cDKO injectats amb OHT (1 mg/injecció) van mostrar un empitjorament del fenotip que els va dur a la mort un o dos dies després de finalitzar el tractament. El grau d'empitjorament dels ratolins ePS cDKO va resultar ser dosi dependent, de manera que els ratolins injectats amb una menor dosi de OHT (0.5 mg/injecció) van morir més tard que els ratolins injectats amb una major dosi. Aquests resultats demostren que la deleció de PS1 i PS2 en la capa basal d'epitelis multiestratificats resulta letal en l'adult. El fet que la doble deleció de PS1 i PS2 en pell tingui dràstiques conseqüències indica que les PS tenen un important paper en l'homeòstasi epitelial, ja que una de les funcions principals de la pell és la protecció a mode de barrera vers agents del medi extern.

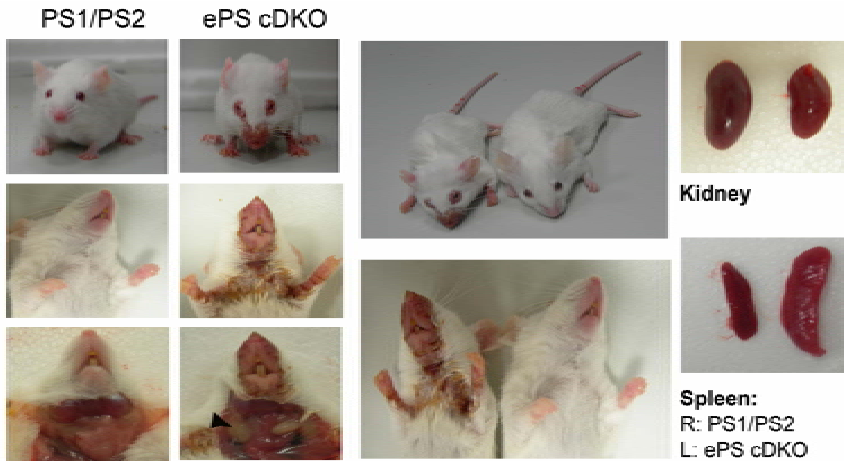


Figura R-19: Fenotip dels ratolins ePS cDKO. Fotografies d'un ratolí control (PS1/PS2) i un ratolí ePS cDKO als 2.5 mesos d'edat. El ratolí ePS cDKO presenta disminució en la grandària corporal i un increment en la mucosa periorbital i peribucal, lesions cutànies al coll i una inflamació dels ganglis limfàtics (senyalats amb fletxes). També s'observa un engrandiment en la melsa i una disminució en la mida del ronyó. (*R: dreta; L: esquerra*)

3. LA DELECIÓ DE PS1 I PS2 INDUEIX LA FORMACIÓ DE TUMORS EPITELIALS

Per investigar les conseqüències de la deleció de PS en la capa basal de l'epidermis es va analitzar la pell d'animals ePS cDKO mitjançant tincions d'hematoxilina i eosina (H&E). L'anàlisi histològic mostra hiperplàsia i hiperqueratinització de l'epidermis, així com la desorganització de les diferents capes de la pell (Figura R-20). L'estudi histològic de les lesions cutànies de la pell del coll dels ratolins ePS cDKO va revelar l'existència d'un procés tumoral altament vascularitzat i histològicament classificat com a tumor escatós (SCC). S'observa una extensa hiperproliferació i hiperqueratosi de l'epidermis, així com una total desestructuració de les capes epitelials. Existeix infiltració de l'epidermis en l'estroma i hipodermis, evidenciada per perles de queratina immerses en la part dèrmica de la pell, característica pròpia dels SCC. Les cèl·lules proliferatives tenen una aparença atípica, indicant malignitat (Figura R-20).

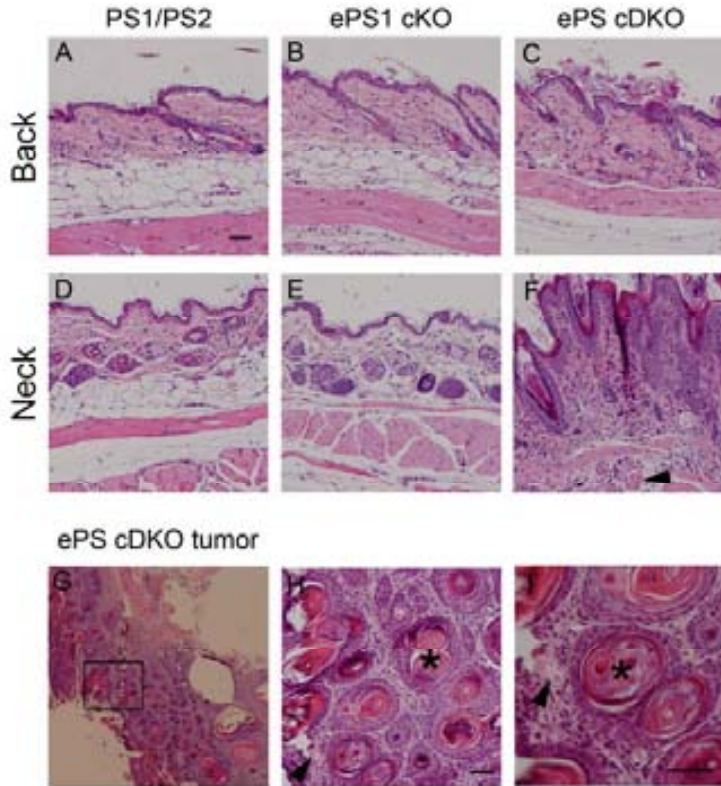


Figura R-20: La deleció induïda de PS produeix la formació de tumors escatosos (SCC). Les imatges A, B i C mostren tincions de H&E representatives de pell de la eskena de ratolins de 2.5 mesos d'edat control, ePS1 cKO i ePS cDKO. Les imatges D, E i F mostren tincions de la pell del coll dels mateixos animals. S'observa que en absència d'ambdues PS es produeix una hiperproliferació i hiperqueratosi de l'epidermis així com una desorganització de les capes epitelials en la pell de la eskena i el desenvolupament de tumors SCC en la pell del coll. En la imatge G i ampliacions òptiques de la mateixa (H,I) es mostren en més detall els tumors SCC desenvolupats pels ratolins ePS cDKO. S'observa una massiva hiperproliferació infiltrant, angiogènesi (senyalada amb caps de fletxa) i la presència de perles de queratina (asteriscs) característiques dels tumors de tipus escatós. Barra d'escala: 50 μ M

Degut a la mortalitat dels ratolins al ser tractats amb OHT intraperitonealment (apartat anterior) vam seguir una estratègia alternativa per incrementar el grau de deleció de PS1, optant pel tractament tòpic de OHT prèviament utilitzat per altres autors (Benitah et al., 2005). Es van utilitzar ratolins de 1.5 mesos, una edat en que no s'observa encara cap canvi fenotípic. El tractament de ratolins control amb vehicle o OHT no va produir cap canvi en el seu fenotip. En canvi el tractament tòpic amb OHT en la pell de l'esquena de ratolins ePS cDKO produeix una ràpida hiperproliferació i hiperqueratosi de l'epidermis d'aquest teixit (Figura R-21). Aquest efecte es produeix únicament allà on s'ha induït la deleció ja que la pell del coll no tractada del mateix animal (Figura R-21), que als dos mesos desenvolupa SCC (Figura R-20), no presenta aquesta patologia. Aquest resultat corroboren les observacions anteriors i demostren que la deleció de PS1 i PS2 en l'epidermis promou la hiperproliferació de queratinòcits a curt termini (7 després d'iniciar del tractament).

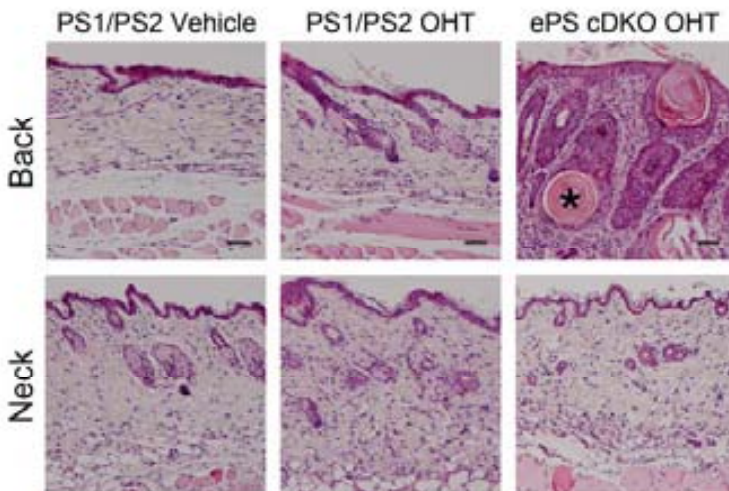


Figura R-21: Hiperproliferació de l'epidermis induïda pel tractament tòpic amb OHT. L'aplicació tòpica d'OHT per induir la deleció de PS1 en la pell de l'esquena de ratolins ePS cDKO de 1.5 mesos d'edat causa una ràpida proliferació en l'epidermis als 5 dies d'iniciar el tractament comparat amb ratolins control (PS1/PS2). Aquest efecte és únicament observat en la pell que ha estat tractada amb OHT ja que la pell del coll, que als 2 mesos d'edat desenvolupa agressius SCC, no presenta cap alteració estructural. Els asteriscs senyalen les perles de queratina. Barra d'escala: 50 μ m.

4. ELS RATOLINS ePS cDKO PRESENTEN UNA MAJOR SUSCEPTIBILITAT A DESENVOLUPAR TUMORS EPITELIALS EN FRONT A UN AGENT CITOTÒXIC

La descripció de la presència d'un desenvolupament tumoral tan agressiu en ratolins ePS cDKO ens va dur a investigar l'origen d'aquest procés oncogènic. Les cèl·lules mare (*stem cells*, SC) epitelials són cèl·lules poc diferenciades que es divideixen infreqüentment però poden proliferar ràpidament en resposta a certs estímuls com per exemple una lesió. Es postula com a possible origen tumoral el compartiment de SC epitelials (Perez-Losada and Balmain, 2003) de manera que varem voler estudiar l'estat d'aquest compartiment en el nostre model animal. Per a la identificació de les SC clàssicament s'ha utilitzat la injecció en ratolins neonatals de 5-bromodeoxiuridina (BrdU) per tal de marcar totes les cèl·lules en divisió de l'epidermis en un moment en el que es produeix una gran expansió del teixit i identificar aquelles que no es tornen a dividir de forma que es mantenen marcades en l'organisme adult. Aquestes cèl·lules són anomenades *DNA label-retaining cells* (LRC) (Bickenbach et al., 1986; Bickenbach and Chism, 1998; Braun et al., 2003). El BrdU és un nucleòsid sintètic anàleg de la timidina que pot ser incorporat en l'ADN de nova síntesi en cèl·lules en replicació, sent àmpliament utilitzat per a mesurar la proliferació cel·lular. El sacrifici dels animals poc temps després de l'administració del BrdU (dies) aporta informació sobre la quantitat i la identitat de cèl·lules que s'estan dividint en aquell instant, en canvi el sacrifici dels animals passat un temps llarg (setmanes) després de la injecció mostra aquelles cèl·lules que van incorporar el BrdU en el moment de la injecció però que s'han dividit molt poques vegades ja que encara conserven el BrdU en el seu ADN, aquestes cèl·lules són cèl·lules mare. La capacitat del BrdU d'unió a l'ADN actuant com un antimetabòlit produeix el trencament dels cromosomes propietat que fa que s'hagi proposat el seu ús com a agent antineoplàsic (Prados et al., 1998). Tanmateix aquesta mateixa propietat fa que el BrdU sigui mutagènic i citotòxic i un potent agent teratogènic (Bannigan et al., 1990). L'ús de ratolins postnatsals aboleix

el seu efecte teratogènic però pot produir alteracions en el desenvolupament del cerebel i canvis en l'arquitectura del pulmons en ratolins adults (Nagai et al., 1993; Yu, 1976). Malgrat que en la literatura no apareixen efectes tòxics del BrdU en ratolins salvatges degut al protocol d'injecció utilitzat en aquest treball, s'ha descrit una disminució en la vida mitja i un increment en el desenvolupament de tumors en rates que han rebut múltiples dosis de BrdU postnatalment (Anisimov, 1995). Després de l'administració de 50 mg/kg BrdU en ratolins de 8-10 d'edat no es van observar alteracions fenotípiques apreciables i l'única evidència de l'administració del compost va ser la pèrdua transitòria del cabell dorsal prèvia al primer cicle fol·licular postnatal, efectes observats també per altres autors (Braun et al., 2003). Prematurament, al mes i mig d'edat, els ratolins ePS cDKO van començar a desenvolupar el seu fenotip característic: pèrdua de pes, debilitat, engrandiment de la mucosa peribucal i periocular, inflamació dels nòduls limfàtics, però inesperadament no lesions externes al coll. L'aparició d'aquests símptomes va forçar el sacrifici dels animals. L'estudi histopatològic de la pell del coll i de l'esquena va mostrar greus defectes estructurals així com una severa hiperproliferació i hiperqueratosi, alteracions similars a un procés tumoral de tipus escatós (Figura R-22A). Aquest efecte només s'observà en els ratolins ePS cDKO ja que l'estructura de la pell en ratolins control i ePS1 cKO no mostrà cap alteració (Figura R-22A). Aquest resultat indica que l'absència d'ambdues PS incrementa la susceptibilitat tumoral vers a l'exposició a agents citotòxics, com és el cas del BrdU. Respecte al compartiment de cèl·lules mare epitelials, no s'observaren canvis significatius en el nombre de LRC entre els diferents genotips estudiats (Figura R-22 A i B). La quantificació de la proliferació cel·lular en els diferents individus mostra un increment de la proliferació cel·lular visualitzada amb el marcador de proliferació cel·lular ki67 en ratolins ePS cDKO (Figura R-22 A i C). No s'observà colocalització de LRC i cèl·lules ki67⁺ en cap dels casos, indicant que no hi ha una activació de la proliferació de SC en els diferents genotips (Figura R-22A).

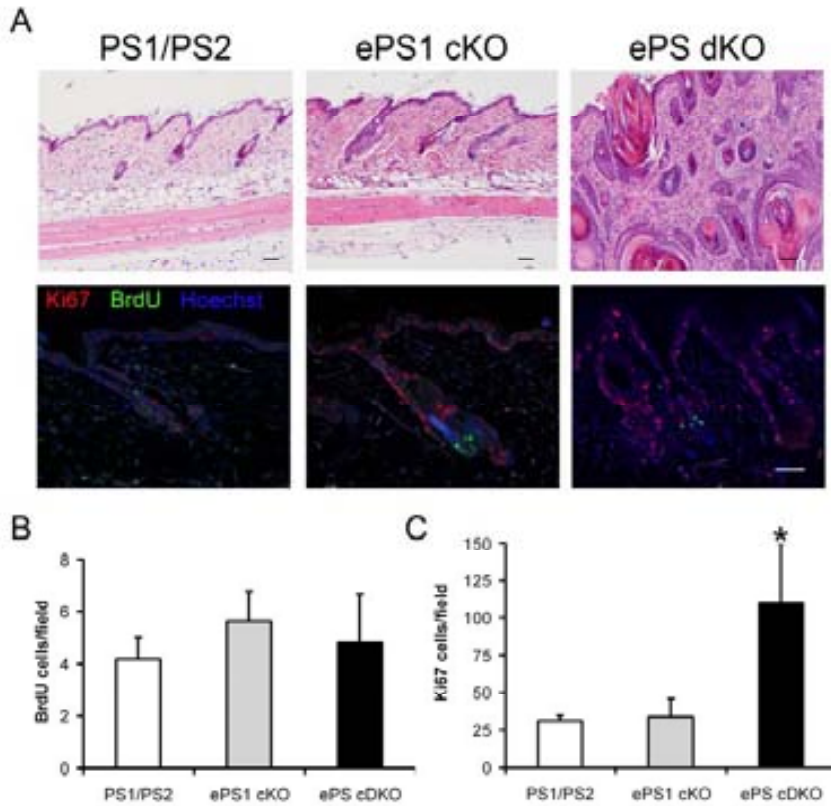


Figura R-22: Increment de la susceptibilitat a desenvolupar tumors en absència de PS. **A)** Per a la detecció de *label-retaining cells* (LRC) es va administrar el marcador de cèl·lules proliferatives i agent citotòxic BrdU (50 mg/kg) en ratolins neonatals (P8) dos cops al dia durant dos dies consecutius tal com s'ha descrit prèviament (Bickenbach and Chism, 1998). L'administració de BrdU va produir el desenvolupament d'un procés tumoral epitelial general similar a un tumor escatós en la pell de l'esquena de ratolins ePS cDKO de 1.5 mesos d'edat tal com es mostra en les tincions representatives de H&E. La tinció **(A)** i la quantificació **(B)** de cèl·lules BrdU⁺ (en verd) mostra que no hi ha diferències en el compartiment de SC epitelials entre els diferents genotips estudiats. Tanmateix s'observa **(A,C)** un increment significatiu de cèl·lules proliferatives (Ki67⁺, en vermell) en ratolins ePS cDKO respecte animals control i ePS1 cKO. * $p < 0.05$; n=3. Barra d'escala: 50 μ m.

5. ELS TUMORS DELS RATOLINS ePS cDKO PRESENTEN UN ELEVAT GRAU DE PROLIFERACIÓ I SÓN K15 NEGATIUS

Per aprofundir en la caracterització dels SCC obtinguts estudiarem marcadors epitelials associats al desenvolupament de tumors de tipus escatós així com la seva capacitat de proliferació i invasió.

5.1. Els tumors desenvolupats pels ratolins ePS cDKO presenten elevats nivells de β -catenina però són K15 negatius.

L'anàlisi per immunohistoquímica dels nivells totals de β -catenina i de queratina K15 va mostrar una expressió diferencial de les dues proteïnes en animals ePS cDKO. En ratolins control, tal com s'ha descrit prèviament (Lyle et al., 1998), s'observa una marcada expressió de K15 en el *bulge* del fol·licle pilós així com a les glàndules sebàcies. En canvi, β -catenina es localitza majoritàriament a la capa basal epitelial i en el bulb, la regió proliferativa del fol·licle pilós (Figura R-23). Cal destacar que no veiem un increment en els nivells de β -catenina ni un increment en la proliferació en teixit d'un animal deficient en PS1 (ePS1 cKO) de dos mesos d'edat. En canvi, ratolins ePS cDKO presenten un increment dels nivells totals de β -catenina en la capa basal epitelial (Figura R-23), el que corrobora altres estudis anteriors en models de deleció parcial de PS (Xia et al., 2001; Tournoy et al., 2004). L'anàlisi immunohistoquímic de l'expressió de la queratina K15 no mostra marcatge per aquesta proteïna en els tumors desenvolupats en ratolins ePS cDKO (Figura R-23), indicant que es tracta d'un tumor SCC d'origen no fol·licular (Jih et al., 1999).

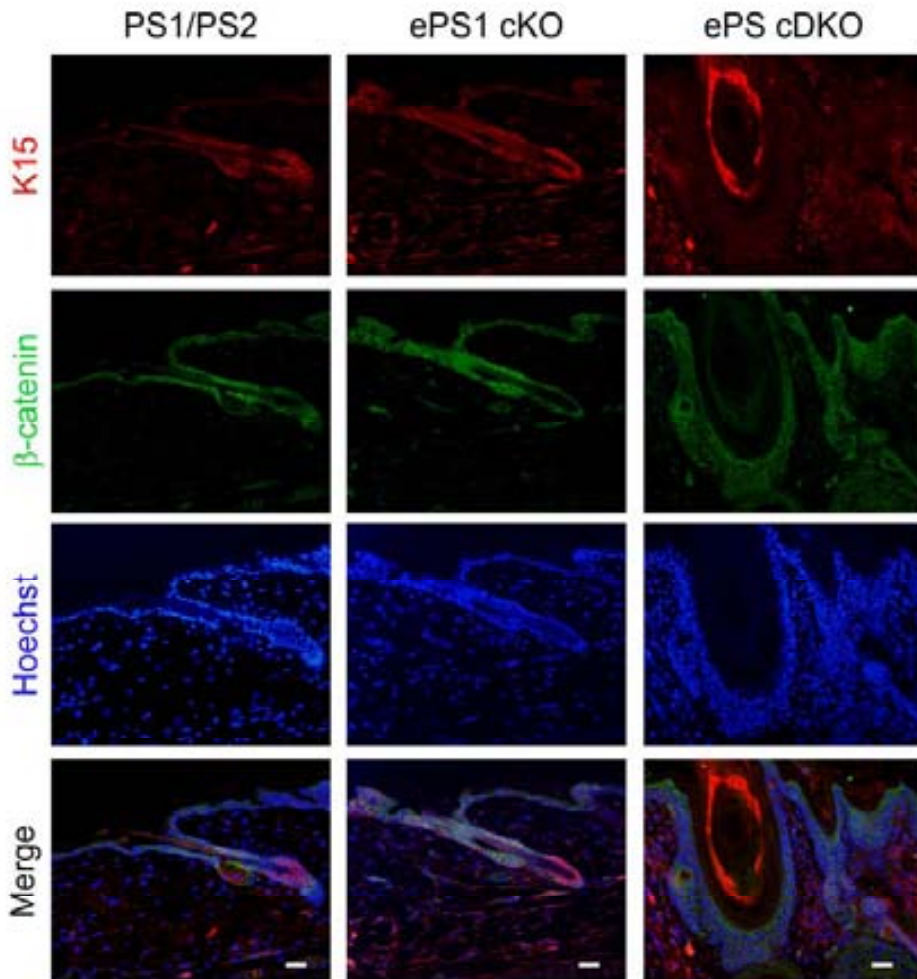


Figura R-23: Increment en els nivells de β -catenina però no de K15 en tumors epitelials de ratolins ePS cDKO. L'anàlisi per immunohistoquímica de teixit de ratolins de 2 mesos d'edat control (PS1/PS2), deficientes en PS1 (ePS1 cKO) i en ambdues PS (ePS cDKO) mostra un increment en els nivells de β -catenina en absència de PS, mentre que no s'observa expressió de K15 en aquests tumors. Barra d'escala: 30 μ m.

