

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**PAPEL FUNCIONAL DE LOS MIEMBROS DE LAQ
FAMILIA RETINOBLASTOMA (pRb, p107 y p130) EN LOS
PROCESOS DE PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y
CERCINOGENESIS DE PIEL DE RATÓN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sergio Ruíz Macías

Bajo la dirección de Los doctores

Jesús M. Paramio González

José Luis Jorcano

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2477-9

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

TESIS DOCTORAL

**PAPEL FUNCIONAL DE LOS MIEMBROS DE LA
FAMILIA DE RETINOBLASTOMA (pRb, p107 Y
p130) EN LOS PROCESOS DE PROLIFERACIÓN,
DIFERENCIACIÓN Y CARCINOGENÉISIS DE PIEL
DE RATÓN**

**SERGIO RUIZ MACÍAS
MADRID, 2004**

**El trabajo experimental presentado en esta memoria se ha realizado en el
Departamento de Daño, Reparación e Ingeniería Tisular en Epitelios
del CIEMAT bajo la co-dirección de los Doctores
Jesús M. Paramio González y José Luis Jorcano Noval**

A mi Familia

AGRADECIMIENTOS.

Parece que fue ayer el día en que empecé a trabajar en el CIEMAT. Sin embargo no fue ayer, sino que fue allá por Julio de 1998. Hoy, 6 años después, hay mucha gente a la que debo agradecer el resultado de todo mi trabajo.

En primer lugar, a mis dos co-directores de Tesis. Por un lado, a José Luis Jorcano que confió en mí y me integró en su grupo (aún habiéndonos conocido en tan extrañas circunstancias). Por otro, a Jesús M. Paramio, mi alma pater durante todo este período. A él le debo todo lo que soy, científicamente hablando, por supuesto. Realmente, no sé que harás sin mí... bueeeno, venga, ni yo sin ti (je, je).

A Carmen, a la que agradezco todo el esfuerzo que realizó en enseñarme durante los duros momentos del principio y por supuesto, por estar siempre ahí cuando la he necesitado.

Al resto de componentes de mi grupo: a Hugo: por ser tan buen amigo y tener siempre un chistecillo malo en la cabeza preparado para ser contado; a Miren, que me ayudó con toda la parte de carcinogénesis ya que yo tenía poca idea; a Maria Fernanda, sangre nueva en el grupo, a la que agradezco que siga con todo el trabajo que he empezado (por cierto, no se dice zell zaikel); a Pilar por su apoyo técnico en todo momento.

A mis compañeros coetáneos de Tesis: a Elenita, que es entusiasmo puro por todo aquello en lo que cree; a Javi, al que admiro mucho por los pasos que va dando en este mundo (¡¡ya eres papá¡¡); a Paula, por estar siempre dispuesta a tomar la penúltima; a Ángela, por intentar siempre arreglar el mundo (por cierto, la próxima debes ser tú).

A Marta G, que es mi ojito derecho y a la que quiero un montón. A Marta C, Mariajo e Isa, por las que siento una debilidad especial. A todos los demás del despachito de arriba y abajo, Laura, Vanessa, Rodolfito, Sandra, Toñi, Alejo, Martín, Blanca, Almudena y Ramón por hacer más divertido este laboratorio. A Sole y a Mandi que aunque no están en los despachitos, también son lo mejor de lo mejor (¿probaré alguna vez las croquetas de la Sole?). A Eva y Martita, que han sido y son muy especiales para mi.

Al resto de gente del grupo, que están o que han estado y que me ayudado en todo lo que he necesitado, Llanos, Ángel, Angus, Fer, Marce, Manu, Paloma, Rodolfo y Marta I.

A Isabel, por haberme hecho tantos y tantos cortes y por ser como mi segunda madre.

A todo el fondo sur, Maruja, Isra, Manuel, Teresa, Jaco (a ver si preparamos los medios alguna vez...), Guille, José Carlos, Bea, Elena, Susana G, Susana N, Rosa, Óscar, M^a Eugenia, Ariana, África, M^a Luz, Florencio, Sergio y Juan.

Al despacho de pedidos, Elena, MariLo y Aurora por tener esa reserva espiritual siempre preparada y que me salvó más de una vez.

A todo el personal del animalario, en especial a Jesús, que aunque no hace nada más que quitarme espacio, en el fondo es que tiene que hacerlo (pero ni uno más ¿eh?).

A los secretarios, Ludi, que me ha sacado de tantos líos que ni me acuerdo y Miguel (este año no nos salva ni el gordo, ¡Hala Madrid!).

A XiaoLing, Scott, Carla y René sin los cuales mi estancia en Amsterdam hubiera sido muy diferente. A Marc y Jos por haberme inculcado la parte crítica de la ciencia y a Ralphie por su incomparable humor. A Ton y al resto de la quinta planta del NKI donde pasé todos esos largos meses en Amsterdam.

A mis antiguas compañeras del labo de Bioquímica de la Complu, Lola, Ana, MariCarmen, Inma, Eduardo y en especial a Begoña, que fue la primera que me enseñó de qué va esto de la ciencia.

A todo el resto de la gente que ha vivido mi Tesis un poco más lejos:

A mis compañeros de piso, George (que perdió el tren hace mucho), Santi (que perdió la cabeza por allá en las tierras gallegas), y Diego (al que perdimos hace tiempo) con los que convivir es toda una aventura (¿se acabarán los guisantes de una vez?). Por supuesto, al resto de Proclaimers, con los que he vivido tantas y tantas cosas y todavía espero hacerlo, Emilio, Saúl, Javi, Pascual, Pedrito, Ortuño, Nacho, Juanfri, JuananTorres, Alvarito y Conguito. Al resto de mis amigos del Chami con los que tengo tantas anécdotas, en especial a Merlín, Maese... Todo hay que decirlo, ninguno de estos sabe distinguir una ameba de un ratón.

A tres de mis mejores amigos, David, Pollo y Ángel.

A toda mi Tuna, Pat, Usi, Tote, Luis, Juli, Fran y todos los demás, con la que he aprendido mucho de lo que necesitaba saber sobre la vida. ¿Qué haría yo sin esos ensayos eternos hasta las mil de la madrugada solo por el mero placer de cantar y pasar un rato divertido?.

A mis amigos de Ciudad-Real, Fer, Iván, Alberto, Jota, Rosa, Lucía, César, Isabelle y Olga.

A toda mi gran familia, en especial a mi tío Carlos que siempre se preocupó por intentar comprender algo de lo que hacía y nunca perdió el interés en escucharme; a mi tía Pili con la que he compartido todos estos años en Madrid; a mis abuelas Isabel y Mercedes, donde quiera que estén, y que hicieron tanto por mi educación; a mi tía Rosi, por enseñarme a vivir la vida; a mis tíos Maribel y Sireno, que tanto han hecho por nosotros.

A mis hermanos, con los que aunque la convivencia ha sido muy dura, ha merecido la pena; os quiero un montón.

A mis padres, que siempre me han proporcionado, dentro de sus limitadas posibilidades, lo mejor de todas las cosas. En especial, a mi madre, a la que admiro en todo lo que hace ¡¡Gracias por luchar por mí en todo momento!!.

A todos,

¡¡¡Gracias!!!

%	Porcentaje.
°C	Grados Celsius.
mg, mm, mm	Microgramo, micrometro, milímetro.
ml, mM	Microlitro, micromolar.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario.
APC	Del inglés, <i>Adenomatous Polyposis Coli</i> .
ARN	Ácido Ribonucleico.
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero.
BrdU	Bromo-deoxi Uridina.
BMP	Del inglés, <i>Bone Morphogenetic Protein</i> , Proteína morfogénica de médula.
BSA	Del inglés, <i>Bovine Serum Albumine</i> , Seroalbúmina bovina.
Ca ²⁺	Iones de calcio.
CBP	Del inglés, <i>CREB Binding Protein</i> , Proteína de unión al factor CREB.
C/EBP	Del inglés, <i>CCAAT/Enhancer Binding Protein</i> , Proteína de unión a la secuencia activadora CCAAT.
CDK	Del inglés, <i>Cycling-Dependent Kinases</i> , Quinasas dependientes de ciclinas.
CKI	Del inglés, <i>Cycling-Dependent Kinases Inhibitors</i> , Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas.
com	común.
DAB	DiAminoBencidina.
DAPI	Del inglés, <i>4, 6 Diamidin-2-Phenyl-Indole</i> , 4,6 diamidino-2-fenil-indol.
dCTP	Del inglés, <i>deoxiCytidine TriPhosphate</i> , Deoxicitidina trifosfato.
dUTP	Del inglés, <i>deoxiUridine TriPhosphate</i> , Deoxuridina trifosfato.
DMBA	7, 12-DiMetilBenz(a)Antraceno.
DMEM	Del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.
dNTP	Del inglés, <i>deoxiNucleotidil TriPhosphate</i> , Deoxinucleotidil trifosfato.
dpc	días <i>post-coitum</i> .
EDA	Del inglés, <i>EctoDysplasin A</i> , Ectodisplasina A.
EDAR	Del inglés, <i>EctoDysplasin A Receptor</i> , Receptor de la ectodisplasina A.
EDTA	Del inglés, <i>Ethylen-Diamin Tetra-Acetate</i> , Etilén-diamino-tetra-acetato.
EGF	Del inglés, <i>Epidermal Growth Factor</i> , Factor de crecimiento epidérmico.
EMEM	Del inglés, <i>Essential Minimum Eagle Medium</i> , Medio mínimo esencial de Eagle.
EMSA	Del inglés, <i>ElectroMobility Shift Assays</i> , Ensayos de movilidad electroforética.
FACS	Del inglés, <i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i> , Separación celular dependiente de fluorescencia.
FITC	Del inglés, <i>Fluorescein IsoThiCyanate</i> , Isotiocianato de fluoresceína.

Fig	<u>Figura</u> .
FGF	Del inglés, <u>Fibroblast Growth Factor</u> , Factor de crecimiento de fibroblastos.
GBD	Del inglés, <u>GSK3b Binding Domain</u> , Dominio de unión a GSK3 b.
GFP	Del inglés, <u>Green Fluorescent Protein</u> , Proteína verde fluorescente.
GS-1	Del inglés, <u>Glycogen Sintetase-1</u> , Glicógeno sintetasa-1.
GSK3b	Del inglés, <u>Glycogen Sintetase Kinase 3b</u> , Quinasa de la glucógeno sintetasa 3b.
GST	Del inglés, <u>Glutation-S-Transferase</u> , Transferasa S del glutation.
HaCaT	Del inglés, <u>Human adult Calcium Temperature</u> .
H2B	Del inglés, <u>Histone 2B</u> , Histona 2B.
HBP	Del inglés, <u>HMG Box-containing Protein 1</u> , Proteína 1 que contiene un dominio de unión HMG.
Hepes	Del inglés, <u>N2-HydroxyEthylPiperazine-N'-2-EthaneSulphonic acid</u> , Ácido N2-hidroxietilpiperacín-N'-2-etanosulfónico.
HGF	Del inglés, <u>Hepacyte Growth Factor</u> , Factor de crecimiento de hepatocitos.
H&E	<u>Hematoxilina/ Eosina</u> .
HPV	Del inglés, <u>Human Papiloma Virus</u> , Virus de papiloma humano.
JNK	Del inglés, <u>JuN Kinase</u> , Quinasa del factor Jun.
K	Del inglés, <u>Keratin</u> , Queratina.
Mut	Mutación en el gen descrito.
neo	<u>neomicina</u> .
NFkB	Del inglés, <u>Nuclear Factor kB</u> , Factor nuclear kB.
NOD/SCID	Del inglés, <u>Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency Disease</u> , ratón diabético no obeso portador de inmunodeficiencia combinada severa.
nu/nu	Del inglés, <u>nude/nude</u> , animales portadores de una mutación que les confiere el aspecto de animales desnudos, sin pelo.
OCT	Del inglés, <u>Optimal Cutting Temperature</u> , Temperatura óptima de corte.
p75NTR	Del inglés, <u>p75 NeuroTrophic Receptor</u> , Receptor neurotrófico p75.
PAGE	Del inglés, <u>PolyAcrilamide Gel Electrophoresis</u> , Electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb	<u>Pares de bases</u> .
PBS	Del inglés, <u>Phosphate Buffered Saline</u> , Tampón fosfato salino.
PCNA	Del inglés, <u>Proliferating Cell Nuclear Antigen</u> , Antígeno nuclear asociado a células proliferativas.
PCR	Del inglés, <u>Polymerase Chain Reaction</u> , Reacción en cadena de la polimerasa.
PKB	Del inglés, <u>Protein Kinase B</u> , Proteína quinasa B.
PKC	Del inglés, <u>Protein Kinase C</u> , Proteína quinasa C.
PMSF	Del inglés, <u>PhenylMethylSulfonylFluoride</u> , Fenil-Metil-Sulfonyl-Fluoruro.
PGK	Del inglés, <u>PhosphoGlycerate Kinase</u> , Fosfoglicerato quinasa.
Rpm	<u>Revoluciones por minuto</u> .

SCC	Del inglés, <i>Squamous Cell Carcinoma</i> , Carcinoma escamoso.
SCLC	Del inglés, <i>Small Cell Lung Carcinoma</i> , Carcinoma pequeño de pulmón.
SDS	Del inglés, <i>Sodium Dodecyl-Sulphate</i> , Dodecil sulfato sódico.
Shh	Del inglés, <i>Sonic hedgehog</i> .
SSC	Del inglés, <i>Sodium chloride/Sodium Citrate</i> , Tampón de citrato sódico y cloruro sódico.
TA-p63	Del inglés, <i>TransActivating-p63</i> , Formas proteicas transactivadoras de p63.
TBE	Del inglés, <i>Tris-Borate-EDTA</i> , Tris-borato-EDTA.
TBS	Del inglés, <i>Tris Buffered Saline</i> , Tampón Tris salino.
TCF	Del inglés, <i>T-Cell Factor</i> , Factor de células T.
TdT	Del inglés, <i>Terminal deoxinucleotidil Transferase</i> , Transferasa terminal de nucleótidos.
TE	<i>Tris-EDTA</i> .
TGF	Del inglés, <i>Tumor Growth Factor</i> , Factor de crecimiento tumoral.
TNF- α	Del inglés, <i>Tumoral Necrosis Factor</i> , Factor de necrosis tumoral.
TLE	Del inglés, <i>Transducin-Like Enhancer of split</i> , Transducina similar al factor <i>Enhancer of split</i> .
TPA	Del inglés, <i>12-O-Tetradecanoil-Phorbol-13-Acetate</i> , 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato.
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano.
TROY/TAJ	Del inglés, <i>TNFR super family expressed On the mouse embryo/Toxicity And JNK inducer</i> , Receptor de la superfamilia TNFR expresado en el embrión de ratón/inductor de JNK y tóxico.
TUNEL	Del inglés, <i>TdT-mediated dUTP Nick End Labeling</i> , Marcaje de extremos con dUTP mediado por la enzima TdT.
V	Voltios.
WT	Del inglés, <i>Wild Type</i> , forma nativa.
XEDAR	Del inglés, <i>X-linked Ectodysplasin-A2 Receptor</i> , Receptor de ectodisplasia A2 ligado al cromosoma X.

1. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza nada hay superfluo.

Averroes

1.1 LA EPIDERMIS.

La epidermis es un epitelio estratificado y queratinizado que forma la barrera entre el organismo y su ambiente, realizando una función esencialmente protectora ante todo tipo de agresiones externas (Fig. 1). Este tejido se encuentra constituido por diferentes poblaciones celulares (queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel), siendo el queratinocito, uno de los prototipos de célula epitelial, el tipo celular más abundante (más del 80% en epidermis humana adulta). El melanocito es el responsable de la pigmentación de la piel mientras que la célula de Langerhans es un tipo de célula dendrítica que cumple funciones inmunológicas (Kimber y cols., 2000). Por último, la célula de Merkel tiene una función de carácter sensorial (Fantini y Johanson, 1995). Subyacente a la epidermis, se encuentra la dermis, una matriz de tejido conjuntivo donde se localizan células especializadas, los fibroblastos, junto con vasos sanguíneos, canales linfáticos y terminales nerviosos.

La epidermis se organiza en diferentes capas o estratos (Fig. 1), clasificados como sigue:

- Estrato germinativo o basal: separado de la dermis por la membrana basal, se localizan aquí las células con capacidad proliferativa de la epidermis (Lavker y Sun, 1983; Potten y Morris, 1988;).

- Estrato espinoso: su nombre deriva de la apariencia que los desmosomas, complejos proteicos de adhesión intercelular, presentan bajo microscopía óptica (Franke y cols., 1987). Estas uniones intercelulares conectan el citoesqueleto de diversas células contribuyendo a la integridad del tejido y a las propiedades de barrera de la epidermis (Franke y cols, 1987). Las células de este estrato, aunque no han perdido totalmente la capacidad mitótica, normalmente no se dividen (Bailleul y cols., 1990).

- Estrato granuloso: en esta capa, las células se caracterizan por la presencia de numerosos gránulos de queratohialina que le confieren un aspecto característico (Resing y Dale, 1991). Dichos gránulos, formados por proteínas como la profilagrina, están unidos al citoesqueleto, y conducen, tras complejos procesamientos proteolíticos, a su agregación. También existen gránulos lamelares cuya exocitosis libera material lipídico alrededor de la célula (Grubauer y cols., 1989) lo que contribuye a la función de barrera de la epidermis. Otras proteínas estructurales como la loricina o la involucrina, también se expresan aquí. Una enzima dependiente de iones Ca^{2+} , la transglutaminasa, une

químicamente estas proteínas a otras de la membrana plasmática, organizando la envuelta celular cornificada característica del último estrato (Hashimoto, 1969).

- Estrato córneo: multicapa de células anucleadas diferenciadas terminalmente y suspendidas en una matriz lipídica (Potts y Francour, 1991; Plewig y cols., 1997). Este estrato es el responsable final de la función protectora de la epidermis.

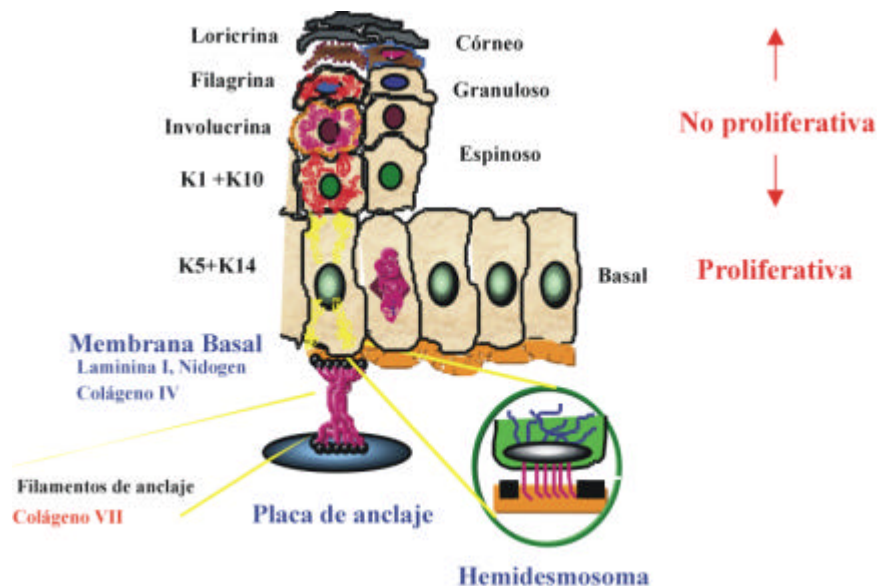


Fig. 1: La epidermis. Esquema de la epidermis en el que se representan la capa basal proliferativa así como los diferentes estratos suprabasales (Basal, Espinoso, Granuloso y Córneo). En cada uno de los estratos se especifican las proteínas marcadoras que se expresan en los mismos. Del mismo modo, se esquematiza la membrana basal y su unión mediante hemidesmosomas, así como alguna de las proteínas implicadas.

La formación de todos estos estratos es el resultado de un complejo proceso programado de diferenciación. El queratinocito de la capa basal, no diferenciado y con capacidad mitótica, recibe señales no muy bien conocidas como resultado de las cuales, migra hacia capas superiores a la vez que pierde completamente su capacidad proliferativa y diferencia de forma gradual para transformarse en queratinocito córneo, célula muerta, anucleada, con forma de escama y altamente diferenciada (Eckert y Rorke, 1989; Fuchs, 1990; Leigh y cols., 1994). Éste, se desprende de manera continua a medida que se produce el recambio celular proveniente de capas inferiores. Dicho recambio necesita de un balance cuidadosamente regulado entre los diferentes procesos de proliferación y diferenciación que afectan al queratinocito basal (Fig. 1).

1.2 PROCESO DE DIFERENCIACIÓN EPIDÉRMICA *IN VIVO*.

Durante la diferenciación, el queratinocito sufre grandes cambios bioquímicos y morfológicos, iniciando la síntesis de diferentes proteínas enzimáticas y estructurales de forma secuencial (Fig. 1). Estas proteínas son características del estadio de diferenciación y, por tanto, del estrato donde se localice el queratinocito (Eckert y cols., 1989; Fuchs, 1990; Yuspa, 1994). En consecuencia, se pueden usar como marcadores de los diferentes estadios por los que atraviesa el queratinocito durante la diferenciación. Dichos marcadores forman parte de las dos estructuras características del queratinocito, el citoesqueleto de filamentos intermedios y la envuelta celular cornificada:

A) En todas las células epiteliales, incluidos los queratinocitos, los filamentos intermedios que conforman el citoesqueleto, están formados por las queratinas, una gran familia de al menos 20 miembros relacionados que se expresan de forma específica de tejido (Moll y cols., 1982). La formación de filamentos de queratina requiere la asociación de una queratina tipo I o ácida y otra de tipo II o básica que se engarzan una alrededor de la otra. El dímero de queratina es el elemento esencial para la formación del filamento (Steinert y cols., 1985). En el queratinocito epidérmico se expresan fundamentalmente dos parejas de queratinas:

- Queratinas 5 y 14 (K5 y K14): localizadas únicamente en queratinocitos de la capa basal (Fig. 1; Purkis y cols., 1990). En capas superiores se inhibe su transcripción.

- Queratinas 1 y 10 (K1 y K10): cuya síntesis comienza en el estrato espinoso y son usadas como marcadores clásicos de diferenciación temprana (Fig. 1; Fuchs y Green, 1980; Roop y cols., 1988; Stoler y cols., 1988).

B) Además del citoesqueleto de filamentos intermedios, la envuelta celular cornificada es el elemento diferencial del queratinocito postmitótico. Durante la diferenciación, la célula se vuelve permeable a los iones de Ca^{2+} del medio extracelular lo que permite la activación de ciertas enzimas catalíticas, las transglutaminasas (Folk y Chung, 1973). Dichas enzimas, localizadas en el estrato granuloso, unirán de forma covalente a la membrana varios tipos de proteínas formando la envuelta celular cornificada:

- Involucrina: se encuentra en las capas más superiores del estrato espinoso siendo precursor de la envuelta celular cornificada y substrato esencial de la enzima transglutaminasa (Fig. 1; Rice y Green, 1979).

- Loricrina y filagrina: ambas proteínas se sintetizan en el estrato granuloso siendo considerados marcadores de diferenciación terminal. La loricrina forma parte de la envuelta celular mientras que la filagrina, de los gránulos de queratohialina (Fig. 1; Dale y cols., 1985; Mehrel y cols., 1990).

Además, determinadas situaciones tales como la remodelación tisular durante la curación de una herida o procesos patológicos como el cáncer, inducen la expresión ectópica de marcadores característicos de otros epitelios o de otras estructuras epiteliales por lo que la caracterización molecular de la diferenciación epidérmica, es un reflejo de su situación homeostática.

Por todo ello, la epidermis es un modelo excelente para el estudio de la proliferación y la diferenciación ya que ambos procesos se encuentran perfectamente caracterizados mediante marcadores específicos. Es accesible, manipulable y prolifera, diferencia y estratifica de manera compartimentalizada (Leigh y cols., 1994). Además, como se mencionará más adelante, se pueden realizar cultivos de queratinocitos primarios y existen protocolos de carcinogénesis química *in vivo* muy bien caracterizados que sirven para el análisis de dichos procesos.

1.3 LA EPIDERMIS DE RATÓN.

La morfogénesis de la piel de ratón comienza alrededor del día 13,5 de gestación y su completa maduración no termina hasta los primeros días después del nacimiento (Byrne y cols., 1994). Células ectodérmicas indiferenciadas comenzarán a formar un epitelio inmaduro que durante la gestación sufrirá un proceso completo de diferenciación para formar una epidermis totalmente funcional antes del nacimiento. La función protectora de la epidermis frente a agresiones externas es esencial durante los primeros días de vida del animal. Por ello, la epidermis de un ratón recién nacido se caracteriza por poseer varios estratos de queratinocitos en diferenciación (Fig. 2). Durante esta etapa, existe una gran proliferación de las células de la capa basal necesaria para generar todas las capas epidérmicas. Sin embargo, durante los primeros días de vida, la epidermis sufre un proceso de adelgazamiento o pérdida progresiva de estratos que dará lugar a la epidermis madura alrededor del día 8-10 después del nacimiento. Esta epidermis se caracteriza por poseer uno o dos estratos epidérmicos, además del estrato córneo, así como por un bajo nivel proliferativo de las células de la capa basal suficiente para mantener la integridad del tejido (Fig. 2).

Como se mencionó anteriormente, la epidermis cumple una función protectora de barrera y, por ello, debe ser un tejido con una alta capacidad regenerativa preparado para responder a las agresiones externas que causen deterioros en el mismo. La epidermis de ratón tiene una alta tasa de recambio renovándose aproximadamente cada dos-tres semanas. El propio proceso de diferenciación produce una continua renovación de la epidermis ya que las células diferenciadas, anucleadas y muertas son eliminadas por procesos mecánicos como la fricción. Aquí es donde intervienen las células madre epidérmicas, células multipotentes con muy baja tasa proliferativa y que son origen de todos los subtipos celulares de la epidermis (Potten y Morris, 1988). Una célula madre se divide para generar una propia célula madre, necesaria para mantener este compartimento, y una célula comprometida con alta capacidad proliferativa capaz de generar cualquiera de los linajes celulares de la epidermis (Taylor y cols., 2000; Oshima y cols., 2001).

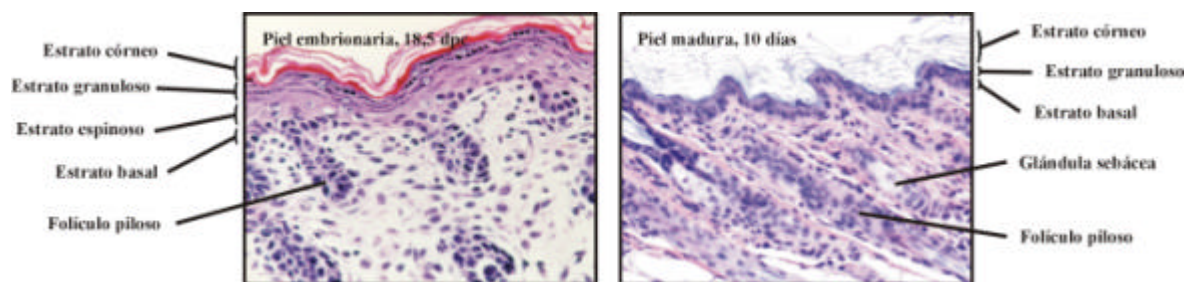


Fig. 2: Diferencias morfológicas entre la epidermis de ratón embrionaria y adulta. Secciones histológicas teñidas con H&E de piel embrionaria y adulta de ratón correspondientes a embriones de 18,5 dpc y animales de 10 días respectivamente.

1.3.1 Un anejo especializado de la epidermis: el folículo piloso.

La piel se caracteriza por tener varios tipos de órganos anejos, derivados ectodérmicos que cumplen funciones muy variadas en el tejido. Concretamente, en la epidermis se localizan los folículos pilosos, estructuras que forman el pelo (revisado en Hardy, 1992). Los folículos pilosos son derivados especializados de la epidermis que se forman a través de complejas interacciones moleculares entre el epitelio y el subyacente mesénquima mesodérmico similares a las de otros órganos ectodérmicos (como el diente o las glándulas sudoríparas). Determinadas células dérmicas, a través de moléculas solubles aún no muy bien conocidas, producen una respuesta en el epitelio que induce una invaginación epidérmica, origen del futuro folículo (Etapas 0 y 1, ver Fig. 3). Dicha región epidérmica produce una segunda señalización hacia las subyacentes células para

que organicen una papila dérmica, un conjunto de células especializadas de origen mesenquimal que se integrarán en la propia estructura folicular orquestando la formación, el desarrollo y el ciclaje (ver más adelante) de los folículos (Etapas 2 y 3, ver Fig. 3). Alrededor de la papila dérmica se organizará una subpoblación de células epiteliales especializadas conocidas como células de la matriz. Ante una última señal producida por la papila dérmica, las células de la matriz comenzarán a diferenciar hacia varios subtipos celulares formando la vaina radicular interna organizándose de forma concéntrica y formando un canal (Etapas 4-6; Fig. 3). En el centro del canal aparecerá una estructura queratinizada, origen del pelo (Etapas 7 y 8; Fig. 3). Por último, durante la morfogénesis del folículo se organiza alrededor de él una glándula sebácea (Etapas 5-8; Fig. 3; ver revisión en Hardy, 1992).

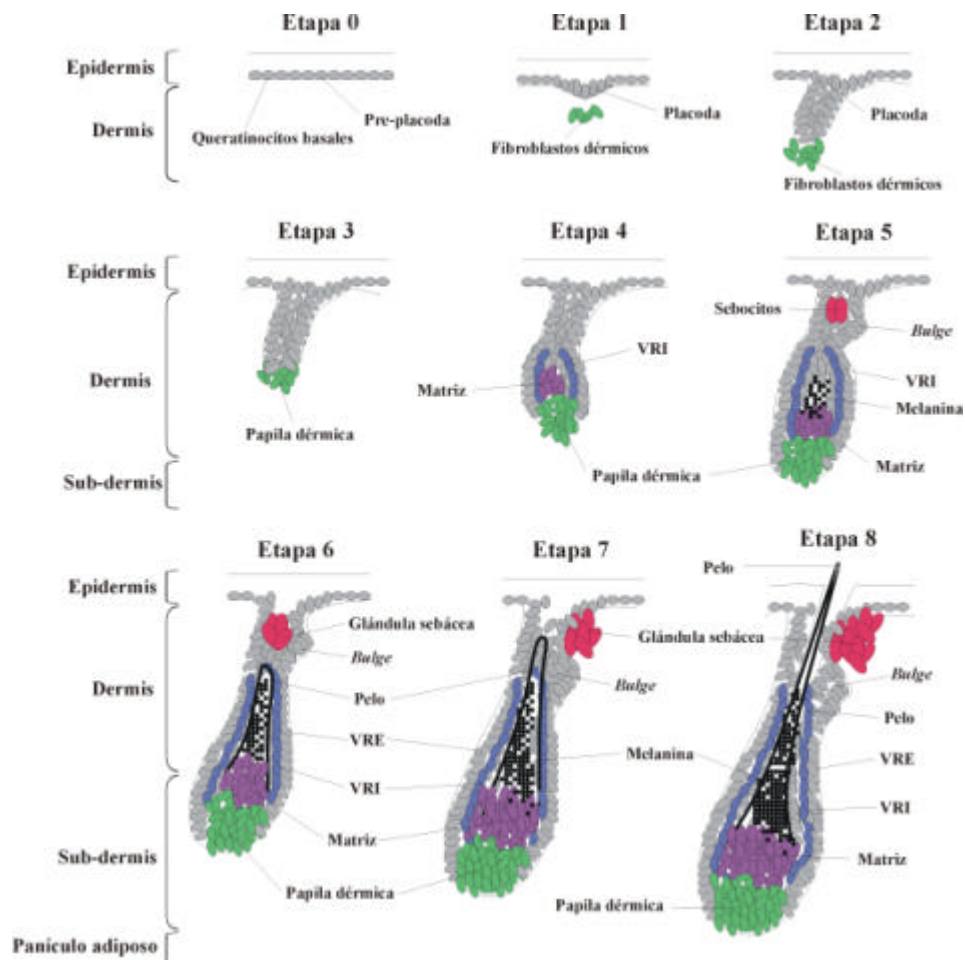


Fig. 3: Etapas en la morfogénesis folicular. Representación esquemática de la evolución morfológica que sufre un folículo, así como las diferentes estructuras que se van originando desde su formación como placoda epitelial (etapa 0) hasta folículo anagénico maduro (etapa 8). VRI: vaina radicular interna. VRE: vaina radicular externa.

Existen numerosas vías señalizadoras que, en los últimos años, han demostrado tener un papel esencial en los procesos de morfogénesis folicular. Concretamente, la vía de Wnt (Fuchs y cols., 2001; Millar, 2003), la de Shh (Bitgood y McMahon, 1995; St-Jacques y cols., 1998; Chiang y cols., 1999) o la participación de determinados miembros de las familias TGF β /BMP (Blessing y cols., 1993; Botchkarev y cols., 1999, 2001, 2002; Foitzik y cols., 1999, 2000) o TNF- α (Headon y cols., 1999; Laurikkala y cols., 2001, 2002) son determinantes para el desarrollo del folículo piloso.