5.2. Queratinòcits de ratolins ePS cDKO tenen un fenotip invasiu

Per tal d'avaluar si queratinòcits de ratolins ePS cDKO presenten un fenotip invasiu es van realitzar assajos d'extensió cel·lular *in vitro* en queratinòcits primaris PS1^{f/f}; PS2^{-/-}; K14-Cre-ERT² (ePS cDKO) tractats amb vehicle o OHT per induir la deleció de PS1, tal com s'ha descrit prèviament (Gebhardt et al., 2006). Aquest assaig consisteix en sembrar les cèl·lules en cobreobjectes permetent que s'hi adhereixin únicament durant 10 minuts, passat aquest temps les cèl·lules es fixen i es tenyeixen amb faloidina que s'uneix a l'actina i permet visualitzar l'estructura del citoesquelet. Les imatges i la quantificació de l'assaig (Figura R-24) demostra que els queratinòcits ePS cDKO presenten una menor capacitat d'extensió en el substrat que els queratinòcits tractats amb vehicle ja que la majoria de cèl·lules ePS cDKO són més petites que les cèl·lules control indicant una major capacitat invasiva.

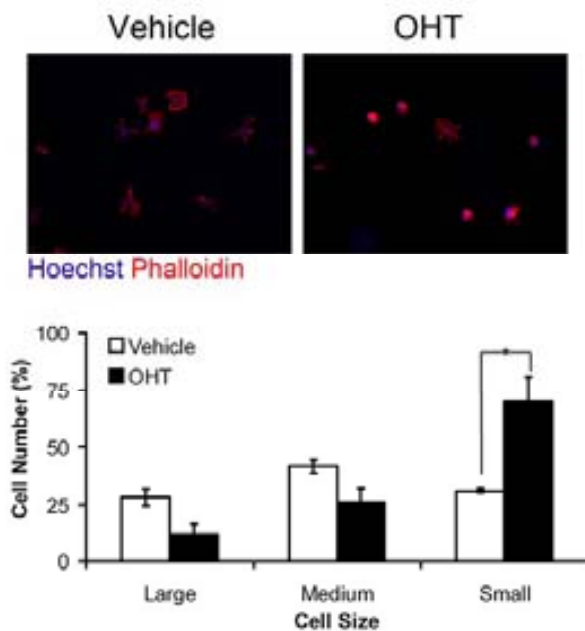


Figura R-24: Baixa capacitat d'extensió dels queratinòcits primaris de ratolins ePS cDKO. Es va dur a terme un assaig d'extensió cel·lular en queratinòcits primaris PS1f/f; PS2-/-; K14Cre-ERT² (ePS cDKO) tractats amb vehicle (etanol) o OTH (200 nM) per tal d'induir la deleció de PS1. La tinció amb faloidina (en vermell) mostra l'estructura del citoesquelet i la tinció amb Hoechst el nucli de la cèl·lula (en blau). Les imatges representatives i la quantificació de cada tractament mostren que la deleció de PS en queratinòcits produeix una menor extensió cel·lular en comparació amb cèl·lules control (vehicle). Les dades de la quantificació mostren el tant per cent de cèl·lules ocupant un àrea petita (<1000 unitats arbitràries), mitjana (1000-2000 u) o gran (>2000 u), quantificada amb el programa ImageJ.

Es mostra la mitjana \pm desviació estàndard de dos experiments independents, en cada un dels quals es va quantificar l'àrea de 50-250 cèl·lules per cada tractament. * $p < 0.001$.

6. L'ABSÈNCIA DE PS EN L'EPIDERMIS PRODUEIX UN INCREMENT EN ELS NIVELLS TOTALS D'EGFR I Fbw7

La desregulació de l'EGFR es present en un 35-55% dels tumors epitelials, sent un dels més potents estimuladors de motilitat tumoral i invasió (Sebastian et al., 2006). És important destacar que l'activació de la via senyalització de l'EGFR en un assaig d'extensió produeix una menor extensió cel·lular així com una reducció en la mida cel·lular (Haase et al., 2003) fenotip molt similar al observat en queratinòcits primaris de ratolins ePS cDKO (Figura R-24). En els capítols I i II d'aquesta tesi doctoral s'ha demostrat que les presenilines regulen els nivells i l'activació de l'EGFR a través de la ubiquitina lligasa Fbw7, sent aquesta responsable de la transformació cel·lular de fibroblasts causada per l'absència de PS. Amb aquests antecedents i les suggerents dades obtingudes en experiments d'extensió cel·lular, varem estudiar aquestes vies de senyalització en els ratolins ePS cDKO.

L'anàlisi immunohistoquímic de mostres de pell de ratolins control i ePS cDKO mostra un increment en els nivells del receptor EGFR coincidint amb la hiperproliferació en la pell de l'esquena de ratolins ePS cDKO comparat amb ratolins control (Figura R-25A). A més, el tractament de queratinòcits primaris de ratolins ePS cDKO amb OHT per tal d'induir la deleció de PS1 produeix un

increment en els nivells d'EGFR respecte a cèl·lules tractades amb vehicle així com un increment en els nivells basals d'ERK1/2 fosforilada indicant una activació d'aquesta via (Figura R-25B).

Per una altra banda, l'anàlisi per immunohistoquímica mostra un increment de Fbw7 en ratolins ePS cDKO en la pell de l'esquena i tumor respecte ratolins control (Figura R-26A). És interessant observar el canvi de localització de Fbw7 en les diferents mostres. En ratolins control Fbw7 es localitza tant en el citoplasma com en el nucli mentre que en la pell de l'esquena i del tumor de ratolins ePS cDKO es produeix un increment majoritàriament en el nucli (Figura R-26A). Aquest increment en els nivells de Fbw7 també es observat en queratinòcits primaris ePS cDKO tractats amb OHT en comparació a cèl·lules tractades amb vehicle (Figura R-26A), el que coincideix amb els resultats obtinguts en fibroblasts (Figura R-12). Finalment, observem una disminució en el fragment intracel·lular de Notch (NICD) en queratinòcits provinents de ratolins ePS cDKO que han estat tractats amb OHT respecte a queratinòcits tractats amb vehicle o controls (Figura R-26B). La disminució dels nivells de NICD en absència de PS es correspon per una banda amb una disminució de l'activitat γ -secretasa i per l'altra a un increment en els nivells de Fbw7, el qual és responsable de la seva degradació. Aquests efectes no són deguts a una acció intrínseca de l'OHT ja que queratinòcits que no expressen Cre recombinasa (PS1/PS2) no mostren cap canvi en els nivells d'EGFR, Fbw7 o NICD ni el l'activació d'ERK1/2 (Figures R-25B i 26B).

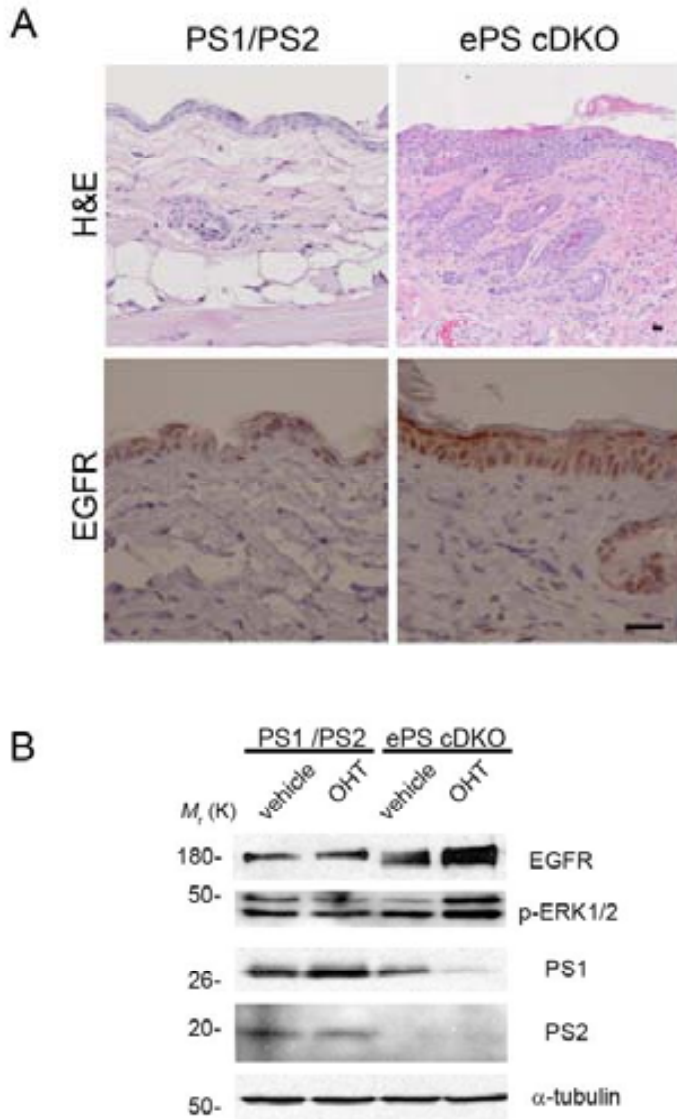


Figura R-25: L'absència de PS en pell de ratolins ePS cDKO produeix un increment en els nivells d'EGFR. A) La immunodetecció de l'EGFR en talls de pell englobats en parafina mostra un increment en els nivells d'aquest receptor en ratolins ePS cDKO, els quals presenten hiperproliferació de l'epidermis tal com es mostra en una tinció H&E. Barra d'escala: 30 μ m. **B)** Anàlisi dels nivells proteics d'EGFR i p-ERK1/2 en queratinòcits primaris de cries de ratolí control (PS1/PS2) i de ratolins ePS cDKO (PS1^{ff}; PS2^{-/-}; K14-Cre-ER^{T2}) tractats amb vehicle o 4-hidroxitamoxifé (OHT: 200 nM) per deletar PS1. El tractament amb OHT en queratinòcits ePS cDKO produeix un increment en els nivells d'EGFR i pERK1/2

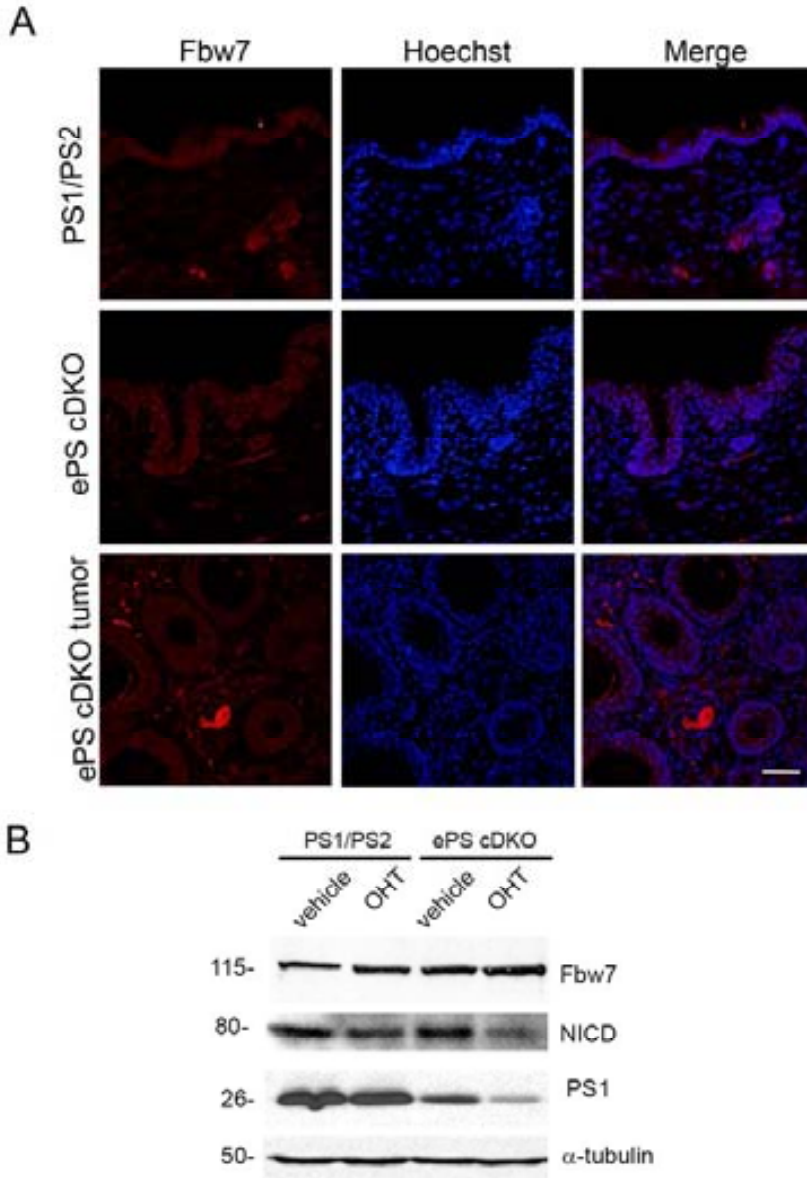


Figura R-26: L'absència de PS en pell produeix un increment en els nivells de Fbw7 *in vivo*.
A) La tinció específica de Fbw7 en mostres de pell mostra un increment en els nivells de Fbw7 en ratolins ePS cDKO. S'observa una localització predominantment nuclear a diferència dels ratolins control (PS1/PS2), majoritàriament citoplasmàtica. Barra d'escala: 30 μ m **B)** Increment en els nivells de Fbw7 i una disminució en els nivells del fragment intracel·lular de Notch (NICD) en queratinòcits primaris de ratolins ePS cDKO tractats amb OHT.

7. ELS RATOLINS DEFICIENTS EN PS1 ESPECÍFICAMENT EN PELL DESENVOLUPEN TUMORS EPITELIALS A EDATS AVANÇADES

Ratolins deficientes en PS1 (ePS1 cKO) en la capa basal de l'epidermis van desenvolupar tumors de pell a edats avançades (6-16 mesos) tal com ja s'havia descrit prèviament (Xia et al., 2001; Tournoy et al., 2004). Aquests ratolins també mostren un procés inflamatori intern, evidenciat per inflamació de la melsa i dels ganglis limfàtics. Els tumors desenvolupats per aquests ratolins van ser visiblement més grans i localitzats predominantment al cap i coll, tot i que algun individu va desenvolupar petits papil·lomes a la pell de l'esquena (Figura R-27). Histològicament s'observa que regions de la pell de la esquena d'aquests ratolins són relativament normals (Figura R-27 imatge B) ja que no s'observa hiperproliferació generalitzada o desorganització de les capes de la pell. Si més no certes regions de la pell de l'esquena es pot desenvolupar un procés tumoral que pot acabar esdevenint un tumor de tipus SCC, caracteritzat per la infiltració de les cèl·lules hiperproliferants en l'estroma (Figura R-27 imatge C). Estats més avançats del tumor es mostren en les imatges D,E,F de la Figura R-27 on s'observa una massiva infiltració de les cèl·lules tumorals en el teixit adipós.

Tanmateix, i a diferència dels ratolins ePS cDKO, cap dels ratolins estudiats desenvolupà un estat de caquèxia indicant un menor grau de malignitat dels tumors desenvolupats per ratolins ePS1 cKO.

En conjunt aquests resultats mostren que els tumors desenvolupats en absència d'ambdues PS presenten un increment en la via de senyalització d'EGFR i una disminució de la via de senyalització de Notch, ambdós implicats en el desenvolupament de càncer de pell. Fbw7 podria jugar un paper regulador de les dues vies implicades. Aquest treball és el primer que mostra que l'increment dels nivells de Fbw7, un important gen supressor de tumors, està associat amb el desenvolupament tumoral epitelial. A més, s'ha observat que en absència d'ambdues PS es produeix un fenotip molt més sever que únicament en absència de PS1, indicant que l'alteració d'una via de senyalització addicional mitjançada

per les dues PS està implicada en l'agressivitat tumoral. Els nostres resultats tan *in vitro* com *in vivo* demostren que aquesta via pot ser la via de l'EGFR .

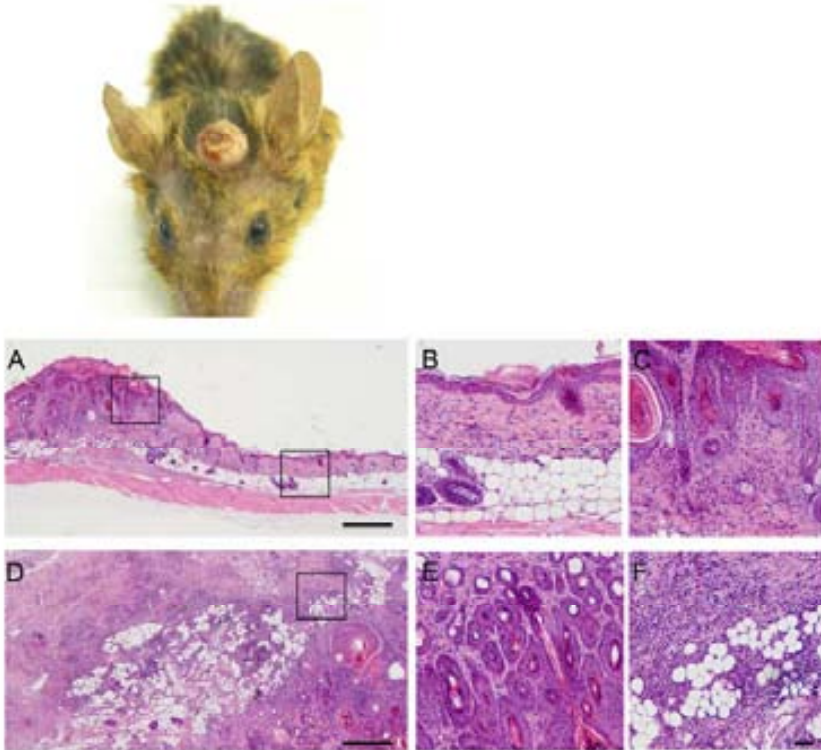


Figura R-27: Desenvolupament tumoral a la pell del cap i coll a edats avançades en ratolins ePS1 cKO. En la imatge es mostra un ratolí de 14 mesos d'edat amb deficiència específica en pell de PS1 (ePS1 cKO) que ha desenvolupat un tumor a la pell del cap. Tincions d'hematoxilina i eosina mostren massiva hiperproliferació i infiltració de les cèl·lules tumorals. Les imatges a baix augment A i D corresponen a la pell de la esquena i tumor respectivament. Les imatges B i C, E i F mostren detalls a gran augment de la pell de la esquena i el tumor, respectivament. Barra d'escala: 50 μm (B,C,E,F) i 500 μm (A,D).

DISCUSIÓ

Les PS són les unitats catalítiques del complex γ -secretasa, que és responsable de la proteòlisi de proteïnes transmembrana tipus I, incloent el receptor Notch i l'APP. La presenilina té un paper essencial en la senyalització del receptor Notch-1 en generar el domini intracel·lular de Notch (NICD), el qual està implicat en diversos processos cel·lulars com l'especificació cel·lular, la diferenciació, la proliferació i la supervivència neuronal (Selkoe and Kopan, 2003). La importància de la regulació de la via de Notch-1 per PS es fa palesa en ratolins PS1^{-/-} i PS1^{-/-}; PS2^{-/-} els quals moren perinatalment a causa de greus defectes durant el desenvolupament embrionari (Donoviel et al., 1999; Herreman et al., 1999; Shen et al., 1997), un fenotip molt similar al desenvolupat per ratolins Notch^{-/-} (Conlon et al., 1995). Malgrat que s'ha descrit una llarga llista de substrats proteolitzats per PS no es coneix el significat biològic de la majoria d'aquestes accions proteolítiques (Taula I-1). Per una altra banda, les PS posseeixen altres funcions que són independents de la seva activitat γ -secretasa, com per exemple la regulació de l'estabilitat de β -catenina. Les funcions de PS atribuïdes a una activitat independent de la seva activitat proteolítica són poc conegudes i no es coneix el mecanisme d'acció mitjançant el qual PS les porta a terme. En aquest treball hem aprofundit en dues cares poc conegudes i importants de PS: per una banda la seva implicació en la regulació de la degradació i tràfic de l'EGFR i per una altra el seu paper en el desenvolupament de càncer de pell.