La morfogénesis folicular en el ratón comienza alrededor del día 14,5 dpc y finaliza varios días después del nacimiento. En primer lugar, en el día 14,5 dpc se produce la inducción de los folículos primarios o tilotricos, mientras que alrededor del día 16,5 dpc, comienza la formación de los folículos secundarios o no tilotricos (Mann, 1962). Ambos tipos de folículos no difieren morfológicamente entre sí, aunque existen diferencias en el tipo de proteínas que participan en su formación (Botchkarev y cols., 2002). Entre los días 10-12 después del nacimiento se pueden observar los folículos anagénicos maduros. Además, durante el resto de la vida del animal el folículo sufre una serie de cambios cíclicos (Hardy, 1992), proceso conocido como ciclaje (Fig. 4), que se divide en tres fases:

- Anagén: Fase activa o de crecimiento del folículo (Fig. 4). Las células de la papila dérmica envían señales químicas (similares a las producidas durante la morfogénesis) que inducen la proliferación de las células de la matriz. El folículo crece y penetra en la capa grasa subdérmica (Fig. 4).
- Catagén: Fase de destrucción del folículo (Fig. 4). En un determinado momento se produce una regresión del folículo hacia la zona subepidérmica que reduce el tamaño del folículo hasta un tercio del anterior (Fig. 4).
- Telogén: Fase de quiescencia del folículo (Fig. 4).

El proceso de ciclaje, química y morfológicamente, es muy similar al que se produce durante la morfogénesis del folículo y ocurre varias veces durante la vida del animal.

Existe una región en el folículo particularmente interesante; se trata del *bulge* (Figs. 3 y 4), una zona bien protegida y muy vascularizada. Es una protuberancia lateral del folículo donde se presupone la localización de las células madre epidérmicas aunque también se ha descrito su presencia en la epidermis interfolicular (Cotsarelis y cols., 1990; Ghazizadeh y Taichman, 2001). Las células del *bulge* raramente se dividen pero se

activan en determinados momentos cuando se necesita un gran aporte celular, como ocurre durante la regeneración tisular, la curación de heridas o el anagén folicular. Muchos son los esfuerzos en los últimos años para caracterizar y aislar estas células y algunos aspectos del trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral arroja datos novedosos en este sentido.

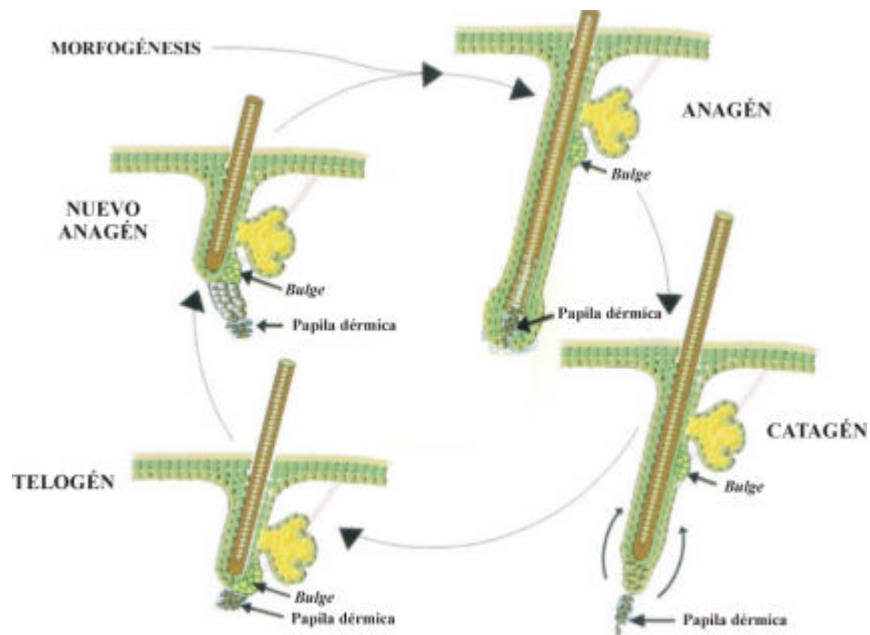


Fig. 4: Etapas del ciclo folicular. Representación esquemática de la evolución morfológica que sufre un folículo durante las diferentes etapas del ciclaje: Anagén o fase de crecimiento del folículo, Catagén o fase de destrucción del folículo y Telogén o fase de quiescencia del folículo.

1.3.2 Modelo de tumorigenesis química en la epidermis.

Una de las ventajas que tiene la epidermis como modelo de estudio es la posibilidad de realizar un protocolo de carcinogénesis química *in vivo* (Fig. 5). El 80% de las neoplasias son de origen epitelial. Por ello, la carcinogénesis de piel de ratón es una herramienta muy útil para dilucidar los mecanismos subyacentes de las neoplasias en general y del cáncer de piel en particular.

El protocolo de carcinogénesis química se divide en tres etapas:

1) **Iniciación:** supone un cambio genético irreversible pero no heredable sin aparentes consecuencias fenotípicas (Fig. 5). La fase de iniciación se consigue mediante la aplicación de un carcinógeno, típicamente DMBA, que produce fundamentalmente una

mutación específica en el codón 61 del gen *Harvey-Ras* (*Ha-Ras*; Balmain y Pragnell, 1983; Quintanilla y cols., 1986; Roop y cols., 1986).

2) Promoción: un estímulo hiperproliferativo mediante la aplicación de un promotor tumoral, típicamente un éster de forbol (TPA), lleva a la expansión de las células iniciadas provocando la aparición de lesiones premalignas conocidas como papilomas escamosos (Fig. 5; Slaga, 1989).

3) Progresión: a pesar de que muchos papilomas regresan y desaparecen, en algunos se produce una transición de una hiperplasia premaligna (papiloma) a un fenotipo maligno (carcinoma epidermoide o SCC) (Fig. 5; Hennings y Yuspa, 1985). Los carcinomas epidermoides a su vez, se pueden clasificar según su grado de malignidad y diferenciación, con mayor o menor número de zonas queratinizadas, en tres subtipos: 1) Muy diferenciado 2) Moderadamente diferenciado. 3) Poco diferenciado. Por último, los carcinomas epidermoides pueden progresar a carcinomas fusiformes, tumores muy indiferenciados, agresivos y altamente metastásicos, representando el último estadio de la progresión tumoral de la carcinogénesis de piel de ratón (Fig. 5).

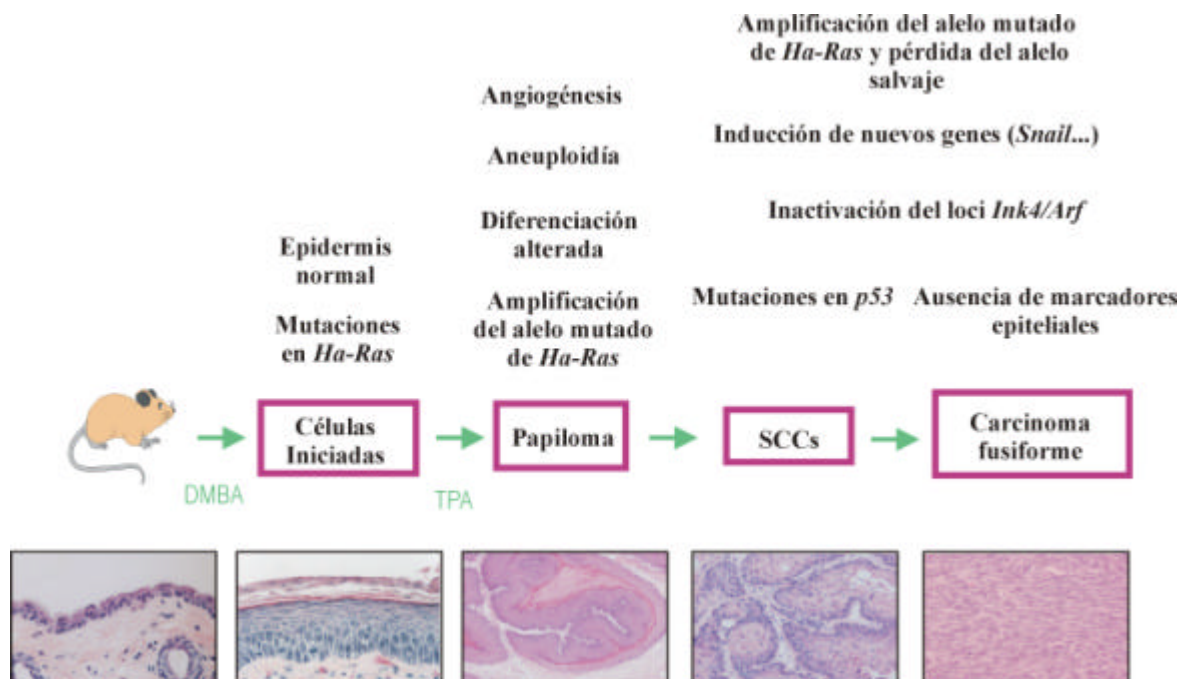


Fig. 5: Modelo de carcinogénesis química de piel de ratón. Representación esquemática de la evolución morfológica a través de los diferentes estadios (células iniciadas, papiloma, SCC y carcinoma fusiforme) que sufre la piel durante el protocolo de carcinogénesis química de DMBA/TPA. Además, se representan las alteraciones genéticas y eventos esenciales que se producen durante la progresión tumoral.

La naturaleza secuencial en la progresión tumoral observada en este modelo se correlaciona con determinadas alteraciones genéticas concretas, algunas de las cuales están muy bien caracterizadas (Fig. 5). Como se ha mencionado anteriormente, en la iniciación se produce una mutación activadora del gen *Ha-Ras* (Quintanilla y cols., 1986). Durante la progresión de los papilomas se producen alteraciones cromosómicas (aneuploidías o trisomías) (Conti y cols., 1986; Aldaz y cols., 1989) que llevan a la amplificación del alelo mutante de *Ha-Ras* (Portella y cols., 1994-95). Además, la transición a carcinoma epidermoide se caracteriza por la pérdida funcional del alelo *Ink4a/Arf* (que codifica para las proteínas p16 y p19) o de *p53* (Klein-Szanto, 1989; Bremmer y Balmain, 1990). De hecho, los ratones deficientes en *p53* sometidos a carcinogénesis química tienen una mayor tasa de conversión maligna (Kemp y cols., 1993). Por último, la formación de carcinomas fusiformes, tumores de aspecto mesenquimal y alta tasa metastásica, se ve determinada por la activación de determinados genes (*Snail*) y asociada a la ausencia de marcadores epiteliales.

La importancia de este modelo radica en la naturaleza secuencial en la génesis y progresión tumoral y la similitud de los tumores obtenidos mediante este protocolo con ciertos tumores humanos.

1.4 PROCESO DE DIFERENCIACIÓN EPIDÉRMICA *IN VITRO*.

Otra de las ventajas de la epidermis como modelo es la posibilidad de crecer cultivos primarios de monocapas de queratinocitos. La dificultad de realizar *in vivo* una adecuada caracterización bioquímica y de estudiar las diferentes señales implicadas en el proceso de diferenciación, llevó a desarrollar numerosos modelos *in vitro*. Existen varios modelos de diferenciación *in vitro*, en los que queratinocitos de cultivos primarios, en respuesta a determinadas señales, pueden sufrir un proceso de diferenciación semejante al que ocurre *in vivo*. Entre los modelos más empleados se encuentran los siguientes:

- Incremento de la concentración de iones Ca^{2+} en el medio de crecimiento de queratinocitos (Hennings y cols., 1980; Stanley y Yuspa, 1983; Yuspa y cols., 1989). Los queratinocitos murinos estratifican, expresan marcadores de diferenciación temprana como K1 y K10 a las 24 horas del aumento del Ca^{2+} , y substituyen dicha expresión por la de marcadores tardíos, filagrina, loricrina y transglutaminasa, a las 48 horas (Yuspa y cols., 1989).

- Adición de ésteres de forbol como el TPA al medio de crecimiento (Yuspa y cols., 1980 y 1983; Parkinson y Emmerson, 1982). Entre otros efectos, el TPA induce un aumento en la actividad proteína kinasa C (PKC) (Kikkawa y cols., 1983; Tseng y cols., 1994). Los queratinocitos murinos tratados con TPA *in vitro* expresan loricrina y filagrina pero no marcadores tempranos de diferenciación como K1 o K10 (Dlugosz y Yuspa, 1993). Estos datos sugieren que la actividad PKC se encuentra implicada en la transición de célula espinosa a célula granular *in vitro* (Dlugosz y Yuspa, 1993).

- Suspensión de los queratinocitos en un medio suplementado con metil celulosa para aumentar así la viscosidad. De esta forma, se evitan los contactos celulares, lo que induce la diferenciación. La síntesis de ADN es irreversiblemente inhibida a las 12 horas de la suspensión, mientras que a las 24 horas la mayoría de las células expresan K1 e involucrina (Hauser y cols., 1997).

1.5 FAMILIA DE RETINOBLASTOMA.

1.5.1 pRb y el control del ciclo celular.

El gen de retinoblastoma fue el primer gen supresor tumoral identificado hace ya más de una década. Fue aislado mediante clonaje posicional de un raro tumor hereditario ocular, el retinoblastoma (Friend y cols., 1986; Lee y cols., 1987; Fung y cols., 1987). Dichos pacientes portaban una copia mutada de un gen, *RBI*, localizado en la región 13q. La identificación y el clonaje de dicho gen abrieron una nueva era en la genética del cáncer en la que surgió la hipótesis del gen supresor tumoral. El producto del gen de retinoblastoma, pRb, es una fosfoproteína de 928 aminoácidos que tiene un papel esencial en el control del ciclo celular (Fig. 6). El paradigma de la célula eucariótica es la división celular mediante la cuál la célula replica y segrega sus cromosomas, crece y se divide. El ciclo celular se divide en dos partes fundamentales, la interfase y la mitosis. La interfase a su vez, se divide en varias fases: Fase G1, en la que la célula sintetiza proteínas y componentes esenciales para llevar a cabo la división celular. Hay células que pueden detener su progresión hacia la división en este estadio y permanecer en una fase inerte que se conoce como G0 (Fig. 6). Además, en la fase G1 existe un punto de control o restricción (punto R) en el que la célula comprueba que las condiciones son óptimas para iniciar la duplicación del ADN (Fig. 6). Fase S, en la que se replica la molécula de ADN (Fig. 6). G2, es el período comprendido entre la finalización de la síntesis del ADN y el comienzo de la mitosis. En esta fase también existe un punto de control que permite o no

la entrada en mitosis (punto G2/M). Por último, en la mitosis existe un tercer punto de control para permitir el final de la división celular (punto M).

En concreto, la función fundamental de pRb es la de controlar la transición entre las fases G1/S del ciclo celular (Weinberg, 1995). pRb integra las señales procedentes de diversas vías celulares para permitir la progresión del ciclo celular (Fig. 6). La sobreexpresión de pRb en líneas celulares mantiene la célula en su fase G1 (Quin y cols., 1995; Lukas y cols., 1996). pRb tiene hasta 16 sitios de fosforilación que son fosforilados y defosforilados durante el ciclo celular (Chen y cols., 1989). La forma hipofosforilada de pRb es una forma activa presente en células quiescentes así como en células que sufren un proceso de diferenciación. Por el contrario, la forma hiperfosforilada, forma inactiva, predomina en células proliferativas. Durante la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular pRb es fosforilado y, por tanto inactivado, permitiendo así la progresión del ciclo celular (Fig. 6). Dicha fosforilación se lleva a cabo por una familia de quinasas conocidas como quinasas dependientes de ciclinas, o CDKs (Morgan, 1995). La actividad de las CDKs se regula por determinadas proteínas, las ciclinas, cuya expresión varía a lo largo del ciclo celular. En concreto, los complejos ciclina D-CDK4/6 y ciclina E-CDK2 se encargan de la fosforilación secuencial de pRb necesaria para su completa inactivación (Fig. 6; Lundberg y Weinberg, 1998). Además, existen dos familias de proteínas, conocidas como inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas o CKIs que regulan negativamente la actividad de las CDKs y que añaden un nivel más de regulación en el control del ciclo celular (Fig. 6; Harper y Elledge, 1996). En concreto, se trata de la familia *ink4* que comprende los miembros p15, p16, p18 y p19 y de la familia *cip/kip* que contiene a p21, p27 y p57 (Harper y Elledge, 1996).

La forma hipofosforilada de pRb es capaz de unir unos factores de transcripción, conocidos como E2F (Fig. 6). Existen al menos 7 factores E2F relacionados entre sí (Dyson, 1998; Nevins, 1998). La sobreexpresión de E2F en células quiescentes induce la entrada en la fase S del ciclo celular (Lukas y cols., 1996). La fosforilación de pRb induce la liberación de los factores E2F permitiendo la expresión de numerosos genes regulados por los mismos e implicados en replicación del ADN y en el control de diversas actividades del ciclo celular (Fig. 6; Johnson y Schneider-Broussard, 1998). pRb puede reprimir la transcripción mediada por E2F mediante dos mecanismos: por un lado, es capaz de bloquear el dominio de transactivación de los factores E2F mediante su unión, mientras que por otro, pRb puede actuar como correpresor transcripcional, ya que los complejos pRb/E2F pueden unir y bloquear los promotores regulados por E2F. Sin

embargo, la contribución relativa de cada uno de estos mecanismos *in vivo* es aún controvertida (Harbour y Dean, 2000).

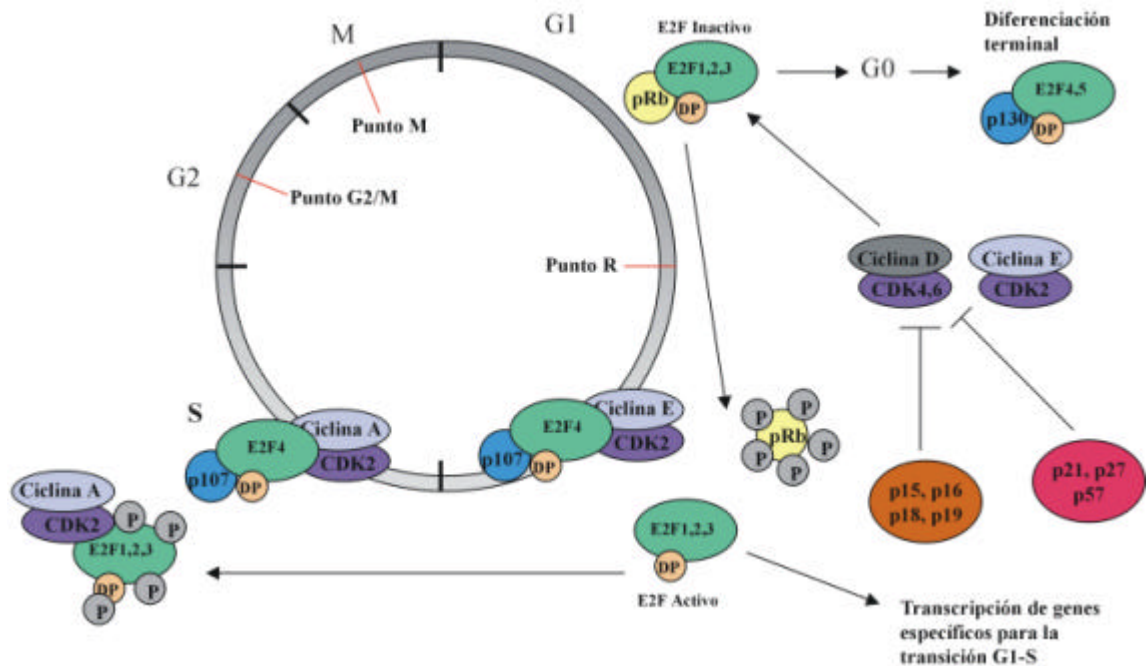


Fig. 6: El ciclo celular. Representación esquemática del ciclo celular. En él se observan las diferentes fases del mismo (G1, S, G2, M y G0) así como los puntos de control (R, G2/M y M). La fase G0 se caracteriza por la presencia de complejos p130/E2F4, 5 que reprimen la transcripción de genes regulados por los factores E2F. La transición G1/S se controla mediante la fosforilación secuencial de pRb llevada a cabo por los complejos ciclina D/CDK4, 6 y ciclina E/CDK2. Dicha fosforilación permite la liberación de los factores E2F que activan la transcripción de genes necesarios para la replicación del ADN y la transición G1/S. La fase S se caracteriza por la inactivación mediante fosforilación de los factores E2F, así como por la aparición de nuevos complejos tales como los formados por E2F4/ciclina A, E/CDK2/p107. Por último, las dos familias de proteínas ink4 (p15, p16, p18 y p19) y cip/kip (p21, p27 y p57) regulan la actividad de las quinasas CDKs de forma negativa.

El ciclo celular debe estar cuidadosamente regulado. A lo largo del mismo, existen varios puntos de control en los que la célula analiza su estado permitiendo o no la progresión del ciclo y culminando así con la mitosis o división celular. pRb concretamente se encarga del control de la transición G1-S.

1.5.2 La familia de retinoblastoma.

Posteriormente a la identificación de pRb, se encontraron dos proteínas funcionalmente relacionadas y con gran homología entre ellas, p107 y p130, formando así

la familia de retinoblastoma (Ewen y cols., 1991; Hannon y cols., 1993). Los tres miembros comparten la presencia de un dominio proteico bipartito compuesto de dos subdominios, A y B, altamente conservado (Fig. 7). Esta región es crítica para la funcionalidad de pRb. Un gran número de proteínas endógenas contiene el dominio LXCXE (L=leucina; C=cisteína; E=glutámico; X=cualquier aminoácido) capaz de interactuar con la región A/B. Además, entre ambos subdominios A y B existe una zona espaciadora altamente homóloga entre p107 y p130 capaz de unir los complejos ciclina E/A-CDK2 (Fig. 7; Lees y cols., 1992; Hannon y cols., 1993). pRb carece de esta capacidad ya que, aunque también presenta una región espaciadora, ésta no puede unir los mismos complejos ciclina/CDK. Estas diferencias indican la existencia de funciones específicas entre los diferentes miembros de la familia retinoblastoma.

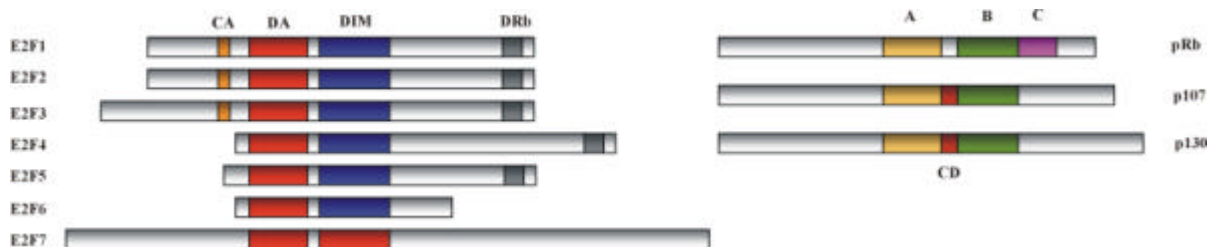


Fig. 7: Las familias de retinoblastoma y de los factores de transcripción E2F. Representación esquemática de cada uno de los miembros de la familia de E2F (E2F1-7) y de la familia de retinoblastoma (pRb, p107 y p130). CA: dominio de unión a ciclina A. DA: Dominio de unión al ADN. DIM: Dominio de dimerización. DRb: Dominio de unión a los miembros de la familia de retinoblastoma. A, B: Dominios funcionales de unión a proteínas de los miembros de la familia de E2F. CD: dominio de unión a los complejos ciclina A/CDK2 y ciclina E/CDK2. C: Dominio necesario para la interacción de pRb con E2F1-3 o con otras proteínas como c-abl.

A pesar de que p107 y p130 también unen factores E2F, inhiben su actividad transcritora y detienen la proliferación celular cuando son sobreexpresados, existen claras diferencias entre ellos y pRb. Como se mencionó anteriormente existen hasta 7 factores E2F (Fig. 7). Sin embargo, no todos ellos muestran la misma afinidad de unión por cada uno de los miembros de la familia de retinoblastoma. En general, E2F1-4 se unen a pRb, mientras que E2F4 y E2F5 se unen preferencialmente tanto a p107 como a p130 (ver revisión en Classon y Dyson, 2001). E2F6 y E2F7 carecen del dominio de unión a los miembros de la familia de retinoblastoma y pueden funcionar como represores (Fig. 7; Trimarchi y cols., 2001; de Bruin y cols., 2003). Los complejos p107/E2F predominan

en células en proliferación (Beijersbergen y cols., 1995). Sin embargo, los complejos p130/E2F se encuentran en células quiescentes, en fase G₀, o en células que sufren un proceso de diferenciación (Cobrinik y cols., 1993; Smith y cols., 1996).

Los factores E2F no son las únicas proteínas que los miembros de la familia de retinoblastoma pueden unir. De hecho, en los últimos años se han descrito numerosas interacciones con proteínas tales como elementos reguladores de la cromatina, otros factores de transcripción diferentes a E2F o proteínas implicadas en vías como la apoptosis o la diferenciación y cuya funcionalidad real no ha sido dilucidada en la mayoría de los casos (revisado en Lipinski y Jacks, 1999; Classon y Dyson, 2001).

1.5.3 La familia de retinoblastoma y el cáncer.

Como ya se mencionó anteriormente, *Rb* fue aislado de un tipo de tumor hereditario, el retinoblastoma, describiéndose así el concepto de gen supresor de tumores (Friend y cols., 1986). El papel de pRb en la supresión tumoral se basó en las siguientes observaciones: A) pRb bloquea la activación transcripcional de los factores E2F, los cuales a su vez, regulan la transcripción de genes necesarios para la replicación celular (Dyson, 1998). B) pRb es el blanco de ciertas oncoproteínas virales (antígeno T de SV40, proteína del adenovirus E1A y la proteína E7 de papilomavirus humano) que promueven la proliferación celular. Estas proteínas son capaces de bloquear la región A/B, inactivando a pRb, y permitiendo la liberación de los factores E2F (Nevins, 1998). C) La vía que regula la actividad de pRb se encuentra alterada a diferentes niveles en la mayoría de los tumores humanos.

El tumor clásico derivado de la mutación del gen de *Rb* es el retinoblastoma. La forma más común es la hereditaria aunque también se han descrito casos esporádicos. Individuos con retinoblastoma hereditario tienen 30 veces más riesgo de padecer una segunda neoplasia, específicamente tumores de médula, sarcomas e incluso melanomas (ver revisión en Moll y cols., 1997). Además del retinoblastoma, se han encontrado mutaciones en el gen *Rb* en otros tumores humanos tales como osteosarcomas, cáncer de pulmón (SCLC), próstata o mama (Harbour y cols., 1988; Lee y cols., 1988; Bookstein y cols., 1990).

Además de pRb, otros elementos de la vía de retinoblastoma pueden estar alterados. Concretamente, p16/ink4a, un CKI inhibidor de la actividad del complejo ciclina D/CDK4, se encuentra mutado, o su promotor inactivado mediante metilación, en un gran número de tumores humanos, especialmente en casos de melanoma (Rocco y

Sidransky, 2001). La pérdida de p16/ink4a conlleva una sobreactivación de CDK4 el cuál, hiperfosforila a pRb liberando ectópicamente los factores de transcripción E2F. Del mismo modo, determinados eventos como la amplificación o mutación del gen de CDK4 o la amplificación del gen de ciclina D1 se han observado en ciertos tumores humanos (Peters, 1994). En cualquier caso, todas las alteraciones inciden en la funcionalidad de pRb.

Los otros miembros de la familia de retinoblastoma, p107 y p130, no parecen tener una importancia clara en la génesis y/o progresión tumoral. Únicamente se han encontrado mutaciones de p130 en un alto porcentaje de carcinomas pulmonares y en otros tipos de tumores como linfomas (Claudio y cols., 2000; Cinti y cols., 2000). Sin embargo, al desconocer si estas alteraciones son la causa o la consecuencia de la progresión tumoral, el significado real de estos datos es aún controvertido.

Como conclusión, la desregulación, pérdida o ganancia de cualquiera de los elementos de la vía de retinoblastoma que induzca la pérdida funcional de pRb, es un paso clave en la génesis y/o progresión tumoral.

1.5.4 La familia de retinoblastoma y la diferenciación.

La diferenciación celular es un proceso coordinado que sufre una célula cuyo objetivo es concederle identidad funcional. Células precursoras, normalmente proliferativas y debido a señales no muy bien conocidas, adquieren un compromiso para sufrir un proceso de diferenciación y adquirir así una determinada funcionalidad celular dentro de un tejido. Una célula que sufre un proceso de diferenciación se caracteriza esencialmente por tres aspectos que la definen: A) Salida irreversible del ciclo celular B) Protección frente a la apoptosis. C) Expresión de marcadores específicos de tejido.

A) La diferenciación impone a la célula una salida irreversible del ciclo celular. La salida permanente de ciclo es un requisito esencial para el inicio de la diferenciación. Por ello, moléculas que controlan la progresión del ciclo celular podrían también participar en determinados eventos de la diferenciación (revisión en Lipinski y Jacks, 1998). Concretamente, los miembros de la familia de retinoblastoma tienen un papel determinante en la salida irreversible del ciclo celular. Esta función se realiza a través de la inactivación permanente de los factores E2F así como mediante la interacción con determinados corepresores como HBP1 (Shih y cols., 1998). Las células en proliferación contienen elevados niveles de p107 así como complejos p107/E2F4 (Kiess y cols., 1995; Ikeda y cols., 1996; Richon y cols., 1997; Paramio y cols., 1998). Sin embargo, células

que entran en diferenciación terminal disminuyen los niveles de p107 y aumentan los de p130 incrementando la presencia de complejos p130/E2F4. Estos últimos complejos pueden bloquear permanentemente los promotores regulados por E2F. De hecho, los complejos p130/E2F4 se han encontrado en numerosos sistemas de diferenciación *in vitro* (Kiess y cols., 1995; Ikeda y cols., 1996; Richon y cols., 1997; Paramio y cols., 1998). Del mismo modo, las formas hipofosforiladas de pRb, activas, son predominantes en células diferenciadas pudiendo intervenir también en la represión transcripcional de E2F o interaccionando con otros factores de transcripción específicos.

B) El proceso de diferenciación también se caracteriza por un aumento en la resistencia a estímulos apoptóticos. En este punto han sido implicados p21/waf1, otro CKI, así como formas hipofosforiladas de pRb (Lipinski y Jacks, 1998). De hecho, células musculares y neuronales deficientes en pRb, muestran mayores índices de apoptosis durante la diferenciación que células normales (Wang y cols., 1997). Ello puede ser debido a la habilidad que posee E2F1, pero no otros factores E2F, en la inducción de apoptosis mediante mecanismos dependientes o independientes de p53 (Pan y cols., 1998; Phillips y cols., 1999). Por ello, la protección de pRb frente a la apoptosis puede provenir del bloqueo funcional de E2F1.

C) Por último, los miembros de la familia de retinoblastoma parecen tener importancia en la expresión de marcadores de diferenciación en determinados sistemas (Lipinski y Jacks, 1999). Aunque los mecanismos pueden variar dependiendo del tipo de sistema, en general pRb aumenta la actividad de los factores de transcripción implicados en la diferenciación. Así, pRb interacciona físicamente con el factor MyoD o con los factores C/EBP para expresar marcadores tempranos de diferenciación muscular o adiposa, respectivamente (Novitch y cols., 1996; Chen y cols., 1996). Fibroblastos embrionarios deficientes en pRb inducidos a diferenciar a células musculares carecen de la capacidad de expresar marcadores de diferenciación tardíos (Novitch y cols., 1996). La sobreexpresión de p107 en estas células permite una recuperación parcial en la expresión de los marcadores, aunque la presencia de pRb es necesaria para una completa inducción (Schneider y cols., 1994).

En los últimos años se han aportado numerosos datos que demuestran la importancia de los miembros de la familia de retinoblastoma en varias etapas de la diferenciación.

1.5.5 Modelos animales deficientes en los miembros de la familia de retinoblastoma.

Muchos de los datos sobre las funciones de los miembros de la familia de retinoblastoma se han obtenido gracias a los modelos animales deficientes en los mismos. La descripción del modelo animal deficiente en pRb se publicó simultáneamente en 1992 por tres grupos diferentes (Clarke y cols., 1992; Jacks y cols., 1992; Lee y cols., 1992). Los animales heterocigotos para la mutación desarrollan tumores espontáneos en el lóbulo intermedio de la glándula pituitaria y en la glándula tiroidea. Sin embargo, los homocigotos son letales embrionarios entre los días 13,5-15,5 de gestación con proliferación y apoptosis ectópicas en hígado, retina y en el sistema nervioso así como defectos en la eritropoiesis (Clarke y cols., 1992; Jacks y cols., 1992; Lee y cols., 1992). La importancia de pRb durante el desarrollo embrionario contrasta con la de p107 o p130. En los animales deficientes en cualquiera de estos últimos no se observa ningún fenotipo aparente (Cobrinik y cols., 1996; Lee y cols., 1996). Esto indica la existencia de compensación funcional entre los diferentes miembros de la familia de retinoblastoma, es decir, p130, en ausencia de p107, puede realizar las funciones que normalmente realiza p107, o viceversa. Este fenómeno se observa tanto *in vivo* como *in vitro*. De hecho, fibroblastos embrionarios deficientes en pRb tienen aumentada la expresión de p107 (Hurford y cols., 1997) mientras que linfocitos T quiescentes deficientes en p130 cambian sus complejos p130/E2F por la presencia de complejos p107/E2F (Mulligan y cols., 1998). No obstante, los animales deficientes para ambos, p107 y p130, son letales perinatales, tienen defectos en la osificación endocondral, poseen las extremidades más cortas y una proliferación descontrolada de los condrocitos (Cobrinik y cols., 1996). Estos resultados indican que ambas proteínas comparten determinadas funciones en estos tejidos en los que específicamente pRb no puede compensar la pérdida de p107 y p130.