Les presenilines actuen com a gens supressors de tumors epitelials

A part de la seva important implicació en la malaltia d'Alzheimer les presenilines han estat implicades en processos de carcinogènesi epitelial. La pèrdua parcial de funció de PS en ratolins PS1^{+/-}; PS2^{-/-} produeix hiperplàsia epitelial benigna a edats tardanes (entre 6 i 18 mesos) acompanyada de malaltia autoimmunitària (Tournoy et al., 2004) mentre que ratolins PS1^{-/-} que expressen PS1 en cervell desenvolupen carcinomes malignes en pell (Xia et al., 2001). La pèrdua

de funció de PS en l'ectoderm durant l'embriogènesi revela que PS no és necessària per a l'especificació de la pell, la determinació de destí cel·lular i la diferenciació temprana del fol·licle. Tanmateix post-natalment s'observa atrofia fol·licular i una severa hiperplàsia de l'epidermis que no pot ser estudiada en l'organisme adult degut a la mort dels animals després del deslletament a causa del desenvolupament d'un desordre limfoproliferatiu de les cèl·lules T (Demehri et al., 2008; Pan et al., 2004). Els defectes en el desenvolupament epitelial i apèndixs degut a la deleció de PS a nivell ectodèrmic van ser atribuïts a una desregulació de la via de Notch (Pan et al., 2004). En realitat, l'absència de Notch-1 específicament en pell produeix també la formació de tumors epitelials (Nicolas et al., 2003). Els tumors causats per l'absència de PS1 es van associar inicialment amb un increment de β -catenina (Xia et al., 2001). Degut a que les PS regulen tant de la via de Notch com de la via de β -catenina (Xia et al., 2001), ambdues vies de senyalització podrien estar implicades en el desenvolupament de tumors epitelials. En conjunt, aquests treballs suggereixen que les PS podrien estar actuant com a gens supressors de tumors. Al començament d'aquesta tesi doctoral però, els mecanismes moleculars pels quals les PS regulaven la proliferació epitelial i la formació de tumors eren desconeguts. El treball presentat en aquesta tesi doctoral posa de manifest que les presenilines regulen el desenvolupament de tumors epitelials mitjançant la desregulació de la via de l'EGFR. De fet, durant el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral altres grups van observar un increment de l'EGFR en tumors de pell en ratolins deficientes en PS1 (Repetto et al., 2007; Zhang et al., 2007) o nicastrina, un altre component del complex γ -secretasa (Li et al., 2007). Aquests estudis però no van definir si les alteracions en l'expressió d'EGFR causaven o eren conseqüència de l'increment de proliferació degut a l'absència de PS.

Les presenilines regulen la proliferació cel·lular a través de la via de senyalització del receptor d'EGF

En aquest treball s'ha demostrat que fibroblasts deficients en ambdues PS però no en absència parcial de PS1 o PS2 presenten un increment de la proliferació en condicions limitants de sèrum. Aquest increment en la proliferació és bloquejat en inhibir específicament la via de senyalització de l'EGFR i en expressar el gen de PS1 humà (Figura R-1). A més, els fibroblasts PS^{-/-} presenten creixement independent de l'ancoratge, una característica indicativa de la transformació oncogènica que també és dependent de la via de senyalització de l'EGFR (Ke et al., 2004; Rao et al., 2003). Aquests resultats estan d'acord amb el paper de PS en el control de la proliferació cel·lular, on la sobreexpressió de PS2 arresta les cèl·lules en fase G1 del cicle cel·lular (Janicki and Monteiro, 1999) mentre que la inactivació de PS2 en fibroblasts produeix un increment en la proliferació (To et al., 2006). En realitat no es coneixen les funcions específiques i diferencials de PS2 respecte PS1, excepte la seva funció en el control de l'apoptosi. La sobreexpressió de PS2 en cèl·lules HeLa i PC12 diferenciades produeix un increment en l'apoptosi (Janicki and Monteiro, 1997; Wolozin et al., 1996), indicant que PS2 produeix l'activació de vies apoptòtiques. A més, s'han detectat mutacions germinals en el gen de presenilina 2 en casos de càncer de mama (To et al., 2006).

Quins són els mecanismes moleculars implicats en la transformació cel·lular induïda per la inactivació de les PS? En els darrers anys les presenilines s'han implicat en la regulació de la via de senyalització de les MAPK/ERK. Les presenilines regulen negativament la senyalització de SAPK/JNK, un dels membres de la família de les MAPK (Kim et al., 2001). Per una altra banda, s'ha descrit l'activitat basal d'ERK1/2 disminuïda en fibroblasts deficients en PS1 o en ambdues PS i una disminució de la senyalització d'ERK1/2 induïda per PDGF acompanyada d'una reducció en els nivells del receptor (Kang et al., 2005; Kim et al., 2005). En el present treball s'ha demostrat que fibroblasts PS^{-/-} mostren un

increment sostingut en la senyalització de la via ras/MEK/ERK1/2 induïda per l'activació de l'EGFR (Figura R-3). Estudis de microscòpia confocal i biotinació mostren que aquest augment és degut a un increment en els nivells de l'EGFR present en la superfície cel·lular. A més, l'anàlisi bioquímic demostra que en absència de PS es produeix un increment en l'expressió de l'EGFR, ErbB3 i IGFR, mentre que els nivells d'ErbB2 no es veuen modificats (Figura R-1).

Les discrepàncies observades en aquests treballs que impliquen PS i la via de senyalització d'ERK1/2 suggereixen un paper multifuncional de les PS en les diferents vies de transducció de senyals regulant diferencialment la via de senyalització d'ERK1/2. Així, la disminució del receptor de PDGF en fibroblasts PS-/- és deguda a una disminució en la seva transcripció proteica (Kang et al., 2005). Per una altra banda, s'han suggerit dos mecanismes alternatius pels quals PS pot regular l'EGFR: regulant la seva transcripció a través del fragment intracel·lular d'APP derivat de l'activitat γ -secretasa de PS (Zhang et al., 2007) o bé regulant la degradació lisosomal del receptor (Repetto et al., 2007) i aquest treball). A més, l'alteració observada en aquest estudi en fibroblasts PS-/- en la via de senyalització de l'EGFR sembla ser específica, ja que no s'observa un increment de la via de senyalització de l'IGFR (Figura R-3). És interessant destacar que l'IGFR és proteolitzat per la presenilina (McElroy et al., 2007), per la qual cosa l'increment dels nivells de l'IGFR observat en absència de PS pot ser degut a un efecte derivat de la manca de proteòlisi. És també important destacar l'increment en els nivells del receptor ErbB3 observats en absència de PS. Malgrat que en aquest estudi no s'ha aprofundit en aquest resultat no s'ha d'oblidar que ErbB3 està fortament implicat en el desenvolupament de diversos tipus de càncer, incloent càncer de mama, d'ovari, de pròstata, gastrointestinal i de cervell (Sithanandam and Anderson, 2008). El coneixement de la regulació d'ErbB3 és de gran importància ja que aquest receptor no posseeix domini cinasa intrínsec sent difícil l'ús d'inhibidors com a diana terapèutica.

Finalment, el nostre estudi mostra que es produeix un increment en els nivells d'EGFR únicament en absència d'ambdues PS, un efecte que és independent de

l'activitat γ -secretasa, indicant que el mecanisme pel qual PS regula l'EGFR és redundant en PS1 i PS2.

Les presenilines són clau en la regulació del tràfic intracel·lular de l'EGFR

L'expressió de l'EGFR és regulada essencialment mitjançant dos mecanismes principals: transcripció i degradació. L'anàlisi de la transcripció gènica i l'activació del promotor de l'EGFR ens mostrarà que no existeixen canvis en la síntesi del receptor en absència de PS (Figura R-5). Aquest resultat contrasta amb una publicació recent que indica que la regulació de l'EGFR per PS és deguda a canvis en la seva transcripció mitjançada pel fragment intracel·lular d'APP (Zhang et al., 2007). Contràriament, els nostres resultats indiquen que la PS regula negativament la degradació del receptor d'EGF. La unió del lligand a l'EGFR induïx la seva activació i dimerització, produint una ràpida internalització de l'EGFR en vesícules de clatrina sent immediatament multiubiquitinatzat, senyal que el dirigeix cap a la ruta endocítica de degradació. En els cossos multivesiculars l'EGFR deixa de ser actiu ja que és defosforilat i deubiquitinatzat (Marmor and Yarden, 2004). La via lisosomal és la principal via de degradació de l'EGFR, malgrat que la funcionalitat del proteosoma és necessària per la seva degradació a través d'un mecanisme no totalment conegut (Longva et al., 2002). Estudis d'estabilitat demostren un retard tant en la degradació constitutiva com en la degradació induïda per EGF de l'EGFR. Així la vida mitja de l'EGFR en fibroblasts PS^{-/-} és major tant en presència com en absència d'EGF (Figura R-6). Aquests resultats suggereixen que les PS regulen negativament la degradació de l'EGFR, la qual cosa està d'acord amb els treballs d'altres autors (Repetto et al., 2007). La inhibició de la via lisosomal produeix un bloqueig en la degradació de l'EGFR tan en cèl·lules control com en cèl·lules PS^{-/-}. Contràriament, la inhibició de l'activitat proteosomal mitjançant l'ús de lactacistina produeix un retard de la degradació de l'EGFR en cèl·lules control però no en cèl·lules PS^{-/-}. Aquest resultat indica que les PS regulen específicament la degradació de l'EGFR regulada pel proteosoma. És ben conegut que el proteosoma és necessari per a la degradació de l'EGFR

(Alwan et al., 2003; Longva et al., 2002) tot i que hi ha controvèrsia sobre si la seva activitat és essencial o no en base a l'inhibidor utilitzat, ja que la lactacistina és més selectiva que el MG132, que inhibeix altres vies de senyalització (Alwan et al., 2003; Longva et al., 2002). Els nostres resultats indiquen que en absència de PS la degradació de l'EGFR és independent de l'acció del proteosoma.

Contràriament a la degradació, la internalització de l'EGFR no està alterada en absència de PS ja que no s'observen diferències significatives en la quantitat de receptor internalitzat ni en el nombre de vesícules que contenen l'EGFR que es formen en els primers temps de l'endocitosi induïda per lligand (Figura R-7). En canvi, si s'observa un bloqueig de la ruta endocítica en les etapes tardanes de l'endocitosi de manera que l'EGFR s'acumula en vesícules grans i irregulars. Aquests resultats indiquen una alteració en les etapes tardanes de la degradació lisosomal en absència de PS. Els assajos de biotinació ens mostren una disminució en el reciclatge de l'EGFR, alteració que pot ser deguda al bloqueig en les etapes tardanes d'endocitosi.

Una alteració similar s'observa en cèl·lules deficientes en PS1 en la desregulació del recanvi de la telencefalina i la α - i β - sinucleïna, les quals s'acumulen en orgànuls lisosomals i/o vacuoles d'origen autofàgic a través d'un mecanisme independent a l'activitat γ -secretasa (Esselens et al., 2004; Wilson et al., 2004). És interessant destacar que un nombre creixent de treballs descriuen la regulació del tràfic intracel·lular de diverses proteïnes per les PS. L'absència de PS1 produeix una anormal maduració i tràfic d'algunes proteïnes de membrana com l'APP, Notch, el receptor TrkB, nicastrina o la tirosinasa (Herreman et al., 2003; Kaether et al., 2002; Naruse et al., 1998); (Wang et al., 2006). També s'ha descrit que l'activitat γ -secretasa és necessària pel correcte reciclatge endosomal (Zhang et al., 2006) i que proteïnes de la família Vps11p són substrats de l'activitat γ -secretasa (Nyborg et al., 2006). A diferència d'aquests últims treballs, el nostre estudi demostra que l'increment dels nivells de l'EGFR en fibroblasts PS-/- no és degut directament a l'activitat γ -secretasa (Figura R-4) fet que està d'acord amb un treball recentment publicat (Repetto et al., 2007).

Les presenilines regulen la ubiquitinització i deubiquitinització de l'EGFR

La ubiquitinització de l'EGFR no és necessària per la seva internalització (Huang et al., 2006), tanmateix la ubiquitinització sostinguda i l'associació de Cbl al receptor activat són essencials per a la seva eficient degradació (Huang et al., 2006; Mosesson et al., 2003). Com hem comentat, els nostres resultats indiquen que la internalització de l'EGFR induïda per EGF no està alterada en absència de PS, mentre que el reciclatge i la degradació estan afectats. La pèrdua de PS incrementa la ubiquitinització basal però redueix la multiubiquitinització sostinguda induïda pel lligand resultant en un retard significatiu en la degradació de l'EGFR (Figura R-8).

En absència de PS, tot i observar un increment de la ubiquitinització basal de l'EGFR, no hem observat diferències en els nivells de la ubiquitina lligasa Cbl (no mostrat), tanmateix seria interessant analitzar si Cbl es troba associada a l'EGFR durant tot el procés de degradació. Així sembla ser que PS afavoreix la multiubiquitinització sostinguda del receptor, procés necessari per a la correcta conducció de l'EGFR a través de la ruta endocítica (Huang et al., 2006). Curiosament, l'estimulació de l'EGFR amb TGF α induïx una ràpida deubiquitinització del receptor causant una retenció del receptor en MVBs i disminuint la degradació del receptor (Alwan et al., 2003; Longva et al., 2002). D'aquesta manera PS podria estar regulant la deubiquitinització necessària per l'alliberament del receptor en els cossos multivesiculars que finalitzaria amb l'emissió de senyals intracel·lulars per part del receptor.

Per una altra banda, s'ha descrit que l'activitat proteosomal és necessària per la deubiquitinització de l'EGFR, precedint l'alliberament de l'EGFR en el lisosoma (Alwan et al., 2003). El fet que el proteosoma afecta majoritàriament la degradació de l'EGFR en situació de sostinguda ubiquitinització (Alwan et al., 2003; Longva et al., 2002) podria explicar que la degradació de l'EGFR no està afectada per l'inhibidor del proteosoma en fibroblasts deficients en PS. També s'ha observat que la inhibició del proteosoma mitjançant l'ús del MG132 produeix un increment

en la ubiquitinització basal i la multiubiquitinització induïda pel lligand (Kesarwala et al., 2009). De fet, els nostres resultats suggereixen que PS desestabilitza l'EGFR afectant un pas de ubiquitinització/deubiquitinització que podria regular la regulació del tràfic i degradació endosomal/lisosomal de l'EGFR dependent de PS1.

La presenilina regula els nivells i l'activitat de la ubiquitina lligasa Fbw7

Prèviament s'ha demostrat una interacció funcional entre els homòlegs en *C.elegans* de presenilina (*sel-12*) i Fbw7 (*sel10/cdc4*). La pèrdua d'activitat de *sel-10* porta a la supressió del fenotip defectiu de posta d'ous causat pels mutants de *sel-12* (Wu et al., 1998). En cèl·lules de mamífers, s'ha demostrat que Fbw7 regula els nivells i l'activitat de PS (Li et al., 2002) tot i que no s'ha investigat un efecte recíproc. La ubiquitina lligasa Fbw7 és un gen supressor de tumors que es troba mutat en una gran varietat de càncers (Welcker and Clurman, 2008). Fbw7 dirigeix múltiples proteïnes oncogèniques implicades en la regulació del cicle cel·lular cap a degradació proteosomal. Sorprenentment, els nostres estudis revelen que PS regula negativament els nivells i l'activitat de Fbw7 (Figura R-12). La regulació de Fbw7 per la PS és independent de la seva activitat proteolítica, ja que un inhibidor de l'activitat γ -secretasa no afecta els nivells endògens de Fbw7. Tanmateix, hem observat que la pèrdua de PS causa un increment en els nivells d'ARNm de Fbw7 suggerint que PS disminueix l'expressió de Fbw7 en regular la seva transcripció (Figura R-14). Aquest és el primer estudi que demostra un mecanisme de regulació de transcripció i funció del gen Fbw7. La motivació d'estudiar Fbw7 en el nostre sistema s'originà en l'existència d'una interacció funcional entre PS i Fbw7, de manera que és possible una regulació addicional de PS sobre Fbw7. Recentment s'ha suggerit la dimerització de Fbw7 com a possible mecanisme regulador de la seva activitat (Welcker and Clurman, 2007). En absència de PS s'observa un increment en el nombre de dímers de Fbw7 indicant que PS podria estar regulant la capacitat de dimerització i activitat de Fbw7 i en conseqüència la interacció amb els seus substrats. Tanmateix, és també possible que l'increment

en el nombre de dímers sigui conseqüència de l'augment en els nivells totals de Fbw7.

Els nostres resultats demostren per primera vegada un *crossstalk* entre Fbw7 i EGFR en proliferació i transformació cel·lular. Diverses observacions demostren que Fbw7 modula positivament la funció de l'EGFR. En primer lloc, l'expressió de Fbw7 en un sistema heteròleg incrementa l'estabilitat i senyalització de l'EGFR, mentre que el mutant dominant negatiu redueix la seva expressió (Figura R-10). Segon, la inactivació gènica de Fbw7 en fibroblasts i cèl·lules epitelials produeix una disminució dels nivells de l'EGFR (Figura R-11). Tercer, l'increment anormal en els nivells d'EGFR en cèl·lules PS-/- van ser disminuïts mitjançant el silenciament de Fbw7 o en disminuir els nivells de Fbw7 en cèl·lules PS-/-; hPS1 (Figura R-13). Finalment, la capacitat de formació de colònies en medi semi-sòlid dependent de la via de senyalització de l'EGFR en cèl·lules PS-/- es va reduir significativament en inactivar Fbw7 (Figura R-15). Els nostres resultats no aclareixen si Fbw7 afecta la degradació de l'EGFR directament o indirectament a través d'un efector desconegut. Tanmateix els nostres resultats defineixen un nou paper de Fbw7 facilitant l'estabilitat i senyalització de l'EGFR en cèl·lules epitelials. Això contrasta amb la funció ben establerta de Fbw7 en la ubiquitinització i conseqüent degradació de proteïnes oncogèniques i el seu paper com a gen supressor de tumors en diversos tipus de càncer (Welcker and Clurman, 2008). És possible que Fbw7 reguli els nivells d'un efector encara no identificat necessari pel tràfic de l'EGFR al lisosoma. Un increment en la funció de Fbw7 portaria a una disminució en els nivells d'aquest efector fent que no sigui possible la degradació de l'EGFR. L'increment en els nivells de Fbw7 degut a la pèrdua funcional de PS en fibroblasts i queratinòcits primaris produeix una disminució en els substrats de Fbw7 com per exemple Notch1/4. El fet que l'absència de Fbw7 estigui clàssicament implicada en nombrosos tipus de càncer porta a pensar que l'entorn cel·lular podria estar regulant la funció de Fbw7. Aquest fenomen es produeix amb el receptor Notch, on la seva sobreexpressió en el sistema immunitari condueix a diversos tipus de leucèmia mentre que la seva absència en pell dona lloc a l'aparició espontània de tumors epitelials (Nicolas et al., 2003). Cal destacar que el

fragment intracel·lular de Notch (NICD) és substrat de Fbw7, de manera que un increment en els nivells de Fbw7 dóna lloc a una disminució en els nivells de NICD amb la conseqüent disminució de la senyalització d'aquest receptor. A més, de forma molt interessant, recentment s'ha descrit que l'EGFR regula negativament la transcripció de Notch1 (Kolev et al., 2008). Segons aquest escenari, PS estaria regulant la senyalització d'aquest receptor mitjançant tres mecanismes diferents: la regulació de la proteòlisi de NICD depenent de γ -secretasa, la seva estabilitat regulant Fbw7 i la seva transcripció a través de la senyalització de l'EGFR.

En resum, aquest estudi aporta evidències genètiques i bioquímiques que demostren que la presenilina regula negativament la ubiquitina lligasa Fbw7, la qual actua com a regulador positiu o negatiu de la via de senyalització d'EGFR i Notch, respectivament. Segons la nostra hipòtesi la desregulació d'aquestes dues vies en absència de PS dóna lloc a un increment en proliferació i transformació cel·lular (Figura D-1).

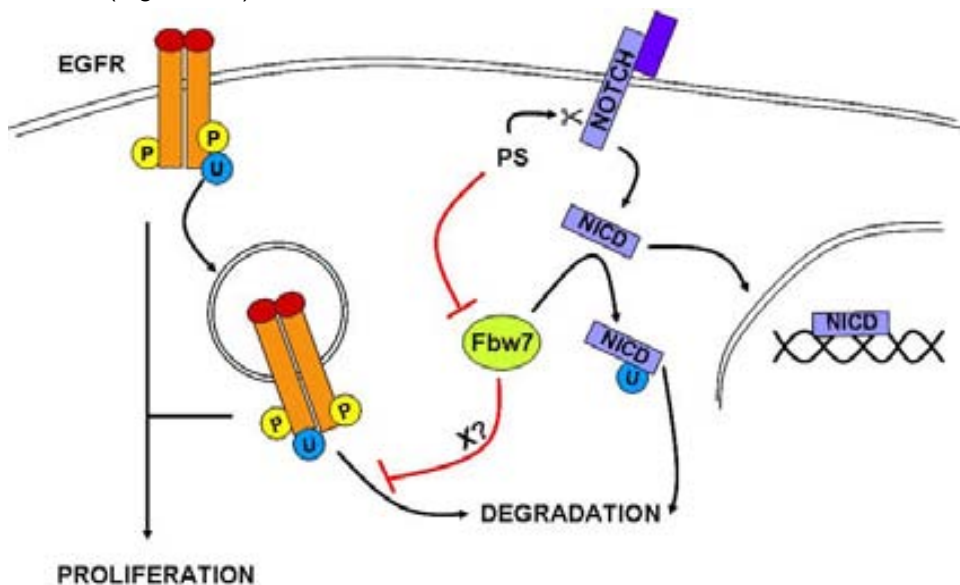


Figura D-1: Model de regulació d'EGFR i Notch per PS a través de Fbw7. Presenilina regula negativament l'expressió de Fbw7, la qual regula positivament la degradació d'EGFR a través d'un mecanisme no del tot aclarit però que dependria de la ubiquitinització de l'EGFR. A més, Fbw7 regula l'estabilitat de NICD, generat per l'activitat γ -secretasa (Gupta-Rossi et al., 2001). L'absència de PS produeix un increment de Fbw7 i d'EGFR així com la inactivació de la via de senyalització de Notch.