La posibilidad de combinar y acumular deficiencias en el ratón permite dilucidar funciones específicas para cada uno de los miembros de la familia en determinados tejidos. Así, aunque los animales pRb^{+/-}, no desarrollan retinoblastoma como ocurre en los humanos, los animales pRb^{+/-}; p107^{-/-} desarrollan una displasia multifocal bilateral en la retina (Lee y cols., 1996). Además, animales quimeras compuestos por células deficientes en pRb y p107 y células normales, desarrollan retinoblastoma (Robanus-Maandag y cols. 1998). Por tanto, p107 funciona como un supresor tumoral en el desarrollo del retinoblastoma en ausencia de pRb en el ratón. Por el contrario, los animales pRb^{+/-}; p130^{-/-}, p107^{+/-}; p130^{-/-} o p107^{-/-}; p130^{+/-} carecen de estas alteraciones (Mulligan y Jacks, 1998).

También se han generado los animales pRb^{-/-}; p107^{-/-} y pRb^{-/-}; p130^{-/-} (Lee y cols., 1998; Mulligan y Jacks, 1998) que tienen una letalidad embrionaria previa a la de los animales deficientes exclusivamente en pRb. Estos datos redundan en la compensación funcional entre todas estas proteínas.

Por último, es importante señalar que el fondo genético en el que se generan los animales deficientes, es importante para el resultado del fenotipo. Así, la pérdida de p107 en el fondo BALB/cJ produce el desarrollo de hiperplasia mieloide y un menor tamaño del animal, mientras que la pérdida de p130 en el mismo fondo genético produce letalidad embrionaria temprana (LeCouter y cols., 1998a; LeCouter y cols., 1998b). Sin embargo, los mismos animales deficientes generados en un fondo C57BL/6J carecen de fenotipo (Lee y cols., 1996). Ello puede deberse a alteraciones hipomórficas en determinados genes o a la presencia de genes modificadores específicos del fondo genético. De hecho, se han descrito formas menos efectivas de p16/ink4a en el fondo genético BALB/cJ (Zhang y cols., 2001).

1.5.6 Modelos animales deficientes de tipo condicional.

Los modelos animales deficientes de tipo convencional tienen ciertas limitaciones cuando la deficiencia de la proteína eliminada es esencial durante el desarrollo embrionario y produce letalidad previa al nacimiento. Como consecuencia, no se puede analizar la funcionalidad de una proteína en un tejido adulto. Por ello, se han desarrollado estrategias en las que se puede controlar de forma espacio-temporal la eliminación de una proteína específicamente en un tejido (ver revisión en Lewandoski, 2001). El sistema más utilizado es el sistema Cre/LoxP (Sauer y Henderson, 1988). Cre es una recombinasa aislada del bacteriofago P1, no presente en células eucarióticas, que cataliza una recombinación conservada entre dos secuencias específicas (secuencias LoxP). El proceso de recombinación no requiere ningún factor adicional además de la recombinasa, convirtiéndolo en un sistema ideal para su uso en células eucarióticas (Fig. 8).

La introducción de dos secuencias LoxP en el mismo sentido flanqueando una región determinada de un gen, permite la eliminación de la misma en la célula donde se exprese la recombinasa Cre (Fig. 8). En principio, la expresión de Cre debería ser inocua en la célula debido a que el genoma de ratón carece de secuencias LoxP; sin embargo, se han descrito secuencias pseudo-LoxP (Thyagarajan y cols., 2000) que pueden generar recombinaciones *in vitro* y conducir a fenotipos no deseados (Loonstra y cols., 2001). Normalmente, se generan animales modificados genéticamente que portan secuencias

LoxP en el gen diana. Las secuencias LoxP se suelen colocar en secuencias intrónicas para que el gen modificado tenga un comportamiento normal (no existe ningún caso descrito en el que la introducción de las secuencias LoxP varíe la expresión génica del gen modificado). Estos animales se cruzan con una línea transgénica que exprese la recombinasa Cre bajo el control de un promotor específico de tejido. De esta forma, solo se producirá la recombinación en el tejido en el que se exprese Cre sin afectar al resto del animal (Fig. 8).

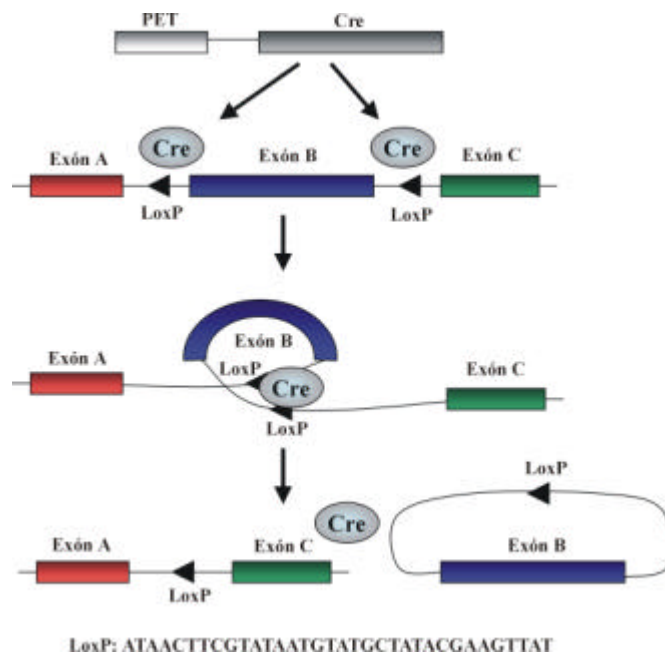


Fig. 8: Sistema de recombinación específica de tejido Cre/LoxP. Representación esquemática de la recombinación específica mediada por la recombinasa Cre entre dos secuencias LoxP que flanquean una determinada secuencia génica. PET: Promotor específico de tejido.

Como se mencionó anteriormente, el animal deficiente en pRb es letal alrededor del día 13,5-15,5 de gestación e impide el estudio de tejidos de desarrollo embrionario tardío o durante la vida adulta. Este es el caso de la epidermis cuya morfogénesis comienza alrededor del día 13,5 de gestación. Por ello, para analizar el papel de pRb en la epidermis hemos usado un modelo animal que posee secuencias LoxP flanqueando el exón 19 del gen *Rb* (Vooijs y cols., 2002) y una línea transgénica que expresa Cre bajo el promotor de la queratina 14 (Jonkers y cols., 2001), cuya expresión se restringe a los queratinocitos basales de epitelios estratificados (Byrne y cols., 1994).

1.6 PAPEL DE LA FAMILIA DE RETINOBLASTOMA EN LA EPIDERMIS.

Las proteínas de la familia de retinoblastoma son de expresión ubicua. En particular, los tres miembros de la familia se expresan en los queratinocitos de epitelios estratificados como la epidermis. La importancia de esta familia en el control de la proliferación y diferenciación epidérmicas se observó por el hecho de que la mayoría de los tumores epidérmicos humanos presenta alteraciones en la vía de retinoblastoma. Las alteraciones más comunes son la amplificación del gen de *ciclina D1* y la pérdida del gen *p16/ink4a* induciendo en ambos casos la inactivación funcional de pRb. Por otro lado, queratinocitos humanos inmortalizados mediante la sobreexpresión de proteínas virales como E1A, HPV E7 o el antígeno T, proteínas que unen e inactivan pRb, p107 y p130, tienen muy reducida su capacidad de diferenciar (Taylor-Papadimitriou y cols., 1982; McCance y cols., 1988; Barrandon y cols., 1989). Además, es preciso resaltar la importancia de la proteína HPV E7 en la etiología de ciertas patologías de piel humanas (Zur Hausen, 1996). Por último, las alteraciones epidérmicas observadas en modelos animales transgénicos (específicos de la piel) de las proteínas antes mencionadas, HPV E7, HPV E6 o E1A (Missero y cols., 1993; Arbeit y cols., 1994; Auewarakul y cols., 1994), o proteínas relacionadas directamente con la funcionalidad de pRb tales como E2F1 o ciclina D1 (Robles y cols., 1996; Pierce y cols., 1998), demuestran el posible papel de pRb en la homeostasis de la piel.

Nuestro grupo comenzó el estudio funcional de las proteínas de retinoblastoma demostrando la existencia de una expresión secuencial de pRb, p107 y p130 durante el proceso de diferenciación *in vitro* de queratinocitos humanos (Paramio y cols., 1998). Por otro lado, también se observó la implicación de los factores E2F, concretamente E2F1 y E2F4, en el proceso de diferenciación epidérmica (Paramio y cols., 2000). Por último, se demostró la importancia de dos CKIs (p16/ink4a y p21/waf1) en los procesos de diferenciación, senescencia y carcinogénesis de piel *in vivo* (Paramio y cols., 2001a).

Los datos obtenidos demostraron un papel esencial de los miembros de la familia de retinoblastoma en la homeostasis de la epidermis. Sin embargo, hay pocos estudios realizados acerca de la importancia de esta familia *in vivo*, es decir, en una situación real y fisiológica. Por ello, se abordó el estudio de los tres miembros de la familia utilizando como herramientas de trabajo los animales deficientes en una o en varias de estas proteínas simultáneamente en la epidermis. Ello nos ha permitido analizar el papel

funcional de pRb, p107 y p130, de forma individual o conjunta, en los procesos de proliferación, diferenciación, carcinogénesis y homeostasis de la piel.

2. OBJETIVOS

Sin duda no hay progreso.

Charles Darwin

El 80% de las neoplasias humanas son de origen epitelial. En particular, el cáncer de piel constituye el tipo de cáncer más abundante en Europa y otros países occidentales. Además, su incidencia ha aumentado en los últimos años debido a la adquisición de nuevas costumbres como la exposición prolongada a la radiación solar. Por ello, se está realizando una gran labor investigadora para dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen en los procesos de proliferación, diferenciación y homeostasis de la piel y de cómo la alteración en estos procesos puede inducir la aparición del cáncer. El objetivo de esta Tesis ha sido el de comprender alguno de estos mecanismos.

La familia de retinoblastoma está compuesta por tres miembros (pRb, p107 y p130) implicados en el control de la proliferación, diferenciación y carcinogénesis en muchos tejidos. Nuestros trabajos previos demostraron la importancia que, en la epidermis, tiene esta familia en todos estos procesos. Sin embargo, la falta de estudios determinantes en una situación real y fisiológica nos llevó a utilizar ratones deficientes en estas proteínas como herramienta para tratar de desvelar el papel que esta familia tiene en los procesos anteriormente mencionados en la piel. Los trabajos que serán descritos a continuación corresponden a los objetivos abajo enunciados:

- Caracterización de los posibles fenotipos existentes en la piel de los modelos animales deficientes en los diferentes miembros de la familia de retinoblastoma.
- Análisis de la implicación de los diferentes miembros de la familia en los procesos de proliferación y diferenciación epidérmicas.
- Estudio del papel de los miembros de la familia de retinoblastoma en la morfogénesis y el desarrollo del folículo piloso.
- Evaluación de la importancia de *Rb* en la carcinogénesis de piel.

3. *MATERIALES Y MÉTODOS*

*En principio, la investigación necesita
más cabezas que medios.*

Severo Ochoa

3.1 ANIMALES DEFICIENTES Y PROCEDIMIENTOS HISTOLÓGICOS.

Los animales deficientes en p107, p130 y en p107/p130 utilizados para el trabajo realizado exclusivamente en estas dos proteínas, fueron cedidos generosamente por el Dr. Tyler Jacks (Massachusetts Institute of Technology, USA) siendo generados en un fondo genético C57BL/6J (Cobrinik y cols., 1996; Lee y cols., 1996). Los animales $Rb^{F19/F19}$, $K14cre$ y los animales deficientes en p107 (estos últimos utilizados para el estudio de la compensación funcional de p107 en los animales $Rb^{F19/F19}$; $K14cre$) fueron cedidos generosamente por el Dr. Anton Berns (Nederlands Kanker Instituut, Holanda) siendo generados en un fondo genético FVB (Marino y cols., 2000; Jonkers y cols., 2001; Robanus-Maandag y cols., 1998, respectivamente). Por último, los animales ROSA-26 fueron cedidos generosamente por el Dr. Philip Soriano (Fred Hutchinson Cancer Research Center, USA) (Soriano, 1999).

Las muestras histológicas se fijaron en formaldehído 4% en PBS o en etanol 70% y embebidas en parafina. Los cortes histológicos (5 μm de espesor), realizados con microtomo (Leica), se desparafinaron y se tiñeron con hematoxilina/eosina (Sigma) para realizar el análisis histológico o se procesaron para inmunohistoquímica o inmunofluorescencia (ver más adelante). En el caso de los cortes por congelación (8 μm de espesor), las muestras se embebieron frescas en medio OCT (Bayer) y se procesaron mediante congelación a -20°C para su uso en el criostato (Leica).

3.2 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.

El protocolo de extracción de ADN genómico es básicamente el descrito en Laird y cols., 1991. Brevemente: un pequeño fragmento de cola de ratón se digirió en 700 μl de buffer de lisis (100 mM Tris-HCl pH: 8.5, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 200 mM NaCl y 100 μg proteinasa K/ml) a 55°C durante toda la noche en agitación. Una vez digerida la cola se precipitó el ADN con isopropanol (en proporción 1:1) y se lavó en etanol 70% para eliminar las sales residuales. El ADN se secó manteniendo el tubo abierto y finalmente se resuspendió en 500 μl de buffer TE (10 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH: 8). Para las reacciones de PCR siempre se usó 1 μl del ADN genómico obtenido.

3.3 GENOTIPADO DE LOS ANIMALES.

El genotipado de los animales se realizó por PCR mediante la reacción que se describe a continuación:

ADN	1 µl
Tampón 10X	2 µl
dNTPs (2 mM)	2 µl
Oligonucleótidos (10 µM)	1 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl
Enzima Taq polimerasa (Promega)	0,2 µl
H ₂ O destilada	11,8 µl

El programa de reacción que se usó fue el siguiente:

- 5 minutos 94°C
 - 30 segundos 94°C
 - 30 segundos 58°C
 - 50 segundos 72°C
 - 10 minutos 72°C
- } 29 ciclos

Los oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los diferentes animales se describen en el siguiente recuadro:

Gen	Oligonucleótidos (5'-3')	Secuencia	Fragmento amplificado (oligonucleótidos utilizados)	Tamaño de la banda
<i>p107</i>	p107 com	TCGCTGGAGTCTGAGTCAG	<i>Alelo p107^{WT}</i> (p107com+p107wt)	280 pb
	p107 neo	ACGAGACTAGTGAGACGTGC	<i>Alelo p107^{Neo}</i> (p107com+p107neo)	330 pb
	p107 wt	TGTCCTGAGCATGAACAGAC		
<i>p130</i>	p130 com	ACGGATGTCAGTGTACCG	<i>Alelo p130^{WT}</i> (p130com+p130wt)	260 pb
	p130 neo	GAAGAACGAGATCAGCAG	<i>Alelo p130^{Neo}</i> (p130com+p130neo)	300 pb
	p130 wt	TACATGGTTTCCTCAGCGG		
<i>Rb</i>	Rb18	GGCGTGTGCCATCAATG	<i>Alelo Rb^{WT}</i> (Rb18 + Rb19)	680 pb
	Rb19	AACTCAAGGGAGACCTG	<i>Alelo Rb^{F19}</i> (Rb18 + Rb19)	748 pb
			<i>Alelo Rb^{D19}</i> (Rb18 + Rb19)	300 pb
<i>Cre</i>	Cre 1	CGATGCAACGAGTGATGAGG TTC	<i>Alelo Cre</i> (Cre1 + Cre2)	400 pb
	Cre 2	GCACGTTCCACGGCATCAAC		

Gen	Oligonucleótidos (5'-3')	Secuencia	Fragmento amplificado (oligonucleótidos utilizados)	Tamaño de la banda
<i>p107</i>	p107 F	TCGTGAGCGCGATAGAAAGG	<i>Alelo p107^{wt}</i> (p107F + p107R)	215 pb
	p107 R	CTGCCGAAGGTAAATACGGAC		
<i>LacZ</i>	TN-LZ1	CGTCACACTACGTTGAACG	<i>Alelo LacZ</i> (TN-LZ1 + TN-LZ2)	560 pb
	TN-LZ2	CGCACACTACGTCTGAACG		

Los animales deficientes en *p107* utilizados para estudiar la compensación entre *p107* y *p130* se genotiparon mediante los oligonucleótidos *p107 com*, *p107 neo* y *p107 wt* (Fig. 9; Cobrinik y cols., 1996; Lee y cols., 1996). Por el contrario, los animales deficientes en *p107* utilizados para estudiar la compensación entre *p107* y *pRb* se genotiparon con los oligonucleótidos *p107 F*, *p107 R*, *TN-LZ1* y *TN-LZ2* (ver Fig. 31; Robanus-Maandag y cols., 1998). La utilización de diferentes oligonucleótidos para el genotipado del gen *p107* se debe a la diferente estrategia usada para generar dichos animales deficientes (Cobrinik y cols., 1996; Lee y cols., 1996; Robanus-Maandag y cols., 1998).

Por último, los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa/TBE 1X (89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 8) al 1,8%. 15 µl del producto de PCR, mezclados con colorante (Sacarosa 7%, azul de bromofenol 0,04% y azul de xilenocianol 0,04%), se cargaron en cada calle del gel y se corrieron a 60V durante al menos 2 horas. Los fragmentos de ADN se visualizaron con bromuro de etidio (1 µg/ml) en un transiluminador de luz ultravioleta determinando así, la existencia de los correspondientes fragmentos. Además, en todos los casos se usó un marcador de bajo peso molecular (marcador IX, Roche).

3.4 CULTIVOS DE QUERATINOCITOS PRIMARIOS DE RATÓN.

Los queratinocitos primarios se obtuvieron mediante la tripsinización controlada de la piel de animales recién nacidos (1-3 días postparto) (Hennings y cols. 1980). Para ello, se usó tripsina 0,25 % en PBS (Trypsin 1-300, ICN Biomedicals). Tras 20 horas de tripsinización a 4°C, se procedió al aislamiento de la epidermis, separándola de la dermis, se troceó y agitó para obtener los queratinocitos. Durante el período de tripsinización y, previamente al plaqueo, se genotipó el animal sacrificado. Las células se sembraron en medio de alto calcio para favorecer la adhesión: medio EMEM (Biowhitaker, Inc), 4% de suero fetal tratado con resina Chelex 100 (BioRad Laboratories), 0,2 mM CaCl₂ y

antibiótico/antimicótico 1X (Gibco). El tratamiento del suero fetal con la resina, agitación de 500 ml de suero con 180 g de resina durante 3 horas a 4°C, sirve para eliminar el calcio existente en el suero pudiendo controlar así la concentración final de este catión en el medio. Tras 15 horas de adhesión se cambió el cultivo a un medio de crecimiento en bajo calcio: medio EMEM, 4% de suero-Chelex, 0,05 mM CaCl₂, 10 ng/ml EGF y antibiótico/antimicótico 1X, medio que además, debido a la baja concentración de calcio, impide la proliferación de posibles fibroblastos contaminantes. El medio se renovó diariamente.

3.4.1 Diferenciación de queratinocitos primarios *in vitro*.

Los cultivos de queratinocitos primarios mantenidos al menos dos días en medio de crecimiento, se diferenciaron en medio de alto calcio: EMEM, 4% de suero-Chelex, 1,2 mM CaCl₂ y antibiótico/antimicótico 1X (Hennings y cols., 1980; Stanley y Yuspa, 1983; Yuspa y cols., 1989). El proceso de diferenciación se mantuvo durante 1, 2 o 3 días según el objetivo del experimento tras lo cuál, dependiendo del mismo, se re-estimuló el cultivo volviendo a las condiciones de crecimiento en bajo calcio durante 24 horas. Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado.

3.4.2 Infección adenoviral de queratinocitos primarios.

Los adenovirus codificantes para Cre y GFP fueron proporcionados generosamente por el Dr. Curiel (University of Alabama, Birmingham, USA) (Bilbao y cols., 1999). La amplificación del adenovirus se realizó en células HEK-293 en medio DMEM (Gibco), 5% suero fetal y antibiótico/antimicótico. Para la infección de los queratinocitos, el sobrenadante adenoviral se diluyó 1:2 en Optimem (Gibco) con 8 µg/ml de polibreno añadiéndose un volumen suficiente para cubrirlos durante al menos 2 horas. Tras dos lavados con PBS se volvió al medio de crecimiento.

3.4.3 Análisis del ciclo celular de queratinocitos primarios.

Para estudiar la cantidad del ADN sintetizado durante el ciclo celular se utilizaron técnicas de citometría de flujo. Se usó básicamente el método descrito por Braylan y cols., (1982). Los queratinocitos se tripsinizaron, se fijaron en etanol 100% y se marcaron con yoduro de propidio 12,5 µg/ml, analizándose por un citómetro EPICS XL Cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Los datos se procesaron utilizando el programa WinMDI (proporcionado por Joe Trotter del Scripps Institute, La Jolla, USA). El análisis

de los resultados se realizó utilizando el programa Cyclred, basado en un modelo desarrollado por Watson y cols., (1987) y Ormerod y cols., (1987). Los experimentos de ciclo celular se hicieron siempre por triplicado.

3.4.4 Infección retroviral de queratinocitos primarios.

Las estructuras retrovirales pBABE-Frat1 y pBABEFrat1 Δ GBD fueron proporcionadas por Renée van Amerongen (Nederlands Kanker Instituut, Holanda). Dichos plásmidos se co-transfectaron en células empaquetadoras HEK-293-T con un vector codificante para la envoltura ecotrópica del retrovirus. Los sobrenadantes retrovirales se obtuvieron en DMEM con 5% suero fetal y antibiótico/antimicótico. Tras la adición de 8 μ g/ml de polibreno se filtraron por 0,45 μ m y se añadieron a los cultivos de queratinocitos primarios durante 4 horas. Después de la infección, los cultivos se lavaron en PBS y se volvió al medio de crecimiento. 48 horas después se realizaron las inmunofluorescencias como se describe posteriormente.

3.4.5 Curvas de crecimiento de queratinocitos primarios.

Para realizar las curvas de crecimiento de los queratinocitos en cultivo se plaquearon 10^5 células y tras un día de aclimatación celular al medio de crecimiento, se tripsinizaron y contaron diariamente en un microscopio invertido usando una cámara de Neubauer.

3.4.6 Incorporación de BrdU en queratinocitos primarios.

Para medir el grado de incorporación de BrdU en un cultivo, los queratinocitos primarios se incubaron en BrdU 10 μ M diluido en el medio durante un período de 1 hora. Tras dicha incubación, los queratinocitos se fijaron en formaldehído 4% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. El procesamiento inmunohistoquímico para detectar las células positivas se realizó tal y como se describe más adelante. Se realizaron al menos tres experimentos independientes y se contaron alrededor de 1000 células en cada marcaje de incorporación de BrdU.

3.4.7 Transfección de queratinocitos primarios.

Los queratinocitos primarios al 40% de confluencia en placas p35 se transfectaron mediante el reactivo Superfect (Quiagen). En 400 μ l de medio EMEM sin suero se

diluyeron un total de 2,5 µg de la mezcla de plásmidos y 2 µl del reactivo Superfect. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se añadieron 600 µl de medio de crecimiento y la mezcla se añadió a los cultivos previamente lavados 2 veces con PBS. Dos horas después se lavaron nuevamente en PBS y se repuso el medio de crecimiento fresco. Mediante el uso de transfecciones control se determinó que, 24 horas después de la transfección, alrededor del 15% de los queratinocitos expresaban el transgén transfectado (tinciones LacZ).

3.4.8 Inmunofluorescencias en queratinocitos primarios.

Los cultivos de queratinocitos en proliferación o en diferenciación crecidos en pequeños cristales de 9 mm de diámetro se fijaron en metanol/acetona (2:1) durante 7 minutos a 4°C. Tras 3 lavados de PBS se almacenaron a 4°C. El protocolo de inmunofluorescencia se describe más adelante.

3.5 INCORPORACIÓN DE BrdU *IN VIVO*.

Para medir el grado de incorporación de BrdU en un tejido o tumor del animal se inyectó una solución de BrdU 10 mg/ml en un total de 0,1 mg por gramo de peso del animal. Una hora después de la inyección, se sacrificó al animal fijando los tejidos en formaldehído 4% en PBS e incluyéndolos después en parafina. Los cortes histológicos desparafinados se pretrataron una hora en HCl 2N para favorecer la desnaturalización del ADN y así detectar mejor la molécula de BrdU incorporada en el mismo. Tras este pretratamiento, el proceso de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia realizado es el mismo descrito más adelante.

3.6 DETECCIÓN DE MUERTE CELULAR MEDIANTE TUNEL.

El análisis de células apoptóticas se realizó en tejidos fijados con formaldehído al 4% en PBS mediante la detección del nucleótido dUTP añadido por la enzima TdT en los extremos 3' de los fragmentos de ADN característicos de una célula en proceso de apoptosis.

En la detección de células apoptóticas mediante técnicas inmunofluorescentes se utilizó el kit *In situ Cell Death Detection, Fluorescein* (Boehringer Mannheim) en el que el tejido desparafinado se incubó con una mezcla de la enzima TdT junto a dUTP

asociado a fluoresceína. Tras la incubación se pudieron detectar las células marcadas en un microscopio de fluorescencia.

En la detección de células apoptóticas mediante técnicas inmunohistoquímicas se utilizó el kit *ApopTag Plus Peroxidase In situ Apoptosis Detection* (Intergen). Mediante la misma reacción antes descrita, la detección del dUTP se realizó mediante anticuerpos asociados a una enzima peroxidasa. La localización de los anticuerpos se realizó añadiendo el substrato DAB, y H₂O₂. La reacción química se paró con agua, controlando la reacción con el microscopio óptico. Posteriormente se realizó una contratinción con hematoxilina.

3.7 WESTERN BLOT.

Los extractos proteicos de piel o de queratinocitos se obtuvieron mediante homogeneización activa (mediante el uso de Polytron) o pasiva (mediante 3 ciclos de congelación/descongelación) respectivamente, en medio A suplementado con inhibidores de proteasas (medio de lisis). Los lisados se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C durante 10 minutos y los sobrenadantes se transfirieron a tubos fríos. La concentración de proteínas se determinó mediante el análisis colorimétrico de Bradford (BioRad) usando una curva estandar de rango 1 µg/µl-25 µg/µl de BSA.

<u>Medio de lisis:</u>		<u>Medio A:</u>	
Medio A		Tris-HCl pH 7.5	20 mM
PMSF	1 mM	NaCl	137 mM
NaF	20 mM	glicerol	10%
Aprotinina	1 µg/ml	TritonX-100	1 %
Leupeptina	1 µg/ml		
Pirofosfato disódico	1 mM		
Na ₃ VO ₄	1 mM		

Mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) se resolvieron en gel de poliacrilamida, en diferente porcentaje dependiendo de los pesos moleculares de las proteínas a analizar, un total de 25 µg de proteínas mediante amperaje constante (15 mA/gel). En todos los casos se usó un marcador de peso molecular (New England Biolabs). Posteriormente, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Amershan Pharmacia Biotech) en cámara semihúmeda con medio de transferencia

(Tris-Base 33 mM, Glicina 194 mM y Metanol 20%) a 15V durante 40 minutos. La membrana se incubó con una solución de leche desnatada al 5% en TBS-Tween 0,5% (Tris-Cl 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7,6) durante al menos 3 horas para el bloqueo de uniones inespecíficas. Tras ello, se incubó con los correspondientes anticuerpos primarios dirigidos frente a las proteínas especificadas en la siguiente tabla:

Anticuerpos usados en los análisis de <i>western blot</i>			
Anticuerpos primarios			
Especificidad	Origen	Dilución	Casa comercial
pRb	Policlonal de conejo	1:1000	Santa Cruz (C-15)
pRb	Monoclonal de ratón	1:1000	PharMingen (G3-245)
p107	Policlonal de conejo	1:500	Santa Cruz (C-18)
p130	Policlonal de conejo	1:500	Santa Cruz (C-20)
β -catenina	Monoclonal de ratón	1:1000	Transduction Laboratories
Fosfo- β -catenina	Monoclonal de ratón	1:100	Cell Signalling
Akt1/2	Policlonal de cabra	1:1000	Santa Cruz (N-19)
Gsk3 β	Monoclonal de ratón	1:1000	Transduction Laboratories
Slimb/ β TrcP	Policlonal de cabra	1:1000	Santa Cruz (C-18)
Frat	Policlonal de cabra	1:200	Santa Cruz (S-20)
E2F1	Policlonal de conejo	1:1000	Santa Cruz (C-20)
E2F4	Policlonal de conejo	1:500	Santa Cruz (C-108)
E2F5	Policlonal de conejo	1:500	Santa Cruz (E-19)
Axina	Policlonal de conejo	1:1000	Santa Cruz (H-98)
Actina	Policlonal de cabra	1:500	Santa Cruz (I-19)
Anticuerpos secundarios			
Especificidad	Conjugado	Dilución	Casa comercial
Anti-ratón	Peroxidasa	1:5000	Jackson 715-035-151
Anti-cabra	Peroxidasa	1:10000	Santa Cruz (sc-2020)
Anti-conejo	Peroxidasa	1:5000	Jackson 711-035-152

Para detectar la unión del anticuerpo primario se usaron anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa, concretamente, anticuerpos anti-IgG de especificidad variable (ratón, conejo, cabra) también detallados en la tabla. Por último, para visualizar la unión de los anticuerpos se usó un Kit de detección de luminiscencia basado en una reacción específica de la peroxidasa siguiendo las instrucciones de la casa comercial (WestPicoSignal, Pierce).

Para el análisis de los complejos proteicos asociados a GSK3 β (Fig. 24) se realizaron inmunoprecipitaciones de un total de 50 μ g de extractos de proteínas totales de piel en PBS-Tritón 1% con inhibidores de proteasas (antes mencionados) durante 15 horas usando un anticuerpo específico frente a GSK3 β . Tras ello, las inmunoglobulinas unidas a los complejos proteicos de GSK3 β se incubaron con 15 μ l de proteína A/G Plus-agarosa (Santa Cruz sc-2003) durante 2 horas. Tras sucesivos lavados en PBS con

inhibidores de proteasas, los complejos así aislados se resolvieron mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) como se ha descrito anteriormente.

En el caso de la co-precipitación de la forma libre de β -catenina no asociada a membrana (Fig. 23), los extractos proteicos se incubaron con el fragmento citoplásmico de E-cadherina acoplado a GST (proporcionado por el Dr. Salvatore Pece, Oral and Pharyngeal Cancer Branch, Maryland, USA.) y posteriormente con glutatión-agarosa. La co-precipitación se realizó mediante centrifugación en PBS con inhibidores de proteasas y, posteriormente se resolvió mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE).

Por último, para defosforilar la axina (Fig. 24), los extractos de proteínas se incubaron con 1 μ l de fosfatasa de intestino de ternero (Roche) a diferentes tiempos. A continuación, el grado de fosforilación de la misma se analizó mediante la diferente movilidad electroforética en electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE).

3.8 ENSAYOS DE RETARDO EN GEL.

Los ensayos de movilidad electroforética de retardo en gel (EMSA) se realizaron incubando 5 μ g de extractos proteicos totales de piel con un oligonucleótido marcado con α^{32} P-dCTP correspondiente a la siguiente secuencia palindrómica κ B: 5'-GATCCAACGGCAGGGGAATTCCCCTCTCCTTA-3' (Pérez y cols., 2000). Los complejos formados se resolvieron en un gel nativo de acrilamida al 5,5% en 0,25X TBE (TBE 1X: 89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 8). El gel obtenido se secó y se expuso mediante autoradiografía (Amersham) a -70°C. La identificación de los complejos NF- κ B en este sistema se realizó mediante la adición de 1 μ l de los correspondientes anticuerpos específicos a la mezcla de incubación tal y como se encuentra descrito (Pérez y cols., 2000).

3.9 TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.

Se utilizaron muestras fijadas en formaldehído 4% PBS o en etanol 70%. Tras el desparafinado, las muestras se preincubaron durante 30 minutos con PBS-5% de suero fetal de cabra para bloquear uniones inespecíficas. Posteriormente, las muestras se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C y con los secundarios durante dos horas a temperatura ambiente. Entre todas las

incubaciones se realizaron al menos tres lavados de PBS. Los anticuerpos primarios y los secundarios utilizados se resumen en la siguiente tabla:

Anticuerpos usados en las tinciones inmunohistoquímicas o inmunofluorescentes			
Anticuerpos primarios			
Especificidad	Origen	Dilución	Casa comercial o cedido por
K10	Monoclonal de ratón	1:1000	SIGMA (K8.60)
Filagrina	Policlonal de conejo	1:500	BABCO
Loricrina	Policlonal de conejo	1:1000	BABCO
Involucrina	Policlonal de conejo	1:2000	BABCO
K5	Policlonal de conejo	1:500	BABCO
K6	Policlonal de conejo	1:500	BABCO
K13	Policlonal de conejo	1:50	Dennis R. Roop, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA.
Δ Np63	Monoclonal de ratón	1:100	Santa Cruz (4A4)
p107	Policlonal de conejo	1:150	Santa Cruz (C-18)
p130	Policlonal de conejo	1:150	Santa Cruz (C-20)
p75NTR	Policlonal de conejo	1:500	BABCO
HGF	Monoclonal de ratón	1:50	R&D
EDAR	Monoclonal de ratón	1:100	R&D (AF745)
XEDAR	Policlonal de cabra	1:100	Santa Cruz (T-14)
TROY/TAJ	Policlonal de cabra	1:100	Santa Cruz (M-20)
PCNA	Monoclonal de ratón	1:50	Sir David Lane (PC10), Ninewells Hospital and Medical School, Escocia, Reino Unido.
BMP4	Policlonal de cabra	1:50	Santa Cruz (N-16)
Noggin	Policlonal de cabra	1:50	Santa Cruz (C-18)
BrdU	Monoclonal de ratón	1:50	Boehringer Manngheim
BrdU	Monoclonal de rata	1:5	Sibille Mittnacht, Institute of Cancer Research, Londres, Reino Unido.
p53	Policlonal de conejo	1:200	Novocastra (CM5)
AE13	Monoclonal de ratón	1:1	Tung-Tien Sung, New York University School of Medicine, New York, USA
AE15	Monoclonal de ratón	1:1	Tung-Tien Sung, New York University School of Medicine, New York, USA.
β -catenina	Monoclonal de ratón	1:200	Transduction Laboratories
Frat	Policlonal de cabra	1:50	Santa Cruz (S-20)
Anticuerpos secundarios			
Especificidad	Conjugado	Dilución	Casa comercial
Anti-ratón	Biotina	1:4000	Jackson 715-065-151
Anti-cabra	Biotina	1:10000	Jackson 705-065-147
Anti-conejo	Biotina	1:4000	Jackson 711-065-152
Anti-rata	FITC	1:50	Jackson 712-095-153
Anti-conejo	FITC	1:50	Jackson 711-095-152
Anti-ratón	Texas-Red	1:500	Jackson 715-075-151
Anti-conejo	Texas-Red	1:500	Jackson 711-075-152

En el caso de las inmunohistoquímicas, la detección del anticuerpo se realizó mediante el sistema avidina/estreptavidina-peroxidasa, utilizando el Kit Vectastain ABC (Vector Laboratories). La localización de los anticuerpos se realizó añadiendo el sustrato DAB, y H₂O₂ (Vector Laboratories). La reacción química se paró con agua, controlando

la reacción con el microscopio óptico. Posteriormente se realizó una contratinción con hematoxilina.

En el caso de dobles inmunofluorescencias la incubación se realizó con ambos anticuerpos primarios y secundarios al mismo tiempo. Las inmunofluorescencias se montaron con moviol (Hoechst) al que se añadió DAPI (200 $\mu\text{g/ml}$), como complemento para la detección de ácidos nucleicos. La visualización se realizó en un microscopio Zeiss Axiophot equipado con fuente de epifluorescencia y filtros adecuados. Para la captura de las imágenes se utilizó una cámara digital (Apogee) y el programa de análisis de datos Microimage (Olympus).

3.10 AISLAMIENTO DE ARN Y NORTHERN BLOT.

Se obtuvieron muestras de piel de lomo de ratón que se congelaron en N_2 líquido. Para la obtención del ARN se utilizó el reactivo Trizol (GibcoBRL) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Tras verificar la integridad del ARN mediante la observación al UV de 1 μg de ARN resuelto en un gel-fosfato 15 mM pH=6,9 teñido con bromuro de etidio, se analizaron los ARNs mediante *Northern Blot*. Los ARNs (20 μg por muestra) se desnaturalizaron y se fraccionaron en geles de agarosa al 1% con tampón de formaldehído y se transfirieron a membranas de Nylon (Hybond-N+ Amersham Pharmacia Biotech) en tampón SCC-10X (Lehrach y cols. 1977). Las membranas se hibridaron a 42°C durante toda la noche con la sondas marcadas radioactivamente con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, utilizando el sistema de marcaje Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech). Los filtros hibridados se sometieron a dos lavados con SCC-2X/SDS 1% a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó uno o dos lavados (según las sondas) con una mezcla que contiene SCC-0.2X/SDS 0.1% durante 15 minutos a 55°C. Para hibridar un mismo filtro con varias sondas, el ADN marcado se eliminó mediante lavados en SCC-0.01X/SDS 0.01% en ebullición, comprobándose posteriormente mediante autorradiografía, que el filtro carecía de cualquier marca.

3.10.1 Sondas utilizadas.

Las sondas utilizadas fueron los ADNc completos de Axina (cedidos por el Dr. Kikuchi, Hiroshima University, Japón), β -Catenina y FWD-1 (cedidos por el Dr. Hatakeyama, Kyushu University, Japón), Lef1 (cedido por la Dra. Amparo Cano,

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid), Shh y BMP4 (cedidos por el Dr. Chiang, National Institute of Health, USA), y 7S (ARN ribosómico utilizado para comprobar la carga del mensajero en los *Northern Blots*; Balmain y cols., 1982).

3.11 ENSAYOS DE ACTIVIDAD LUCIFERASA.

Para medir el grado de activación diferencial de promotores o elementos de respuesta a determinados factores de transcripción, se utilizaron ensayos de actividad luciferasa. En cultivos de queratinocitos primarios se transfectaron los plásmidos necesarios para realizar el ensayo de actividad según el protocolo del kit *Dual-Luciferase Kit* (Promega): 1) Plásmido informador, portador de la secuencia promotora de estudio asociada al ADNc de la enzima luciferasa aislada de la luciérnaga (*Photinus pyralis*). En concreto: pGL3-E2F (plásmido de respuesta a factores de transcripción E2F; cedido por el Dr. Lu, Imperial College of Science, Londres, Reino Unido), TOPFLASH (plásmido de respuesta a β -catenina/Lef1) y FOPFLASH (forma mutante del plásmido de respuesta a β -catenina/Lef1), estos últimos cedidos por el Dr. Gutkind, National Institutes of Health, USA. 2) plásmido de expresión del segundo tipo de luciferasa (aislado de *Renilla reniformis*) necesario para la estandarización de las diferentes muestras, evitando así, posibles diferencias debidas a la eficacia de transfección 3) Plásmido/s de expresión de determinadas proteínas (dependiendo del experimento). En concreto: plásmidos de expresión de Lef1 (proporcionado por la Dra. Amparo Cano, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid) Frat1 y Frat1 Δ GBD (proporcionados por Renée Van Amerongen, Nederlands Kanker Instituut, Holanda). 24-48 horas después de la transfección, las células se lisaron y se realizó el ensayo de actividad luciferasa según el protocolo del kit midiéndose la actividad en un luminómetro (Berthold). Se realizaron al menos dos experimentos independientes, en los que las transfecciones se hicieron por triplicado.

3.12 TRASPLANTES DE PIEL.

Para realizar los trasplantes de piel se realizó una biopsia de piel de lomo de 2-3 cm² en embriones de 18,5 días de gestación. La piel donante se trasplantó sobre una zona de similar tamaño en el animal receptor a la que previamente se le había eliminado la piel mediante cirugía. Los animales receptores siempre fueron hembras adultas (2

meses) inmunodeficientes NOD/SCID para evitar así el rechazo. La piel donante se cosió a los bordes de la piel receptora con sutura de seda y se cubrió con NewSkin (Medtech, Jackson) como medio de protección. La evolución del trasplante se observó diariamente y los animales fueron sacrificados entre 2-8 semanas después de la operación procesando la región trasplantada así como las zonas adyacentes para usarlas como región control.

3.13 PROTOCOLO DE CARCINOGENÉISIS QUÍMICA EN PIEL DE RATÓN.

Se realizó un protocolo clásico de carcinogénesis química DMBA/TPA. Un total de 15 animales de 2 meses de edad de cada genotipo, se afeitaron y posteriormente se iniciaron mediante la aplicación de una única dosis de 100 µg de DMBA diluido en acetona en la espalda afeitada del animal. Tras 10 días del tratamiento con DMBA, se comenzaron las aplicaciones de TPA (5 µg/200 µl) en un total de 2 por semana durante un total de 10 semanas. Alrededor de la octava semana tras la iniciación se observó la aparición de los primeros tumores realizándose un seguimiento semanal del número así como el tamaño de los mismos. Tras 30 semanas de protocolo, los animales fueron sacrificados y los tumores se procesaron para histología (cortes de parafina o por congelación) o para la obtención de proteínas, ARN o ADN como se describió anteriormente.

3.14 ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA.

Para detectar la actividad quinasa de Akt o GSK3β se inmunoprecipitaron 50 µg de extractos proteicos totales de piel con 1 µl de anticuerpo anti-Akt o GSK3β por cada 25 µg de proteínas (Segrelles y cols., 2002; Leis y cols., 2002). Los inmunoprecipitados se incubaron a 37°C durante media hora en 20 mM Hepes pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 10 µCi de γ³²P-dATP y H2B 0.05 µg/ml (Sigma) o GS-1 (Sigma) como sustratos para AKT o GSK3β respectivamente. A continuación, los inmunoprecipitados se resolvieron en un gel de acrilamida del 12% y la presencia de sustrato marcado radioactivamente se detectó mediante autoradiografía (Amershan). En paralelo se determinó la presencia de la enzima inmunoprecipitada mediante *western blot* como se describió anteriormente.

3.15 TINCIÓN *LacZ*.

Para la detección de la actividad β -Galactosidasa se fijaron los tejidos de interés en 0,2% paraformaldehído durante dos horas y luego se mantuvieron en una solución al 30% de sacarosa en PBS durante toda la noche. Posteriormente se incluyeron en medio OCT y se hicieron cortes por congelación de 8 μ m. La tinción de *LacZ* se realizó por incubación en el siguiente tampón: $K_4[Fe(CN)_6]$ 11,4 mM, $K_3[Fe(CN)_6]$ 11,4 mM, 1,4 mM $CaCl_2$ y X-Gal 40 mg/ml durante 24 horas a 37°C según se encuentra descrito (Jonkers y cols., 2001).

3.16 ANÁLISIS DE CÉLULAS MADRE EPIDÉRMICAS.

La detección de células con características madre epidérmicas se realizó básicamente según el protocolo desarrollado por Cotsarelis y cols., 1990. Brevemente: se realizaron 4 inyecciones (una cada 12 horas) de 20 μ l de una solución de BrdU (12,5 mg/ml diluido en NaCl 0,9%) en animales de 10 días de edad. 30 y 75 días después de la última inyección, se sacrificaron los animales y se analizó la incorporación de BrdU por inmunohistoquímica. El número de células madre se evaluó como porcentaje de folículos pilosos que contenían células positivas. Se analizaron al menos 4 animales de cada genotipo y 200 folículos por animal.

4. *RESULTADOS*

El que no sabe de nada no duda de nada.

George Herbert

4.1 PAPEL DE p107 Y p130 EN LA DIFERENCIACIÓN EPIDÉRMICA Y EN LA MORFOGÉNESIS FOLICULAR.

4.1.1 La epidermis de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} tiene alteraciones en la diferenciación terminal.

Los animales deficientes para p107 o p130 no muestran ninguna alteración fenotípica observable a nivel macroscópico (Lee y cols., 1996; Cobrinik y cols., 1996). Posiblemente, esto se debe a que la ausencia de cualquiera de estas proteínas puede ser compensada funcionalmente por los otros dos miembros de la familia, p107 o p130 (dependiendo del caso) y pRb. Sin embargo, los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} son letales perinatales ya que mueren horas después del nacimiento (Cobrinik y cols., 1996). Morfológicamente, estos animales se caracterizan por un acortamiento de las extremidades, un hocico más corto, protusión abdominal y, en general, un tamaño del 30% menor en comparación con sus hermanos p107^{+/-}; p130^{+/-} (Fig. 9a; Cobrinik y cols., 1996). La letalidad observada en estos animales se produce por un fallo respiratorio originado por problemas en la osificación endocondral. Esto se debe a que los condrocitos p107^{-/-}; p130^{-/-} presentan una alteración grave de la proliferación (Cobrinik y cols., 1996; Rossi y cols., 2002; Laplantine y cols., 2002). A pesar de estos defectos, no se ha descrito ninguna alteración en la epidermis de estos animales.

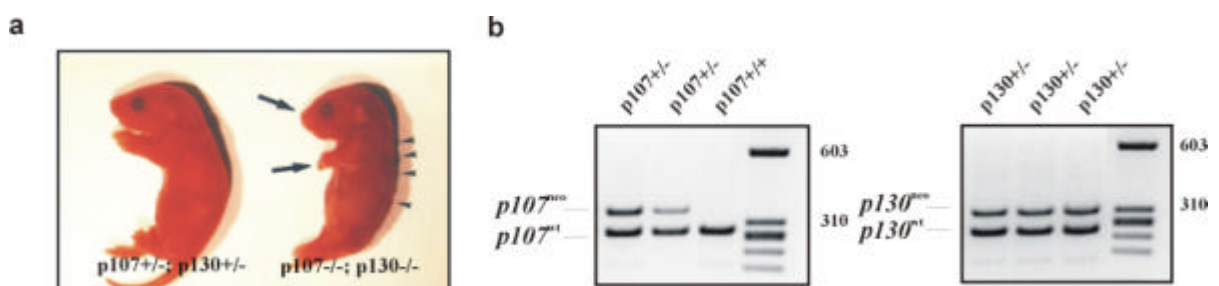


Fig. 9: Obtención de los animales deficientes en p107 y/o p130. a) Aspecto macroscópico de animales recién nacidos p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-}. Nótese el menor tamaño de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-}, el hocico y las extremidades más pequeñas (flechas) así como la existencia de pliegues anómalos de la piel (puntas). b) Análisis de PCR de los alelos p107 y p130 a partir de ADN genómico obtenido de las colas de los animales con los genotipos representados.

Dado el papel de la familia de retinoblastoma en la homeostasis de la piel (ver introducción), se analizaron los animales deficientes en p107 y/o p130 para determinar la

posible existencia de alteraciones en la epidermis. En todos los casos se analizó la piel en embriones de 18,5 días de gestación debido a la letalidad perinatal de los animales $p107^{-/-}$; $p130^{-/-}$. Los alelos $p107^{wt}$, $p107^{neo}$, $p130^{wt}$ y $p130^{neo}$ se detectaron mediante PCR para determinar el genotipo del animal (Fig. 9b). La epidermis de los animales $p107^{-/-}$; $p130^{+/+}$ y $p107^{+/+}$; $p130^{-/-}$ carece de alteraciones histológicas en comparación con sus respectivos hermanos controles $p107^{+/+}$; $p130^{+/+}$, por lo que estos últimos se utilizaron como animales de referencia en el resto del estudio (Fig. 10a).

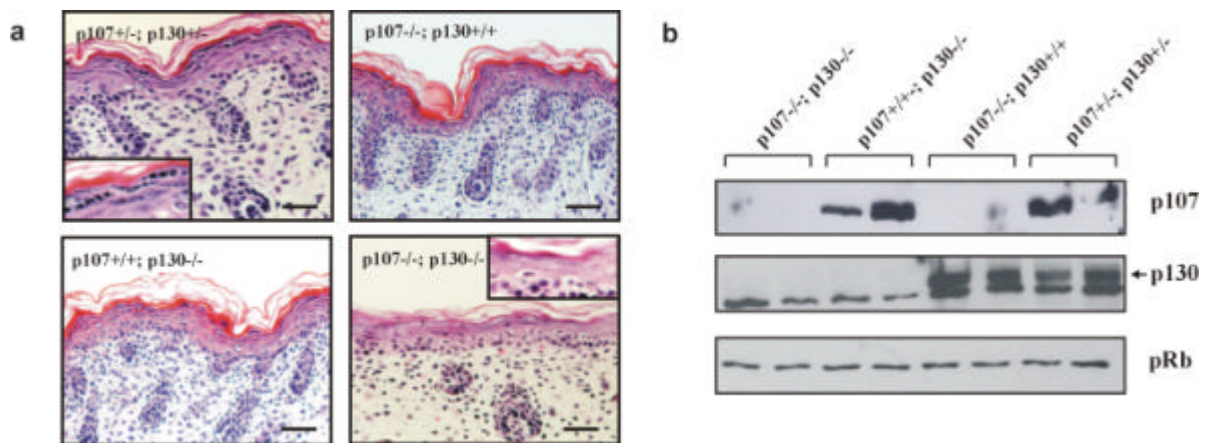


Fig. 10: Los animales $p107^{-/-}$; $p130^{-/-}$ tienen claras alteraciones en el estrato granuloso de la epidermis. a) Secciones histológicas teñidas con H&E de la piel de embriones de 18,5 dpc de los genotipos representados. En los recuadros de menor tamaño se amplifica la región del estrato granuloso de los correspondientes genotipos. b) Análisis de western blot frente a los miembros de la familia de retinoblastoma, pRb, p107 y p130, realizados a partir de extractos de proteínas obtenidos de pieles de embriones de 18,5 dpc de los genotipos representados. Barra= 75 μ m.

Del mismo modo a como ocurre en otros tejidos (Lee y cols., 1996; Cobrinik y cols., 1996), la ausencia de p107 o p130 en la epidermis no provoca la aparición de ningún fenotipo en la piel. Se ha descrito en células deficientes en *Rb* un aumento del ARNm de *p107* que sugiere la existencia de compensación funcional entre los diferentes miembros de la familia de retinoblastoma (Dannenbergh y cols., 2000; Hurford y cols., 1997). Para determinar si la ausencia de p107 y/o p130 inducía el aumento en la expresión de algún miembro de la familia se realizaron análisis de *western blot* utilizando extractos de proteínas obtenidos de la piel de embriones de 18,5 dpc de todos los genotipos (Fig. 10b). Se observó que la ausencia de p107 no inducía un aumento en la expresión de p130 y viceversa (Fig. 10b). Del mismo modo, la expresión de pRb no

variaba en ninguno de los genotipos analizados, por lo que la compensación funcional observada, no depende de cambios en la expresión de los diferentes miembros de la familia de retinoblastoma (Fig. 10b).

A diferencia de lo que ocurre en los animales $p107^{+/-}; p130^{+/-}$, la epidermis de los animales $p107^{-/-}; p130^{-/-}$ presentaba varias alteraciones morfológicas. Se observó una disminución en el número así como en el tamaño de los gránulos de queratohialina existentes en las células del estrato granuloso, en comparación con la epidermis de los animales $p107^{+/-}; p130^{+/-}$ (Fig. 10a; ver recuadros). Como ya se mencionó en la introducción, estos gránulos están formados por proteínas como la filagrina, siendo esenciales en la formación de la escama celular, último estadio de la diferenciación epidérmica. Por ello, la disminución en su formación sugiere la existencia de alteraciones en la diferenciación terminal de los animales $p107^{-/-}; p130^{-/-}$. Para comprobarlo, se analizó la expresión de varios marcadores de diferenciación como la queratina K10, loricrina y filagrina en los animales $p107^{+/-}; p130^{+/-}$ y $p107^{-/-}; p130^{-/-}$ (Fig. 11). No se observaron alteraciones en la expresión de la queratina K10 en ausencia de p107 y p130 (Fig. 11). Este resultado indica que las primeras etapas de diferenciación se realizan correctamente en los animales $p107^{-/-}; p130^{-/-}$ (Fig. 11). Sin embargo, la expresión de ambos marcadores de diferenciación terminal, loricrina y filagrina, se encuentra claramente disminuida en los animales $p107^{-/-}; p130^{-/-}$ en comparación con sus respectivos hermanos $p107^{+/-}; p130^{+/-}$ (Fig. 11).

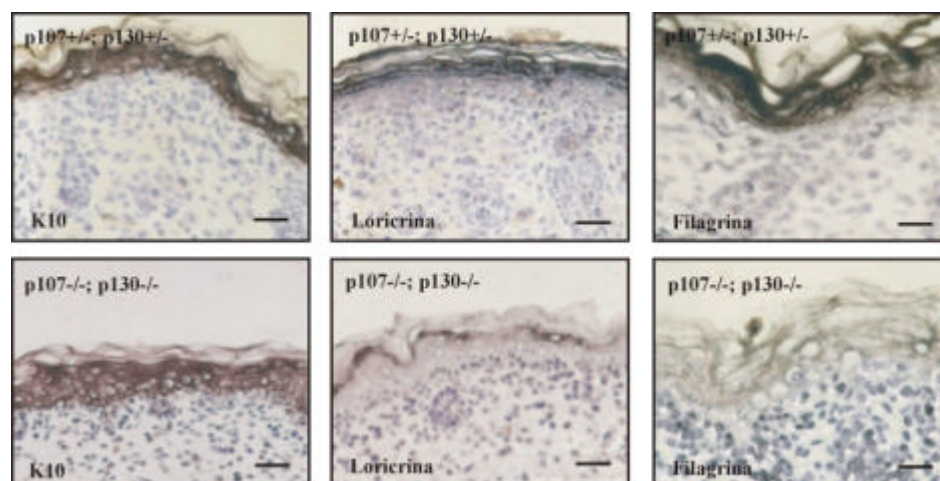


Fig. 11: Los animales $p107^{-/-}; p130^{-/-}$ tienen alterada la diferenciación terminal. Tinción inmunohistoquímica frente a K10, loricrina y filagrina en epidermis de embriones de 18,5 dpc de los genotipos representados. Barra= 50 μ m.

Estos datos sugieren que la pérdida conjunta de p107 y p130 altera el proceso normal de diferenciación epidérmica terminal *in vivo* pero no las primeras etapas de dicho proceso.

4.1.2 La ausencia de p107 y p130 produce alteraciones en la formación de derivados ectodérmicos.

La piel de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} de 18,5 dpc también se caracteriza por una clara disminución en el número de folículos pilosos formados durante la embriogénesis en comparación con los animales p107^{+/-}; p130^{+/-} (Fig. 12a, d). Además, esta disminución se observa en diferentes estadios de la embriogénesis ya que, tanto a 16,5 dpc como a 18,5 dpc, existe un menor número de folículos (Fig. 12d). De hecho, en el rudimento epitelial de embriones de 14,5 dpc se observa una generalizada disminución del número de las estructuras germinales de los futuros folículos pilosos (Fig. 12b). Por último, también se encontraron deficiencias en la formación de las vibrisas, folículos sensoriales especializados localizados en el hocico del ratón. Los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} tienen un menor número de los centros germinales que darán origen a las vibrisas (Fig. 12c).

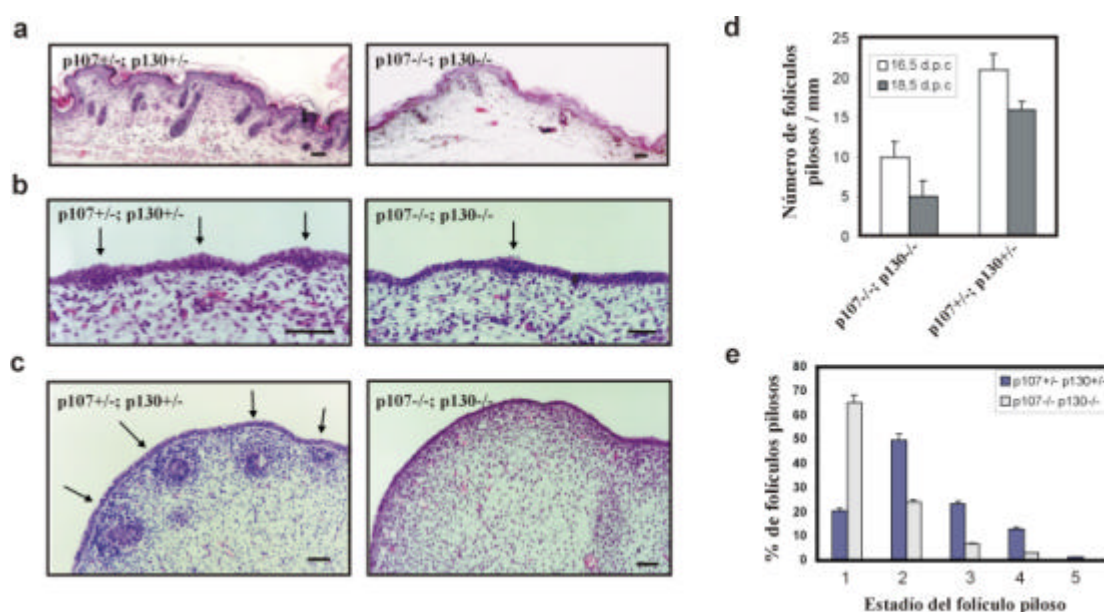


Fig. 12: La pérdida de p107 y p130 produce una alteración generalizada en la morfogénesis folicular. a-c) Secciones histológicas teñidas con H&E de la piel (a, b) o el hocico (c) de embriones de 18,5 (a), 14,5 dpc (b) o 16,5 dpc (c) de animales p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-}. Las flechas indican los rudimentos foliculares (b) o las vibrisas (c). d, e) Representación gráfica del número medio de folículos pilosos/mm (d) o del porcentaje de folículos existentes en cada estadio observados en pieles de animales p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-} de 18,5 dpc. Barra= 100 μ m.

Los folículos pilosos pueden ser catalogados durante su morfogénesis en diferentes estadios de desarrollo (1-8) utilizando una clasificación basada en criterios morfológicos y bioquímicos (Fig. 3; Paus y cols., 1999). El estadio 1 corresponde a la estructura germinal que originará el folículo, mientras que el estadio 8 corresponde al folículo anagénico completamente desarrollado (Fig. 3). Usando esta clasificación se caracterizó la población de folículos pilosos existentes en la piel de embriones $p107^{+/-}$; $p130^{+/-}$ y $p107^{-/-}$; $p130^{-/-}$ de 18,5 dpc. Se observó que, en los animales $p107^{-/-}$; $p130^{-/-}$, existía un claro retraso en el desarrollo de los folículos pilosos debido al predominio de los primeros estadios de los mismos, en comparación con los animales $p107^{+/-}$; $p130^{+/-}$ (Fig. 12e).

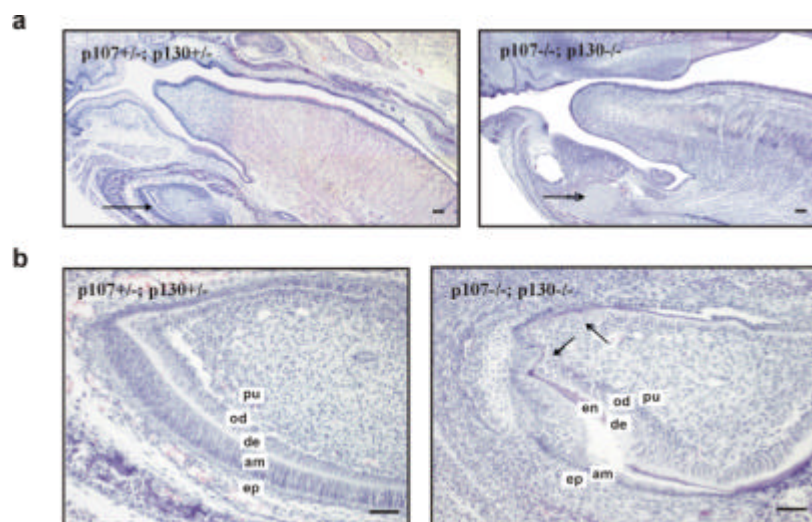


Fig. 13: Los animales $p107^{-/-}$; $p130^{-/-}$ tienen alteraciones en la formación de los dientes.

a, b) Secciones histológicas teñidas con H&E de la cavidad oral (a) o del rudimento dental (b) en embriones de 18,5 dpc de animales de los genotipos representados. En el caso de los animales $p107^{-/-}$; $p130^{-/-}$ se detectaron casos de anodontia (a, ver flechas) o hipoplasia de la capa de odontoblastos (b, ver flechas en animal $p107^{-/-}$; $p130^{-/-}$) Clave: pu=pulpa dental, od= capa de odontoblastos, de= dentina, am= capa de ameloblastos, ep= pulpa externa. Barra= 100 μ m.

La morfogénesis de los folículos pilosos, como ya se explicó en la introducción, depende de una compleja señalización molecular recíproca entre células dérmicas mesenquimales y células epiteliales. Al igual que los folículos pilosos, existen numerosos derivados ectodérmicos, como por ejemplo el diente, que requieren una señalización epitelio-mesénquima muy similar a la que ocurre durante la formación del folículo. Por ello, se analizaron también las estructuras dentales presentes en embriones $p107^{+/-}$;

p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-} de 18,5 dpc. Se observaron numerosas alteraciones en los dientes de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} en comparación con sus hermanos p107^{+/-}; p130^{+/-}. Estas alteraciones se caracterizaban normalmente por microdoncia de los incisivos (Fig. 13b) aunque en algunos casos se observó una total ausencia de los dientes o anodontia con la presencia de tejido mesenquimal indiferenciado en lugar del incisivo (Fig. 13a). Además, los rudimentos dentales presentaban una hipoplasia de la capa de odontoblastos, poco diferenciados y claramente desorganizados (Fig. 13b).

Estos datos sugieren que la ausencia de p107 y p130, provoca graves alteraciones en la formación de los derivados ectodérmicos, en los que la señalización epitelio-mesénquima podría encontrarse alterada.

4.1.3 Los defectos en el folículo y en los incisivos de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} no se deben a alteraciones de las vías NFκB o TNF-α.

Existen numerosos modelos animales que presentan alteraciones en el desarrollo de los folículos pilosos así como en los derivados dentales. Por ejemplo, los animales que tienen mutaciones *tabby* o *downless* tienen defectos en el desarrollo de los folículos y los dientes (Miard y cols., 1999; Pispá y cols., 1999; Headon and Overbeek, 1999; Laurikkala y cols., 2001, 2002) lo que demuestra la existencia de vías comunes en la génesis de estos órganos ectodérmicos. Las alteraciones anteriormente descritas en los folículos pilosos y en los rudimentos dentales de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} se asemejan a las descritas en los mencionados modelos animales. *edar* fue identificado como el gen responsable del fenotipo descrito en los animales con mutaciones *downless* (Headon and Overbeek, 1999). Se trata, como posteriormente se describió con TROY o XEDAR (Kojima y cols., 2000; Srivastava y cols., 2001), de un nuevo miembro de la familia de receptores del TNF-α (Headon and Overbeek, 1999). Tanto su ligando, EDA (*tabby*), como sus receptores, EDAR, TROY o XEDAR, han sido implicados en varios trabajos en la morfogénesis y el desarrollo de los folículos pilosos así como de los derivados dentales (Miard y cols., 1999; Pispá y cols., 1999; Headon and Overbeek, 1999; Laurikkala y cols., 2001, 2002).

Para determinar si los defectos de los derivados ectodérmicos de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} eran debidos a la alteración de alguno de estos receptores, se analizó la expresión de los tres receptores de la superfamilia de TNF-α (EDAR, XEDAR y TROY/TAJ). Se observó que en los folículos pilosos de embriones p107^{-/-}; p130^{-/-} de

18,5 dpc no existían alteraciones en la expresión de EDAR (Fig. 14a), XEDAR (Fig. 14b) o TROY/TAJ (Fig. 14c) en comparación con los folículos de los embriones p107^{+/-}; p130^{+/-}. Por otro lado, se ha descrito que la transducción mediada por EDAR se realiza a través de los factores de transcripción NFκB (Schmidt-Ullrich y cols., 2001). Por ello, para determinar la actividad NFκB en los animales deficientes en p107 y/o p130, se realizó un ensayo de retardo en gel (EMSA) en el que se analizó la unión de los complejos p50/p50 y p50/p65 (p50 y p65 son los componentes mayoritarios de los complejos NFκB en piel) a una secuencia de unión consenso NFκB marcada radiactivamente (Pérez y cols., 2000). No obstante, no se detectaron variaciones significativas en la actividad NFκB en ninguno de los genotipos analizados (Fig. 14d).

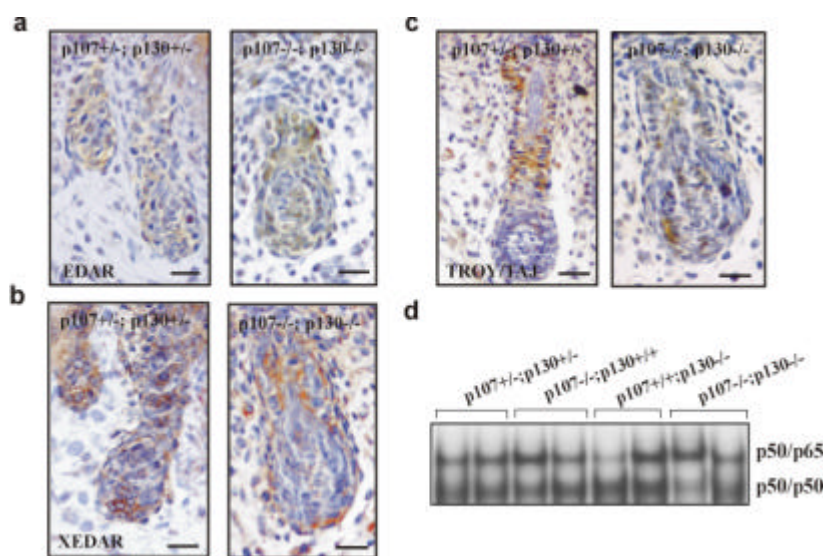


Fig. 14: Las alteraciones de los derivados ectodérmicos de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} no se deben a defectos en la vía NFκB o a la expresión de receptores de la familia TNF-α. a-c) Tinción inmunohistoquímica frente a EDAR (a), XEDAR (b) o TROY/TAJ (c) en folículos pilosos de embriones de 18,5 dpc de los genotipos representados. d) Ensayo de retardo en gel (EMSA) realizado para la detección de los complejos NFκB p50/p50 y p50/p65 en extractos proteicos obtenidos de pieles de embriones de 18,5 dpc. Barra= 50 μm.

Todos estos datos sugieren que, las alteraciones observadas en los derivados ectodérmicos de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-}, no se deben a variaciones en la expresión o localización de determinados receptores de la familia de TNF-α o a alteraciones en la actividad NFκB.

4.1.4 La formación y el desarrollo de los folículos pilosos se restaura en trasplantes de piel procedentes de animales p107^{-/-}; p130^{-/-}.

La letalidad perinatal de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} impide determinar las consecuencias fenotípicas que, la pérdida de estas dos proteínas, produce en un estado adulto en la epidermis así como en sus derivados ectodérmicos. Parte de estos problemas se pueden solventar mediante la utilización de trasplantes de piel de embriones de 18,5 dpc en animales adultos inmunodeficientes NOD/SCID. La piel embrionaria tiene una gran capacidad regeneradora, de forma que es capaz de asentarse en una matriz dérmica extraña, existente en el animal receptor, y producir una epidermis totalmente madura al cabo de pocas semanas. Mediante el uso de trasplantes se pudo analizar la evolución de la epidermis deficiente en p107 y p130 hasta un estado maduro. Para la realización de los trasplantes de piel, se utilizaron ratones NOD-SCID, los cuales, a diferencia de los ratones *nu/nu*, otro modelo animal inmunodeficiente (Nehls y cols., 1994), carecen de alteraciones génicas que repercutan en el desarrollo del pelo. Los ratones *nu/nu* tienen una mutación en el gen *Whn*, que codifica para un factor de transcripción (FoxN1), que impide el correcto desarrollo de las células del timo así como de los folículos pilosos (Nehls y cols., 1994).