La deleció condicional de PS1 i PS2 en ratolins ePS cDKO causa carcinogènesi epitelial

Resultats previs indicaven que la deficiència parcial de PS en ratolins PS1 +/-; PS2-/- causa hiperplàsia epitelial benigna a edats tardanes (Tournoy et al., 2004) mentre que la deleció de PS1 en ratolins PS1-/- que expressen PS1 humana en cervell causa carcinomes malignes en pell (Xia et al., 2001). Per tant el fenotip oncogènic causat per la pèrdua de funció de les PS és depenent de la dosi gènica de PS, sent més agressiva l'absència total de PS1. Per tal d'estudiar el paper de PS en la carcinogènesi epitelial en l'adult i degut a que la deleció de PS1 resulta letal en l'embrió (Donoviel et al., 1999; Herreman et al., 1999; Shen et al., 1997) i per evitar possibles efectes de la deleció de PS i la senyalització de Notch en l'estadi embrionari (Demehri et al., 2008; Pan et al., 2004) vam generar un model murí condicional induïble *knockout* de PS1 i PS2 en pell (ePS cDKO). Es va creuar un ratolí mutant amb dues seqüències loxP flanquejant el gen endogen de la PS1 en un *background* PS2-/- (Saura et al., 2004) amb un ratolí transgènic K14-Cre-ERT² en el qual el tractament de 4-hidroxitamoxifé (OHT) produeix l'expressió de la Cre recombinasa sota el control del promotor de la queratina K14, el qual és actiu en la capa basal de l'epidermis (Li et al., 2000). La deleció de PS1 i PS2 es mostrà específica en la pell dels animals ePS cDKO, els quals són viables, fèrtils i fenotípicament normals fins als dos mesos d'edat (Figura R-17). En aquesta edat detectàrem una deleció espontània de PS1, efecte segurament degut a una repressió incompleta de l'expressió de Cre recombinasa del constructe K14-Cre-ERT² tal com s'ha observat anteriorment (Stratis et al., 2006). És possible que una mínima expressió de Cre recombinasa amb el promotor K14-Cre-ERT² a nivell postnatal doni lloc a una deleció de PS suficient per a desenvolupar el fenotip observat, cosa que no s'observa amb altres gens (Benitah et al., 2005; Li et al., 2000).

La deleció de presenilina precedeix un procés tumoral altament agressiu. Aquest fenotip és degut a l'absència simultània de PS1 i PS2 ja que en aquesta edat els

ratolins condicionals en pell PS1^{-/-} (ePS1 cKO) i *knockout* PS2^{-/-} són absolutament normals. A més, el tractament sistèmic o local de ratolins ePS cDKO de 1.5-2 mesos d'edat amb OHT per tal d'induir la deleció de PS1 produeix una ràpida hiperplàsia de l'epidermis i la mort dels ratolins ePS cDKO pocs dies després del tractament. El conjunt d'aquests resultats confirmen que el fenotip observat és degut a la deleció de PS en pell. Als dos mesos d'edat els ratolins ePS cDKO manifesten pèrdua de pes progressiva que correspon a un estat de caquèxia, la qual els condueix a la mort a una edat màxima de 2.5-3 mesos (Figura R-19). La caquèxia és característica de la fase terminal d'un procés tumoral i es defineix com la pèrdua de pes progressiva sense voluntat de perdre'l, tanmateix també es produeix com a conseqüència de certes malalties infeccioses. La manifestació de la caquèxia, causada per un procés tumoral altament agressiu o un procés infecciós, demostra la importància de les PS en el manteniment de l'homeòstasi epitelial en l'organisme adult.

A més, la necròpsia dels ratolins posa de manifest un prominent procés inflamatori evidenciat per esplenomegàlia i inflamació de tots els nòduls limfàtics. Un fenotip similar es desenvolupa per ratolins PS1^{+/-}; PS2^{-/-} els quals desenvolupen malaltia autoimmune caracteritzada per inflamació de la melsa i nòduls limfàtics (Tournoy et al., 2004). En aquest cas es tracta d'una deleció parcial de PS a nivell sistèmic fent palesa la importància de les presenilines en el desenvolupament de limfòcits corroborant les observacions que ja s'havien fet *in vitro*. No oblidem però que en aquest treball hem observat que ratolins ePS1 cKO desenvolupen a edats avançades tumors de pell presentant també signes d'inflamació com senyala l'esplenomegàlia, indicant que la deleció específica en la pell de PS1 produeix una resposta inflamatòria (Figura R-27). En el nostre cas és possible que el procés inflamatori observat sigui degut a les lesions cutànies presents a la pell del coll de l'animal fent-lo més sensible a infeccions.

Amb les dades obtingudes fins el moment no podem concloure la causa exacta de la mort dels animals. És possible que els ratolins morin degut a un procés metastàtic generalitzat degut a l'agressivitat i invasivitat dels tumors de pell desenvolupats. Per una altra banda és possible que s'ha produït metàstasi en els

òrgans limfoides i que aquesta ocasió immunosupressió i en conseqüència infecció generalitzada dels ratolins ePS cDKO produint-ne la mort. Les dues hipòtesis explicarien l'estat de caquèxia desenvolupat pels animals. Serà interessant llavors explorar el paper de la inflamació en aquest fenotip. Clàssicament s'ha observat la presència de cèl·lules inflamatòries en biòpsies de tumors així com una elevada freqüència de desenvolupament de tumors en àrees d'inflamació crònica. En els darrers anys s'ha comprovat que pacients amb malalties inflamatòries presenten un major risc de desenvolupar càncer i que fàrmacs antiinflamatoris en disminueixen el risc senyalant un important paper de la inflamació en el desenvolupament tumoral (Mantovani et al., 2008). La disrupció de la funció de la pell com a barrera amb el medi extern produeix inflamació en el teixit epitelial, i aquesta està invariablement associada amb un increment en susceptibilitat tumoral (Mueller, 2006; Quigley et al., 2009). És possible que els ratolins ePS cDKO desenvolupin un procés tumoral metastàtic provinent d'un tumor SCC altament agressiu que els porta a un possible estat d'immunosupressió o contràriament, una ferida inicial produeix un estat crònic d'inflamació que afavorirà el desenvolupament de SCC en aquests ratolins.

La deleció d'ambdues PS en la pell adulta de ratolins va desencadenar el desenvolupament en >95% dels casos de lesions al voltant dels ulls, boca i la pell del coll, que en ser analitzades histològicament es van classificar com a tumors de tipus escatós (SCC). L'anàlisi histològic de la pell de l'esquena revelà hiperproliferació i hiperqueratosi en l'epidermis, a més d'una desorganització de les capes epitelials. Aparentment sembla ser que els tumors apareixen espontàniament a la regió del coll, tanmateix queda per resoldre si la disrupció de l'estructura de la pell del coll i el conseqüent procés inflamatori són esdeveniments previs al desenvolupament tumoral o per contra en són una conseqüència.

Els SCC desenvolupats pels ratolins ePS cDKO presenten un elevat grau de cèl·lules proliferants visualitzades amb el marcador de proliferació Ki67 (Figura R-22). A més són K15 negatius, indicant que es tracta d'un SCC (Jih et al., 1999; Porter et al., 2000) ja que els BCC expressen aquesta queratina. Tanmateix, seria necessari l'estudi d'altres marcadors per a concloure l'origen del tipus tumoral ja

que els pilomatricomes també es mostren K15 negatius tot i que les lesions observades han estat classificades histològicament com a SCC (Jih et al., 1999). Així, l'origen causal del deteriorament físic dels ratolins ePS cDKO és el desenvolupament de tumors SCC a una edat molt temprana, presumptament aquest procés tumoral ocasionaria immunodepressió probablement deguda a metastasi en el sistema limfàtic fent susceptible els animals a qualsevol tipus d'infecció, que els causaria la mort. La formació de lesions cutànies i la pèrdua de l'homeòstasi epitelial alteren una de les funcions més importants de la pell, la protecció vers al medi extern fent vulnerable l'organisme animal en front a qualsevol agent patogen. El fenotip observat en els ratolins ePS cDKO indica que l'absència simultània de PS1 i PS2 és suficient pel desenvolupament de tumors SCC suggerint que no és necessària cap mutació per a que es produeixi transformació cel·lular. De totes maneres, seria interessant estudiar la possible presència de mutacions en el gen *H-ras*, àmpliament associada a iniciació tumoral, en aquests ratolins (introducció punt 1.5.4). Degut a la implicació de la via de senyalització de l'EGFR en la hiperproliferació deguda a l'absència de PS, és probable que no es trobin mutacions en H-ras tal com passa en un model animal amb sobreexpressió del lligand de l'EGFR, el TGF α (Dominey et al., 1993; Vassar et al., 1992).

Un resultat interessant d'aquest estudi és que l'administració intraperitoneal de BrdU, un agent citotòxic, en cries de ratolí ePS cDKO va produir una aparició generalitzada i prematura d'hiperplàsia epitelial que desembocà en la formació de SCC. Aquest efecte no s'observà en ratolins injectats control o ePS1 cKO. Aquests resultats inesperats indiquen que els ratolins ePS cDKO presenten una major susceptibilitat a desenvolupar tumors en front a l'exposició a un agent citotòxic com és el BrdU (Anisimov and Osipova, 1992; Bannigan et al., 1990). A més aporta noves dades sobre la importància en la dosi gènica de PS en carcinogènesi epitelial, ja que ratolins amb una delecció parcial de PS no desenvolupen aquest procés tumoral. Aquesta troballa obre la possibilitat d'estudiar amb més profunditat la relació de presenilina i susceptibilitat tumoral mitjançant irradiació dels ratolins o realització del protocol d'inducció de tumors basat en l'administració de

DMBA/TPA (introducció punt 1.5.3). Tanmateix, ambdós processos experimentals requereixen temps llargs de tractament. La curta vida d'aquests ratolins mutants i l'agressivitat de la malaltia desenvolupada fan que sigui èticament qüestionable l'aplicació d'aquests protocols.

Crosstalk entre PS, EGFR i Fbw7 en el desenvolupament de tumors epitelials

L'alteració de la senyalització de β -catenina ha estat associada a la formació de tumors en ratolins deficientes en PS (Tournoy et al., 2004; Xia et al., 2001). El fet que ratolins amb deleció del domini d'unió a β -catenina no desenvolupin tumors de pell (Deng et al., 2006) suggereix que altres vies de senyalització poden estar involucrades en el desenvolupament de tumors epitelials en absència de PS. Aquesta idea està reforçada pel fet que l'expressió de l'EGFR està incrementada en tumors de pell en ratolins deficientes en PS1 (Repetto et al., 2007; Zhang et al., 2007). Els nostres resultats indiquen que l'increment dels nivells d'EGFR en els SCC de ratolins ePS cDKO està associat a un increment en els nivells de Fbw7. Aquest resultat és de gran rellevància ja que mai abans s'havia descrit un increment en el gen supressor de tumors Fbw7 en un procés tumoral. Al contrari, la pèrdua de funció de Fbw7 està associada a diferents tipus de càncers. Malgrat que el paper de Fbw7 en un procés tumoral epitelial ha de ser estudiat amb més profunditat en un futur, els nostres resultats suggereixen que la desregulació de la via de senyalització de Notch per Fbw7 pot jugar un paper important en la carcinogènesi epitelial. L'absència de Notch-1, un important oncogen especialment en diferents tipus de leucèmia (O'Neil et al., 2007), causa la formació espontània de BCC i SCC (Nicolas et al., 2003; Proweller et al., 2006). Contràriament, la pèrdua de senyalització de Notch en l'ectoderm embrionari causa dèficits en la diferenciació de l'epidermis, desordre limfoproliferatiu i mort (Demehri et al., 2008), mentre que l'activació de Notch1 en queratinòcits de la capa basal de l'epidermis desencadena diferenciació prematura conduint a baixa capacitat de proliferació (Blanpain et al., 2006). En aquesta tesi doctoral hem descrit una disminució en els nivells de NICD juntament amb nivells incrementats

de Fbw7 en queratinòcits de ratolins ePS cDKO. Aquestes dades indiquen que les vies de senyalització de l'EGFR i de Notch poden participar en el fenotip oncogènic causat per la deficiència de PS. A més, aquests resultats en conjunt indiquen que les PS a part de regular positivament la generació de NICD a través de l'activitat γ -secretasa (De Strooper B. et al., 1999), poden regular la transcripció gènica de Notch mitjançant la regulació de la via de senyalització d'EGFR (Kolev et al., 2008) i retardar la degradació de NICD controlant els nivells de Fbw7, la ubiquitina lligasa responsable de la seva degradació (Gupta-Rossi et al., 2001; Wu et al., 2001).

Consistent amb els nostres resultats, s'ha observat un *crossstalk* negatiu entre les vies de senyalització de *let-23*/EGFR i *lin-12*/Notch en *C.elegans* durant l'especificació dels precursors vulvars (Shaye and Greenwald, 2002). Notablement, l'homòleg en *C.elegans* de LRBA (*beige-like anchor protein*) *sel-2* que actua com a regulador negatiu de *lin-12*/Notch, regula positivament el creixement de cèl·lules tumorals en regular el tràfic de l'EGFR en endosomes i la senyalització d'aquest receptor (de Souza N. et al., 2007; Wang et al., 2004). A més, recentment s'ha demostrat una disminució en els nivells de PS1 i Notch-1 proteolitzat així com un increment en els nivells d'EGFR en papil·lomes de ratolins *knockout* condicionals d'ATF2 (*activating transcription factor 2*; Bhoumik et al., 2008). En base als nostres resultats, proposem que les PS regulen el *crossstalk* entre les vies de senyalització d'EGFR i Notch a través de Fbw7 durant la carcinogènesi epitelial (Figura D-1).

Les presenilines són clau en la regulació de vies fisiològiques implicades en processos de carcinogènesi

L'evasió de tots els sistemes de seguretat de la cèl·lula condueix a la transformació d'una cèl·lula tumoral mitjançant l'adquisició de sis propietats particulars: 1) l'autosuficiència de senyals de creixement; 2) la insensibilitat vers a senyals inhibidores del creixement; 3) l'evasió de l'apoptosi; 4) potencial replicatiu il·limitat; 5) angiogènesi sostinguda i 6) invasió del teixit i metàstasi (Hanahan and Weinberg, 2000) (Figura D-2). El paper central de PS en la regulació de diferents vies de senyalització implicades en aquests processos pot tenir una gran

importància en la transformació oncogènica d'una cèl·lula. Així, els nostres resultats indiquen que els gens de les PS són una peça clau en la regulació de diverses proteïnes implicades en proliferació cel·lular: Notch, β -catenina, EGFR i Fbw7. És molt possible que el fenotip transformant proliferatiu observat en l'absència de PS no sigui degut a l'alteració d'una única via de senyalització si no a l'efecte de la combinació de vàries d'elles. Un ratolí transgènic que sobreexpressa TGF α desenvolupa papil·lomes al voltant d'una ferida o després del tractament amb TPA, però no tumors de tipus escatós (Dominey et al., 1993; Vassar et al., 1992). Ratolins amb deficiència dels receptors Notch desenvolupen també SCC però apareixen a edats més avançades que en els ratolins ePS cDKO (Proweller et al., 2006). Finalment, l'estabilització de β -catenina en un model animal produeix la formació de pilomatricomes (Gat et al., 1998; Lo Celso et al., 2004) i no SCC.

L'alteració de Notch-1/4, β -catenina, EGFR i Fbw7 en absència de PS compleix un gran nombre d'aquestes característiques (Figura D-2). En primer lloc, la família de proteïnes Notch regulen l'**angiogènesi** tumoral (Figura D-2), tanmateix no és del tot clar si l'activació de la via de senyalització de Notch té efectes pro- o anti-angiogènics ja que s'han observat els dos tipus d'efectes sobreexpressant o delectant Notch (Rehman and Wang, 2006). Una possibilitat és que sigui crucial un nivell òptim de senyalització de Notch per a la correcta diferenciació endotelial i l'angiogènesi (Rehman and Wang, 2006). Si més no, els tumors de pell desenvolupats en ratolins condicionals *knockout* de Notch-1 presenten un elevat grau de vascularització (Nicolas et al., 2003) fet també observat en ratolins ePS cDKO (Figura R-20) indicant que l'angiogènesi observada en absència de PS pot ser deguda a una disminució en la senyalització de Notch. En segon lloc, la via de senyalització de β -catenina té un paper dual ja que per una banda regula l'adhesió cel·lular mitjançant la regulació de E-cadherina i per altra banda pot translocar al nucli activant la transcripció de gens implicats en proliferació i diferenciació cel·lular com ciclina D i c-myc (Logan and Nusse, 2004). De manera molt simple, podem dir que la regulació aberrant de β -catenina permet a la cèl·lula tumoral la **invasió** del teixit i li atorga **capacitat autoreplicativa** (Figura D-2). En tercer lloc,

l'increment en els nivells de l'EGFR redueix la dependència de la cèl·lula de senyals extracel·lulars que indueixin proliferació tenint un major **potencial proliferatiu** i una activació sostinguda de **vies anti-apoptòtiques**. L'alteració dels mecanismes de degradació de l'EGFR en absència de PS fa a la cèl·lula **insensible a les senyals anti-proliferatives** ja que hi ha una activació continuada de la proliferació. A més, la sobreexpressió d'EGFR va sovint associada a baixa prognòsis (Uberall et al., 2008) (Figura D-2). Finalment, PS pot regular negativament els nivells d'EGFR i positivament l'estabilitat de NICD a través de Fbw7, accions que en tots dos casos tenen conseqüències supressores de tumors en pell. Així, l'absència de PS porta a un increment de Fbw7 que resulta en una disminució de NICD i un increment de la senyalització d'EGFR, efectes que promouen la transformació cel·lular en pell. Degut a que aquest és el primer treball que demostra un increment de Fbw7 en un procés tumoral és necessària una investigació addicional per saber quin és el paper d'altres oncògens regulats per Fbw7 en el desenvolupament de tumors epitelials (Figura D-2).

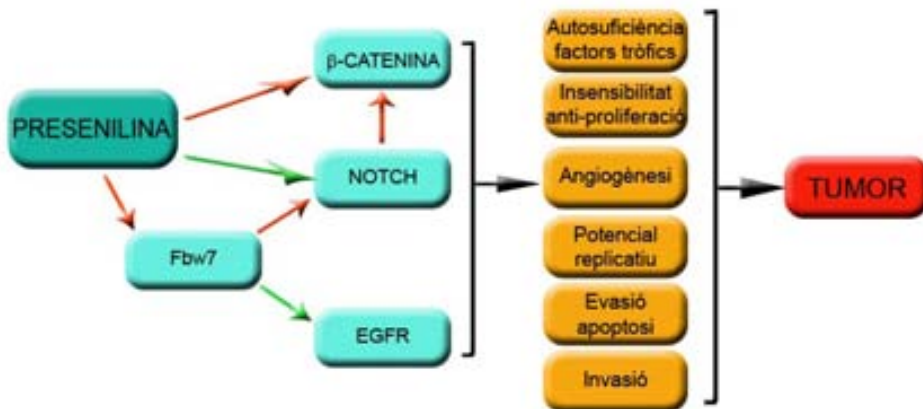


Figura D-2: Vies moleculars regulades per la PS en el desenvolupament tumoral epitelial. La presenilina regula diferents vies de senyalització (β-catenina, Notch, EGFR) que en conjunt fan que una cèl·lula adquireixi un fenotip maligne donant lloc a la formació d'un tumor. Les fletxes vermelles indiquen inhibició i les verdes activació de la via de senyalització.

Presenilines en diagnòstic i teràpia antitumoral

En el tractament de SCC s'ha suggerit l'ús d'inhibidors de l'EGFR ja que aquest receptor es troba sobreexpressat en el 90-100% dels casos estant associat amb un increment en la capacitat d'invasió del tumor i metàstasi. Els pacients amb estadis temprans de SCC són tractats amb cirurgia i/o radioteràpia presentant una curació d'aproximadament el 80% (Reuter et al., 2007). Tanmateix, pacients amb un estadi avançat de la malaltia tenen una elevada recurrència (50-60%), metàstasi (20%) o desenvolupen altres tumors (Reuter et al., 2007). Malgrat que en els darrers anys s'ha utilitzat quimioteràpia clàssica per al seu tractament no s'ha observat una gran supervivència en aquests pacients (Reuter et al., 2007). D'aquesta manera l'ús dels inhibidors de l'EGFR com a teràpia podria significar un gran avenç en el tractament de tumors tipus SCC. Actualment aquests fàrmacs s'utilitzen amb èxit en el tractament de càncer de pulmó de cèl·lules no petites (Fong et al., 2008) i el seu ús en el tractament de càncer de pell ha estat avaluat arribant a la fase III d'assajos clínics donant lloc a resultats prometedors (Reuter et al., 2007). Els ratolins ePS cDKO generats i descrits en aquesta tesi doctoral podrien ser un bon model per a l'estudi de l'eficàcia de fàrmacs antitumorals basats en la inhibició de l'EGFR ja que aquest model desenvolupa de manera ràpida i agressiva tumors de tipus SCC. A més, l'assaig d'aquesta teràpia en aquest model permetria examinar l'efecte sobre altres vies de senyalització associades a tumors de tipus SCC descrites en aquest treball. Per una altra banda, s'han utilitzat inhibidors de l'activitat γ -secretasa en leucèmia limfoblàstica de les cèl·lules T (T-ALL) on l'increment de la via de senyalització de Notch degut a mutacions en aquest és el principal promotor de la malaltia. Tanmateix, aquest tractament té una elevada toxicitat gastrointestinal pel que s'ha suggerit la seva administració juntament amb glucocorticoids (Real et al., 2009). Curiosament, s'ha observat que la resistència a aquesta teràpia està associada a mutacions en el gen *fbw7* (O'Neil et al., 2007) atribuint la resistència al tractament a un increment en l'estabilitat del fragment NICD degut a la pèrdua de funció de Fbw7 o a

l'increment en els nivells de mTOR un nou substrat de Fbw7 recentment descrit (Cullion et al., 2009; Mao et al., 2008). Així doncs l'ús d'inhibidors de l'activitat γ -secretasa en leucèmies és una teràpia prometedora malgrat que serà necessària una teràpia combinatòria. Tanmateix, el treball realitzat en aquesta tesi doctoral demostra l'existència d'una activitat supressora de tumors de presenilina independent de la seva funció γ -secretasa, pel que no es pot considerar presenilina com a diana terapèutica indiscriminada ja que els seus efectes en altres teixits poden ser oposats als esperats. De la mateixa manera, la regulació d'EGFR per Fbw7 s'ha de tenir en compte a l'hora de dissenyar possibles aproximacions terapèutiques que incloguin una potenciació de l'activitat de Fbw7.