Se realizaron trasplantes de piel embrionaria de animales p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-} en animales NOD/SCID en zonas en las que previamente se había eliminado la piel del animal receptor (ver Materiales y Métodos). Alrededor de dos a cuatro semanas después la operación, se observó la formación de pelo en los trasplantes procedentes de la piel de ambos genotipos (Fig. 15a). Todos los análisis que se describen a continuación se realizaron en la piel trasplantada donante o trasplante, región fácilmente diferenciable ya que los pelos procedentes de la piel donante, eran de color oscuro mientras que los pelos de los animales NOD/SCID eran de color blanco (Fig. 15a).

Se realizaron análisis histológicos de los trasplantes a diferentes semanas tras la realización del mismo. Cuatro semanas después del trasplante se observó que, en el caso de la piel p107^{-/-}; p130^{-/-} formada, se originó una mayoría de folículos pilosos normales sin ninguna alteración en sus capas celulares (Fig. 15c). Además, la mayoría de los bulbos anagénicos eran indistinguibles de los formados en los folículos pilosos de los trasplantes p107^{+/-}; p130^{+/-} (Fig. 15b). Estos resultados indicaban que el retraso en el desarrollo de los folículos pilosos se rescataba mediante la utilización de un trasplante de piel p107^{-/-}; p130^{-/-} a una dermis normal.

No obstante, se observó la existencia de numerosas alteraciones en los trasplantes derivados de piel p107^{-/-}; p130^{-/-}. En concreto, se detectó un aumento del número de folículos pilosos 4 semanas después de la operación, en comparación con trasplantes de animales p107^{+/-}; p130^{+/-} (Fig. 16a). Además, la epidermis interfolicular de los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} se caracterizaba por una grave hiperplasia con zonas de paraqueratosis (presencia de escamas diferenciadas que no han sufrido enucleación; Fig. 16b). Por otro lado, a pesar de la existencia de una mayoría de folículos pilosos normales, se detectaron numerosas aberraciones tales como la existencia de dos folículos compartiendo un mismo canal de salida (Fig. 16c), folículos con orientaciones anómalas (Fig. 16d), quistes foliculares (Fig. 16e) o glándulas sebáceas hiperplásicas (Fig. 16f).

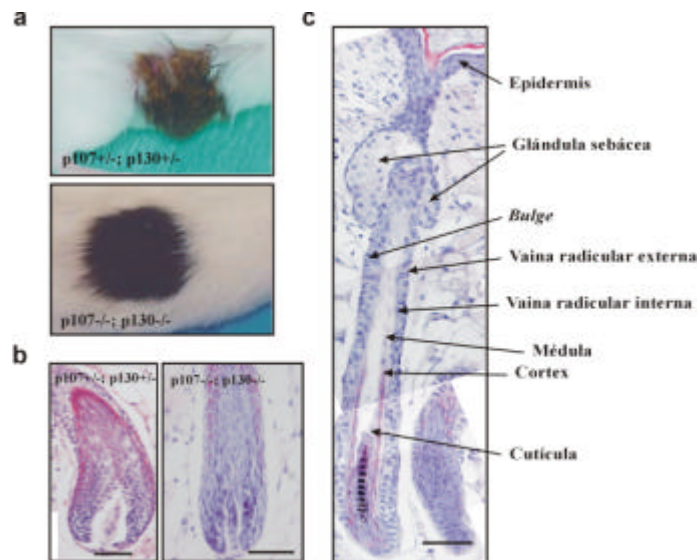


Fig. 15: Los trasplantes de piel p107^{-/-}; p130^{-/-} desarrollan una mayoría de folículos pilosos normales. a) Aspecto macroscópico de la región trasplantada 4 semanas después del trasplante de piel de los genotipos representados. b, c) Secciones histológicas teñidas con H&E de los bulbos folículares localizados en los trasplantes de los genotipos representados (b) y de un folículo tipo de un trasplante p107^{-/-}; p130^{-/-}. Barra= 150 μ m.

Además, para determinar si existían alteraciones en el ciclo del pelo se analizaron trasplantes de animales p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-} en diferentes semanas tras la operación. Se observó que, en trasplantes de 8 semanas realizados con piel procedente de animales p107^{+/-}; p130^{+/-}, los folículos pilosos se encontraban en fase de telogén (Fig. 16g). Sin embargo, en los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} la inmensa mayoría de los folículos

se encontraban todavía en anagén, resultado que confirmaba las alteraciones que, la ausencia de p107 y p130, producía en el ciclo del pelo (Fig. 16g).

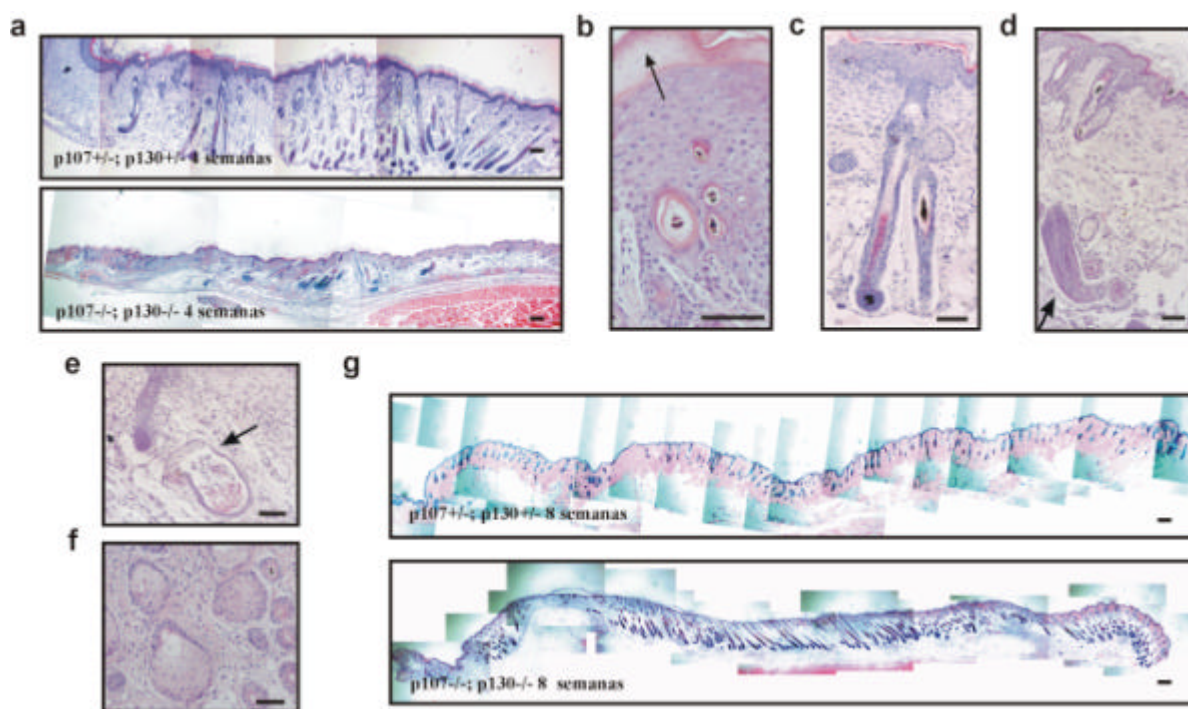


Fig. 16: Los trasplantes de piel p107^{-/-}; p130^{-/-} tienen alteraciones foliculares e interfoliculares.

a-g) Secciones histológicas teñidas con H&E de trasplantes de piel embrionaria de animales p107^{+/-}; p130^{+/-} (a,g) y p107^{-/-}; p130^{-/-} (a-g) en ratones NOD/SCID tras 4 (a-f) y 8 semanas (g) después de la operación. En los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} de 4 semanas se observaron varias alteraciones tales como hiperplasia interfolicular con paraqueratosis (b, ver flecha), folículos compartiendo un mismo canal de salida (c) o en orientaciones anómalas (d, ver flecha), quistes foliculares (e, ver flecha) o glándulas sebáceas hiperplásicas (f). Barra=150 μ m.

La morfogénesis de los folículos pilosos depende de una compleja señalización recíproca entre células epiteliales y células dérmicas mesenquimales (Hardy, 1992). Los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} tienen un menor número de folículos que además, se encuentran retrasados en su desarrollo. Sin embargo, en los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} este fenotipo se restauró (Fig. 16). Ambas proteínas, p107 y p130, se expresan en los folículos originados en los trasplantes p107^{+/-}; p130^{+/-} en diferentes capas del folículo tales como la vaina radicular externa e interna o la matriz, pero también en las células mesenquimales de la papila dérmica (Fig. 17a). Por ello, los defectos observados en los folículos de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} podrían deberse a alteraciones en cualquiera de los dos componentes, epitelial o mesenquimal. La utilización de los trasplantes como modelo,

puede ayudar a discriminar qué componente se encuentra afectado, ya que la epidermis donante del animal transgénico se coloca sobre un lecho receptor normal. En los folículos formados en los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-}, se observó que ambas proteínas, p107 y p130, se expresaban en la papila dérmica (Fig. 17b) lo que indica que los fibroblastos de la dermis receptora se organizan para formar una papila dérmica que permitirá al epitelio donante p107^{-/-}; p130^{-/-} desarrollar un folículo maduro. Estos datos sugieren que en la piel p107^{-/-}; p130^{-/-}, los defectos foliculares se deben a alteraciones en la señalización dérmica ya que la mayoría de los mismos, se restauran en presencia de una dermis normal, tal y como ocurre en los trasplantes. No obstante, la persistencia de algunos folículos aberrantes sugiere también la participación, aunque en menor medida, del componente epitelial.

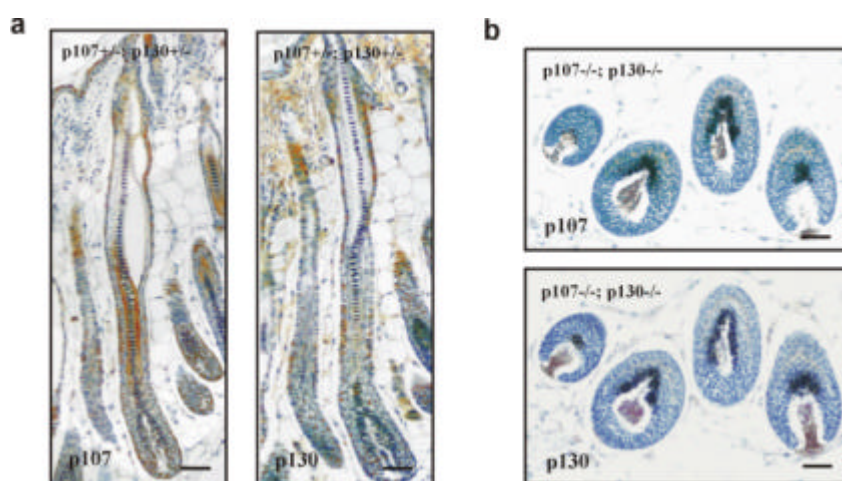


Fig. 17: Expresión de p107 y p130 en los folículos anagénicos de los trasplantes. a, b) Tinción inmunohistoquímica frente a p107 y p130 en folículos anagénicos de los trasplantes p107^{+/+}; p130^{+/+} (a) y p107^{-/-}; p130^{-/-} (b). Nótese la tinción nuclear únicamente en las células de la papila dérmica de los folículos de los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} (b) en comparación con la expresión ubicua en los folículos de los trasplantes control. Barra=100 μ m.

4.1.5 Los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} tienen alteraciones en la proliferación y diferenciación en la epidermis interfolicular.

Los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} se caracterizan por una grave hiperplasia en la epidermis interfolicular que sugiere la existencia de alteraciones en la proliferación y diferenciación. Para comprobarlo, se realizaron análisis inmunohistoquímicos de varias queratinas epiteliales (Fig. 18).

Por ejemplo, la expresión de K5, restringida a la capa basal en los trasplantes p107^{+/-}; p130^{+/-} (Fig. 18a), se encuentra expandida en capas suprabasales en los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} (Fig. 18b). La queratina K10, uniformemente expresada en las capas suprabasales de los trasplantes control, o la queratina K6 localizada en los folículos pilosos (Fig. 18a), se encontraba expresada en forma de parches en los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} o por toda la epidermis interfolicular, respectivamente (Fig. 18b). Por otro lado, se detectó expresión de la queratina K13 únicamente en los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-}, una queratina expresada en papilomas premalignos (Fig. 18a, b; Nischt y cols., 1988). Por último, la expresión de loricrina y filagrina, marcadores de diferenciación terminal, se encontró claramente disminuida y con parches en su expresión en los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} (Fig. 18a, b).

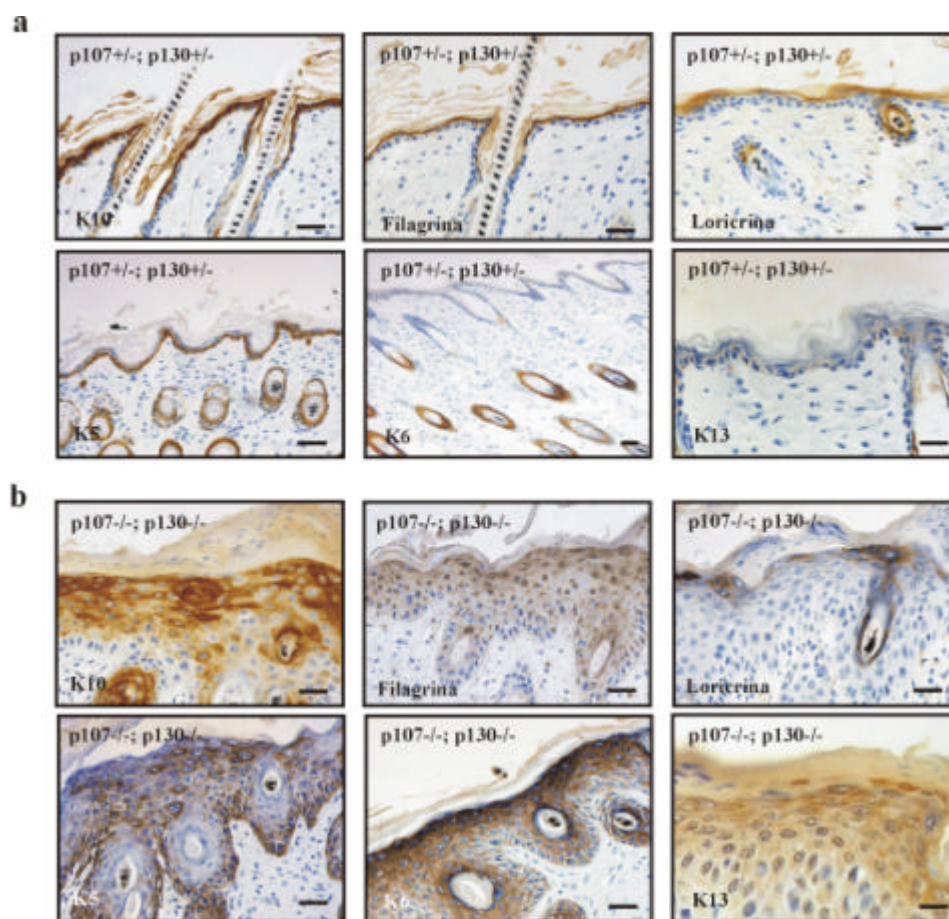


Fig. 18: Los trasplantes piel p107^{-/-}; p130^{-/-} tienen alteraciones en la diferenciación. Tinción inmunohistoquímica frente a K5, K10, K13, K6, loricrina y filagrina en los trasplantes de piel de 4 semanas p107^{+/-}; p130^{+/-}(a) y p107^{-/-}; p130^{-/-} (b) realizados en ratones NOD-SCID. Barra= 50 μ m.

Por otro lado, para estudiar el estado proliferativo de las células correspondientes a la zona del trasplante, se analizó la expresión del marcador nuclear asociado a división celular, PCNA. En los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} se observó que la mayoría de las células basales, así como los queratinocitos foliculares, expresaban PCNA (Fig. 19). Además, también se detectaron células positivas para PCNA en células suprabasales de los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} (Fig. 19, ver recuadro). Por el contrario, los trasplantes p107^{+/-}; p130^{+/-} tienen un escaso número de células positivas para la expresión de PCNA y siempre limitadas a la capa basal (Fig. 19). Este resultado es indicativo de que las células p107^{-/-}; p130^{-/-} del trasplante se encuentran proliferando muy activamente en comparación con las células del trasplante control p107^{+/-}; p130^{+/-}.

Como conclusión, todos estos datos sugieren que los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} tienen graves alteraciones en los procesos de proliferación y diferenciación.

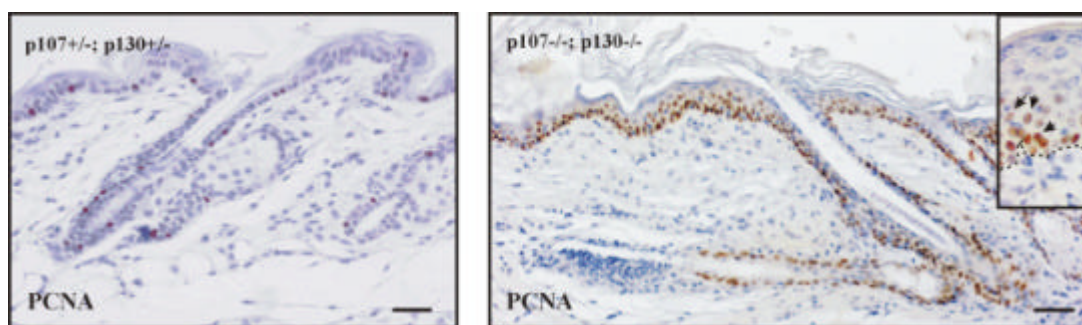


Fig. 19: Los trasplantes piel p107^{-/-}; p130^{-/-} tienen alteraciones en la proliferación. Tinción inmunohistoquímica frente al antígeno nuclear PCNA en trasplantes de piel p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-}. Localización de células positivas suprabasales en los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} (ver flechas en el recuadro). Barra= 50 μ m.

4.1.6 La expresión de determinados morfógenos se encuentra alterada en ausencia de p107 y p130.

Existen numerosas vías señalizadoras implicadas en la formación y desarrollo de los folículos pilosos. Debido a las graves alteraciones encontradas en los folículos de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} se propuso analizar alguna de estas vías. Como ya se mencionó en la introducción, la vía de Shh y la vía de Wnt se han descrito como esenciales en la morfogénesis y ciclaje folicular (Chiang y cols., 1999; Fuchs y cols., 2001; Millar, 2003; Van Mater y cols., 2003). Por ello, se analizó por *northern blot* la expresión de varios componentes de estas vías en extractos de ARN obtenidos de pieles de animales p107^{+/-};

p130^{+/-}, p107^{-/-}; p130^{+/+}, p107^{+/+}; p130^{-/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-}. No se detectaron alteraciones en la expresión de *Shh*, *b-catenina*, *Lef-1* y *Axina* en ninguno de los genotipos analizados (Fig. 20).

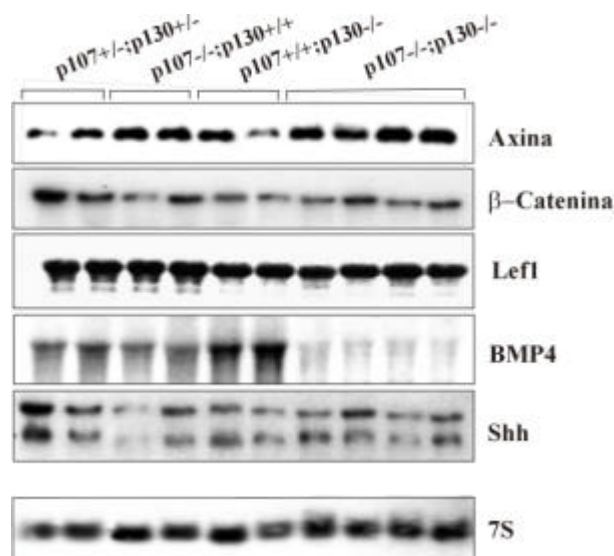


Fig. 20: La deficiencia de p107 y p130 produce una disminución en la expresión de BMP4.

Análisis de northern blot frente a *Axina*, *b-catenina*, *Lef1*, *BMP4* y *Shh* en extractos de ARN obtenidos de pieles embrionarias de 18,5 dpc de animales de los genotipos representados. La expresión del ARNr 7S se usó como control de carga.

También se ha descrito la participación de varios miembros de la superfamilia BMP/TGF β como moduladores del crecimiento folicular (Blessing y cols., 1993; Botchkarev y cols., 1999, 2001, 2002; Foitzik y cols., 1999, 2000). En concreto, se detectó una disminución considerable en la expresión por *northern blot* de BMP4 en animales p107^{-/-}; p130^{-/-} en comparación con el resto de genotipos analizados (Fig. 20). Para comprobar esta disminución, se analizó por inmunohistoquímica la expresión de BMP4 en folículos pilosos de animales p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-} (Fig. 21a). Se observó que en los folículos de animales p107^{+/-}; p130^{+/-}, la expresión de BMP4 se localizaba en la vaina radicular externa próxima a la región del bulbo del folículo, tal y como se ha descrito (Kulesa y cols., 2000; Botchkarev y cols., 2002), mientras que en los folículos deficientes en p107 y p130 no se detectó apenas proteína (Fig. 21a). En los folículos pilosos, la actividad y expresión de BMP4 es modulada por varias proteínas tales como Noggin, HGF y p75NTR (Botchkareva y cols., 1999; Botchkarev y cols., 1999, 2001, 2002; Kulesa y cols., 2000; Lindner y cols., 2000). A su vez, como

mecanismo de control, la expresión de estas proteínas también se ve regulada por BMP4. Por ello, se analizó la localización y expresión de estas moléculas en los folículos de los animales p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-}. Se observó que, aunque la expresión de p75NTR no presentaba variación, la localización y expresión de HGF y Noggin se encontraba totalmente alterada (Fig. 21b, d).

Por último, se estudió la expresión de estas proteínas en las pieles trasplantadas p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-} para determinar si existía una reversión hacia una correcta expresión, debido a la existencia de un ambiente dérmico normal, tal y como se ha mencionado anteriormente. Efectivamente, la expresión de BMP4, HGF y Noggin se restauró en los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} (Fig. 21e).

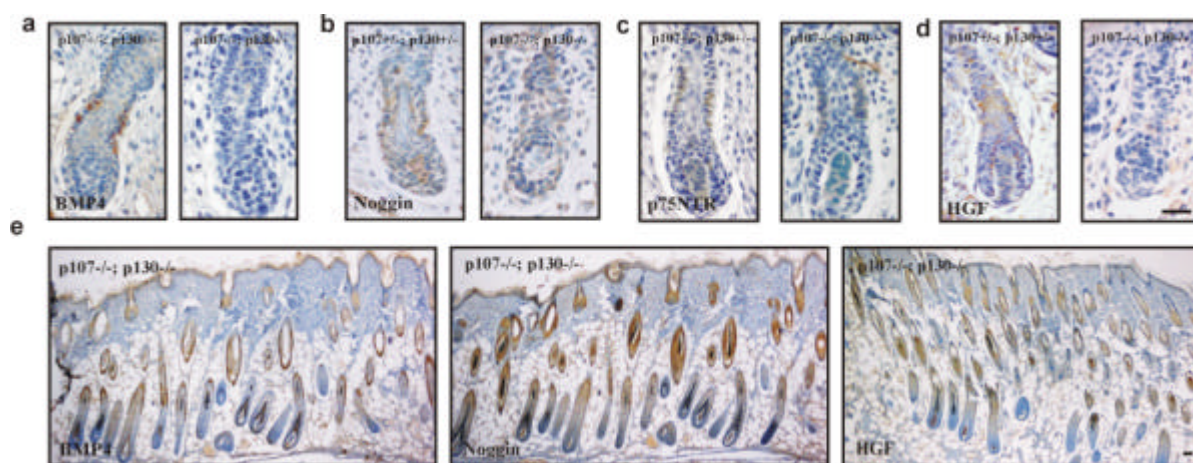


Fig. 21: La deficiencia de p107 y p130 produce alteraciones en la expresión y localización de varias proteínas foliculares. a-d) Tinción inmunohistoquímica frente a BMP4 (a, e), Noggin (b, e), p75NTR (c) y HGF (d, e) en folículos pilosos de piel embrionaria de 18,5 dpc de los genotipos representados (a-d) y en trasplantes de piel p107^{-/-}; p130^{-/-} de 4 semanas (e). Barra= 50 μ m.

Estos datos demuestran que, en ausencia de p107 y p130 se produce una alteración de la vía señalizadora de BMP4 que podría ser la responsable del fenotipo observado en los folículos de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-}.

4.1.7 La disminución en la expresión de BMP4 produce una disminución de la expresión de DN p63 en la epidermis.

p63 es uno de los miembros de la familia de proteínas de p53 que recientemente ha sido implicada en el proceso de estratificación epidérmica (Koster y cols., 2004). Se trata de un gen que transcribe para, al menos, 6 isoformas distintas algunas de las cuales

contienen un dominio de transactivación (TAp63) mientras que otras, carecen de él (Δ Np63). En la epidermis madura, las formas Δ Np63 son las predominantes (Yang y cols., 1998). Además, se ha identificado a Δ Np63, específicamente en tejidos ectodérmicos, como una de las proteínas reguladas por la señalización dependiente de BMP4 (Bakkers y cols., 2002). Por otro lado, diversos síndromes humanos que cursan con alteraciones en los folículos pilosos y los dientes se producen como resultado de mutaciones específicas en el gen de p63 (Brunner y cols., 2002a, 2002b; van Bokhoven y McKeon, 2002). Δ Np63 se encuentra expresada en las células proliferativas foliculares e interfoliculares de la epidermis mientras que desaparece de queratinocitos en diferenciación (Parsa y cols., 1999; Pellegrini y cols., 2001). Por todo ello, se analizó la expresión de Δ Np63 en la epidermis de los animales p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-} (Fig. 22). Se observó que en la piel de los animales p107^{+/-}; p130^{+/-}, la expresión de Δ Np63 se restringía a las células proliferativas de la capa basal y a las células de los folículos, siendo además, una inmunoreacción no homogénea, tal y como se encuentra descrito (Fig. 22, ver flechas; Parsa y cols., 1999; Pellegrini y cols., 2001). Sin embargo, en los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} se observó una disminución generalizada de Δ Np63 (Fig. 22). Esta menor expresión puede deberse a las alteraciones observadas en la expresión de BMP4. De hecho, como era de esperar, la expresión de Δ Np63 se restauraba en la piel p107^{-/-}; p130^{-/-} trasplantada ya que, la expresión de BMP4 también lo hace (Fig. 22).

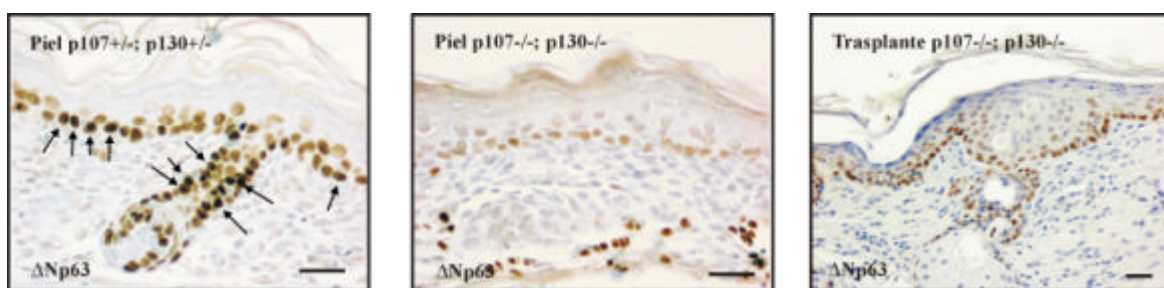


Fig. 22: La pérdida de BMP4 produce una disminución en la expresión de Δ Np63. Tinción inmunohistoquímica nuclear frente a Δ Np63 (ver flechas) en pieles embrionarias de 18,5 dpc de animales p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-} y en trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} de 4 semanas. Barra: 50 μ m.

4.2 RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA DE RETINOBLASTOMA, p107 Y p130, Y LA VÍA DE WNT EN LA EPIDERMIS.

4.2.1 La pérdida de p107 y p130 induce la localización nuclear de b-catenina en los queratinocitos de la capa basal.

La vía de transducción de señales de Wnt y, en particular, la señalización mediada por β -catenina son esenciales en la morfogénesis y ciclaje de los folículos pilosos (Gat y cols., 1998; Fuchs y cols., 2001; Huelsken y cols., 2001; Millar, 2003) así como en la regulación de la expresión de BMP4 (Baker y cols., 1999; Huelsken y cols., 2001; Laurikkala y cols., 2002). Por ello, se analizó la expresión y localización de β -catenina en la piel de los animales p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-}. Se comprobó, tal y como se encuentra descrito (DasGupta y Fuchs, 1999; Zhu y Watt, 1999; Merrill y cols., 2001), que β -catenina se localiza acomplejada en los desmosomas localizados en las células suprabasales de la epidermis, así como en el núcleo de las células de la matriz folicular de los animales p107^{+/-}; p130^{+/-} (Fig. 23a). Sin embargo, aunque la localización nuclear de β -catenina en los folículos y capas suprabasales de la epidermis deficiente en p107 y p130 era similar a la observada en los animales controles, también se detectó la presencia de β -catenina nuclear en los queratinocitos de la capa basal, siendo anómala esta localización (Fig. 23a).

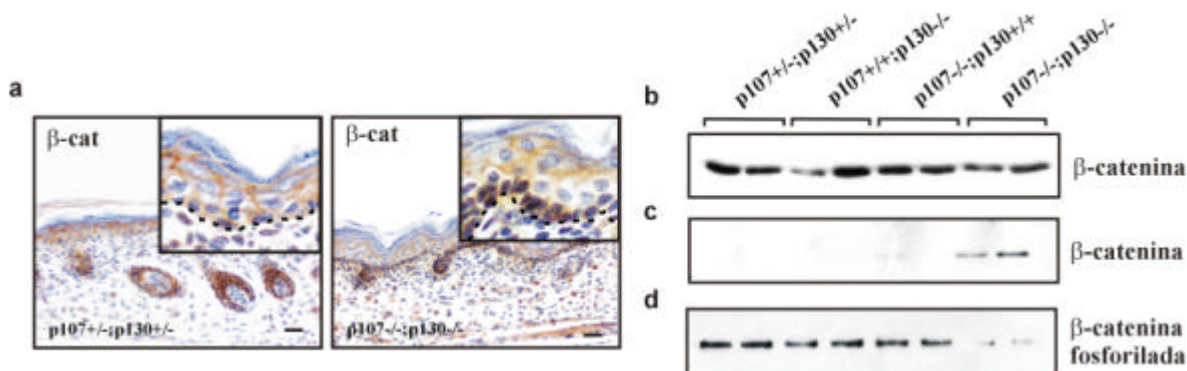


Fig. 23: La pérdida de p107 y p130 induce la acumulación nuclear de b-catenina en los queratinocitos basales. a) Tinción inmunohistoquímica frente a **b-catenina** en la piel de embriones p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-} de 18,5 dpc. Nótese en los recuadros ampliados la tinción nuclear de **b-catenina** en ausencia de p107 y p130. b, c) Análisis de western blot frente a **b-catenina** en extractos de piel totales (b) o en co-precipitados de **b-catenina** mediante el fragmento de E-cadherina (c) de animales con los genotipos representados. d) Análisis de western blot frente a formas fosforiladas de **b-catenina** en los mismos extractos proteicos mencionados. Barra= 50 μ m.

La expresión y localización de β -catenina en los folículos deficientes en p107 y p130 es normal y no parece ser responsable del desarrollo retrasado de los mismos. Aún así, dada la importancia de β -catenina en la aparición de ciertos tumores foliculares así como en la homeostasis de la epidermis (Gat y cols., 1998; Chan y cols., 1999; Huelsken y cols., 2001), se estudiaron con detalle los mecanismos responsables de la aparición de β -catenina en el núcleo de los queratinocitos basales de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-}. Entre dichos mecanismos, la activación por la vía de Wnt es la predominante. En ausencia de proteínas Wnt, la forma citoplásmica de β -catenina forma un complejo con Axina y el supresor tumoral APC para inducir la fosforilación mediada por GSK3 β . La forma fosforilada de β -catenina es reconocida por una proteína, Slimb/ β TrcP, la cuál la lleva a degradación mediante ubiquitinación. Por el contrario, la señalización mediada por Wnt promueve el desplazamiento de Axina y β -catenina de los complejos formados por GSK3 β impidiendo su degradación. Así, puede penetrar al núcleo y mediante la unión a factores de transcripción de la familia TCF/Lef1, activar la transcripción de determinados genes (revisado en Cadigan y Nusse, 1997; Wodarz y Nusse, 1998; Eastman y Grosschedl, 1999). Por ello, con el objetivo de determinar si este cambio de localización iba acompañado de una variación en la cantidad total de β -catenina existente en la piel, se realizaron análisis de *western* y *northern blot* en extractos de piel de animales deficientes en p107 y/o p130. Sin embargo, no se observaron variaciones en la expresión de proteína total de β -catenina (Fig. 23b) ni se detectaron cambios en la expresión de ARNm (Fig. 20) en ningún caso. Por otro lado, se comprobó que, en ausencia de p107 y p130, existía efectivamente un aumento en la localización nuclear de β -catenina. Para ello, se incubaron los anteriores extractos de piel con un fragmento citoplásmico de E-cadherina fusionado con la proteína GST, capaz de unir la β -catenina no asociada a los complejos de adhesión celular. Posteriormente, se realizó una reacción de co-precipitación frente a la proteína GST, utilizando para ello glutatión-agarosa, y se analizó por *western blot* la presencia de β -catenina. Únicamente se detectó β -catenina libre no complejada o nuclear, en los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} (Fig. 23c). Si en ausencia de p107 y p130 realmente se produce una acumulación nuclear de β -catenina, esto indicaría que existe una menor degradación de la misma, permitiendo así su entrada al núcleo y su posterior activación transcripcional. De hecho, la cantidad de β -catenina fosforilada, es decir, la forma proteica que será degradada, es menor en los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} en comparación con el resto de genotipos analizados (Fig. 23d).

Estos datos sugieren que la ausencia de p107 y p130 en la epidermis produce una inhibición en la vía de degradación de β -catenina permitiendo su entrada al núcleo de los queratinocitos basales. Sin embargo, en los folículos no parecen existir alteraciones ni en la expresión ni en la localización de β -catenina.

4.2.2 La localización nuclear de β -catenina es debida a la sobreexpresión de Frat.

Con el objetivo de determinar qué mecanismos producían la acumulación nuclear de esta proteína, se analizaron por *western blot*, la expresión de varias proteínas implicadas en la vía de Wnt/ β -catenina. Por un lado, se ha descrito que la serina/treonina quinasa AKT/PKB puede fosforilar y, por tanto, inhibir a GSK3 β (revisado en Datta y cols., 1999). Para comprobar si la actividad de AKT/PKB se encontraba alterada en ausencia de p107 y p130 se analizó, por un lado, su expresión por *western blot* y, por otro, su actividad medida a través de un ensayo quinasa realizado mediante inmunoprecipitación de la proteína y posterior incubación con un sustrato específico (H2B). Sin embargo, no se detectaron variaciones ni en su expresión ni en la actividad AKT/PKB, independientemente del genotipo analizado (Fig. 24a). Por otro lado, la disminución observada en la fosforilación de β -catenina (Fig. 23c) indicaría que la actividad de GSK3 β , la quinasa que conduce a la degradación de β -catenina mediante fosforilación, podría encontrarse alterada. Por ello, se analizó de forma similar a la realizada con AKT/PKB, un ensayo quinasa para medir la actividad de GSK3 β sobre un sustrato específico (GS-1), observando del mismo modo la ausencia de alteraciones en la expresión y actividad de dicha proteína (Fig. 24b). Además, se analizó por *western blot* la expresión de determinadas proteínas implicadas en la vía de Wnt, no detectando variaciones en β -catenina (Fig. 23b), Axina, Slimb/ β TrcP o GSK3 β (Fig. 24c). Sin embargo, se detectó un incremento en la expresión de Frat (Fig. 24c), una proteína clonada en mamíferos por su actividad oncogénica en linfocitos T (Jonkers y cols., 1997) e identificada en *Xenopus* por su capacidad de unión e inactivación a GSK3 β (Yost y cols., 1998).

La proteína Frat lleva su acción mediante la rotura de los complejos GSK3 β /Axina/ β -catenina uniéndose a GSK3 β y desplazando al resto de los componentes del complejo, permitiendo por tanto, la estabilización de β -catenina y su actividad transcripcional (Li y cols., 1999; Thomas y cols., 1999). Además, la formación del complejo GSK3 β /Frat no impide su actividad sobre determinados sustratos como GS-1

(Fig. 24b) pero sí sobre otros como la β -catenina (Fig. 22b; Li y cols., 1999; Thomas y cols., 1999). Para analizar los complejos existentes en la epidermis de los animales deficientes en p107 y/o p130, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación frente a GSK3 β en extractos de piel seguidos de *western blot* para detectar todos los componentes de los complejos. En los animales p107 $^{+/-}$; p130 $^{+/-}$, p107 $^{+/+}$; p130 $^{-/-}$ y p107 $^{-/-}$; p130 $^{+/+}$ se detectó la existencia de los complejos GSK3 β /Axina/ β -catenina (Fig. 24d). Sin embargo, en los animales p107 $^{-/-}$; p130 $^{-/-}$ se detectaron mayoritariamente los complejos GSK3 β /Frat, mientras que β -catenina se encontraba libre de sufrir la degradación proteolítica mediada por GSK3 β (Fig. 24d).

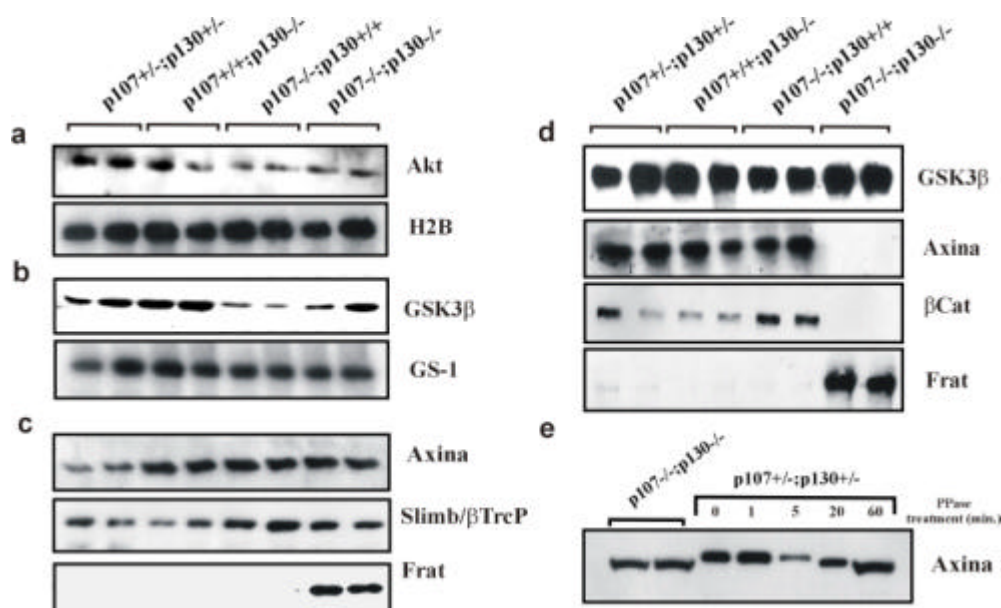


Fig. 24: La localización nuclear de β -catenina es debida a la sobreexpresión de Frat. a, b) Análisis de *western blot* en extractos de piel de embriones p107 $^{+/-}$; p130 $^{+/-}$, p107 $^{+/+}$; p130 $^{-/-}$, p107 $^{-/-}$; p130 $^{+/+}$ y p107 $^{-/-}$; p130 $^{-/-}$ de 18,5 dpc frente a AKT/PKB (a) o GSK3 β (b) junto a sus respectivas actividades quinasas realizadas mediante la inmunoprecipitación de AKT/PKB (a) o GSK3 β (b) y su correspondiente incubación con los sustratos H2B (a) o GS-1 (b). c) Análisis de *western blot* frente a Axina, Slimb/ β TrcP y Frat en los mismos extractos. d) Análisis de inmunoprecipitación frente a GSK3 β y posterior *western blot* frente a GSK3 β , Axina, β -catenina y Frat en los mismos extractos anteriormente mencionados. e) Análisis del estado de fosforilación de Axina detectado mediante la diferente movilidad electroforética en gel de acrilamida. El tratamiento con fosfatasa se realizó para comprobar la fosforilación de la Axina procedente de los extractos de los animales p107 $^{+/-}$; p130 $^{+/-}$.

Por último, para demostrar que la actividad de GSK3 β se encontraba inhibida sobre los componentes de la vía de Wnt, se analizó el grado de fosforilación de Axina, ya

que la expresión de Frat bloquea la fosforilación dependiente de GSK3 β de la misma (Thomas y cols., 1999; Willert y cols., 1999). La fosforilación de Axina se pudo analizar mediante la diferente movilidad electroforética de las formas fosforilada y defosforilada en un gel de acrilamida (Willert y cols., 1999). Se observó que la Axina presente en los animales p107 $^{-/-}$; p130 $^{-/-}$ migraba más rápido que la de los animales p107 $^{+/-}$; p130 $^{+/-}$ (Fig. 24e). Además, el tratamiento con fosfatasa de los extractos derivados de los animales p107 $^{+/-}$; p130 $^{+/-}$ cambiaba la movilidad de la Axina hasta hacerla comparable a la de los animales p107 $^{-/-}$; p130 $^{-/-}$ (Fig. 24e). Estos datos sugieren que la fosforilación de Axina mediada por GSK3 β se encuentra impedida en ausencia de p107 y p130.

4.2.3 La sobreexpresión de Frat1 es suficiente para inducir la localización nuclear de β -catenina.

Una vez demostrada la participación de Frat en la inducción de la localización nuclear de β -catenina, era necesario determinar su expresión y localización en la epidermis. Para ello, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas frente a Frat en la epidermis de embriones p107 $^{+/-}$; p130 $^{+/-}$ y p107 $^{-/-}$; p130 $^{-/-}$ de 18,5 dpc. Se observó que en la piel de los animales heterocigotos, la expresión de Frat se restringía a algunas células de la parte inferior de la vaina radicular externa del folículo (Fig. 25a). Sin embargo, en los animales p107 $^{-/-}$; p130 $^{-/-}$ la expresión de Frat se localizaba por todas las capas de la epidermis, con mayor intensidad en la capa basal, y en las células de los folículos pilosos (Fig. 25a).

La expresión de Frat y la localización nuclear de β -catenina nos llevó a cuestionar si la expresión de Frat era realmente la responsable de esta localización nuclear. Para ello, se hicieron infecciones retrovirales en cultivos de queratinocitos expresando la proteína Frat1, una de las tres isoformas de Frat en ratón, y una forma de Frat1 mutante en la que el dominio de unión a GSK3 β se había delecionado (Frat Δ GBD) y se analizó por inmunofluorescencia la localización de β -catenina. En los queratinocitos infectados con la forma de Frat mutante, Frat Δ GBD, se observó que β -catenina se localizaba fundamentalmente en la membrana plasmática asociada a los complejos de adhesión aunque se podía localizar alguna célula con presencia nuclear de la misma (Fig. 25b). Por el contrario, la expresión en queratinocitos de la forma salvaje de Frat inducía una localización mayoritaria de β -catenina en el núcleo de los mismos (Fig. 25b; ver flechas).

Por último, se determinó si la translocación nuclear de β -catenina era capaz de activar la transcripción mediada por los factores de transcripción TCF/Lef1. Para ello, se realizó un ensayo de actividad de promotor con un plásmido de respuesta a β -catenina/Lef1 (TOPFlash) o su forma mutante (FOPFlash) acoplado a la enzima luciferasa, en queratinocitos en los que se transfectaron los plásmidos de expresión correspondientes a Frat1, Frat1 Δ GBD, o un plásmido irrelevante como pcDNA3 (Fig. 25c). Además, se cotrasfectó Lef1 ya que su expresión es necesaria para detectar actividad transcripcional del promotor. Se observó que Frat inducía la activación del plásmido informador, indicativa de la actividad β -catenina/Lef1, mientras que la forma Frat Δ GBD lo inducía en menor manera (Fig. 25c). En ningún caso se observó actividad con el plásmido informador mutante FOPFlash (Fig. 25c).

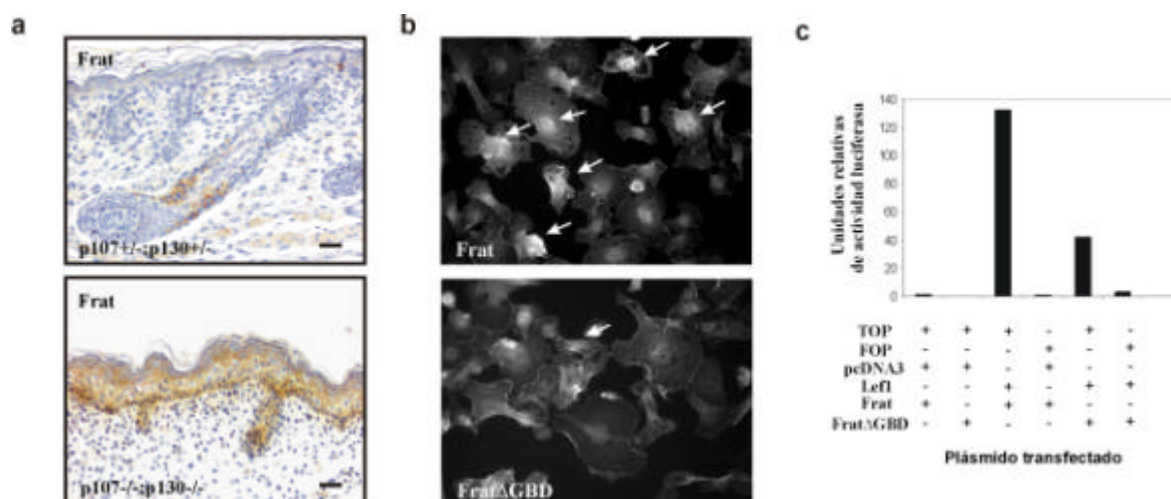


Fig. 25: La sobreexpresión de Frat es suficiente para inducir actividad transcripcional de β -catenina. a) Tinción inmunohistoquímica frente a Frat en la piel de embriones p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-} de 18,5 dpc. b) Tinción inmunofluorescente frente a β -catenina en queratinocitos infectados con retrovirus codificantes para Frat o Frat Δ GBD. Nótese la presencia de tinción nuclear de forma predominante en las células que expresan Frat (ver flechas). c) Ensayo de actividad de la secuencia de respuesta a β -catenina/Lef1 (TOPFlash) o de la secuencia mutante (FOPFlash) en condiciones en las que se expresan mediante plásmidos las proteínas mencionadas. Barra= 50 nm.

Estos datos sugieren que la pérdida de p107 y p130 induce la expresión de Frat, la cuál es responsable de la localización nuclear de β -catenina en los queratinocitos basales de la epidermis de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-}.

4.2.4 La expresión y localización de b-catenina y Frat se restaura en los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-}.

Como se ha descrito anteriormente, en la piel p107^{-/-}; p130^{-/-} trasplantada en ratones inmunodeficientes NOD/SCID sobre un lecho dérmico normal, se restauraba el desarrollo folicular (Fig. 14) si bien se observó un gran número de folículos aberrantes así como alteraciones en el ciclaje de los mismos (Fig. 16). Estos resultados sugerían también la existencia de alteraciones en el compartimento epitelial. Por ello, se analizó la expresión de β -catenina y Frat en los trasplantes de piel p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-} (Fig. 26). Se observó que, contrariamente a lo que ocurría en la epidermis de los animales deficientes en p107 y p130 (Fig. 26), los trasplantes deficientes en p107 y p130 presentaban una localización de Frat restringida a células de la parte media de la vaina radicular externa (Fig. 26a), de forma similar a como ocurría en los trasplantes control p107^{+/-}; p130^{+/-} (Fig. 26a). Del mismo modo, la expresión nuclear de β -catenina en los queratinocitos de la capa basal en la epidermis p107^{-/-}; p130^{-/-} desaparecía en los trasplantes del mismo genotipo, adquiriendo un patrón de expresión normal y restringido a los complejos de adhesión de las células suprabasales (Fig. 26b).

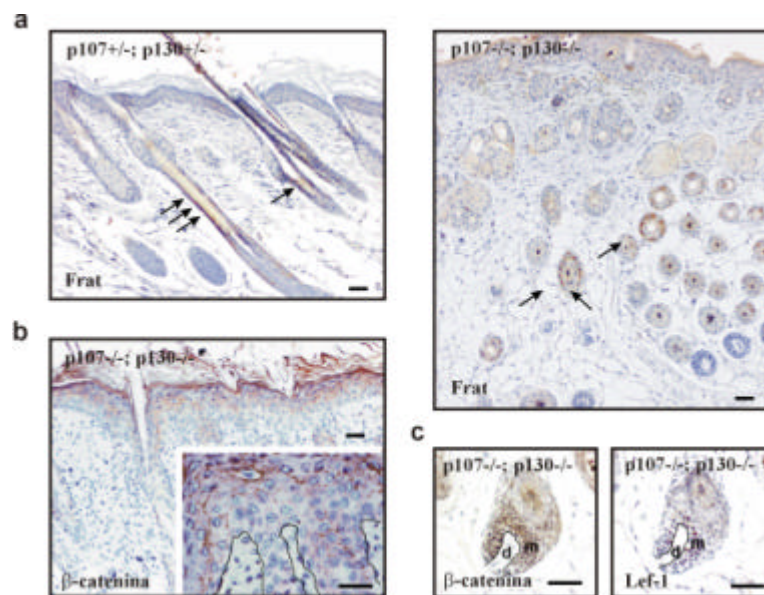


Fig. 26: La expresión de Frat y b-catenina se normaliza en los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-}. **a, b,** **c**) Tinción inmunohistoquímica frente a Frat (**a**), **b**-catenina (**b, c**) y Lef-1 (**c**) en trasplantes p107^{+/-}; p130^{+/-} y p107^{-/-}; p130^{-/-}, 4 semanas después de la operación. Las flechas indican los queratinocitos que expresan Frat en **a**). Nótese la tinción nuclear de **b**-catenina y Lef-1 en el núcleo de las células de la matriz folicular. Barra= 50 μ m.

Por último, se comprobó que la expresión de β -catenina y Lef1 en la matriz de los folículos aberrantes también presentaba una expresión normal (Fig. 26c), tal y como se encuentra descrito (DasGupta y Fuchs, 1999; Zhu y Watt, 1999; Merrill y cols., 2001).

Estos datos sugieren que las alteraciones observadas en los folículos pilosos así como en la epidermis de los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-}, no son debidas a cambios en la expresión y localización de β -catenina y Frat.

4.3 COMPENSACIÓN FUNCIONAL DE pRb, MEDIADA POR p107, EN LA PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y MORFOGÉNESIS EPIDÉRMICAS.

4.3.1 Inactivación condicional de pRb en epitelios estratificados.

La inactivación funcional de *Rb* se consiguió mediante la utilización de un modelo animal, generado previamente, en el que se introdujeron dos secuencias *LoxP* en el gen de *Rb* (Fig. 27; Marino y cols., 2000; Vooijs y cols., 2002). Dichas secuencias se encuentran flanqueando el exón 19 el cuál codifica para una parte del subdominio B, región esencial para la funcionalidad de la proteína (Fig. 27; alelo Rb^{F19}). La delección generalizada de este exón mediante el uso de animales transgénicos que sobreexpresan de manera ubicua la recombinasa Cre (animales transgénicos Actina-Cre; Vooijs y cols., 2002), produce un fenotipo y predispone a la formación tumoral de forma similar a como ocurre con los animales $Rb^{-/-}$ y $Rb^{+/-}$, respectivamente (Clarke y cols., 1992; Jacks y cols., 1992; Lee y cols., 1992). Por ello, el alelo de *Rb* con el exón 19 deleccionado (Fig. 27; $Rb^{\Delta 19}$) se comporta de forma similar al alelo de *Rb* inactivado de manera convencional. El animal transgénico $Rb^{F19/F19}$ se ha utilizado con éxito en el desarrollo de modelos animales deficientes de tipo condicional en otros tejidos (Marino y cols., 2000; Vooijs y cols., 2002; Ferguson y cols., 2002).

Para dirigir la expresión de Cre e inducir la pérdida de pRb en epidermis se utilizó el promotor de la queratina K14 (*K14Cre*) (Fig. 28a; Jonkers y cols., 2001). La queratina K14 se expresa muy activamente en las células basales de los epitelios estratificados (Byrne y cols., 1994). Además, la expresión de Cre dirigida por el promotor de K14 no produce ningún efecto fenotípico en la epidermis (Jonkers y cols., 2001).

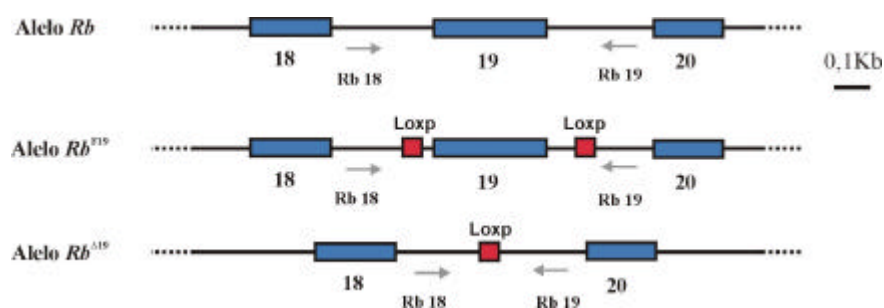


Fig. 27: Inactivación funcional del gen *Rb* a) Representación esquemática del alelo *Rb*, del alelo *Rb* con las secuencias *LoxP* introducidas a ambos lados del exón 19 (Rb^{F19}) y del alelo de *Rb* deleccionado mediante la acción de la recombinasa Cre ($Rb^{\Delta 19}$). *Rb18* y *Rb19* se corresponden con los oligonucleótidos usados para realizar, mediante PCR, el genotipado de los animales.

La recombinación mediada por Cre se puede visualizar *in vivo* de una manera sencilla. Así, se puede determinar si la expresión de la recombinasa Cre y, por tanto, la recombinación mediada por la misma, ocurre en los tejidos esperados. Para ello, se utiliza un modelo animal informador (ROSA26R) en el que la expresión del gen de la β -galactosidasa bacteriana se expresa de forma condicional bajo el control del promotor ubicuo ROSA-26 (Fig. 28b; Soriano, 1999). Si no existe recombinación, el gen LacZ no se expresa debido a la interferencia que existe con el gen que codifica para la resistencia a neomicina localizado entre el promotor y el gen de LacZ (Fig. 28b). Sin embargo, cuando existe recombinación, la región PGK-neo comprendida entre las secuencias LoxP desaparece permitiendo así la expresión de la β -galactosidasa.

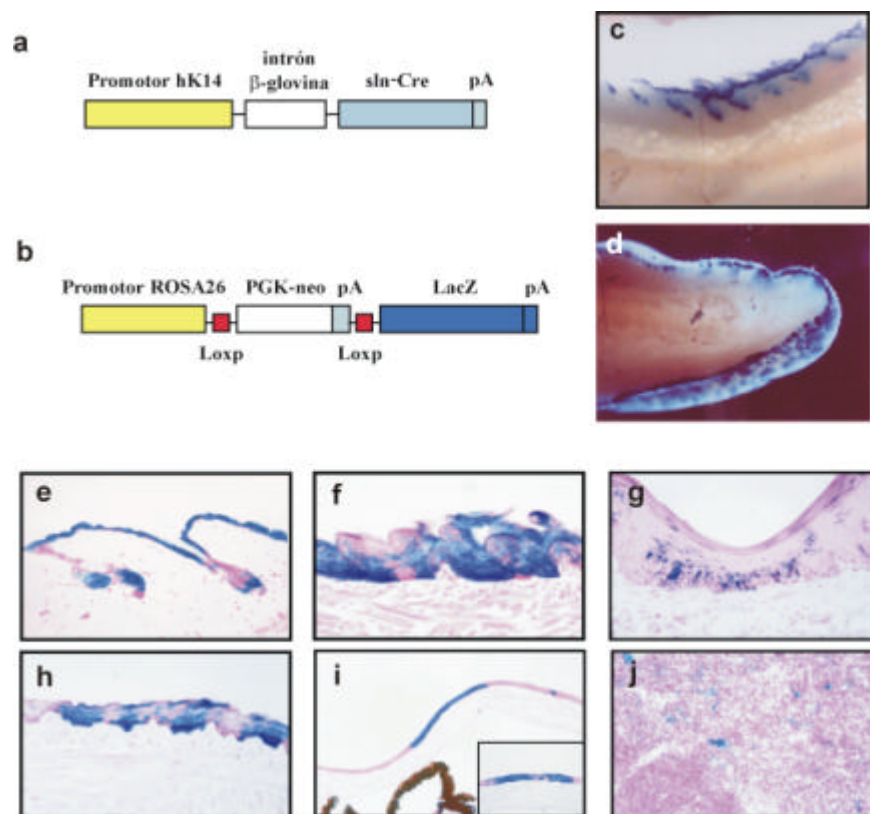


Fig. 28: Visualización de la actividad recombinasa Cre dirigida por el promotor humano de la queratina K14. a) Representación esquemática del transgén utilizado para la generación de los animales K14Cre (*sln*: secuencia de localización nuclear; pA: secuencia de poliadenilación). b) Representación esquemática de la construcción utilizada para la generación del animal informador de la actividad recombinasa Cre (PGK-neo: gen de resistencia a neomicina dirigido por el promotor PGK). c-j) Tinción X-gal (azul) para la detección de la actividad β -galactosidasa en tejidos enteros tales como la piel (c) y la lengua (d) o bien en cortes histológicos de piel (e), lengua (f), paladar duro (g), paladar blando (h), córnea (i) y timo (j) de los animales ROSA26R:K14Cre.

Para comprobar que la expresión de Cre dirigida por el promotor de la queratina K14 se realizaba correctamente, se obtuvieron animales doble transgénicos ROSA26R:K14Cre y se analizó la expresión de la β -galactosidasa mediante una tinción X-Gal. Por un lado, se realizaron tinciones de órganos enteros, concretamente, de la piel y la lengua, tejidos donde típicamente se expresa K14 y por tanto, la recombinasa Cre (Fig. 28c y d respectivamente). Tanto en los epitelios estratificados de la piel (epidermis interfolicular y folicular) como de la lengua, se detectó la coloración azul producida por la reacción enzimática catalizada por la β -galactosidasa. Por otro lado, se hicieron cortes por congelación de diversos tejidos para analizar con más detalle la tinción X-Gal. Todos los tejidos que presentan expresión de la queratina K14 tales como la epidermis (Fig. 28e), el epitelio estratificado de la lengua (Fig. 28f), el paladar duro (Fig. 28g), el paladar blando (Fig. 28h), la córnea (Fig. 28i) o las células epiteliales del timo (Fig. 28j) presentan actividad β -galactosidasa, hecho revelador de la existencia de recombinación. No se observó tinción alguna en tejidos donde no hay expresión de K14 *in vivo* como en la dermis (Fig. 28e).

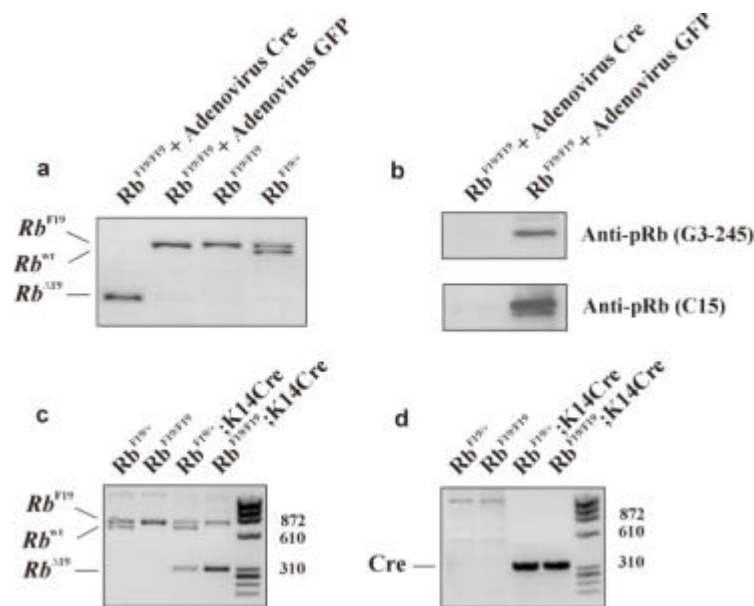


Fig. 29: La expresión de Cre induce la recombinación específica del alelo Rb^{F19} en queratinocitos *in vivo* e *in vitro*. a) Análisis de PCR del alelo de Rb a partir de ADN genómico obtenido de cultivos primarios de queratinocitos infectados con adenovirus codificantes para Cre o para GFP, demostrando así la recombinación específica en presencia de la recombinasa. b) Western blot de extractos de proteínas obtenidos de los cultivos antes mencionados. G3-245 y C15 son dos clones de anticuerpos dirigidos contra los extremos amino y carboxi-terminal de pRb, respectivamente. c, d) Análisis de PCR del alelo de Rb (c) y Cre (d) con ADN genómico obtenido de las colas de los animales con los genotipos representados.

Con el objetivo de determinar si la recombinación del alelo Rb^{F19} en queratinocitos es efectiva, se realizaron infecciones de cultivos primarios de queratinocitos procedentes de animales $Rb^{F19/F19}$ con un adenovirus que codifica para la recombinasa Cre. Mediante amplificación selectiva de la zona del exón 19 por PCR (ver oligonucleótidos Rb18 y Rb19 en Fig. 27) se observó una recombinación muy efectiva mediada por Cre en dicho alelo (Fig. 29a). En los mismos cultivos primarios infectados con un adenovirus codificante para GFP, así como en queratinocitos obtenidos de animales $Rb^{F19/+}$ o $Rb^{F19/F19}$, no se observó amplificación de la banda correspondiente al alelo deleciónado $Rb^{\Delta 19}$ (Fig. 29a). Además, para conocer si dicha recombinación producía la pérdida de la proteína de pRb, se realizaron análisis de *western blot* en extractos proteicos obtenidos de los cultivos primarios infectados con los correspondientes adenovirus. Se utilizaron dos anticuerpos dirigidos frente a las regiones carboxi-terminal y amino-terminal de pRb demostrando que la proteína pRb $^{\Delta 19}$ (o el ARNm) es inestable y, por tanto, no se expresa la proteína (Fig. 29b).

Para producir la deleción específica de *Rb* en epidermis, se cruzaron los animales $Rb^{F19/F19}$ con los animales transgénicos *K14Cre*. La presencia de los alelos Rb^{F19} , Rb^{wt} o el alelo deleciónado $Rb^{\Delta 19}$ se determinó mediante análisis por PCR del ADN genómico obtenido de la cola del animal en los diferentes genotipos resultantes (Fig. 29c). Del mismo modo, mediante PCR se genotiparon los animales transgénicos *K14Cre* (Fig. 29d). Únicamente se detectó el alelo $Rb^{\Delta 19}$ en los animales que eran transgénicos para la recombinasa Cre (Fig. 29c, d). Por tanto, se concluyó que la recombinación también ocurría *in vivo* de una forma similar a la observada *in vitro* siendo además totalmente dependiente de la presencia de Cre.

Para determinar si la expresión de Cre en la epidermis inducía la pérdida de la proteína de pRb se prepararon extractos proteicos de queratinocitos primarios obtenidos de animales recién nacidos $Rb^{F19/F19}$ y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ y se analizó por *western blot* la presencia de la misma. Mientras que los queratinocitos derivados de los animales $Rb^{F19/F19}$ expresan niveles normales de pRb, los queratinocitos $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ carecían totalmente de la proteína (Fig. 30). Además, también se analizaron por *western blot* la expresión de los otros dos miembros de la familia de retinoblastoma (p107 y p130). Se observó que, en ausencia de pRb, se producía un aumento en la expresión de p107 pero no de p130 (Fig. 30). El aumento del ARNm de *p107* ha sido descrito en células deficientes en *Rb* (Dannenbergh y cols., 2000; Hurford y cols., 1997) sugiriendo la

existencia de compensación funcional entre los diferentes miembros de la familia de retinoblastoma. En este caso, p107 puede adquirir funciones que normalmente realiza pRb. Por ello, para determinar si p107 realiza una función compensatoria como respuesta a la pérdida de pRb *in vivo*, se cruzaron los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ con animales deficientes en $p107$ para obtener transgénicos $Rb^{F19/F19}; p107+/-; K14Cre$ y $Rb^{F19/F19}; p107-/-; K14Cre$. Los animales $p107+/-$ y $p107-/-$ carecen de fenotipo epidérmico (Fig. 10) así como los queratinocitos obtenidos de los mismos se comportan de forma normal (Ruiz y cols., 2003). Esto demuestra que, en ausencia de p107, pRb o p130 asumen toda la funcionalidad de p107.

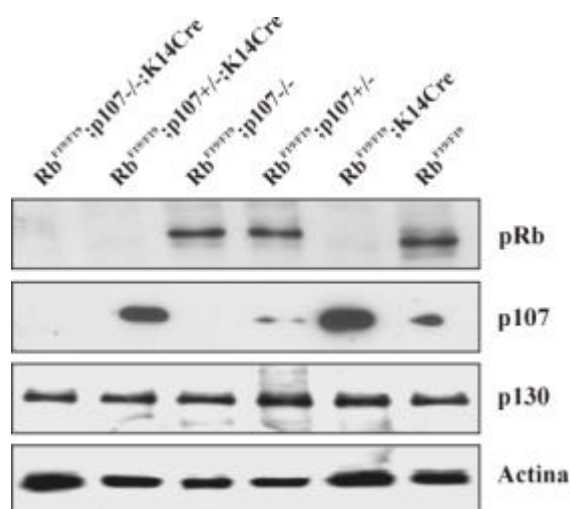


Fig. 30: La pérdida de pRb en queratinocitos induce un aumento en la expresión de p107, pero no de p130. Análisis de western blot de los diferentes miembros de la familia de retinoblastoma en extractos obtenidos de cultivos de queratinocitos de los genotipos representados. La inmunodetección de actina se usó como control de carga.