El fet que la presenilina és un gen clau en el desenvolupament tumoral fa que sigui un bon candidat per a ser utilitzat com a biomarcador terapèutic d'un procés tumoral. Els gens de la PS1 i PS2 es localitzen en les regions cromosòmiques 14q24.3 i 1q31-q42, respectivament. S'ha observat pèrdua d'heterozigositat (de l'anglès, LOH) en el cromosoma 14 en diferents tipus de càncer incloent neuroblastomes, meningiomes, carcinomes renals, colorectals i hepatocel·lulars (Bando et al., 1999; Herbers et al., 1997; Piao et al., 1998; Simon et al., 1995), el que indica la possible presència de gens supressors de tumors en aquesta regió. Un estudi recent ha analitzat en més detall la LOH en el cromosoma 14 en casos de SCC per tal d'identificar regions amb una elevada freqüència de deleció i així determinar nous gens supressors de tumors (Pehlivan et al., 2008). La utilització d'un marcador específic per a la regió 14q24.3, on es localitza el gen de presenilina 1, mostra una elevada freqüència de deleció corresponent amb baixa prognòsis (Pehlivan et al., 2008), suggerint que PS1 és un possible candidat a gen supressor de tumors delecionat amb elevada freqüència en casos de SCC. Per una altra banda, la regió 1q31 presenta LOH en casos esporàdics de càncer de mama, colorectal, gastrinomes i insulinomes (Benitez et al., 1997; Chen et al., 2003; Yang et al., 2005; Zhou et al., 2008). Aquestes dades senyalen que la deleció de la regió 1q31, on es localitza el gen de presenilina 2, conté un possible gen supressor de tumors. Seria interessant analitzar per una banda si aquesta regió es troba delecionada en casos de SCC i si aquesta deleció va acompanyada

d'una deleció en la regió 14q24. En l'actualitat únicament s'han identificat mutacions en el gen de PS2 en mostres humanes de càncer de mama (To et al., 2006). El conjunt d'aquestes dades planteja pel futur l'anàlisi de possibles alteracions gèniques, tan mutacions com delecions, en els gens de PS1 i PS2 en mostres humanes de tumors epitelials.

CONCLUSIONS

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral s'ha arribat a les següents conclusions:

- L'absència de presenilina en fibroblasts produeix un fenotip transformant oncogènic que és mediat per la via de senyalització d'EGF.
- Les PS regulen negativament l'expressió de l'EGFR independentment de l'activitat γ -secretasa o de la regulació directa del promotor d'EGFR.
- L'absència d'ambdues PS produeix una activació sostinguda de la via de senyalització de l'EGFR degut a que les presenilines són necessàries per la degradació constitutiva i induïda per lligand de l'EGFR.
- L'increment en els nivells de l'EGFR en absència de PS és depenent de Fbw7.
- Fbw7, l'expressió de la qual és reprimida per PS, regula positivament els nivells, la ubiquitinització i la senyalització d'EGFR.
- L'absència de PS en pell en ratolins ePS cDKO en estadi adult produeix hiperproliferació i hiperqueratosi de l'epidermis, desorganització de les capes epitelials i desenvolupament de tumors de tipus escatós (SCC).
- Els ratolins ePS cDKO presenten una major susceptibilitat a desenvolupar tumors en front a un agent citotòxic com el BrdU i una mort prematura.
- La pell i els tumors SCC desenvolupats pels ratolins ePS cDKO presenten un increment en els nivells d'EGFR, Fbw7 i β -catenina i una disminució en els nivells del fragment intracel·lular de Notch.

En resum, les PS regulen negativament els nivells de l'EGFR afavorint la seva degradació modificant els processos d'ubiquitinització i deubiquitinització. Aquest efecte és depenent de l'acció de Fbw7, ubiquitina lligasa que és regulada negativament per PS. Per una altra banda, PS és necessària per l'homeòstasi epitelial i la seva absència produeix el desenvolupament espontani de tumors SCC. La pell dels ratolins ePS cDKO presenta un increment en els nivells de l'EGFR, Fbw7 i β -catenina i una disminució de NICD, vies de senyalització implicades en el desenvolupament dels tumors SCC.

BIBLIOGRAFIA

A

- Akhoondi,S., Sun,D., von der Lehr,N., Apostolidou,S., Klotz,K., Maljukova,A., Cepeda,D., Fiegl,H., Dafou,D., Marth,C. et al. (2007). FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. *Cancer Res.* **67**, 9006-9012.
- Alonso,L. and Fuchs,E. (2006). The hair cycle. *J. Cell Sci.* **119**, 391-393.
- Alwan,H.A., van Zoelen,E.J., and van Leeuwen,J.E. (2003). Ligand-induced lysosomal epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation is preceded by proteasome-dependent EGFR de-ubiquitination. *J. Biol. Chem.* **278**, 35781-35790.
- Anders,L., Mertins,P., Lammich,S., Murgia,M., Hartmann,D., Saftig,P., Haass,C., and Ullrich,A. (2006). Furin-, ADAM 10-, and gamma-secretase-mediated cleavage of a receptor tyrosine phosphatase and regulation of beta-catenin's transcriptional activity. *Mol. Cell Biol.* **26**, 3917-3934.
- Andersson,C.X., Fernandez-Rodriguez,J., Laos,S., Baeckstrom,D., Haass,C., and Hansson,G.C. (2005). Shedding and gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis of the mucin-type molecule CD43. *Biochem. J.* **387**, 377-384.
- Anisimov,V.N. (1995). Carcinogenesis induced by neonatal exposure to various doses of 5-bromo-2'-deoxyuridine in rats. *Cancer Lett.* **91**, 63-71.
- Anisimov,V.N. and Osipova,G.Y. (1992). Effect of neonatal exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine on life span, estrus function and tumor development in rats--an argument in favor of the mutation theory of aging? *Mutat. Res.* **275**, 97-110.
- Annaert,W. and De Strooper,B. (2002). A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 25-51.
- Annaert,W.G., Levesque,L., Craessaerts,K., Dierinck,I., Snellings,G., Westaway,D., George-Hyslop,P.S., Cordell,B., Fraser,P., and De Strooper,B. (1999). Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* **147**, 277-294.
- Araki,Y., Miyagi,N., Kato,N., Yoshida,T., Wada,S., Nishimura,M., Komano,H., Yamamoto,T., De Strooper,B., Yamamoto,K. et al. (2004). Coordinated metabolism of Alcadein and amyloid beta-protein precursor regulates FE65-dependent gene transactivation. *J. Biol. Chem.* **279**, 24343-24354.
- Argiles,J.M., Moore-Carrasco,R., Fuster,G., Busquets,S., and Lopez-Soriano,F.J. (2003). Cancer cachexia: the molecular mechanisms. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 405-409.

Aszterbaum,M., Epstein,J., Oro,A., Douglas,V., LeBoit,P.E., Scott,M.P., and Epstein,E.H., Jr. (1999). Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice. *Nat. Med.* **5**, 1285-1291.

B

Babst,M., Odorizzi,G., Estepa,E.J., and Emr,S.D. (2000). Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic*. **1**, 248-258.

Bache,K.G., Slagsvold,T., and Stenmark,H. (2004). Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. *EMBO J.* **23**, 2707-2712.

Bai,C., Sen,P., Hofmann,K., Ma,L., Goebel,M., Harper,J.W., and Elledge,S.J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**, 263-274.

Balmain,A., Ramsden,M., Bowden,G.T., and Smith,J. (1984). Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature* **307**, 658-660.

Bando,T., Kato,Y., Ihara,Y., Yamagishi,F., Tsukada,K., and Isobe,M. (1999). Loss of heterozygosity of 14q32 in colorectal carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **111**, 161-165.

Bannigan,J.G., Cottell,D.C., and Morris,A. (1990). Study of the mechanisms of BUdR-induced cleft palate in the mouse. *Teratology* **42**, 79-89.

Bao,J., Wolpowitz,D., Role,L.W., and Talmage,D.A. (2003). Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J. Cell Biol.* **161**, 1133-1141.

Benitah,S.A., Frye,M., Glogauer,M., and Watt,F.M. (2005). Stem cell depletion through epidermal deletion of Rac1. *Science* **309**, 933-935.

Benitah,S.A. and Watt,F.M. (2007). Epidermal deletion of Rac1 causes stem cell depletion, irrespective of whether deletion occurs during embryogenesis or adulthood. *J. Invest Dermatol.* **127**, 1555-1557.

Benitez,J., Osorio,A., Barroso,A., Arranz,E., az-Guillen,M.A., Robledo,M., Rodriguez de Cordoba,S., and Heine-Suner,D. (1997). A region of allelic imbalance in 1q31-32 in primary breast cancer coincides with a recombination hot spot. *Cancer Res.* **57**, 4217-4220.

Bentahir,M., Nyabi,O., Verhamme,J., Tolia,A., Horre,K., Wiltfang,J., Esselmann,H., and De Strooper,B. (2006). Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J. Neurochem.* **96**, 732-742.

- Bhounik,A., Fichtman,B., Derossi,C., Breitwieser,W., Kluger,H.M., Davis,S., Subtil,A., Meltzer,P., Krajewski,S., Jones,N. et al. (2008). Suppressor role of activating transcription factor 2 (ATF2) in skin cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 1674-1679.
- Bickenbach,J.R. and Chism,E. (1998). Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture. *Exp. Cell Res.* **244**, 184-195.
- Bickenbach,J.R., McCutcheon,J., and Mackenzie,I.C. (1986). Rate of loss of tritiated thymidine label in basal cells in mouse epithelial tissues. *Cell Tissue Kinet.* **19**, 325-333.
- Bishop,N., Horman,A., and Woodman,P. (2002). Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J. Cell Biol.* **157**, 91-101.
- Blanpain,C. and Fuchs,E. (2006). Epidermal stem cells of the skin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 339-373.
- Blanpain,C., Horsley,V., and Fuchs,E. (2007). Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell* **128**, 445-458.
- Blanpain,C., Lowry,W.E., Geoghegan,A., Polak,L., and Fuchs,E. (2004). Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* **118**, 635-648.
- Blanpain,C., Lowry,W.E., Pasolli,H.A., and Fuchs,E. (2006). Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev.* **20**, 3022-3035.
- Bohm,C., Seibel,N.M., Henkel,B., Steiner,H., Haass,C., and Hampe,W. (2006). SorLA signaling by regulated intramembrane proteolysis. *J. Biol. Chem.* **281**, 14547-14553.
- Boutwell,R.K., Verma,A.K., Ashendel,C.L., and Astrup,E. (1982). Mouse skin: a useful model system for studying the mechanism of chemical carcinogenesis. *Carcinog. Compr. Surv.* **7**, 1-12.
- Braun,K.M., Niemann,C., Jensen,U.B., Sundberg,J.P., Silva-Vargas,V., and Watt,F.M. (2003). Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development* **130**, 5241-5255.
- Bremner,R. and Balmain,A. (1990). Genetic changes in skin tumor progression: correlation between presence of a mutant ras gene and loss of heterozygosity on mouse chromosome 7. *Cell* **61**, 407-417.
- Buerger,H., Gebhardt,F., Schmidt,H., Beckmann,A., Hutmacher,K., Simon,R., Lelle,R., Boecker,W., and Brandt,B. (2000). Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of egfr is related to cytogenetic alterations and epithelial growth factor receptor expression. *Cancer Res.* **60**, 854-857.

Burns,P.A., Kemp,C.J., Gannon,J.V., Lane,D.P., Bremner,R., and Balmain,A. (1991). Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene* **6**, 2363-2369.

C

Cai,D., Leem,J.Y., Greenfield,J.P., Wang,P., Kim,B.S., Wang,R., Lopes,K.O., Kim,S.H., Zheng,H., Greengard,P. et al. (2003). Presenilin-1 regulates intracellular trafficking and cell surface delivery of beta-amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 3446-3454.

Calhoun,E.S., Jones,J.B., Ashfaq,R., Adsay,V., Baker,S.J., Valentine,V., Hempen,P.M., Hilgers,W., Yeo,C.J., Hruban,R.H. et al. (2003). BRAF and FBXW7 (CDC4, FBW7, AGO, SEL10) mutations in distinct subsets of pancreatic cancer: potential therapeutic targets. *Am. J. Pathol.* **163**, 1255-1260.

Carey,B.W., Kim,D.Y., and Kovacs,D.M. (2007). Presenilin/gamma-secretase and alpha-secretase-like peptidases cleave human MHC Class I proteins. *Biochem. J.* **401**, 121-127.

Cervantes,S., Saura,C.A., Pomares,E., Gonzalez-Duarte,R., and Marfany,G. (2004). Functional implications of the presenilin dimerization: reconstitution of gamma-secretase activity by assembly of a catalytic site at the dimer interface of two catalytically inactive presenilins. *J. Biol. Chem.* **279**, 36519-36529.

Chan,E.F., Gat,U., McNiff,J.M., and Fuchs,E. (1999). A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat. Genet.* **21**, 410-413.

Chang,C.P., Lazar,C.S., Walsh,B.J., Komuro,M., Collawn,J.F., Kuhn,L.A., Tainer,J.A., Trowbridge,I.S., Farquhar,M.G., Rosenfeld,M.G. et al. (1993). Ligand-induced internalization of the epidermal growth factor receptor is mediated by multiple endocytic codes analogous to the tyrosine motif found in constitutively internalized receptors. *J. Biol. Chem.* **268**, 19312-19320.

Chavez-Gutierrez,L., Tolia,A., Maes,E., Li,T., Wong,P.C., and De Strooper,B. (2008). Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for gamma-secretase complex maturation but not for its activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 20096-20105.

Chen,Y.J., Vortmeyer,A., Zhuang,Z., Huang,S., and Jensen,R.T. (2003). Loss of heterozygosity of chromosome 1q in gastrinomas: occurrence and prognostic significance. *Cancer Res.* **63**, 817-823.

Chyung,J.H., Raper,D.M., and Selkoe,D.J. (2005). Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J. Biol. Chem.* **280**, 4383-4392.

- Claudinot,S., Nicolas,M., Oshima,H., Rochat,A., and Barrandon,Y.** (2005). Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 14677-14682.
- Clayton,E., Doupe,D.P., Klein,A.M., Winton,D.J., Simons,B.D., and Jones,P.H.** (2007). A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature* **446**, 185-189.
- Conlon,R.A., Reaume,A.G., and Rossant,J.** (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* **121**, 1533-1545.
- Cowan,J.W., Wang,X., Guan,R., He,K., Jiang,J., Baumann,G., Black,R.A., Wolfe,M.S., and Frank,S.J.** (2005). Growth hormone receptor is a target for presenilin-dependent gamma-secretase cleavage. *J. Biol. Chem.* **280**, 19331-19342.
- Cullion,K., Draheim,K.M., Hermance,N., Tammam,J., Sharma,V.M., Ware,C., Nikov,G., Krishnamoorthy,V., Majumder,P.K., and Kelliher,M.A.** (2009). Targeting the Notch1 and mTOR pathways in a mouse T-ALL model. *Blood*.

D

- Dai,X. and Segre,J.A.** (2004). Transcriptional control of epidermal specification and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 485-491.
- DasGupta,R. and Fuchs,E.** (1999). Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development* **126**, 4557-4568.
- de Souza N., Vallier,L.G., Fares,H., and Greenwald,I.** (2007). SEL-2, the *C. elegans* neurobeachin/LRBA homolog, is a negative regulator of lin-12/Notch activity and affects endosomal traffic in polarized epithelial cells. *Development* **134**, 691-702.
- De Strooper B.** (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* **38**, 9-12.
- De Strooper B.** (2007). Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep.* **8**, 141-146.
- De Strooper B., Annaert,W., Cupers,P., Saftig,P., Craessaerts,K., Mumm,J.S., Schroeter,E.H., Schrijvers,V., Wolfe,M.S., Ray,W.J. et al.** (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**, 518-522.
- De Strooper,B., Saftig,P., Craessaerts,K., Vanderstichele,H., Guhde,G., Annaert,W., Von Figura,K., and Van Leuven,F.** (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* **391**, 387-390.

- De Strooper,B., Annaert,W., Cupers,P., Saftig,P., Craessaerts,K., Mumm,J.S., Schroeter,E.H., Schrijvers,V., Wolfe,M.S., Ray,W.J. et al. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**, 518-522.
- Demehri,S., Liu,Z., Lee,J., Lin,M.H., Crosby,S.D., Roberts,C.J., Grigsby,P.W., Miner,J.H., Farr,A.G., and Kopan,R. (2008). Notch-deficient skin induces a lethal systemic B-lymphoproliferative disorder by secreting TSLP, a sentinel for epidermal integrity. *PLoS Biol.* **6**, e123.
- Deng,Y., Tarassishin,L., Kallhoff,V., Peethumnongsin,E., Wu,L., Li,Y.M., and Zheng,H. (2006). Deletion of presenilin 1 hydrophilic loop sequence leads to impaired gamma-secretase activity and exacerbated amyloid pathology. *J. Neurosci.* **26**, 3845-3854.
- Dillen,K. and Annaert,W. (2006). A two decade contribution of molecular cell biology to the centennial of Alzheimer's disease: are we progressing toward therapy? *Int. Rev. Cytol.* **254**, 215-300.
- Dominey,A.M., Wang,X.J., King,L.E., Jr., Nanney,L.B., Gagne,T.A., Sellheyer,K., Bundman,D.S., Longley,M.A., Rothnagel,J.A., Greenhalgh,D.A. et al. (1993). Targeted overexpression of transforming growth factor alpha in the epidermis of transgenic mice elicits hyperplasia, hyperkeratosis, and spontaneous, squamous papillomas. *Cell Growth Differ.* **4**, 1071-1082.
- Donehower,L.A., Harvey,M., Slagle,B.L., McArthur,M.J., Montgomery,C.A., Jr., Butel,J.S., and Bradley,A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215-221.
- Donoviel,D.B., Hadjantonakis,A.K., Ikeda,M., Zheng,H., Hyslop,P.S., and Bernstein,A. (1999). Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev.* **13**, 2801-2810.
- Downward,J., Yarden,Y., Mayes,E., Scrace,G., Totty,N., Stockwell,P., Ullrich,A., Schlessinger,J., and Waterfield,M.D. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* **307**, 521-527.
- Dries,D.R. and Yu,G. (2008). Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **5**, 132-146.
- Englert,C., Hou,X., Maheswaran,S., Bennett,P., Ngwu,C., Re,G.G., Garvin,A.J., Rosner,M.R., and Haber,D.A. (1995). WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J.* **14**, 4662-4675.
- Esselens,C., Oorschot,V., Baert,V., Raemaekers,T., Spittaels,K., Semeels,L., Zheng,H., Saftig,P., De Strooper,B., Klumperman,J. et al. (2004). Presenilin 1 mediates the turnover of

telencephalin in hippocampal neurons via an autophagic degradative pathway. *J. Cell Biol.* **166**, 1041-1054.

F

Farrer,L.A., Cupples,L.A., Haines,J.L., Hyman,B., Kukull,W.A., Mayeux,R., Myers,R.H., Pericak-Vance,M.A., Risch,N., and van Duijn,C.M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* **278**, 1349-1356.

Feldman,R.M., Correll,C.C., Kaplan,K.B., and Deshaies,R.J. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**, 221-230.

Feng,Q., Baird,D., Peng,X., Wang,J., Ly,T., Guan,J.L., and Cerione,R.A. (2006). Cool-1 functions as an essential regulatory node for EGF receptor- and Src-mediated cell growth. *Nat. Cell Biol.* **8**, 945-956.

Fong,T., Morgensztern,D., and Govindan,R. (2008). EGFR inhibitors as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **3**, 303-310.

Friedhoff,P., von,B.M., Mandelkow,E.M., and Mandelkow,E. (2000). Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim. Biophys. Acta* **1502**, 122-132.

Fry,D.W., Bridges,A.J., Denny,W.A., Doherty,A., Greis,K.D., Hicks,J.L., Hook,K.E., Keller,P.R., Leopold,W.R., Loo,J.A. et al. (1998). Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 12022-12027.

Fuchs,E. and Horsley,V. (2008). More than one way to skin . . . *Genes Dev.* **22**, 976-985.

Fujii,Y., Yada,M., Nishiyama,M., Kamura,T., Takahashi,H., Tsunematsu,R., Susaki,E., Nakagawa,T., Matsumoto,A., and Nakayama,K.I. (2006). Fbxw7 contributes to tumor suppression by targeting multiple proteins for ubiquitin-dependent degradation. *Cancer Sci.* **97**, 729-736.

G

Gat,U., DasGupta,R., Degenstein,L., and Fuchs,E. (1998). De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* **95**, 605-614.