Los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ se cruzaron con animales $p107-/-$ en los que el gen de $p107$ se encuentra intercalado por la secuencia codificadora de LacZ (Fig. 31a; Robanus-Maandag y cols., 1998). Ambos alelos, $p107^{wt}$ y $p107^{mut}$, se detectaron mediante reacción de PCR (ver localización de oligonucleótidos en Fig. 31a, b). Mediante análisis por *western blot* de extractos obtenidos de queratinocitos de los diferentes genotipos se determinó que p107 se reduce drásticamente en los animales $p107+/-$ y, como era de esperar, desaparece completamente en los $p107-/-$ (Fig. 30). Por otro lado, en los queratinocitos $Rb^{F19/F19}; p107+/-; K14Cre$ también se observó un incremento en la expresión de p107, aunque de menor magnitud que en los $Rb^{F19/F19}; K14Cre$, inducido por la pérdida de pRb (Fig. 30). Sin embargo, en ninguno de todos los genotipos

anteriormente mencionados se induce la expresión de p130 o la de pRb, en su caso correspondiente (Figs. 10 y 30). Esto sugeriría que posiblemente p130 no compense ninguna de las funciones llevadas a cabo por pRb y en su caso, p107 en la epidermis. Al menos, si existe algún tipo de compensación funcional, no es debida al aumento de expresión de p130.

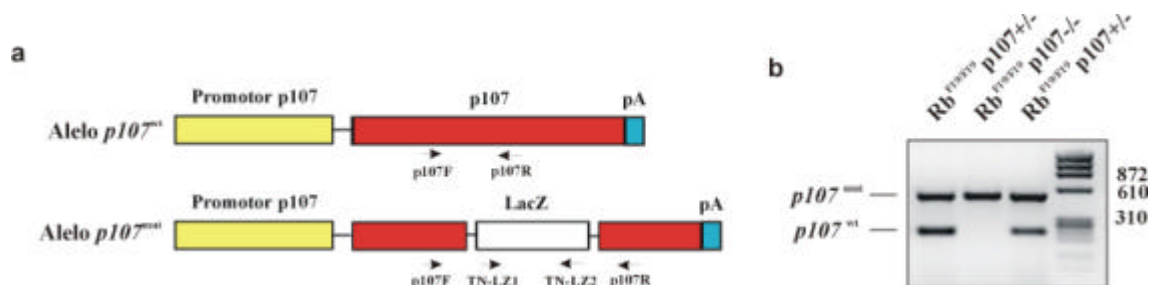


Fig. 31: Descripción de los animales deficientes en p107. a) Representación esquemática del alelo $p107^{wt}$ y del alelo $p107^{mut}$ al que se le ha introducido la secuencia génica de la β -galactosidasa (LacZ) con el objetivo de impedir su correcta expresión. TN-LZ1, TN-LZ2, p107F y p107R son los oligonucleótidos utilizados para la detección, mediante PCR, del gen de LacZ y del alelo p107. b) Análisis de PCR del alelo de p107 con ADN genómico obtenido de las colas de los animales con los genotipos representados.

4.3.2 Consecuencias fenotípicas de la pérdida de pRb y/o p107 en la epidermis.

La introducción de las secuencias LoxP en los intrones que flanquean al exón 19 de *Rb* no conllevan, como era de esperar, a la aparición de ningún cambio fenotípico (Vooijs y cols., 2002). Los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ nacen en la frecuencia mendeliana esperada y son indistinguibles en el momento del nacimiento de sus hermanos $Rb^{F19/F19}$. Sin embargo, a partir del día 8 después del nacimiento, los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ comienzan a mostrar una pérdida progresiva de pelo junto con síntomas de hiperqueratosis (Fig. 32a). Éste es el único fenotipo macroscópico observable ya que no hay variaciones de ninguna otra índole a lo largo de toda la vida adulta del animal (peso, vida media...). Por otro lado, los animales $Rb^{F19/F19}, K14Cre$ y $Rb^{F19/+}; K14Cre$ no muestran ningún fenotipo macroscópico ni tampoco a nivel histológico (véase más adelante) aunque en la mayoría de los experimentos subsiguientes los $Rb^{F19/F19}$ fueron utilizados como genotipo control o de referencia.

La apariencia externa de los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ se agrava por la pérdida progresiva de alelos de *p107*. A pesar de que a 10 días después del nacimiento los animales $Rb^{F19/F19}; p107^{+/-}; K14Cre$ eran indistinguibles de los $Rb^{F19/F19}; K14Cre$, las

diferencias se hacían evidentes durante la edad adulta (véase más adelante). Por el contrario, los animales $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$ carecen totalmente de pelo, son claramente más pequeños (Fig. 32a) y mueren alrededor del día 10 después del nacimiento, aunque las causas de la muerte son aún desconocidas. Además, en los animales recién nacidos $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$ se observó una total ausencia de vibrisas (Fig. 32b). Las vibrisas son unos folículos pilosos especializados situados en el hocico del ratón cuyo desarrollo morfológico ocurre previamente al del resto de folículos corporales. Los análisis histológicos de dicha región (Fig. 32c) demostraron la existencia de una desorganización generalizada de varias capas, concretamente las que diferencian para organizar el pelo (capa de Huxley y capa de Henle).

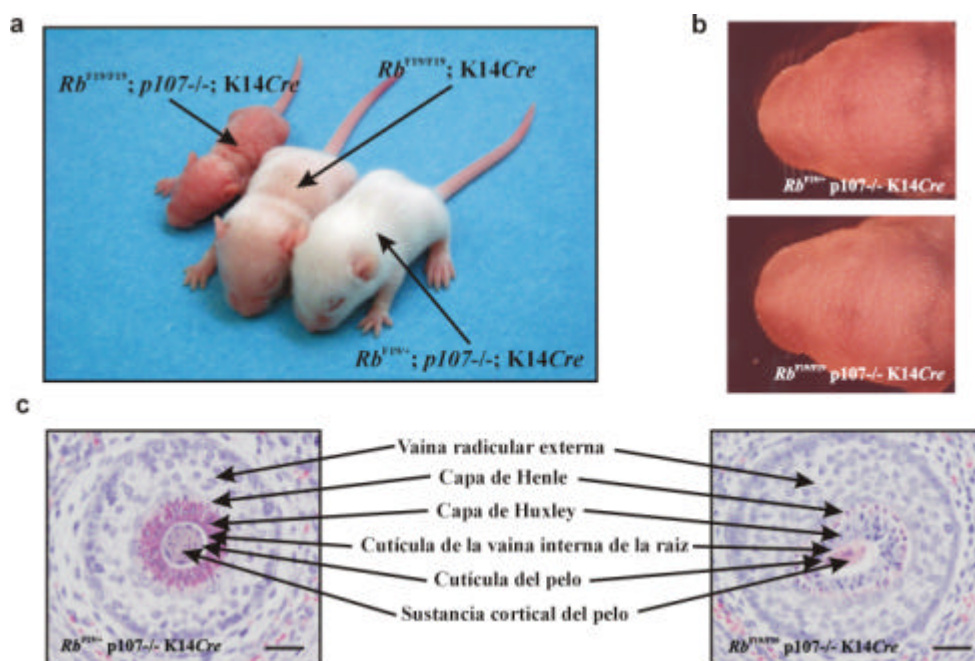


Fig. 32: Consecuencias fenotípicas producidas por la pérdida de pRb y/o p107. a) Aspecto macroscópico de los animales de 10 días de edad con los genotipos representados. b) Visualización de las vibrisas en animales recién nacidos con los genotipos representados. c) Cortes histológicos teñidos con H&E de la zona del hocico de animales recién nacidos donde se observa una vibrisa representativa junto con la localización de todas las capas que la organizan. Barra= 50 μ m.

La gravedad fenotípica en los animales $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$ contrasta con la ausencia de fenotipo en los $Rb^{F19/+}; p107^{-/-}; K14Cre$. Esto demuestra que la presencia de un alelo funcional de *Rb* es suficiente para revertir todo el fenotipo debido a la ausencia de *Rb* que, a su vez, resulta agravado por la pérdida de *p107* (Fig. 32a).

Con el objetivo de determinar si la ausencia de *Rb* en la epidermis conduce a la aparición de algún fenotipo, se realizaron análisis histológicos en todos los genotipos descritos 10 días después del nacimiento. Se escogió esta edad de referencia debido a la letalidad temprana observada en los animales $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$. Sin embargo, los fenotipos descritos más adelante son similares a los observados en animales adultos, en el caso de los genotipos que no conllevan letalidad. La piel de los animales $Rb^{F19/F19}$ y $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}$ es totalmente normal, demostrando que la ausencia de *p107* es compensada *in vivo* por los otros miembros de la familia de retinoblastoma (Fig. 33). No obstante, la epidermis de los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ se caracteriza por una hiperplasia moderada e hiperqueratosis (Fig. 33). La pérdida progresiva de uno o ambos alelos de *p107* agrava el fenotipo de los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ de una manera dependiente del número de copias de *p107* (Fig. 33). De esta forma queda demostrada que la pérdida de *pRb* en la epidermis *in vivo*, se ve compensada funcionalmente y de forma dosis-dependiente por *p107*. A pesar de la gravedad fenotípica que muestran los animales $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$, la presencia de un solo alelo de *Rb* revierte todo el fenotipo en los animales $Rb^{F19/+}; p107^{-/-}; K14Cre$ tal y como ya se había mencionado anteriormente (Fig. 33).

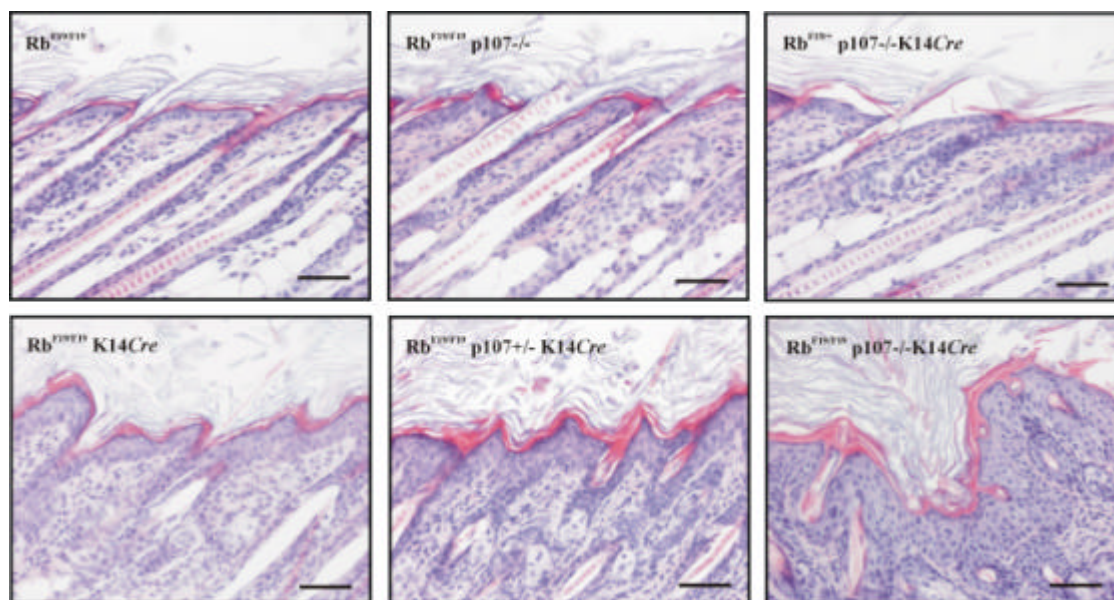


Fig. 33: Fenotipo epidérmico debido a la pérdida de *pRb* y/o *p107* en la epidermis. Secciones histológicas teñidas con H&E de la piel de animales 10 días después del nacimiento con los genotipos representados. Barra=100 μ m.

Por último, aunque la expresión de la recombinasa Cre ocurre en otros tejidos además de la epidermis (lengua, córnea, paladar...), únicamente se observó una alteración fenotípica en el timo de los animales adultos $Rb^{F19/F19}; p107+/-; K14Cre$, pero no en ningún otro tejido o genotipo. No obstante, el análisis se restringió a la epidermis.

4.3.3 Alteraciones en la proliferación debidas a la ausencia de pRb en la epidermis.

Para cuantificar la hiperplasia progresiva observada en la epidermis de los animales deficientes en Rb , se midió el espesor de la misma en varias secciones de cortes histológicos de piel obtenidas de todos los genotipos (Fig. 34a). Se observó que en los animales $Rb^{F19/F19}; p107-/-; K14Cre$, el fenotipo más drástico, el espesor epidérmico era de hasta 4 veces mayor que el de una epidermis normal. Las diferencias observadas pueden deberse a una alteración en los procesos proliferativos de los queratinocitos. Para comprobarlo, se realizaron análisis de incorporación de BrdU, reflejo de la proliferación de un tejido, en animales de todos los genotipos (Fig. 34b). Se observó un progresivo incremento en la incorporación basal de BrdU en los animales $Rb^{F19/F19}$ ($8,8\pm 0,5$), $Rb^{F19/F19}; p107-/-$ ($10,5\pm 0,6$), $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ ($12,8\pm 0,4$) y $Rb^{F19/F19}; p107+/-; K14Cre$ ($15\pm 1,1$), respectivamente (Fig. 33c). No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre los animales $Rb^{F19/F19}; p107+/-; K14Cre$ ($15\pm 1,1$) y $Rb^{F19/F19}; p107-/-; K14Cre$ ($15,6\pm 0,2$) (Fig. 34c). Este inesperado resultado, dada la clara diferencia en el grado de hiperplasia observada entre ambos genotipos, podría explicarse por la existencia de células proliferando en las capas suprabasales de la epidermis que, de alguna manera, contribuyeran a dicho agravamiento. En una epidermis normal, el queratinocito con capacidad proliferativa de la capa basal, sufre una parada de ciclo previa al comienzo del proceso de diferenciación y migración hacia las capas suprabasales. Por ello, es improbable observar células suprabasales que incorporen BrdU, signo de que todavía se encontrarían dividiendo (Fig. 34b, d). Por el contrario, en ausencia de Rb es posible detectar una población significativa de células suprabasales que están proliferando (Fig. 34b, d). Además, la pérdida progresiva de alelos de $p107$ produce un aumento en dicha población (Fig. 34b, d). Estos resultados indican que en el queratinocito, Rb juega un papel esencial *in vivo* regulando la salida del ciclo celular previa al proceso de diferenciación. Además, $p107$, de forma dosis-dependiente, es capaz de suplir funcionalmente aunque de forma incompleta, la ausencia de Rb en el proceso anteriormente mencionado. Sin embargo, aunque la pérdida de $p107$ tiene un efecto

menor que la de *Rb* en el control de la proliferación basal, no existen diferencias significativas entre el grado de incorporación basal en animales *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{+/-}; *K14Cre* y *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}; *K14Cre* (Fig. 34b).

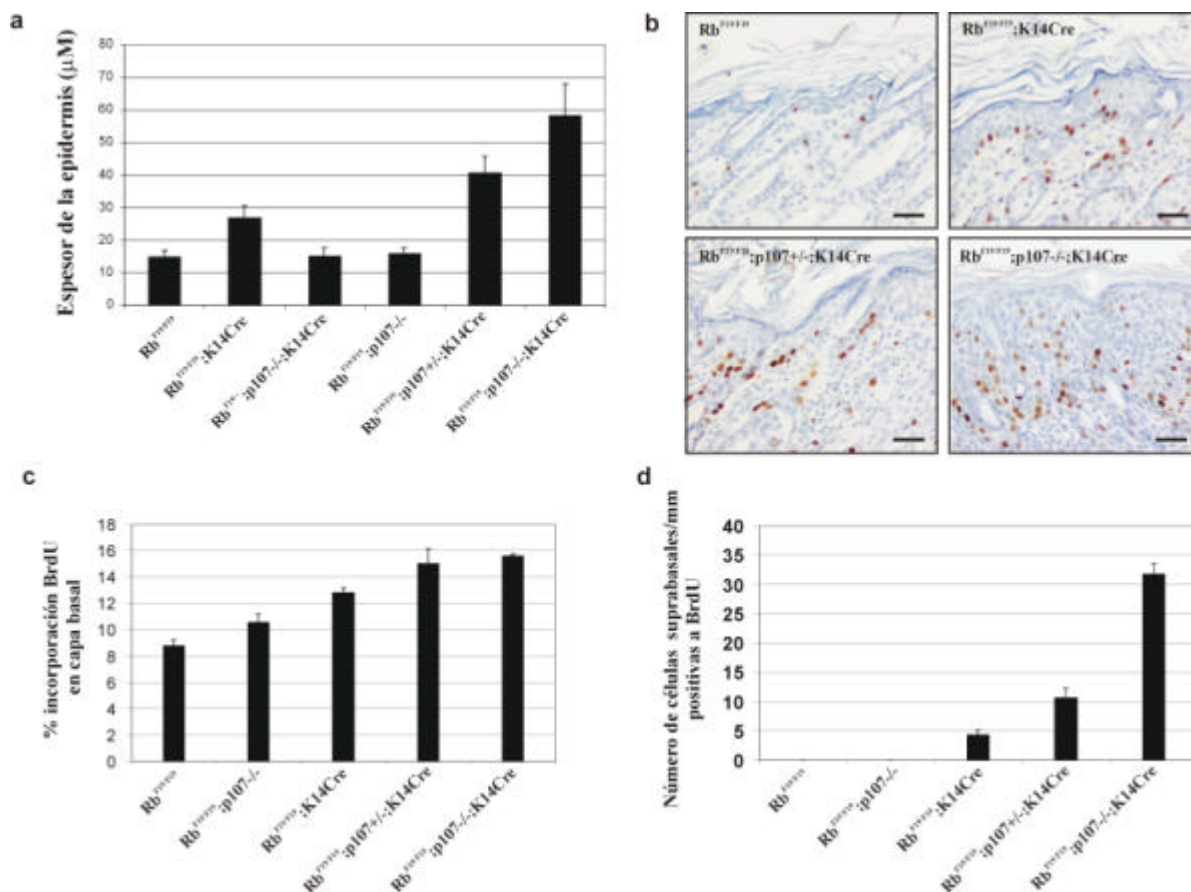


Fig. 34: Alteraciones en la proliferación debidas a la pérdida de pRb y/o p107 en la epidermis. a) Espesor en μm de la epidermis de los animales con los genotipos representados. b) Tinciones inmunohistoquímicas de BrdU en secciones de piel de animales de 10 días de edad de los diferentes genotipos. c, d) Porcentaje de incorporación basal de BrdU en la piel (c) y cuantificación del número de células suprabasales positivas para BrdU (d) en la piel de los mismos animales. Barra=50 μm .

4.3.4 Alteraciones en la diferenciación debidas a la ausencia de pRb en la epidermis.

La anómala proliferación de las células suprabasales deficientes en *Rb* hace suponer la existencia de alteraciones, no solo en la proliferación, sino también en la diferenciación. Como ya se describió en la introducción, la expresión diferencial de queratinas en la epidermis es muy útil para caracterizar los diferentes estadios por los que pasa un queratinocito desde la capa basal hasta su desprendimiento como célula córnea. En una epidermis normal, la expresión de la queratina K5 se restringe a las células de la

capa basal, células mitóticamente activas, mientras que la expresión de la queratina K10 se localiza en células diferenciadas no proliferativas de las capas suprabasales. No se detecta co-localización de ambas queratinas ya que la célula basal inhibe la expresión de K5 previamente a su movimiento hacia las capas suprabasales e induce la expresión de K10 (Fig. 35a). Sin embargo, en la epidermis de los animales $Rb^{F19/F19}$; $K14Cre$ existe una expansión de la capa de células que expresa K5 pudiéndose observar células que co-expresan ambas queratinas, K5 y K10 (Fig. 35a). Este patrón de expresión aberrante se ve agravado por la pérdida progresiva de alelos de $p107$ (Fig. 35a). Además, en los animales $Rb^{F19/F19}$; $p107+/-$; $K14Cre$ se observa una disminución en el número de células que expresan K10, fenotipo que también se agrava en el caso de los animales $Rb^{F19/F19}$; $p107-/-$; $K14Cre$ en los que prácticamente todas las células de la epidermis expresan K5, mientras que existen muy pocas células que expresen K10, y por tanto, co-expresen ambas queratinas (Fig. 35a).

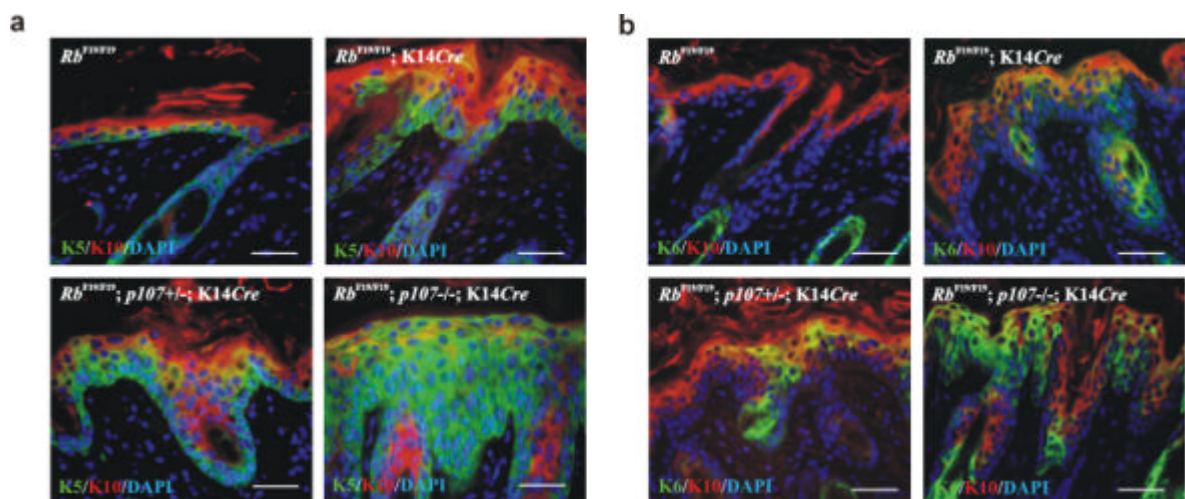


Fig. 35: Alteraciones en la diferenciación debidas a la pérdida de pRb y/o p107 en la epidermis.

a) Doble inmunofluorescencia realizada en secciones de piel de animales de 10 días de edad, frente a K5 (color verde) y K10 (color rojo) en los genotipos representados. El color amarillo indica co-expresión.
b) Doble inmunofluorescencia en la piel de los mismos animales antes mencionados frente a K6 (color verde) y K10 (color rojo). Barra=50 μ m.

En situaciones de hiperproliferación, la disminución en la expresión de K10 se ve acompañada por la inducción en la expresión de la queratina K6. Esta queratina normalmente no se expresa en la epidermis interfolicular pero sí en la vaina radicular interna del folículo y bajo determinadas situaciones como en la curación de heridas o en

procesos tumorales (Weiss y cols., 1984; Takahashi y cols., 1998). Por ello, también se analizó si la hiperplasia y la pérdida de expresión de la queratina K10 en ausencia de pRb, se relacionaba con un aumento de la expresión de queratina K6 *in vivo*. En la epidermis de los animales $Rb^{F19/F19}$ la expresión de K6 se localizó exclusivamente en los folículos (Fig. 35b). Sin embargo, en los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ se observó la aparición de una expresión ectópica de K6 en las capas suprabasales de la epidermis (Fig. 35b). De forma similar a como ocurría con la expresión de K5, la pérdida sucesiva de alelos de *p107*, $Rb^{F19/F19}; p107+/-; K14Cre$ y $Rb^{F19/F19}; p107-/-; K14Cre$, inducía una mayor expresión de K6 (Fig. 35b). En algunas células se detectó la existencia de co-expresión de K10 y K6 (Fig. 35b).

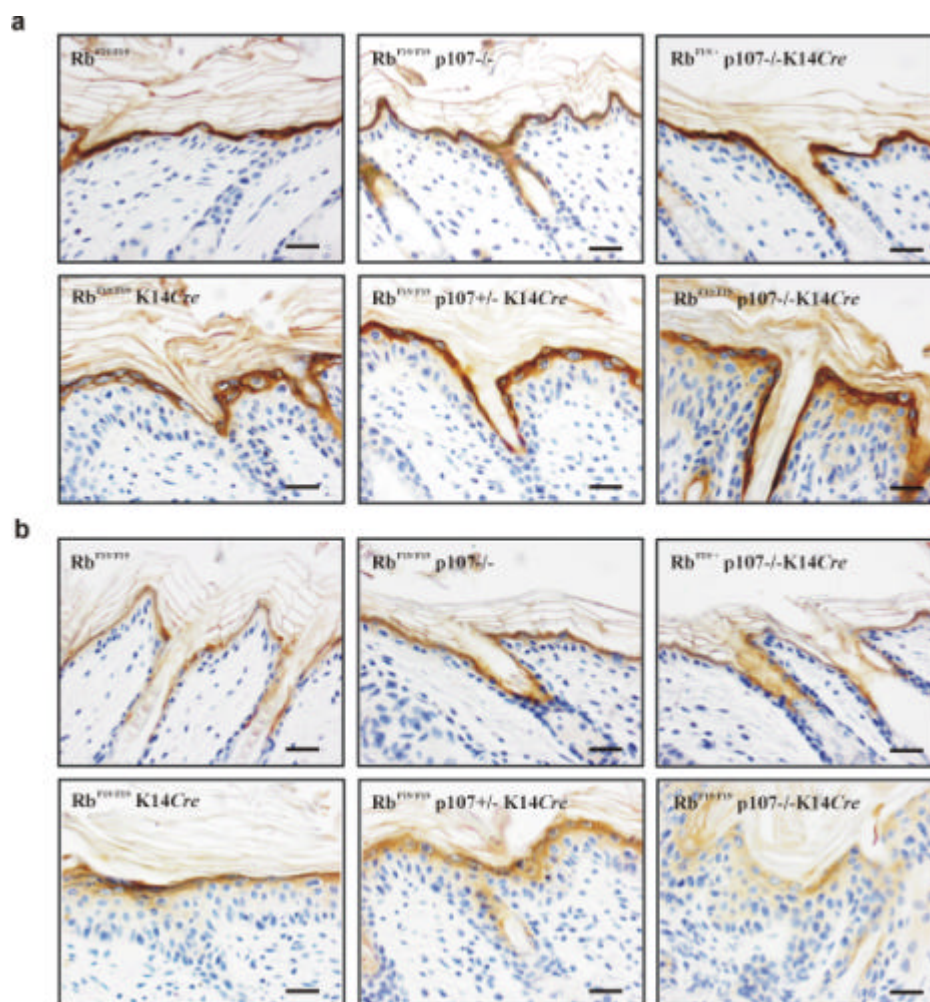


Fig. 36: La pérdida de pRb y p107 en la epidermis produce alteraciones en la expresión de involucrina, pero no de loricrina. a, b) Tinción inmunohistoquímica para detectar la expresión de loricrina (a) e involucrina (b) en la epidermis de animales de 10 días de edad de los genotipos representados. Barra= 50 μ m.

Del mismo modo, también se analizó la expresión de marcadores de diferenciación terminal, concretamente loricrina e involucrina, en la epidermis de los animales $Rb^{F19/F19}$, $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}$, $Rb^{F19/+}; p107^{-/-}$; $K14Cre$, $Rb^{F19/F19}; K14Cre$, $Rb^{F19/F19}; p107^{+/-}$; $K14Cre$ y $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}$; $K14Cre$ (Fig. 36). En ninguno de ellos se observó variación en la expresión de loricrina (Fig. 36a). Sin embargo, la expresión de involucrina se ve reducida de forma progresiva en los animales $Rb^{F19/F19}; p107^{+/-}$; $K14Cre$ y $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}$; $K14Cre$ en comparación con el resto de genotipos, en los que no se observó variación en la expresión de la misma (Fig. 36b).

Por tanto, la ausencia de Rb unida a la pérdida de uno o dos alelos de $p107$ conduce a una alteración en la expresión de determinados marcadores de diferenciación temprana como la queratina K10, de diferenciación terminal como la involucrina o a la expresión ectópica de otras queratinas como la queratina K6.

4.3.5 La pérdida de pRb en epidermis induce la división celular ectópica de células suprabasales.

El queratinocito proliferativo de la capa basal sufre un complejo programa de diferenciación que permitirá su migración a través de las sucesivas capas de la epidermis y acabará con su transformación en célula córnea. Previo al inicio de la diferenciación, el queratinocito debe sufrir un bloqueo en la progresión del ciclo celular que impide, de forma permanente, la división celular. Una vez hecho esto, comienza la expresión de determinados marcadores de diferenciación uno de los cuales es la queratina K10. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la expresión ectópica de la queratina K10 en células epiteliales conducía a un bloqueo en la progresión del ciclo celular (Paramio y cols., 1999; Paramio y cols., 2001b; Santos y cols., 2002). Además, la salida del ciclo celular inducida por K10 era dependiente de la presencia de un alelo funcional de Rb en células en cultivo (Paramio y cols., 1999). Por ello, se comprobó si en ausencia de Rb , en un modelo *in vivo*, células suprabasales que se encuentran bajo diferenciación, caracterizadas por la expresión de K10, se encontraban en proliferación, es decir, incorporaban BrdU. En animales adultos $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ se detectó la presencia de células doble-positivas para la expresión de K10 y para la incorporación de BrdU (Fig. 37a) mientras que estas células nunca se detectaron en animales $Rb^{F19/F19}$ (Fig. 37a). Además, este fenotipo se agravaba por la pérdida de un alelo de $p107$ en el caso de los animales $Rb^{F19/F19}; p107^{+/-}$; $K14Cre$ (Fig. 37a). Estos resultados demostraron la

importancia de *Rb* en la inducción de la salida permanente del ciclo celular ya que, en su ausencia, los queratinocitos que comenzaron a diferenciar aún son capaces de proliferar.

Por otro lado, es posible argumentar que las células suprabasales que se encuentran en diferenciación tengan características de células basales ya que, muchas de ellas, continúan expresando K5, marcador de células basales proliferativas. Para discriminar esta situación se realizó una triple tinción de inmunofluorescencia frente a K10, K5 y BrdU. De esta forma, se puede observar la existencia de células proliferativas positivas para K10 pero que, sin embargo, habían perdido la expresión de K5, signo inequívoco de que la célula se encuentra en un proceso real de diferenciación. En la epidermis de los animales $Rb^{F19/F19}$; K14Cre se observó la existencia de células K10+/BrdU+/K5- (Fig 37b) cuya presencia aumentaba con la pérdida de un alelo de p107 (Fig. 37b). Sin embargo, en los animales $Rb^{F19/F19}$ únicamente las células K5 positivas incorporaban BrdU (Fig. 37b).

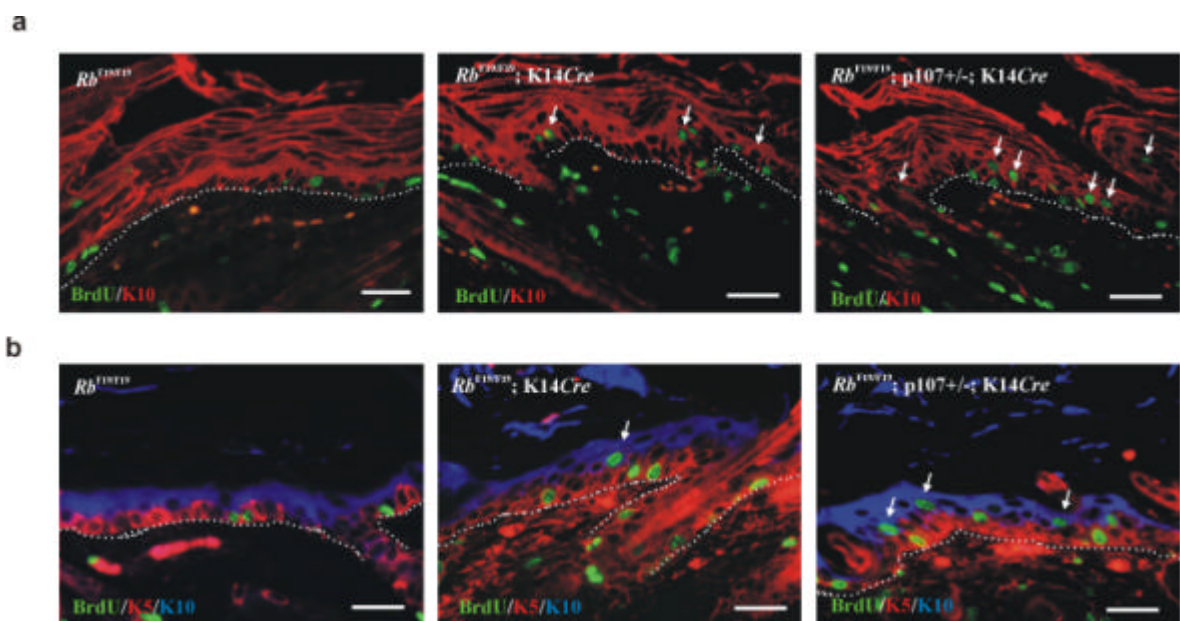


Fig. 37: La pérdida de pRb en la epidermis permite la división celular en células en diferenciación. a) Doble inmunofluorescencia realizada en la piel de animales adultos de los genotipos representados frente a K10 (rojo) y BrdU (verde). b) Triple inmunofluorescencia realizada en la piel de animales adultos de los genotipos representados frente a K10 (azul), BrdU (verde) y K5 (rojo). Las flechas indican la localización de las células K10/BrdU doble-positivas. Barra= 50 μ m.

Estos datos sugieren que, en ausencia de *Rb*, los queratinocitos que han comenzado un proceso de diferenciación pueden continuar proliferando *in vivo*.

Por otro lado, para comprobar que la parada de ciclo permanente mediada por la expresión de K10 en queratinocitos *in vivo* era exclusivamente dependiente de *Rb*, se utilizó una línea transgénica previamente caracterizada en nuestro laboratorio (Santos y cols., 2002). En ella, se consiguió expresar la queratina humana K10 (hK10) en la capa basal de epitelios estratificados bajo el control del promotor de la queratina bovina K5, una queratina que se expresa de forma totalmente solapante a la queratina K14 (Ramírez y cols., 1994; Byrne y cols., 1994; Santos y cols., 2002). Los animales transgénicos *K5hK10* se caracterizan por una hipoplasia de la epidermis producida por el bajo nivel proliferativo de las células epiteliales de la capa basal que sobreexpresan la queratina K10 (Fig. 38a; Santos y cols., 2002).