- Gebhardt,A., Frye,M., Herold,S., Benitah,S.A., Braun,K., Samans,B., Watt,F.M., Elsasser,H.P., and Eilers,M. (2006). Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *J. Cell Biol.* **172**, 139-149.
- Gebhardt,F., Zanker,K.S., and Brandt,B. (1999). Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J. Biol. Chem.* **274**, 13176-13180.
- Georgakopoulos,A., Litterst,C., Ghersi,E., Baki,L., Xu,C., Serban,G., and Robakis,N.K. (2006). Metalloproteinase/Presenilin1 processing of ephrinB regulates EphB-induced Src phosphorylation and signaling. *EMBO J.* **25**, 1242-1252.
- Gowrishankar,K., Zeidler,M.G., and Vincenz,C. (2004). Release of a membrane-bound death domain by gamma-secretase processing of the p75NTR homolog NRADD. *J. Cell Sci.* **117**, 4099-4111.
- Graus-Porta,D., Beerli,R.R., Daly,J.M., and Hynes,N.E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* **16**, 1647-1655.
- Groves,R.W., Allen,M.H., and MacDonald,D.M. (1992). Abnormal expression of epidermal growth factor receptor in cutaneous epithelial tumours. *J. Cutan. Pathol.* **19**, 66-72.
- Gupta-Rossi,N., Le Bail,O., Gonen,H., Brou,C., Logeat,F., Six,E., Ciechanover,A., and Israel,A. (2001). Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 34371-34378.
- Guy,P.M., Platko,J.V., Cantley,L.C., Cerione,R.A., and Carraway,K.L., III (1994). Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 8132-8136.

H

- Haapasalo,A., Kim,D.Y., Carey,B.W., Turunen,M.K., Pettingell,W.H., and Kovacs,D.M. (2007). Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage regulates association of leukocyte-common antigen-related (LAR) receptor tyrosine phosphatase with beta-catenin. *J. Biol. Chem.* **282**, 9063-9072.
- Haas,I.G., Frank,M., Veron,N., and Kemler,R. (2005). Presenilin-dependent processing and nuclear function of gamma-protocadherins. *J. Biol. Chem.* **280**, 9313-9319.
- Haase,I., Evans,R., Pofahl,R., and Watt,F.M. (2003). Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *J. Cell Sci.* **116**, 3227-3238.

- Hager,B., Bickenbach,J.R., and Fleckman,P. (1999). Long-term culture of murine epidermal keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* **112**, 971-976.
- Haglund,K. and Dikic,I. (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J.* **24**, 3353-3359.
- Haj,F.G., Markova,B., Klamann,L.D., Bohmer,F.D., and Neel,B.G. (2003). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J. Biol. Chem.* **278**, 739-744.
- Haley,J., Whittle,N., Bennet,P., Kinchington,D., Ullrich,A., and Waterfield,M. (1987). The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *Oncogene Res.* **1**, 375-396.
- Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hartwell,L.H., Mortimer,R.K., Culotti,J., and Culotti,M. (1973). Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants. *Genetics* **74**, 267-286.
- Hass,M.R., Sato,C., Kopan,R., and Zhao,G. (2008). Presenilin: RIP and beyond. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- Henson,E.S. and Gibson,S.B. (2006). Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy. *Cell Signal.*
- Herbers,J., Schullerus,D., Muller,H., Kenck,C., Chudek,J., Weimer,J., Bugert,P., and Kovacs,G. (1997). Significance of chromosome arm 14q loss in nonpapillary renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes. Cancer* **19**, 29-35.
- Herreman,A., Hartmann,D., Annaert,W., Saftig,P., Craessaerts,K., Semeels,L., Umans,L., Schrijvers,V., Checler,F., Vanderstichele,H. et al. (1999). Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 11872-11877.
- Herreman,A., Van,G.G., Bentahir,M., Nyabi,O., Craessaerts,K., Mueller,U., Annaert,W., and De Strooper,B. (2003). gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation. *J. Cell Sci.* **116**, 1127-1136.
- Higashiyama,S., Iwabuki,H., Morimoto,C., Hieda,M., Inoue,H., and Matsushita,N. (2008). Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci.* **99**, 214-220.
- Huang,F., Kirkpatrick,D., Jiang,X., Gygi,S., and Sorkin,A. (2006). Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol. Cell* **21**, 737-748.

Hubbard,E.J., Wu,G., Kitajewski,J., and Greenwald,I. (1997). sel-10, a negative regulator of lin-12 activity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the CDC4 family of proteins. *Genes Dev.* **11**, 3182-3193.

Huelsken,J., Vogel,R., Erdmann,B., Cotsarelis,G., and Birchmeier,W. (2001). beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* **105**, 533-545.

Hunter,T. (1998). The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **353**, 583-605.

Hutton,M. and Hardy,J. (1997). The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1639-1646.

I

Indra,A.K., Warot,X., Brocard,J., Bornert,J.M., Xiao,J.H., Chambon,P., and Metzger,D. (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4324-4327.

Ishii,S., Xu,Y.H., Stratton,R.H., Roe,B.A., Merlino,G.T., and Pastan,I. (1985). Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 4920-4924.

Ito,M., Liu,Y., Yang,Z., Nguyen,J., Liang,F., Morris,R.J., and Cotsarelis,G. (2005). Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat. Med.* **11**, 1351-1354.

Iwatsubo,T. (2004). The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 379-383.

J

Janicki,S. and Monteiro,M.J. (1997). Increased apoptosis arising from increased expression of the Alzheimer's disease-associated presenilin-2 mutation (N141I). *J. Cell Biol.* **139**, 485-495.

Janicki,S.M. and Monteiro,M.J. (1999). Presenilin overexpression arrests cells in the G1 phase of the cell cycle. Arrest potentiated by the Alzheimer's disease PS2(N141I)mutant. *Am. J. Pathol.* **155**, 135-144.

- Jensen,K.B. and Watt,F.M.** (2006). Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: Lrig1 is a regulator of stem cell quiescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 11958-11963.
- Jih,D.M., Lyle,S., Elenitsas,R., Elder,D.E., and Cotsarelis,G.** (1999). Cytokeratin 15 expression in trichoepitheliomas and a subset of basal cell carcinomas suggests they originate from hair follicle stem cells. *J. Cutan. Pathol.* **26**, 113-118.
- Johnson,A.C., Murphy,B.A., Matelis,C.M., Rubinstein,Y., Piebenga,E.C., Akers,L.M., Neta,G., Vinson,C., and Birrer,M.** (2000). Activator protein-1 mediates induced but not basal epidermal growth factor receptor gene expression. *Mol. Med.* **6**, 17-27.
- Jones,P.H. and Watt,F.M.** (1993). Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* **73**, 713-724.

K

- Kaether,C., Lammich,S., Edbauer,D., Ertl,M., Rietdorf,J., Capell,A., Steiner,H., and Haass,C.** (2002). Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **158**, 551-561.
- Kageyama,R., Merlino,G.T., and Pastan,I.** (1988). A transcription factor active on the epidermal growth factor receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 5016-5020.
- Kang,D.E., Soriano,S., Xia,X., Eberhart,C.G., De Strooper,B., Zheng,H., and Koo,E.H.** (2002). Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis. *Cell* **110**, 751-762.
- Kang,D.E., Yoon,I.S., Repetto,E., Busse,T., Yermian,N., Je,L., and Koo,E.H.** (2005). Presenilins mediate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and ERK activation via select signaling receptors. Selectivity of PS2 in platelet-derived growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 31537-31547.
- Kanning,K.C., Hudson,M., Amieux,P.S., Wiley,J.C., Bothwell,M., and Schecterson,L.C.** (2003). Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J. Neurosci.* **23**, 5425-5436.
- Ke,N., Albers,A., Claassen,G., Yu,D.H., Chatterton,J.E., Hu,X., Meyhack,B., Wong-Staal,F., and Li,Q.X.** (2004). One-week 96-well soft agar growth assay for cancer target validation. *Biotechniques* **36**, 826-3.
- Kemp,C.J.** (2005). Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 460-473.

- Kemp,C.J., Wheldon,T., and Balmain,A.** (1994). p53-deficient mice are extremely susceptible to radiation-induced tumorigenesis. *Nat. Genet.* **8**, 66-69.
- Kesarwala,A.H., Samrakandi,M.M., and Piwnica-Worms,D.** (2009). Proteasome inhibition blocks ligand-induced dynamic processing and internalization of epidermal growth factor receptor via altered receptor ubiquitination and phosphorylation. *Cancer Res.* **69**, 976-983.
- Kim,D.Y., Ingano,L.A., Carey,B.W., Pettingell,W.H., and Kovacs,D.M.** (2005a). Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage of the voltage-gated sodium channel beta2-subunit regulates cell adhesion and migration. *J. Biol. Chem.* **280**, 23251-23261.
- Kim,D.Y., Ingano,L.A., and Kovacs,D.M.** (2002). Nectin-1alpha, an immunoglobulin-like receptor involved in the formation of synapses, is a substrate for presenilin/gamma-secretase-like cleavage. *J. Biol. Chem.* **277**, 49976-49981.
- Kim,J.W., Chang,T.S., Lee,J.E., Huh,S.H., Yeon,S.W., Yang,W.S., Joe,C.O., Mook-Jung,I., Tanzi,R.E., Kim,T.W. et al.** (2001). Negative regulation of the SAPK/JNK signaling pathway by presenilin 1. *J. Cell Biol.* **153**, 457-463.
- Kim,M.Y., Park,J.H., Choi,E.J., and Park,H.S.** (2005b). Presenilin acts as a positive regulator of basal level activity of ERK through the Raf-MEK1 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 609-613.
- Kimura,T., Gotoh,M., Nakamura,Y., and Arakawa,H.** (2003). hCDC4b, a regulator of cyclin E, as a direct transcriptional target of p53. *Cancer Sci.* **94**, 431-436.
- King,R.W., Peters,J.M., Tugendreich,S., Rolfe,M., Hieter,P., and Kirschner,M.W.** (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* **81**, 279-288.
- Kirkin,V. and Dikic,I.** (2007). Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 199-205.
- Klapper,L.N., Glathe,S., Vaisman,N., Hynes,N.E., Andrews,G.C., Sela,M., and Yarden,Y.** (1999). The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 4995-5000.
- Kobielak,K., Pasolli,H.A., Alonso,L., Polak,L., and Fuchs,E.** (2003). Defining BMP functions in the hair follicle by conditional ablation of BMP receptor IA. *J. Cell Biol.* **163**, 609-623.
- Koepp,D.M., Schaefer,L.K., Ye,X., Keyomarsi,K., Chu,C., Harper,J.W., and Elledge,S.J.** (2001). Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* **294**, 173-177.
- Kolev,V., Mandinova,A., Guinea-Viniegra,J., Hu,B., Lefort,K., Lambertini,C., Neel,V., Dummer,R., Wagner,E.F., and Dotto,G.P.** (2008). EGFR signalling as a

negative regulator of Notch1 gene transcription and function in proliferating keratinocytes and cancer. *Nat. Cell Biol.* **10**, 902-911.

Koo,E.H. and Kopan,R. (2004). Potential role of presenilin-regulated signaling pathways in sporadic neurodegeneration. *Nat. Med.* **10 Suppl**, S26-S33.

Kwak,E.L., Moberg,K.H., Wahrer,D.C., Quinn,J.E., Gilmore,P.M., Graham,C.A., Hariharan,I.K., Harkin,D.P., Haber,D.A., and Bell,D.W. (2005). Infrequent mutations of Archipelago (hAGO, hCDC4, Fbw7) in primary ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **98**, 124-128.

L

Lammich,S., Okochi,M., Takeda,M., Kaether,C., Capell,A., Zimmer,A.K., Edbauer,D., Walter,J., Steiner,H., and Haass,C. (2002). Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide. *J. Biol. Chem.* **277**, 44754-44759.

Langdon,W.Y., Hartley,J.W., Klinken,S.P., Ruscetti,S.K., and Morse,H.C., III (1989). v-cbl, an oncogene from a dual-recombinant murine retrovirus that induces early B-lineage lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 1168-1172.

Laudon,H., Hansson,E.M., Melen,K., Bergman,A., Farmery,M.R., Winblad,B., Lendahl,U., von,H.G., and Naslund,J. (2005). A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J. Biol. Chem.* **280**, 35352-35360.

LaVoie,M.J. and Selkoe,D.J. (2003). The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J. Biol. Chem.* **278**, 34427-34437.

Lechler,T. and Fuchs,E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* **437**, 275-280.

Leem,J.Y., Saura,C.A., Pietrzik,C., Christianson,J., Wanamaker,C., King,L.T., Veselits,M.L., Tomita,T., Gasparini,L., Iwatsubo,T. et al. (2002). A role for presenilin 1 in regulating the delivery of amyloid precursor protein to the cell surface. *Neurobiol. Dis.* **11**, 64-82.

Levkowitz,G., Waterman,H., Zamir,E., Kam,Z., Oved,S., Langdon,W.Y., Beguinot,L., Geiger,B., and Yarden,Y. (1998). c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* **12**, 3663-3674.

Levy,V., Lindon,C., Harfe,B.D., and Morgan,B.A. (2005). Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Dev. Cell* **9**, 855-861.

- Li,J., Pauley,A.M., Myers,R.L., Shuang,R., Brashler,J.R., Yan,R., Buhl,A.E., Ruble,C., and Gurney,M.E. (2002). SEL-10 interacts with presenilin 1, facilitates its ubiquitination, and alters A-beta peptide production. *J. Neurochem.* **82**, 1540-1548.
- Li,J., Xu,M., Zhou,H., Ma,J., and Potter,H. (1997). Alzheimer presenilins in the nuclear membrane, interphase kinetochores, and centrosomes suggest a role in chromosome segregation. *Cell* **90**, 917-927.
- Li,M., Indra,A.K., Warot,X., Brocard,J., Messaddeq,N., Kato,S., Metzger,D., and Chambon,P. (2000). Skin abnormalities generated by temporally controlled RXRalpha mutations in mouse epidermis. *Nature* **407**, 633-636.
- Li,T., Wen,H., Brayton,C., Das,P., Smithson,L.A., Fauq,A., Fan,X., Crain,B.J., Price,D.L., Golde,T.E. et al. (2007). Epidermal growth factor receptor and notch pathways participate in the tumor suppressor function of gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* **282**, 32264-32273.
- Li,X. and Greenwald,I. (1996). Membrane topology of the C. elegans SEL-12 presenilin. *Neuron* **17**, 1015-1021.
- Lin,M.H. and Kopan,R. (2003). Long-range, nonautonomous effects of activated Notch1 on tissue homeostasis in the nail. *Dev. Biol.* **263**, 343-359.
- Lin,S.Y., Makino,K., Xia,W., Matin,A., Wen,Y., Kwong,K.Y., Bourguignon,L., and Hung,M.C. (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol.* **3**, 802-808.
- Linardopoulos,S., Street,A.J., Quelle,D.E., Parry,D., Peters,G., Sherr,C.J., and Balmain,A. (1995). Deletion and altered regulation of p16INK4a and p15INK4b in undifferentiated mouse skin tumors. *Cancer Res.* **55**, 5168-5172.
- Litterst,C., Georgakopoulos,A., Shioi,J., Ghersi,E., Wisniewski,T., Wang,R., Ludwig,A., and Robakis,N.K. (2007). Ligand binding and calcium influx induce distinct ectodomain/gamma-secretase-processing pathways of EphB2 receptor. *J. Biol. Chem.* **282**, 16155-16163.
- Liu,W., Innocenti,F., Wu,M.H., Desai,A.A., Dolan,M.E., Cook,E.H., Jr., and Ratain,M.J. (2005). A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res.* **65**, 46-53.
- Lo Celso,C., Prowse,D.M., and Watt,F.M. (2004). Transient activation of beta-catenin signalling in adult mouse epidermis is sufficient to induce new hair follicles but continuous activation is required to maintain hair follicle tumours. *Development* **131**, 1787-1799.
- Logan,C.Y. and Nusse,R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 781-810.

- Longva,K.E., Blystad,F.D., Stang,E., Larsen,A.M., Johannessen,L.E., and Madshus,I.H. (2002). Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J. Cell Biol.* **156**, 843-854.
- Lowry,W.E., Blanpain,C., Nowak,J.A., Guasch,G., Lewis,L., and Fuchs,E. (2005). Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Dev.* **19**, 1596-1611.
- Ludes-Meyers,J.H., Subler,M.A., Shivakumar,C.V., Munoz,R.M., Jiang,P., Bigger,J.E., Brown,D.R., Deb,S.P., and Deb,S. (1996). Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6009-6019.
- Lyle,S., Christofidou-Solomidou,M., Liu,Y., Elder,D.E., Albelda,S., and Cotsarelis,G. (1998). The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *J. Cell Sci.* **111 (Pt 21)**, 3179-3188.

M

- MacNeil,S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* **445**, 874-880.
- Mantovani,A., Allavena,P., Sica,A., and Balkwill,F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444.
- Mao,J.H., Kim,I.J., Wu,D., Climent,J., Kang,H.C., Delrosario,R., and Balmain,A. (2008). FBXW7 targets mTOR for degradation and cooperates with PTEN in tumor suppression. *Science* **321**, 1499-1502.
- Mao,J.H., Perez-Losada,J., Wu,D., Delrosario,R., Tsunematsu,R., Nakayama,K.I., Brown,K., Bryson,S., and Balmain,A. (2004). Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene. *Nature* **432**, 775-779.
- Marambaud,P., Shioi,J., Serban,G., Georgakopoulos,A., Sarnier,S., Nagy,V., Baki,L., Wen,P., Efthimiopoulos,S., Shao,Z. et al. (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J.* **21**, 1948-1956.
- Marambaud,P., Wen,P.H., Dutt,A., Shioi,J., Takashima,A., Siman,R., and Robakis,N.K. (2003). A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* **114**, 635-645.
- Marmor,M.D. and Yarden,Y. (2004). Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene* **23**, 2057-2070.

- Marron,M.B., Singh,H., Tahir,T.A., Kavumkal,J., Kim,H.Z., Koh,G.Y., and Brindle,N.P.** (2007). Regulated proteolytic processing of Tie1 modulates ligand responsiveness of the receptor-tyrosine kinase Tie2. *J. Biol. Chem.* **282**, 30509-30517.
- Matsumoto,A., Onoyama,I., and Nakayama,K.I.** (2006). Expression of mouse Fbxw7 isoforms is regulated in a cell cycle- or p53-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**, 114-119.
- May,P., Bock,H.H., Nimpf,J., and Herz,J.** (2003). Differential glycosylation regulates processing of lipoprotein receptors by gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* **278**, 37386-37392.
- McElroy,B., Powell,J.C., and McCarthy,J.V.** (2007). The insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor is a substrate for gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 1136-1141.
- McGuire,J.F., Ge,N.N., and Dyson,S.** (2009). Nonmelanoma skin cancer of the head and neck I: histopathology and clinical behavior. *Am. J. Otolaryngol.* **30**, 121-133.
- Melikova,M.S., Kondratov,K.A., and Kornilova,E.S.** (2006). Two different stages of epidermal growth factor (EGF) receptor endocytosis are sensitive to free ubiquitin depletion produced by proteasome inhibitor MG132. *Cell Biol. Int.* **30**, 31-43.
- Meyer,E.L., Strutz,N., Gahring,L.C., and Rogers,S.W.** (2003). Glutamate receptor subunit 3 is modified by site-specific limited proteolysis including cleavage by gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* **278**, 23786-23796.
- Mialon,A., Sankinen,M., Soderstrom,H., Junttila,T.T., Holmstrom,T., Koivusalo,R., Papageorgiou,A.C., Johnson,R.S., Hietanen,S., Elenius,K. et al.** (2005). DNA topoisomerase I is a cofactor for c-Jun in the regulation of epidermal growth factor receptor expression and cancer cell proliferation. *Mol. Cell Biol.* **25**, 5040-5051.
- Mohammadi,M., McMahon,G., Sun,L., Tang,C., Hirth,P., Yeh,B.K., Hubbard,S.R., and Schlessinger,J.** (1997). Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* **276**, 955-960.
- Morohashi,Y., Kan,T., Tominari,Y., Fuwa,H., Okamura,Y., Watanabe,N., Sato,C., Natsugari,H., Fukuyama,T., Iwatsubo,T. et al.** (2006). C-terminal fragment of presenilin is the molecular target of a dipeptidic gamma-secretase-specific inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester). *J. Biol. Chem.* **281**, 14670-14676.
- Morris,R.J., Tryson,K.A., and Wu,K.Q.** (2000). Evidence that the epidermal targets of carcinogen action are found in the interfollicular epidermis of infundibulum as well as in the hair follicles. *Cancer Res.* **60**, 226-229.

- Mosesson,Y., Shtiegman,K., Katz,M., Zwang,Y., Vereb,G., Szollosi,J., and Yarden,Y.** (2003). Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 21323-21326.
- Mueller,M.M.** (2006). Inflammation in epithelial skin tumours: old stories and new ideas. *Eur. J. Cancer* **42**, 735-744.
- Mumm,J.S. and Kopan,R.** (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev. Biol.* **228**, 151-165.
- Murakami,D., Okamoto,I., Nagano,O., Kawano,Y., Tomita,T., Iwatsubo,T., De Strooper,B., Yumoto,E., and Saya,H.** (2003). Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembranous cleavage of CD44. *Oncogene* **22**, 1511-1516.

N

- Nagai,A., Matsumiya,H., Yasui,S., Aoshiba,K., Ishihara,Y., and Konno,K.** (1993). Administration of bromodeoxyuridine in early postnatal rats results in lung changes at maturity. *Exp. Lung Res.* **19**, 203-219.
- Naruse,S., Thinakaran,G., Luo,J.J., Kusiak,J.W., Tomita,T., Iwatsubo,T., Qian,X., Ginty,D.D., Price,D.L., Borchelt,D.R. et al.** (1998). Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* **21**, 1213-1221.
- Nash,P., Tang,X., Orlicky,S., Chen,Q., Gertler,F.B., Mendenhall,M.D., Sicheri,F., Pawson,T., and Tyers,M.** (2001). Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* **414**, 514-521.
- Natarajan,A., Wagner,B., and Sibilio,M.** (2007). The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 17081-17086.
- Nateri,A.S., Riera-Sans,L., Da,C.C., and Behrens,A.** (2004). The ubiquitin ligase SCFFbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling. *Science* **303**, 1374-1378.
- Ni,C.Y., Murphy,M.P., Golde,T.E., and Carpenter,G.** (2001). gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* **294**, 2179-2181.
- Nicholson,R.I., Gee,J.M., and Harper,M.E.** (2001). EGFR and cancer prognosis. *Eur. J. Cancer* **37 Suppl 4**, S9-15.
- Nicolas,M., Wolfer,A., Raj,K., Kummer,J.A., Mill,P., van Noort,M., Hui,C.C., Clevers,H., Dotto,G.P., and Radtke,F.** (2003). Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat. Genet.* **33**, 416-421.

Nishi,H., Nishi,K.H., and Johnson,A.C. (2002). Early Growth Response-1 gene mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor expression during hypoxia. *Cancer Res.* **62**, 827-834.

Nishi,H., Senoo,M., Nishi,K.H., Murphy,B., Rikiyama,T., Matsumura,Y., Habu,S., and Johnson,A.C. (2001). p53 Homologue p63 represses epidermal growth factor receptor expression. *J. Biol. Chem.* **276**, 41717-41724.

Normanno,N., De Luca,A., Bianco,C., Strizzi,L., Mancino,M., Maiello,M.R., Carotenuto,A., De Feo,G., Caponigro,F., and Salomon,D.S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **366**, 2-16.

Nyborg,A.C., Ladd,T.B., Zwizinski,C.W., Lah,J.J., and Golde,T.E. (2006). Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates. *Mol. Neurodegener.* **1**, 3.

O

O'Brien,C. (1996). Auguste D. and Alzheimer's disease. *Science* **273**, 28.

O'Neil,J., Grim,J., Strack,P., Rao,S., Tibbitts,D., Winter,C., Hardwick,J., Welcker,M., Meijerink,J.P., Pieters,R. et al. (2007). FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J. Exp. Med.* **204**, 1813-1824.

Okuyama,R., Nguyen,B.C., Talora,C., Ogawa,E., Tommasi di, V, Lioumi,M., Chiorino,G., Tagami,H., Woo,M., and Dotto,G.P. (2004). High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. *Dev. Cell* **6**, 551-562.

Olayioye,M.A., Neve,R.M., Lane,H.A., and Hynes,N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* **19**, 3159-3167.

Onoyama,I., Tsunematsu,R., Matsumoto,A., Kimura,T., de Alboran,I, Nakayama,K., and Nakayama,K.I. (2007). Conditional inactivation of Fbxw7 impairs cell-cycle exit during T cell differentiation and results in lymphomatogenesis. *J. Exp. Med.* **204**, 2875-2888.

Orlicky,S., Tang,X., Willems,A., Tyers,M., and Sicheri,F. (2003). Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. *Cell* **112**, 243-256.

Oro,A.E. and Higgins,K. (2003). Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception. *Dev. Biol.* **255**, 238-248.

- Ostman,A. and Bohmer,F.D.** (2001). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol.* **11**, 258-266.
- Owens,D.M. and Watt,F.M.** (2003). Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 444-451.
- Pan,Y., Lin,M.H., Tian,X., Cheng,H.T., Gridley,T., Shen,J., and Kopan,R.** (2004). gamma-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis. *Dev. Cell* **7**, 731-743.
- Pehlivan,D., Gunduz,E., Gunduz,M., Nagatsuka,H., Beder,L.B., Cengiz,B., Rivera,R.S., Fukushima,K., Palanduz,S., Ozturk,S. et al.** (2008). Loss of heterozygosity at chromosome 14q is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **134**, 1267-1276.

P

- Perez-Losada,J. and Balmain,A.** (2003). Stem-cell hierarchy in skin cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 434-443.
- Perez-Losada,J., Mao,J.H., and Balmain,A.** (2005). Control of genomic instability and epithelial tumor development by the p53-Fbxw7/Cdc4 pathway. *Cancer Res.* **65**, 6488-6492.
- Piao,Z., Park,C., Park,J.H., and Kim,H.** (1998). Allelotype analysis of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* **75**, 29-33.
- Pirrone,A., Hager,B., and Fleckman,P.** (2005). Primary mouse keratinocyte culture. *Methods Mol. Biol.* **289**, 3-14.
- Porter,R.M., Lunny,D.P., Ogden,P.H., Morley,S.M., McLean,W.H., Evans,A., Harrison,D.L., Rugg,E.L., and Lane,E.B.** (2000). K15 expression implies lateral differentiation within stratified epithelial basal cells. *Lab Invest* **80**, 1701-1710.
- Prados,M.D., Scott,C.B., Rotman,M., Rubin,P., Murray,K., Sause,W., Asbell,S., Comis,R., Curran,W., Nelson,J. et al.** (1998). Influence of bromodeoxyuridine radiosensitization on malignant glioma patient survival: a retrospective comparison of survival data from the Northern California Oncology Group (NCOG) and Radiation Therapy Oncology Group trials (RTOG) for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **40**, 653-659.
- Proweller,A., Tu,L., Lepore,J.J., Cheng,L., Lu,M.M., Seykora,J., Millar,S.E., Pear,W.S., and Parmacek,M.S.** (2006). Impaired notch signaling promotes de novo squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res.* **66**, 7438-7444.

Q

- Quigley,D.A., To,M.D., Perez-Losada,J., Pelorosso,F.G., Mao,J.H., Nagase,H., Ginzinger,D.G., and Balmain,A. (2009). Genetic architecture of mouse skin inflammation and tumour susceptibility. *Nature* **458**, 505-508.
- Quintanilla,M., Brown,K., Ramsden,M., and Balmain,A. (1986). Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* **322**, 78-80.

R

- Rajagopalan,H., Jallepalli,P.V., Rago,C., Velculescu,V.E., Kinzler,K.W., Vogelstein,B., and Lengauer,C. (2004). Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* **428**, 77-81.
- Ramachandran,S., Fryer,A.A., Smith,A.G., Lear,J.T., Bowers,B., Griffiths,C.E., Jones,P.W., and Strange,R.C. (2000). Basal cell carcinoma. *Cancer* **89**, 1012-1018.
- Rangarajan,A., Talora,C., Okuyama,R., Nicolas,M., Mammucari,C., Oh,H., Aster,J.C., Krishna,S., Metzger,D., Chambon,P. et al. (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J.* **20**, 3427-3436.
- Rao,D.S., Bradley,S.V., Kumar,P.D., Hyun,T.S., Saint-Dic,D., Oravecz-Wilson,K., Kleer,C.G., and Ross,T.S. (2003). Altered receptor trafficking in Huntingtin Interacting Protein 1-transformed cells. *Cancer Cell* **3**, 471-482.
- Raurell,I., Castano,J., Franci,C., Garcia de Herreros .A., and Dunach,M. (2006). Presenilin-1 interacts with plakoglobin and enhances plakoglobin-Tcf-4 association. Implications for the regulation of beta-catenin/Tcf-4-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* **281**, 1401-1411.
- Raurell,I., Codina,M., Casagolda,D., DelValle,B., Baulida,J., de Herreros,A.G., and Dunach,M. (2008). Gamma-secretase-dependent and -independent effects of presenilin1 on beta-catenin/Tcf-4 transcriptional activity. *PLoS. ONE.* **3**, e4080.
- Real,P.J., Tosello,V., Palomero,T., Castillo,M., Hernando,E., de,Stanchina,E., Sulis,M.L., Barnes,K., Sawai,C., Homminga,I. et al. (2009). Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* **15**, 50-58.
- Rehman,A.O. and Wang,C.Y. (2006). Notch signaling in the regulation of tumor angiogenesis. *Trends Cell Biol.* **16**, 293-300.
- Repetto,E., Yoon,I.S., Zheng,H., and Kang,D.E. (2007). Presenilin 1 regulates epidermal growth factor receptor turnover and signaling in the endosomal-lysosomal pathway. *J. Biol. Chem.* **282**, 31504-31516.

- Resat,H., Ewald,J.A., Dixon,D.A., and Wiley,H.S.** (2003). An integrated model of epidermal growth factor receptor trafficking and signal transduction. *Biophys. J.* **85**, 730-743.
- Reuter,C.W., Morgan,M.A., and Eckardt,A.** (2007). Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br. J. Cancer* **96**, 408-416.
- Rikiyama,T., Curtis,J., Oikawa,M., Zimonjic,D.B., Popescu,N., Murphy,B.A., Wilson,M.A., and Johnson,A.C.** (2003). GCF2: expression and molecular analysis of repression. *Biochim. Biophys. Acta* **1629**, 15-25.
- Rogers,S.J., Harrington,K.J., Rhys-Evans,P., Charoenrat,P., and Eccles,S.A.** (2005). Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **24**, 47-69.
- Rubin,C., Litvak,V., Medvedovsky,H., Zwang,Y., Lev,S., and Yarden,Y.** (2003). Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. *Curr. Biol.* **13**, 297-307.

S

- Saura,C.A., Chen,G., Malkani,S., Choi,S.Y., Takahashi,R.H., Zhang,D., Gouras,G.K., Kirkwood,A., Morris,R.G., and Shen,J.** (2005). Conditional inactivation of presenilin 1 prevents amyloid accumulation and temporarily rescues contextual and spatial working memory impairments in amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci.* **25**, 6755-6764.
- Saura,C.A., Choi,S.Y., Beglopoulos,V., Malkani,S., Zhang,D., Shankaranarayana Rao,B.S., Chattarji,S., Kelleher,R.J., III, Kandel,E.R., Duff,K. et al.** (2004). Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* **42**, 23-36.
- Saura,C.A., Tomita,T., Soriano,S., Takahashi,M., Leem,J.Y., Honda,T., Koo,E.H., Iwatsubo,T., and Thinakaran,G.** (2000). The nonconserved hydrophilic loop domain of presenilin (PS) is not required for PS endoproteolysis or enhanced abeta 42 production mediated by familial early onset Alzheimer's disease-linked PS variants. *J. Biol. Chem.* **275**, 17136-17142.
- Scheinfeld,M.H., Ghersi,E., Laky,K., Fowlkes,B.J., and D'Adamio,L.** (2002). Processing of beta-amyloid precursor-like protein-1 and -2 by gamma-secretase regulates transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 44195-44201.
- Scheper,W., Zwart,R., and Baas,F.** (2004). Rab6 membrane association is dependent of Presenilin 1 and cellular phosphorylation events. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **122**, 17-23.

- Schlessinger, J.** (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* **110**, 669-672.
- Schlessinger, J.** (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225.
- Schneider, M.R. and Wolf, E.** (2009). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J. Cell Physiol* **218**, 460-466.
- Schroeter, E.H., Ilagan, M.X., Brunkan, A.L., Hecimovic, S., Li, Y.M., Xu, M., Lewis, H.D., Saxena, M.T., De Strooper, B., Coonrod, A. et al.** (2003). A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 13075-13080.
- Schulz, J.G., Annaert, W., Vandekerckhove, J., Zimmermann, P., De Strooper, B., and David, G.** (2003). Syndecan 3 intramembrane proteolysis is presenilin/gamma-secretase-dependent and modulates cytosolic signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 48651-48657.
- Sebastian, S., Settleman, J., Reshkin, S.J., Azzariti, A., Bellizzi, A., and Paradiso, A.** (2006). The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: From expression to turnover. *Biochim. Biophys. Acta* **1766**, 120-139.
- Selkoe, D. and Kopan, R.** (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 565-597.
- Shah, S., Lee, S.F., Tabuchi, K., Hao, Y.H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C.E., III, Sudhof, T., and Yu, G.** (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* **122**, 435-447.
- Shaye, D.D. and Greenwald, I.** (2002). Endocytosis-mediated downregulation of LIN-12/Notch upon Ras activation in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **420**, 686-690.
- Shen, J., Bronson, R.T., Chen, D.F., Xia, W., Selkoe, D.J., and Tonegawa, S.** (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* **89**, 629-639.
- Sherrington, R., Rogae, E.I., Liang, Y., Rogae, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K. et al.** (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**, 754-760.
- Shi, Y. and Massague, J.** (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700.
- Sibilia, M., Fleischmann, A., Behrens, A., Stingl, L., Carroll, J., Watt, F.M., Schlessinger, J., and Wagner, E.F.** (2000). The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell* **102**, 211-220.
- Sibilia, M., Steinbach, J.P., Stingl, L., Aguzzi, A., and Wagner, E.F.** (1998). A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J.* **17**, 719-731.

- Sibilia, M., Wagner, B., Hoebertz, A., Elliott, C., Marino, S., Jochum, W., and Wagner, E.F. (2003). Mice humanised for the EGF receptor display hypomorphic phenotypes in skin, bone and heart. *Development* **130**, 4515-4525.
- Sibilia, M. and Wagner, E.F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* **269**, 234-238.
- Simon, M., von, D.A., Larson, J.J., Wellenreuther, R., Kaskel, P., Waha, A., Warnick, R.E., Tew, J.M., Jr., and Menon, A.G. (1995). Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res.* **55**, 4696-4701.
- Sithanandam, G. and Anderson, L.M. (2008). The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **15**, 413-448.
- Six, E., Ndiaye, D., Laabi, Y., Brou, C., Gupta-Rossi, N., Israel, A., and Logeat, F. (2003). The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 7638-7643.
- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**, 209-219.
- Slagsvold, T., Pattni, K., Malerod, L., and Stenmark, H. (2006). Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol.* **16**, 317-326.
- Small, D.H. (1998). The role of the amyloid protein precursor (APP) in Alzheimer's disease: does the normal function of APP explain the topography of neurodegeneration? *Neurochem. Res.* **23**, 795-806.
- Smith, S.K., Anderson, H.A., Yu, G., Robertson, A.G., Allen, S.J., Tyler, S.J., Naylor, R.L., Mason, G., Wilcock, G.W., Roche, P.A. et al. (2000). Identification of syntaxin 1A as a novel binding protein for presenilin-1. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **78**, 100-107.
- Soriano, S., Kang, D.E., Fu, M., Pestell, R., Chevallier, N., Zheng, H., and Koo, E.H. (2001). Presenilin 1 negatively regulates beta-catenin/T cell factor/lymphoid enhancer factor-1 signaling independently of beta-amyloid precursor protein and notch processing. *J. Cell Biol.* **152**, 785-794.
- Sorkin, A. and Goh, L.K. (2008). Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp. Cell Res.* **314**, 3093-3106.
- Spruck, C.H., Strohmaier, H., Sangfelt, O., Muller, H.M., Hubalek, M., Muller-Holzner, E., Marth, C., Widschwendter, M., and Reed, S.I. (2002). hCDC4 gene mutations in endometrial cancer. *Cancer Res.* **62**, 4535-4539.

- Stratis,A., Pasparakis,M., Markur,D., Knaup,R., Pofahl,R., Metzger,D., Chambon,P., Krieg,T., and Haase,I.** (2006). Localized inflammatory skin disease following inducible ablation of I kappa B kinase 2 in murine epidermis. *J. Invest Dermatol.* **126**, 614-620.
- Strohmaier,H., Spruck,C.H., Kaiser,P., Won,K.A., Sangfelt,O., and Reed,S.I.** (2001). Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* **413**, 316-322.
- Sudakin,V., Ganoth,D., Dahan,A., Heller,H., Hershko,J., Luca,F.C., Ruderman,J.V., and Hershko,A.** (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell* **6**, 185-197.
- Suga,K., Tomiyama,T., Mori,H., and Akagawa,K.** (2004). Syntaxin 5 interacts with presenilin holoproteins, but not with their N- or C-terminal fragments, and affects beta-amyloid peptide production. *Biochem. J.* **381**, 619-628.
- Sundqvist,A., goechea-Alonso,M.T., Ye,X., Lukiyanchuk,V., Jin,J., Harper,J.W., and Ericsson,J.** (2005). Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). *Cell Metab* **1**, 379-391.

T

- Taipale,J. and Beachy,P.A.** (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* **411**, 349-354.
- Takasugi,N., Tomita,T., Hayashi,I., Tsuruoka,M., Niimura,M., Takahashi,Y., Thinakaran,G., and Iwatsubo,T.** (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* **422**, 438-441.
- Taniguchi,Y., Kim,S.H., and Sisodia,S.S.** (2003). Presenilin-dependent "gamma-secretase" processing of deleted in colorectal cancer (DCC). *J. Biol. Chem.* **278**, 30425-30428.
- Tanzi,R.E. and Bertram,L.** (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* **120**, 545-555.
- Tetzlaff,M.T., Yu,W., Li,M., Zhang,P., Finegold,M., Mahon,K., Harper,J.W., Schwartz,R.J., and Elledge,S.J.** (2004). Defective cardiovascular development and elevated cyclin E and Notch proteins in mice lacking the Fbw7 F-box protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 3338-3345.
- Thinakaran,G., Borchelt,D.R., Lee,M.K., Slunt,H.H., Spitzer,L., Kim,G., Ratovitsky,T., Davenport,F., Nordstedt,C., Seeger,M. et al.** (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* **17**, 181-190.

- Thinakaran,G., Harris,C.L., Ratovitski,T., Davenport,F., Slunt,H.H., Price,D.L., Borchelt,D.R., and Sisodia,S.S.** (1997). Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *J. Biol. Chem.* **272**, 28415-28422.
- Threadgill,D.W., Dlugosz,A.A., Hansen,L.A., Tennenbaum,T., Lichti,U., Yee,D., LaMantia,C., Mourtou,T., Herrup,K., Harris,R.C. et al.** (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* **269**, 230-234.
- To,M.D., Gokgoz,N., Doyle,T.G., Donoviel,D.B., Knight,J.A., Hyslop,P.S., Bernstein,A., and Andrusis,I.L.** (2006). Functional characterization of novel presenilin-2 variants identified in human breast cancers. *Oncogene* **25**, 3557-3564.
- To,M.D., Perez-Losada,J., Mao,J.H., and Balmain,A.** (2005). Crosstalk between Pten and Ras signaling pathways in tumor development. *Cell Cycle* **4**, 1185-1188.
- Tonks,N.K. and Neel,B.G.** (2001). Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 182-195.
- Tournoy,J., Bossuyt,X., Snellinx,A., Regent,M., Garmyn,M., Serneels,L., Saftig,P., Craessaerts,K., De Strooper,B., and Hartmann,D.** (2004). Partial loss of presenilins causes seborrhic keratosis and autoimmune disease in mice. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1321-1331.
- Tsunematsu,R., Nakayama,K., Oike,Y., Nishiyama,M., Ishida,N., Hatakeyama,S., Bessho,Y., Kageyama,R., Suda,T., and Nakayama,K.I.** (2004). Mouse Fbw7/Sel-10/Cdc4 is required for notch degradation during vascular development. *J. Biol. Chem.* **279**, 9417-9423.
- Tumbar,T., Guasch,G., Greco,V., Blanpain,C., Lowry,W.E., Rendl,M., and Fuchs,E.** (2004). Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* **303**, 359-363.

U

- Uberall,I., Kolar,Z., Trojanec,R., Berkovcova,J., and Hajduch,M.** (2008). The status and role of ErbB receptors in human cancer. *Exp. Mol. Pathol.* **84**, 79-89.

V

- Vaezi,A., Bauer,C., Vasioukhin,V., and Fuchs,E.** (2002). Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. *Dev. Cell* **3**, 367-381.
- van Noort,M., Meeldijk,J., van der,Zee,R., Destree,O., and Clevers,H.** (2002). Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *J. Biol. Chem.* **277**, 17901-17905.

- Vasioukhin,V., Degenstein,L., Wise,B., and Fuchs,E. (1999). The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 8551-8556.
- Vassar,R., Hutton,M.E., and Fuchs,E. (1992). Transgenic overexpression of transforming growth factor alpha bypasses the need for c-Ha-ras mutations in mouse skin tumorigenesis. *Mol. Cell Biol.* **12**, 4643-4653.
- Verma,R., Feldman,R.M., and Deshaies,R.J. (1997). SIC1 is ubiquitinated in vitro by a pathway that requires CDC4, CDC34, and cyclin/CDK activities. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1427-1437.

W

- Wagner,B., Natarajan,A., Grunaug,S., Kroismayr,R., Wagner,E.F., and Sibilis,M. (2006). Neuronal survival depends on EGFR signaling in cortical but not midbrain astrocytes. *EMBO J.* **25**, 752-762.
- Wakabayashi,T. and De Strooper B. (2008). Presenilins: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiology. (Bethesda.)* **23**, 194-204.
- Wakabayashi,Y., Mao,J.H., Brown,K., Girardi,M., and Balmain,A. (2007). Promotion of Hras-induced squamous carcinomas by a polymorphic variant of the Patched gene in FVB mice. *Nature* **445**, 761-765.
- Walsh,D.M. and Selkoe,D.J. (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* **44**, 181-193.
- Walter,J., Kaether,C., Steiner,H., and Haass,C. (2001). The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 585-590.
- Wang,J.W., Gamsby,J.J., Highfill,S.L., Mora,L.B., Bloom,G.C., Yeatman,T.J., Pan,T.C., Ramne,A.L., Chodosh,L.A., Cress,W.D. et al. (2004). Deregulated expression of LRBA facilitates cancer cell growth. *Oncogene* **23**, 4089-4097.
- Wang,L., Schulz,T.C., Sherrer,E.S., Dauphin,D.S., Shin,S., Nelson,A.M., Ware,C.B., Zhan,M., Song,C.Z., Chen,X. et al. (2007). Self-renewal of human embryonic stem cells requires insulin-like growth factor-1 receptor and ERBB2 receptor signaling. *Blood* **110**, 4111-4119.
- Wang,R., Tang,P., Wang,P., Boissy,R.E., and Zheng,H. (2006). Regulation of tyrosinase trafficking and processing by presenilins: partial loss of function by familial Alzheimer's disease mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 353-358.
- Waters,J.M., Richardson,G.D., and Jahoda,C.A. (2007). Hair follicle stem cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 245-254.

- Watt,F.M., Frye,M., and Benitah,S.A.** (2008). MYC in mammalian epidermis: how can an oncogene stimulate differentiation? *Nat. Rev. Cancer* **8**, 234-242.
- Watt,F.M. and Green,H.** (1982). Stratification and terminal differentiation of cultured epidermal cells. *Nature* **295**, 434-436.
- Wei,W., Jin,J., Schlisio,S., Harper,J.W., and Kaelin,W.G., Jr.** (2005). The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Cancer Cell* **8**, 25-33.
- Weijzen,S., Rizzo,P., Braid,M., Vaishnav,R., Jonkheer,S.M., Zlobin,A., Osborne,B.A., Gottipati,S., Aster,J.C., Hahn,W.C. et al.** (2002). Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat. Med.* **8**, 979-986.
- Welcker,M. and Clurman,B.E.** (2007). Fbw7/hCDC4 dimerization regulates its substrate interactions. *Cell Div.* **2**, 7.
- Welcker,M. and Clurman,B.E.** (2008). FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 83-93.
- Welcker,M., Orian,A., Grim,J.E., Eisenman,R.N., and Clurman,B.E.** (2004a). A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size. *Curr. Biol.* **14**, 1852-1857.
- Welcker,M., Orian,A., Jin,J., Grim,J.E., Harper,J.W., Eisenman,R.N., and Clurman,B.E.** (2004b). The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 9085-9090.
- Wikstrand,C.J. and Bigner,D.D.** (1998). Prognostic applications of the epidermal growth factor receptor and its ligand, transforming growth factor-alpha. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 799-801.
- Wiley,H.S.** (2003). Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp. Cell Res.* **284**, 78-88.
- Wiley,H.S., Herbst,J.J., Walsh,B.J., Lauffenburger,D.A., Rosenfeld,M.G., and Gill,G.N.** (1991). The role of tyrosine kinase activity in endocytosis, compartmentation, and down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 11083-11094.
- Wilhelmsen,K. and van der Geer P.** (2004). Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced release of the colony-stimulating factor 1 receptor cytoplasmic domain into the cytosol involves two separate cleavage events. *Mol. Cell Biol.* **24**, 454-464.
- Wilson,C.A., Murphy,D.D., Giasson,B.I., Zhang,B., Trojanowski,J.Q., and Lee,V.M.** (2004). Degradative organelles containing mislocalized alpha-and beta-synuclein proliferate in presenilin-1 null neurons. *J. Cell Biol.* **165**, 335-346.

- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., and Selkoe, D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* **398**, 513-517.
- Wolozin, B., Iwasaki, K., Vito, P., Ganjei, J.K., Lacana, E., Sunderland, T., Zhao, B., Kusiak, J.W., Wasco, W., and D'Adamio, L. (1996). Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* **274**, 1710-1713.
- Wong, E.S., Fong, C.W., Lim, J., Yusoff, P., Low, B.C., Langdon, W.Y., and Guy, G.R. (2002). Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling. *EMBO J.* **21**, 4796-4808.
- Wong, H.K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P., and Nukina, N. (2005). beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* **280**, 23009-23017.
- Wong, P.C., Zheng, H., Chen, H., Becher, M.W., Sirinathsinghji, D.J., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., Price, D.L., Van der Ploeg, L.H., and Sisodia, S.S. (1997). Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* **387**, 288-292.
- Wong, R.W. and Guillaud, L. (2004). The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 147-156.
- Wu, G., Hubbard, E.J., Kitajewski, J.K., and Greenwald, I. (1998). Evidence for functional and physical association between *Caenorhabditis elegans* SEL-10, a Cdc4p-related protein, and SEL-12 presenilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 15787-15791.
- Wu, G., Lyapina, S., Das, I., Li, J., Gurney, M., Pauley, A., Chui, I., Deshaies, R.J., and Kitajewski, J. (2001). SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Mol. Cell Biol.* **21**, 7403-7415.

X

- Xia, X., Qian, S., Soriano, S., Wu, Y., Fletcher, A.M., Wang, X.J., Koo, E.H., Wu, X., and Zheng, H. (2001). Loss of presenilin 1 is associated with enhanced beta-catenin signaling and skin tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 10863-10868.

Y

- Yada,M., Hatakeyama,S., Kamura,T., Nishiyama,M., Tsunematsu,R., Imaki,H., Ishida,N., Okumura,F., Nakayama,K., and Nakayama,K.I. (2004). Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J.* **23**, 2116-2125.
- Yang,Y.M., Liu,T.H., Chen,Y.J., Jiang,W.J., Qian,J.M., Lu,X., Gao,J., Wu,S.F., Sang,X.T., and Chen,J. (2005). Chromosome 1q loss of heterozygosity frequently occurs in sporadic insulinomas and is associated with tumor malignancy. *Int. J. Cancer* **117**, 234-240.
- Yoo,A.S., Bais,C., and Greenwald,I. (2004). Crosstalk between the EGFR and LIN-12/Notch pathways in *C. elegans* vulval development. *Science* **303**, 663-666.
- Yu,H., Saura,C.A., Choi,S.Y., Sun,L.D., Yang,X., Handler,M., Kawarabayashi,T., Younkin,L., Fedeles,B., Wilson,M.A. et al. (2001). APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice. *Neuron* **31**, 713-726.
- Yu,W.H. (1976). The effect of 5-bromodeoxyuridine on the postnatal development of the rat cerebellum: a biochemical study. *Brain Res.* **118**, 281-291.

Z

- Zhang,M., Haapasalo,A., Kim,D.Y., Ingano,L.A., Pettingell,W.H., and Kovacs,D.M. (2006). Presenilin/gamma-secretase activity regulates protein clearance from the endocytic recycling compartment. *FASEB J.* **20**, 1176-1178.
- Zhang,Y.W., Wang,R., Liu,Q., Zhang,H., Liao,F.F., and Xu,H. (2007). Presenilin/gamma-secretase-dependent processing of beta-amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 10613-10618.
- Zhang,Z., Hartmann,H., Do,V.M., Abramowski,D., Sturchler-Pierrat,C., Staufenbiel,M., Sommer,B., van de Wetering, M., Clevers,H., Saftig,P. et al. (1998). Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature* **395**, 698-702.
- Zhou,C.Z., Qiu,G.Q., Fan,J.W., Wang,X.L., Tang,H.M., Huang,L., Sun,Y.H., and Peng,Z.H. (2008). Refined mapping of loss of heterozygosity on 1q31.1-32.1 in sporadic colorectal carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **14**, 1582-1587.
- Zou,Z., Chung,B., Nguyen,T., Mentone,S., Thomson,B., and Biemesderfer,D. (2004). Linking receptor-mediated endocytosis and cell signaling: evidence for regulated intramembrane proteolysis of megalin in proximal tubule. *J. Biol. Chem.* **279**, 34302-34310.

Recursos electrònics

<http://www.skincancer.org>

<http://www.nccn.org/>

<http://www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/>

<http://www.stanford.edu/group/nolan/>

AGRAÏMENTS

Archivo. Nuevo. Guardar como: agraïments. Crec que aquest és el moment que més m'impersona de l'escriptura de la tesi, ja que estar-ho fent no seria possible sense l'ajuda de moltes i moltes persones que han estat al meu costat durant tot aquest temps. Sense cap ordre especial d'aparició, a tots vosaltres us vull transmetre el meu agraïment.

Tot hagués estat molt diferent si no hagués estat per tu Carles, que em vas donar la oportunitat d'iniciar-me en aquest món. Gràcies per ensenyar-me que les coses s'han de fer bé i haver confiat en mi durant aquest temps, especialment en els inicis del grup, on els nombrosos "Saures" actuals eren una poiata, una nevera, tu i jo. Que en queda de lluny! I és que poc a poc hem anat creixent i ara potser som la primera potència de la unitat. He tingut la sort de compartir laboratori amb grans companys i amics, que han fet el dia a dia molt més fàcil i que els grans desastres dels laboratoris es quedin en petites anècdotes, que és el que són. Tot va començar amb els Pepe's, sempre he dit que els meus orígens estan en vosaltres, gràcies per acollir-me i haver-me ajustat la brúixola al principi, quan tot sembla tant nou.

La poiata se'ns va quedar petita, i a la fi vam tenir un espai per nosaltres...per nosaltres i per dos grups més. Tot i la densitat geogràfica, hi vaig treballar, riure i plorar molt molt a gust amb totes vosaltres. Quin bon record tinc d'aquell temps. Tantes coses, els acudits de l'Eugenio, les neveres imantades, els castells a la pica. Arantza, gràcies per portar flors del teu jardí i alegrar-nos el laboratori. Ana, la veritat es que no sé on col·locar-te dins d'aquest escrit, ja que has estat present en tots els moments, bons i dolents, d'aquesta tesi. Saps del cert que sense tu no estaria escrivint aquestes línies, que has estat al meu costat escoltant-me i aconsellant-me en els mals moments i alegrant-he quan hi ha hagut motiu d'alegria, gràcies de tot cor. Espero tenir-te a prop sempre. Tània, ja saps que jo...*sin ti no soy nada*. Estic molt contenta d'haver coincidit amb tu durant aquests anys.

Quan el servei de seguretat de la UAB va aconsellar la implantació d'un guàrdia urbà per regular el trànsit dins del laboratori, vam traslladar-nos al pis de baix. I, tot i que va costar el canvi, ara hi estem molt bé. I s'hi està molt bé sobretot per que hi ha una gent fantàstica treballant-hi. Judit, has estat la millor companya del món.

Moltes gràcies per somriure o més aviat riure de tot, per alegrar els matins i per ensenyar-me tantíssimes coses durant aquest temps. Elsa, moltes gràcies per fer les que les coses siguin tan fàcils, per estar de bon humor i escoltar les meves històries pel matí. Ets imprescindible. Sergi, tot i que a vegades me'n rigui de la teva motivació sàpigues que ho faig des del carinyo (de veritat eh), i es que la teva motivació m'ha donat l'empenta que em feia falta en aquests últims mesos. Gràcies per la teva espontaneïtat. Jorge, *science is fun!* Que bien que estés aquí enseñándonos siempre a ver el vaso medio lleno de todas las cosas, sean o no sean ciencia. Marta, fantàstic el teu bon humor i esperit reivindicatiu, no et deixis pervertir! Núria, per les terres escoceses, tot ha de sortir bé si estàs per allà rondant. Ens ha tocat la loteria tenint-vos pel lab aquest any! No m'oblido dels Bayascas, Tina, Patri i Juli, que modereu una mica el laboratori. Un altre dels bons motius d'estar al pis de baix, a part de gaudir d'obres perpètuas, és tenir als Galea per veïns. El coneixement del duo post-doc Gema, que con tu vitalidad llenabas todos los pasillos, i Pauli, més tranquil·la. Mateu, m'encanta pensar que fa 10 anys que ens coneixem i haver pogut gaudir de tu tot aquest temps, espero sumar moltes dècades més a aquesta meravellosa xifra. Ets un sol que brilla molt fort.

Una de les virtuts més grans d'aquest departament és que tots i cadascun dels que hi treballa m'ha ajudat d'una manera o altra durant aquests anys. I es que aquesta tesi hagués quedat en un pensament si no hagués estat per les viles, els sopars, les cases rurals i altres sortides que hem fet...hagués estat possible si no hagués posat una espelmeta a Asturies per acabar-la?

Les Unzetes sempre tan hospitalàries; Montse, m'alegro molt d'haver coincidit amb tu aquells mesos a fàrmaco, si no hagués estat per tu! I m'alegro encara més que els nostres camins ens hagin portat al mateix lloc, ha estat una gran sort per mi. Eli has estat l'ànima d'aquest departament durant molts anys i se't troba moltíssim a faltar, espero que compleixis el teu somni i estiguis jubilada a la poiata fent Westerns. Irene, espero que tot et vagi molt bé, a la ciència o allà on sigui. Mar als inicis de la tesi les teves converses em van ajudar moltíssim, ets tan fàcil!

Els Piques, caracteritzats per ser tan...Piques! Albert, tot i les discussions sobre l'homeopatia a cultius, crec que el teu esperit crític i pràctic m'ha ajudat molt. Miki, sempre m'he sentit molt a gust amb tu. David, has estat...mmm...no, t'he d'agrair tantes coses que ho deixo per més tard.

Pepes, que heu sortit al principi de rasquis, sou un puntal referent al departament. Alfredo la teva paciència i meticulositat em sembla inabastable. Bruna, admiro la

teva força de voluntat i passió pel que fas i tens. Nahuai, gracias por ser el capitán de las pachangas realmente me subían la moral que no veas! Cuando quieras las reemprendemos.

Els Aguilera, especialment per la seva minicambra freda. Roger, després del futbol ets el que més em pot pujar la moral (excepte quan dius allò de “els teus ulls...”). Ja saps que lo nostre és impossible, però sempre ens quedarà Paris. Naty, cualquier dia nos encontramos paseando por Luchon! Mireia, m’encanta que et prenguis les coses amb tant de bon humor.

Clínic...és a dir, Laura. Ets l’optimisme personificat! Alex, si algun dia necessito una firmita del Maragall te lo digo. Eres genial, me haces mucha gracia. Santi, crec que hi ha poca gent que em pugui sorprendre tant com tu. Noe, sempre has estat per allà, ai aquell congrés a Torremolinos!

Cris, *culturewoman!* Gracias por tu assistència en momentos de *stress*, especialmente abriendo el tanque de nitrogeno. El Institut tiene una gran suerte al tenerte. Susanna, la teva eficàcia resolent problemes tècnics ha facilitat molt la feina al departament.

Gràcies als de secretaria, Melchor, Santi, Isabel, Carlos, Rosa, per fer les ferragoses tasques administratives més fàcils. Carlos, el teu bon humor, tot i que estem al pis de baix, portant-nos les comandes és sensacional.

Vull agrair al servei de microscòpia de la UAB per el seu magnífic servei. També al servei d’histologia de l’Institut, és a dir, a la Mar. Moltes gràcies per la teva infinita paciència, per la calma que transmetes i per interessar-te per la meva feina. També vull expressar el meu agraïment al Servei de l’Estabulari de la UAB, per l’enorme treball que fan i que des de fora no veiem.

Potser el que més m’agrada de la ciència és la possibilitat de col·laborar i compartir coneixement amb grups propers i no tant propers. Gracias Salva por abrirnos las puertas de tu laboratorio con la máxima hospitalidad i disponibilidad. Tus consejos, tan técnicos como conceptuales, han sido claves para entender una parte muy importante de este trabajo. Ha sido un placer trabajar contigo y con tu gente. Thanks Peggy for your advices and time, specially related to the whole mounts stuff. Nuno, it’s a shame that the Wnt experiment did not work! Hope will be an extra opportunity. Bernd, thanks’ for your sincerely attention taking care of all the skin samples.

Una de les millors etapes d’aquests anys ha estat la meva experiència a San Francisco, que em va enriquir sobremanera tant personal com professionalment.

Thanks Allan to allow me to stay in your lab. From almost the first day I felt like home. With your scientific thinking I learned that we are advancing to some place, thanks for your practical view about things and for that cute mouse. Thanks to Mao for introducing me to Fbw7 world, and also to Jesus that gave to me some technical instructions to work with it. Mihn, thanks for all your advices during my stay. Christine, gracias por tus consejos de iniciación a la inmunohisoquímica. Thanks also to Iljin, Gill, Reyno and all the Arkhurst's lab. Juan, des de que vaig rebre el primer mail teu vaig saber que l'havia encertat. Ets l'ànima del Cancer Center! Gràcies a milers per ensenyar-me com funcionava el centre, per tots els llargs cafès a Murano, els dinars i passejos per la ciutat. Després d'aterrar a una ciutat i país desconegut, jo que vinc de Salardú, vaig tenir la immensa sort de ser rebuda per la Sara i el Pau, a qui agreixo de tot cor la seva atenció durant aquells primers dies i encara més per fer-me descobrir els picnics amb *dim-sum* al Golden Gate Park. La meva sort va continuar sent acollida per en David i la Sylvia, i es no se com agrair la vostra hospitalitat. Vaig sentir casa vostra com casa meva, I hope some day to see you in Salardu! I si he de parlar d'una família per aquelles terres sens dubte parlo amb gran aprecí de l'Anna, el Guillem, el Roger i la Lidia, gràcies per aquelles estones tan tranquil·les a casa vostra. Molts dels records més macos que tinc de SF van associats a dos amics molt especials per mi, Melissa i Erick. Me siento muy afortunada de haberos tenido cerca esos meses, lo puedo resumir en tres palabras: pollo, vino y pintura. Realment puc afirmar que el que diu la cançó de San Francisco és veritat, si fem excepció del temps, que d'això no t'avisen, ai ai ai la boira!

Durant aquest temps he tingut la sort de comptar amb grans amics que han fet les males estones de la tesi, perquè n'hi han, insignificants. Les bionenes, amb les que va començar la història, que totes juntes fem un bon conjunt i ens complementem perfectament. Cadascú aporta un ingredient màgic que fa que surti una sopa boníssima. Trip tu portes el picant, la rebeldia que ens fa falta, que poguem somiar amb coses potser no ens atreviríem a fer; Ana, el punt de sal, fent que les coses no siguin gens soses; la Neus que dirigeix l'orquestra i fa que cada cosa entri en el moment oportú; la Núria evitant el caos i que tot estigui en el seu lloc, posant els ingredients bàsics i necessaris; l'Anna que li dona aquell toc especial i el Richi, que quan diu que se ha acabao és que s'ha acabao. Fi de la cocció. Totes vosaltres sou part del meu món, que espero compartir durant molts i molts anys més. La conjunció màxima és quan apareixen en escena els rebels de biologia, llavors el riure es multiplica. Ferran, com va la guia de Laos? Ja saps que la necessito i es que

amb ella a la ma penso omplir la ment de moments especials. Martí, tot i que no t'agradi ser xirimoia, m'encanta ser la teva prividilegiada i és que si em sento així és perquè tinc la sort que siguis el meu amic. Maria, quan d'aire m'ha portat les escapades a Vilafortuny i quanta energia veure la Mar petiteta, en un paper mal imprès sobre la meva taula del despatx. Anna Boix, visca la Patum! Mateu, no pots de deixar de sortir en aquest trocet i es que són molts els moments feliços que en viscut junts amb tots els de les línies de dalt.

I com a persona de poble que soc, m'hagués ofegat a Barcelona si no hagués sentit casa meva a prop, bé, emocionalment perquè a nivell geogràfic està un rato lluny. Tinc la immensa sort de poder arribar a Salardú i comptar amb grans amigues, que tenen la virtut de fer-me sentir com si el temps no passés. Yoli, cuantas risas juntas y que bien que se está contigo, tengo la certeza que siempre de los siempre estaràs ahí. Anna, quantes converses sobre el futur eh? A veure si un dia en traiem l'aigua clara, tot i que no cal que tinguem massa pressa. Cris, tu sempre tan cachonda. Moni, la millor muntanyista del món! I tots aquests anys han anat inevitablement lligats als jabalís de la Comision d'Hèstes, especialment amb Mari i Gabri, amb els que, per uns dies l'any, he desconnectat totalment del món.

I per desconnectar res millor que un cap de setmana a Valderrobres. Quantes vegades us hagués enviat a....però clar, teniu algo que fa que sigui molt difícil fer-ho. Angel i Marc, no us puc posar per separats, gràcies per ensenyar-me a mirar les coses d'una altra manera. Anna, no saps la paciència que tens! Marlies, crec que una de les coses més importants que he fet durant aquesta tesi ha estat amb tu, si, penses bé: és pujar el *Half Dome*. Però no és per la pedrota que és, si no perquè vaig veure clar lo important i necessària que ets per la meva felicitat. Gràcies per ser sempre tan a prop meu.

He d'agrair a l'AGAUR per haver-me otorgat una beca predoctoral, sense la qual segurament no hagués pogut fer la tesi, tot i que m'hagués estalviat les jornades doctorials. Tanmateix, he d'agrair molt més la confiança i el suport logístic d'en Bernat. Bernat, gràcies de tot cor per ajudar-me tan durant aquest temps. La teva amabilitat ha estat infinita i providencial, ha estat fantàstic per mi tenir cura de la porteria durant aquesta etapa de la vida.

Finalment, però ni de bon tros menys important, gràcies a tota, i quan dic tota vull dir tota, la meva família per la vostra confiança pel que he estat fent durant aquest temps. A la meva nova família a la Bisbal, per la vostra calidesa vora el foc. Iaia i iaio, quan us miro veig la il·lusió i la felicitat en els vostres ulls, se que esteu

orgullosos de mi i jo ho estic de vosaltres. Avi, tot i que siguis una mica ronyeta, m'encanta seure al teu costat i que m'expliquis com de millors eren les coses abans. Papa, Mama, sou el meu millor exemple a seguir. Em sento terriblement afortunada de ser la vostra filla. Sempre, en qualsevol moment del dia, us tinc presents en el que faig. Gerard, és fantàstic tenir-te a prop aquí Barcelona i gaudir de les teves visites i inquietuds. Berta, tinc la sort d'aprendre molt de tu i es que em fascina la teva forta voluntat per les coses. Durant aquests anys us he enyorat molt, m'hagués agradat estar una mica més a prop vostre. Per mi, tots quatre sou imprescindibles i junts fem una gran família. No puc deixar d'agrair també a la Pinda i al Fishtro per fer-me tanta companyia en aquests darrers mesos.

David, puc dir amb tot el convenciment, que ets el millor que m'ha passat durant el doctorat. Has estat amb mi en tots els moments d'aquesta tesi, fent-me veure sempre *the bright side of life.*, gràcies per ensenyar-me tantes coses i per fer-me sentir tant important. Soc feliç de pensar que sempre estaràs al meu costat, en el nostre petit món, en qualsevol part de la Terra.

.....per mi comença una nova etapa, i per sort, amb molts de vosaltres al meu costat! Hi han moltes altres muntanyes per pujar!