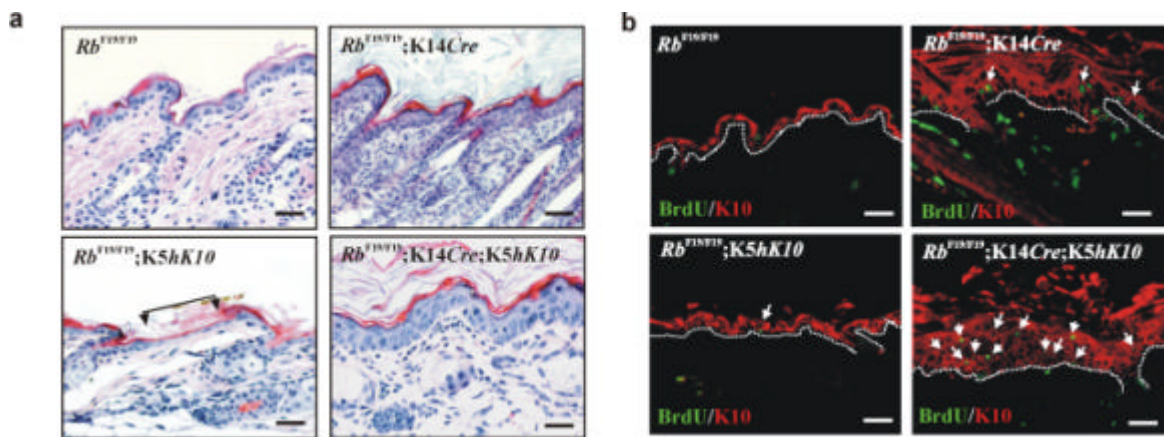


Fig. 38: La parada de ciclo celular inducida por la sobreexpresión de K10 en la epidermis *in vivo* se revierte en ausencia de pRb. a) Secciones de piel teñidas con H&E de animales adultos con los diferentes genotipos representados. La doble flecha señala una región especialmente hipoplásica de los animales $Rb^{F19/F19}; K5hK10$. b) Doble inmunofluorescencia realizada en los mismos animales frente a K10 (rojo) y BrdU (verde). Las flechas indican la localización de las células doble-positivas. Barra= 50 μ m.

La parada de ciclo observada en las células basales de la epidermis de los animales *K5hK10* puede ser dependiente de *Rb* tal y como se determinó en experimentos *in vitro* (Paramio y cols., 1999; Paramio y cols., 2001b). Para comprobarlo, se cruzaron los animales transgénicos *K5hK10* con los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$. Como se ha mencionado anteriormente, los animales $Rb^{F19/F19}; K5hK10$, al igual que los animales *K5hK10*, se caracterizan por una evidente hipoplasia de la epidermis en comparación con los animales control $Rb^{F19/F19}$ (Fig. 38a). Sin embargo, los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre; K5hK10$ presentan una gran hiperplasia epidérmica, incluso mayor, a la anteriormente descrita de los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ (Fig. 38a). De hecho, aunque el número de

células positivas a la incorporación de BrdU en la epidermis de los animales $Rb^{F19/F19}$; $K5hK10$ es muy pequeño, la epidermis de los animales $Rb^{F19/F19}$; $K14Cre$; $K5hK10$, de forma más acusada que los animales $Rb^{F19/F19}$; $K14Cre$, tiene un mayor número de las mismas (Fig. 38b; ver flechas). Así, queda demostrada la importancia de Rb en la parada de ciclo mediada por $K10$ *in vivo*.

El agravamiento fenotípico de los animales $Rb^{F19/F19}$; $K14Cre$; $K5hK10$ en comparación con los $Rb^{F19/F19}$; $K14Cre$ puede deberse a que todos los efectos producidos por la expresión de $K10$ no dependan exclusivamente de la parada de ciclo mediada por Rb sino de otras funciones de $K10$ aún por caracterizar.

Estos resultados sugieren un modelo en el que el queratinocito proliferativo de la capa basal expresa queratina $K10$ en el momento en que comienza a diferenciar que induce una parada irreversible de ciclo celular mediada por Rb que es mantenida durante todo el proceso de diferenciación.

4.3.6 La pérdida de pRb no induce apoptosis en la epidermis interfolicular pero sí en los queratinocitos foliculares.

La ausencia de Rb conduce a una masiva inducción de apoptosis en células de determinadas partes del sistema nervioso central (SNC), del sistema nervioso periférico (SNP) y del ojo (Clarke y cols., 1992; Jacks y cols., 1992; Lee y cols., 1992). Sin embargo, trabajos recientes demostraron que la delección específica de Rb en el SNC mediante el mismo sistema Cre/LoxP, no inducía la mencionada apoptosis, siendo la hipoxia producida por las alteraciones en la eritropoiesis, la causante de la misma (Lipinski y cols., 2001; MacPherson y cols., 2003). A pesar de que, en este caso, se puede concluir que el efecto apoptótico debido a la ausencia de Rb *in vivo* no es un efecto autónomo, existen muchos datos que relacionan la funcionalidad de Rb con la de $p53$ y la apoptosis. Por ejemplo, la sobreexpresión de $E2F1$ induce la apoptosis en determinados tipos celulares (Qin y cols., 1994; Shan y Lee, 1994; Wu y Levine, 1994). Además, Rb puede regular la actividad apoptótica de $p53$ mediante la unión a su regulador negativo $mdm2$ (Hsieh y cols., 1999).

Por todo ello, para comprobar si la pérdida de Rb en epidermis derivaba en un incremento en la apoptosis, se realizaron tinciones específicas para la detección de células apoptóticas (TUNEL) en la epidermis de todos los genotipos. No se observaron células apoptóticas en la epidermis interfolicular en ninguno de los genotipos analizados (Fig. 39a). Sin embargo, en los animales $Rb^{F19/F19}$; $K14Cre$ y, en mayor medida, tras la pérdida

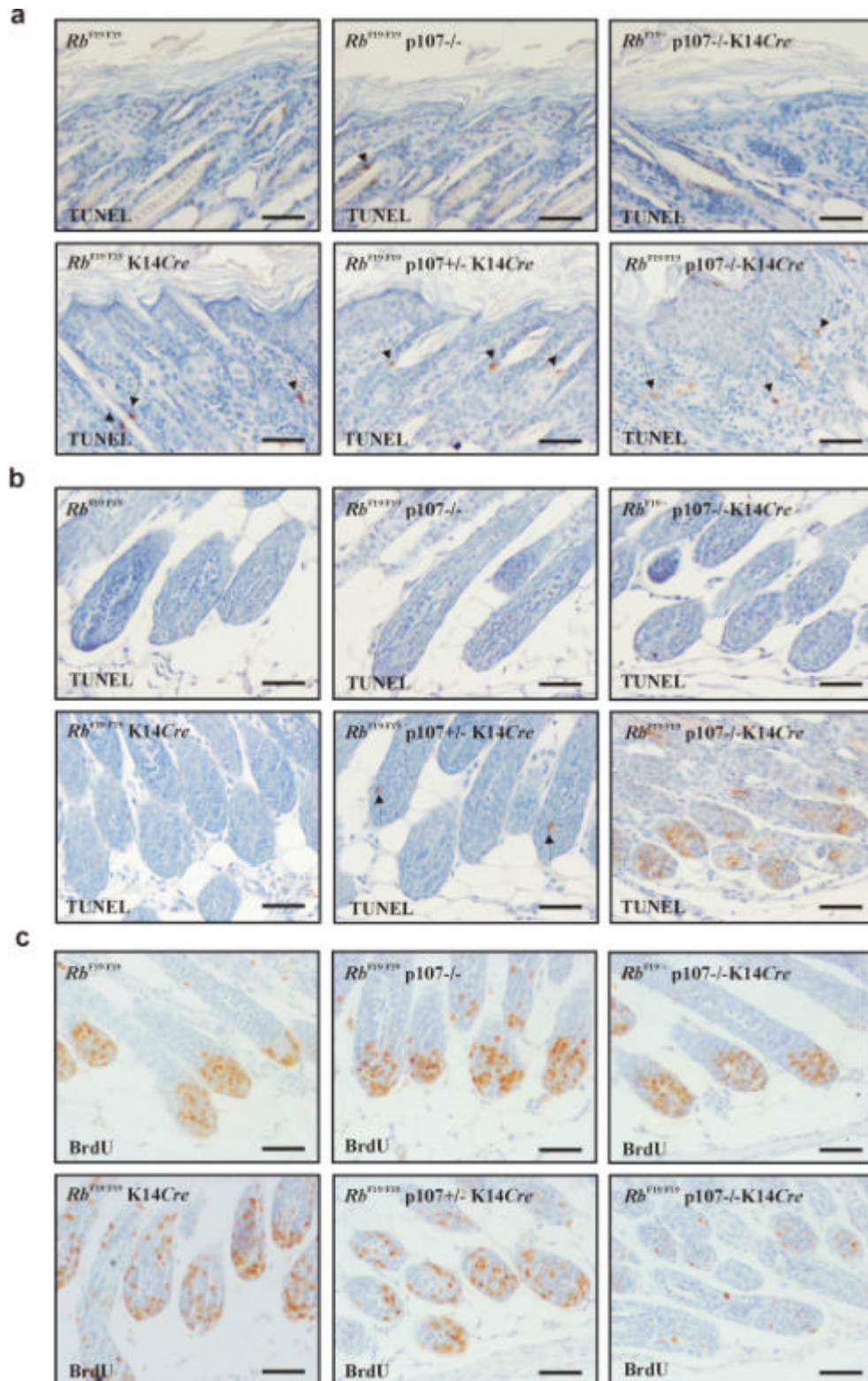


Fig. 39: La ausencia de pelo de los animales $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$ puede ser debida a un aumento de la apoptosis en la matriz del folículo. a, b) Ensayo de TUNEL para la detección de células apoptóticas en secciones de piel de animales de 10 días de edad de los genotipos representados en la epidermis interfollicular (a) y en la región folicular (b). c) Tinciones inmunohistoquímicas frente a BrdU en secciones de piel de los animales antes mencionados en la región folicular. Barra= 100 μ m.

progresiva de alelos de *p107*, se detectó un aumento de células apoptóticas en la parte superior de la vaina radicular externa del folículo piloso (Fig. 39a, ver flechas) y que contribuyen al fenotipo que desarrollan los folículos pilosos en ausencia de *Rb* (ver más adelante). En el caso de los animales *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{+/-}; *K14Cre*, también se detectó alguna célula apoptótica en la región de la matriz, zona proliferativa del folículo anagénico (Fig. 39b). Sin embargo, es en el caso de los animales *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}; *K14Cre* donde se observó el fenotipo más acusado, en el que la mayoría de las células de la matriz se encuentran en apoptosis (Fig. 39b). En el resto de genotipos no se detectaron células apoptóticas en el folículo piloso (Fig. 39b).

El hecho de que las células de la matriz del folículo se encuentren masivamente en apoptosis puede repercutir negativamente en su estado proliferativo. Para comprobarlo, se analizó el grado de incorporación de BrdU en los folículos pilosos en los diferentes genotipos (Fig. 39c). Únicamente en el caso de los animales *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}; *K14Cre* se detectó una disminución acusada en el número de células positivas a la incorporación de BrdU (Fig. 39c). Posiblemente, el balance inverso entre la proliferación y la apoptosis en el folículo piloso sea la explicación a la ausencia de pelo de estos animales a los diez días después del nacimiento.

De estos resultados se concluye que existe una sensibilidad diferencial entre los queratinocitos foliculares y los interfoliculares en la inducción de apoptosis en ausencia de *Rb* y *p107* aunque la base molecular a dicha sensibilidad se desconoce.

4.3.7 La pérdida de pRb y p107 produce una degeneración folicular progresiva.

El folículo piloso, tal y como se comentó en la introducción, es un complejo órgano epitelial organizado en varias capas concéntricas que sufren un proceso de diferenciación para organizar una estructura queratinizada, el pelo. Existen varios marcadores de diferenciación del folículo bien caracterizados, entre ellos los antígenos reconocidos por los anticuerpos AE13 y AE15 (Lynch y cols., 1986; Dhouailly y cols., 1989).

Se analizó la expresión de ambos marcadores en los folículos de los animales *Rb*^{F19/F19}, *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre*, *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{+/-}; *K14Cre* y *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}; *K14Cre* (Fig. 40). En ningún caso, ni la expresión de la queratina reconocida por el anticuerpo AE13 (Fig. 40a) ni la expresión de la trichialina, proteína asociada a gránulos presentes en el folículo piloso y reconocida por el anticuerpo AE15 (Fig. 40b), se vieron afectadas por la pérdida de *Rb* y/o *p107*. Por tanto, aunque la pérdida simultánea de *Rb* y *p107*

produce una disminución en la proliferación de los folículos pilosos acompañada de una apoptosis generalizada de las células de la matriz, algunas de estas células son capaces de diferenciar e inducir la expresión de determinadas queratinas implicadas en la formación del pelo. A pesar de ello, la expresión de AE13 y AE15 en los animales $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$, no es suficiente para completar la correcta formación del pelo ya que estos animales carecen de los mismos.

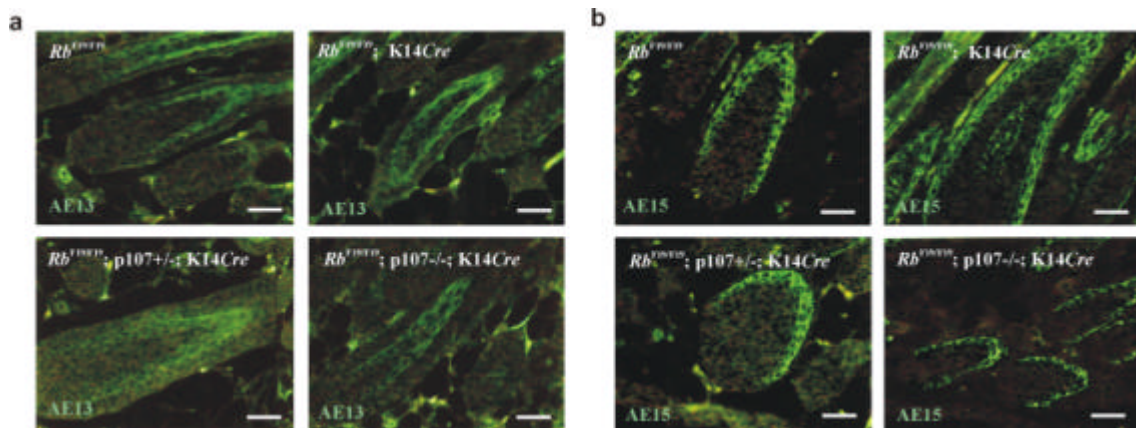


Fig. 40: La pérdida de pRb y $p107$ no impide la expresión de determinados marcadores de diferenciación foliculares. *a, b*) Inmunofluorescencia (color verde) frente a las queratinas de diferenciación folicular AE13 (*a*) y AE15 (*b*) en secciones de piel de animales de 10 días de edad de los genotipos representados. Barra= 50 μ m.

En los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ se observó con la edad una pérdida progresiva de pelo en comparación con los animales $Rb^{F19/F19}$ (Fig. 41a). Esta pérdida de pelo, caracterizada por la aparición de evidentes calvas, era más grave en los animales $Rb^{F19/F19}; p107^{+/-}; K14Cre$ (Fig. 41a). Además, se realizaron trasplantes de piel de animales recién nacidos $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$ en ratones *nu/nu*. Estos trasplantes carecían totalmente de pelo incluso meses después de la realización del mismo (Fig. 41a). La grave pérdida de pelo en los animales adultos $Rb^{F19/F19}; p107^{+/-}; K14Cre$ y, en mayor medida, en los $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$ pareció estar asociada en todos los casos a una desaparición de la parte inferior del folículo piloso junto a una progresiva hiperplasia de las glándulas sebáceas (Fig. 41b).

Se puede concluir, que la pérdida de Rb y $p107$ induce con el tiempo una degeneración folicular asociada a una grave hiperplasia de las glándulas sebáceas que impiden la correcta formación del pelo. También es posible que, en ausencia de Rb y/o

p107, la diferenciación hacia sebocitos se encuentre más favorecida que hacia células foliculares o queratinocitos interfoliculares. Estos aspectos serán estudiados en el futuro dada la importancia del folículo como modelo de desarrollo.

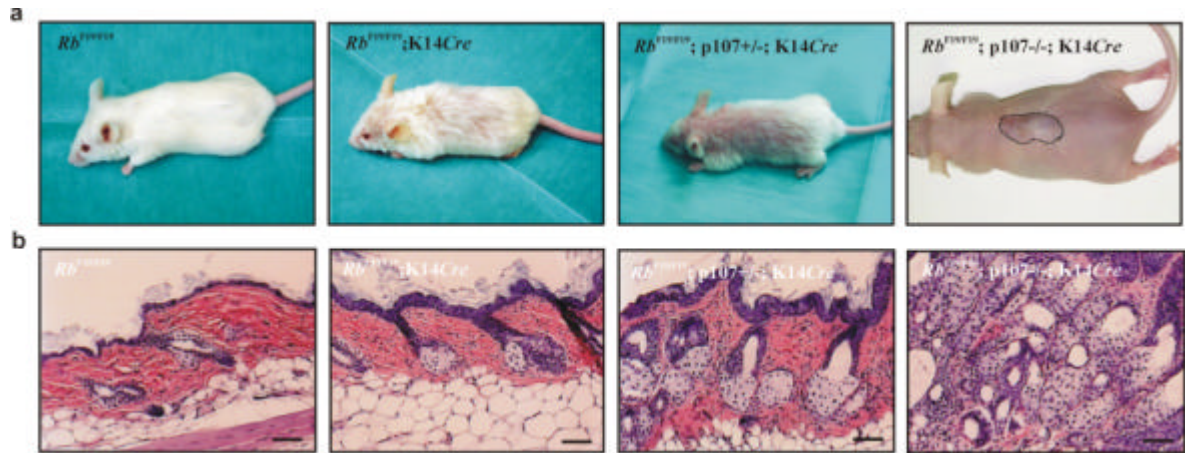


Fig. 41: La alopecia observada en los animales deficientes en *pRb* se correlaciona con una progresiva hiperplasia de las glándulas sebáceas. a, b) Fenotipo macroscópico (a) y secciones de piel teñidas con H&E para análisis histológico (b) de los animales adultos $Rb^{F19/F19}$, $Rb^{F19/F19}; K14Cre$, $Rb^{F19/F19}; p107+/-; K14Cre$ y de trasplantes de piel $Rb^{F19/F19}; p107-/-; K14Cre$ de 6 meses realizados en animales *nu/nu*. Barras= 100 μ m.

4.3.8 Modelo de cultivo de queratinocitos *in vitro*.

El estudio de los genes y su función en modelos animales *in vivo* tiene ciertas limitaciones que pueden solventarse mediante las técnicas de cultivos celulares *in vitro*. El cultivo de queratinocitos humanos y de ratón se encuentra muy estandarizado desde hace mucho tiempo (Rheinwald y Green, 1975; Hennings y cols., 1980). Sin embargo, debido al elevado número de genotipos analizados así como a la limitación de células, el protocolo clásico de obtención de queratinocitos ha sido adaptado introduciendo mejoras sutiles que lo optimizaron en gran medida. En nuestro protocolo, se obtuvo la epidermis de animales recién nacidos y se tripsinizó de forma aislada durante, al menos, 18 horas a 4°C (Fig. 42a). Durante este tiempo, se realizó la reacción de PCR para conocer los genotipos de los animales analizados. De esta forma, se pudieron mezclar los queratinocitos procedentes de diferentes animales con el mismo genotipo obteniendo un mayor rendimiento celular. Por último, los diferentes procesos de adhesión, proliferación y diferenciación se realizaron a muy concretas concentraciones de Ca^{2+} (Fig. 42a).

Previo a la experimentación *in vitro*, se determinó si los queratinocitos obtenidos crecían en condiciones óptimas y expresaban los marcadores adecuados. Por un lado, se analizó el grado de incorporación de BrdU del cultivo celular observando que un gran número de células se encontraban proliferando (Fig. 42b). Por otro lado, se observó que todas las células del cultivo expresaban las queratinas K5 y K14, características del queratinocito proliferativo (Fig. 42b). Además, la inducción de diferenciación en el cultivo mediante el incremento de la concentración de Ca^{2+} inducía la expresión de marcadores de diferenciación tempranos como la queratina K10 y tardíos como la loricrina o la involucrina (ver más adelante).

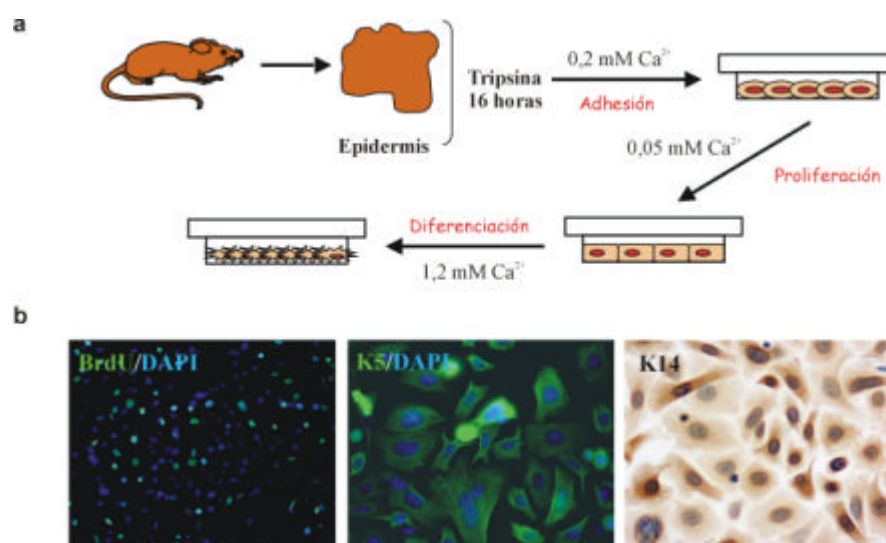


Fig. 42: Modelo de cultivo de queratinocitos *in vitro*. a) Resumen esquemático del protocolo de obtención de queratinocitos obtenidos de animales recién nacidos. Se relacionan además las concentraciones de calcio requeridas para la adhesión, proliferación y diferenciación de los mismos. b) Tinción de inmunofluorescencia frente a BrdU y K5 e inmunohistoquímica frente a K14 realizada en queratinocitos para determinar el estado del cultivo. El colorante nuclear DAPI se usó en las inmunofluorescencias.

4.3.9 Los queratinocitos deficientes en pRb y p107 muestran ventaja proliferativa frente al resto de genotipos.

Para analizar la capacidad proliferativa de queratinocitos de los diferentes genotipos *in vitro* se realizaron curvas de proliferación en todos ellos. Se plaqueó un total de 10^5 células de cada genotipo y se realizaron contajes celulares diariamente. Se observó un moderado incremento en la tasa de crecimiento en los queratinocitos $Rb^{F19/F19}; p107^{+/-}; K14Cre$ comparado con el resto, tres días después del plaqueo de las células (Fig. 43a).

Dicho incremento era mucho mayor en los queratinocitos $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$ (Fig. 43a). Estas variaciones se correspondían bien con el tiempo medio empleado por el queratinocito de un determinado genotipo en realizar una división celular completa (Fig. 43b). Este tiempo era menor en el caso de los queratinocitos $Rb^{F19/F19}; p107^{+/-}; K14Cre$ y aún menor en los $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$ (Fig. 43b), en comparación con el resto de genotipos analizados.

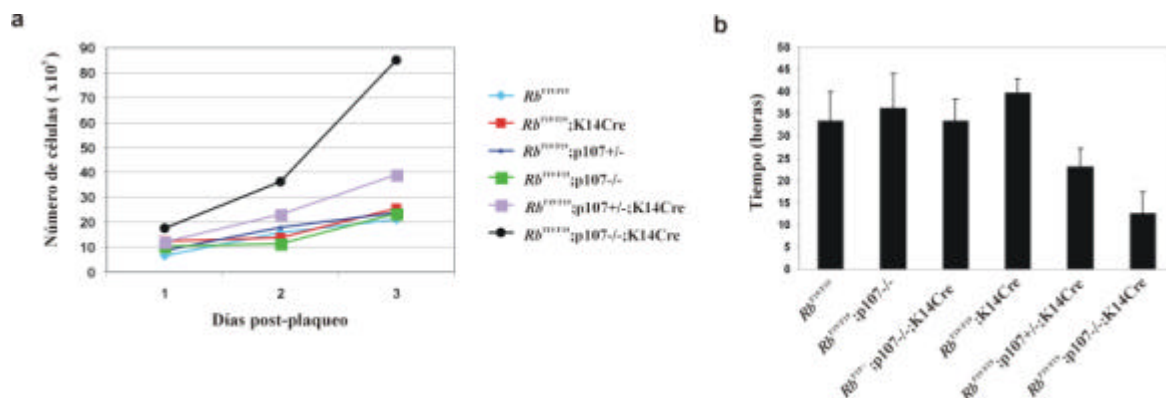


Fig. 43: Los queratinocitos $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$ tienen ventaja proliferativa frente al resto de genotipos. a) Curva de proliferación realizada con cultivos de queratinocitos de todos los genotipos. Se plaqueó un total de 10^5 células y se contabilizó el número de las mismas de forma diaria durante tres días. b) Representación gráfica del tiempo medio necesario en horas para la duplicación celular de los queratinocitos de los genotipos representados.

Como ya se describió en la introducción, los miembros de la familia de retinoblastoma tienen la habilidad de unir y bloquear a los miembros de la familia de factores de transcripción E2F. La actividad de estos factores promueve la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Por ello, concretamente la deficiencia de Rb podría provocar alteraciones en la transición G1/S. Se realizaron análisis mediante citometría de flujo del perfil de ciclo celular en cultivos asincrónicos de todos los genotipos determinando el porcentaje de células del cultivo que se encontraban en cada una de las fases del ciclo celular (G0/G1, S, G2/M). Se observó que la ausencia de Rb y/o $p107$ no alteraba significativamente la fracción de queratinocitos localizados en las fases G0/G1, S o G2/M del ciclo celular en comparación con los queratinocitos controles (Fig. 44). Estos resultados indican que el incremento en la tasa proliferativa observada en los queratinocitos $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$ (Fig. 44) se debe a una disminución en el

tiempo total que la célula emplea para atravesar todas las fases del ciclo celular más que a una entrada acelerada en la fase S como podría ser esperable.

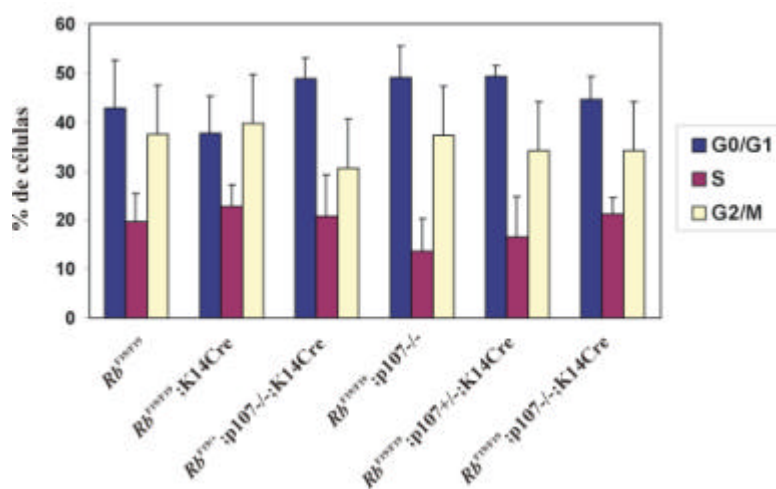


Fig. 44: Los queratinocitos deficientes en *pRb* no muestran aceleración en la transición G1/S. Representación gráfica de las tres fases principales del ciclo celular obtenida mediante análisis de FACS de cultivos de queratinocitos en crecimiento asincrónico.

Todo ello indica que la pérdida combinada de *Rb* y *p107* confiere una ventaja de crecimiento en cultivo que, de alguna forma, depende de la cantidad de alelos de *p107* existentes y que es un reflejo de lo observado *in vivo*. No obstante, dicha ventaja proliferativa no es dependiente de cambios en el tiempo empleado durante la transición G1/S en células sometidas a un crecimiento asincrónico. Es probable que este tiempo sí varíe en células sincronizadas en G0 y re-estimuladas. Sin embargo, la dificultad de sincronizar queratinocitos en G0 impidió la realización de este tipo de experimentos.

4.3.10 Los queratinocitos deficientes en *pRb* no son capaces de mantener el estado postmitótico característico de la diferenciación.

La proliferación de células suprabasales deficientes en *Rb* *in vivo* pone de manifiesto posibles alteraciones de los queratinocitos a determinados estímulos de parada proliferativa. Uno de estos estímulos, ampliamente caracterizado en queratinocitos (Hennings y cols., 1980), es el aumento de la concentración de iones Ca^{2+} en el medio de crecimiento (un aumento de 0,05mM a 1,2 mM). Bajo este estímulo, los queratinocitos detienen la proliferación y comienzan rápidamente la expresión de ciertos marcadores de diferenciación como la queratina K10 (Hennings y cols., 1980; Yuspa y cols., 1989). Para

determinar si la pérdida de *Rb* y/o *p107* conducía a una alteración en la diferenciación inducida por el incremento de Ca^{2+} se analizó el porcentaje de células que incorporaban BrdU bajo condiciones proliferativas o de diferenciación a diferentes días (Fig. 45).

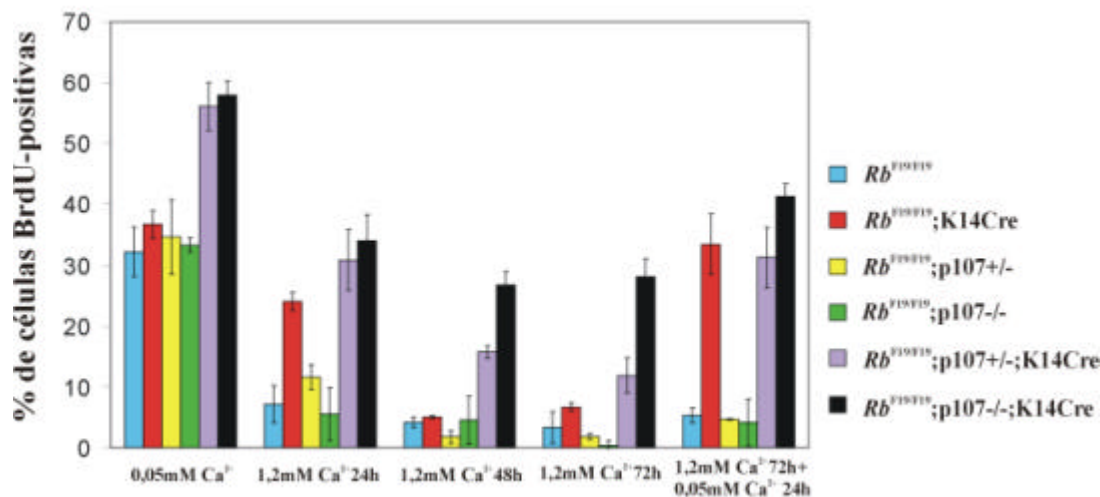


Fig. 45: Los queratinocitos deficientes en *pRb* no son capaces de mantener el estado postmitótico de las células diferenciadas. Análisis del porcentaje de células positivas para la incorporación de BrdU en queratinocitos de los genotipos representados en diferentes condiciones tales como proliferación (0,05 mM Ca^{2+}), diferenciación a diferentes tiempos (1,2 mM Ca^{2+}) y re-estimulación durante 24 horas en bajo calcio de células diferenciadas 72 horas (1,2 mM Ca^{2+} 72h + 0,05 mM Ca^{2+} 24h).

Se observó que los queratinocitos procedentes de los animales *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{+/-}; K14Cre y *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}; K14Cre tenían un mayor porcentaje de células positivas a la incorporación de BrdU, en condiciones de proliferación (Fig. 45). Bajo condiciones de diferenciación, los queratinocitos *Rb*^{F19/F19}; K14Cre sufrían una salida del ciclo celular similar a la del resto de genotipos denominados controles, *Rb*^{F19/F19}, *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{+/-}, *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}, 72 horas después del incremento de calcio. Sin embargo, existe un retraso en esta respuesta ya que, 24 horas después del estímulo de diferenciación, un porcentaje significativo de células deficientes en *Rb* aún proliferaban (Fig. 45). Por el contrario, los queratinocitos obtenidos de los animales *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{+/-}; K14Cre y *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}; K14Cre permanecieron parcialmente resistentes al aumento de calcio aún 72 horas después de la inducción del estímulo (Fig. 45).

Por otro lado, es conocido el papel de *Rb* en el mantenimiento del estado postmitótico característico de células diferenciadas (Schneider y cols., 1994) impidiendo una re-entrada en el ciclo celular. Para comprobar si este fenómeno ocurría también en

queratinocitos y era dependiente o no de la presencia de alelos de *p107*, células de los diferentes genotipos diferenciadas durante 72 horas en alto calcio, se pusieron de nuevo en condiciones proliferativas de bajo calcio durante 24 horas, analizándose el grado de incorporación de BrdU del cultivo. Todos las células de los genotipos deficientes en *Rb* con independencia de la presencia o ausencia de *p107*, conseguían re-entrar en ciclo hasta prácticamente alcanzar los niveles de proliferación basales durante el crecimiento asincrónico (Fig. 45).

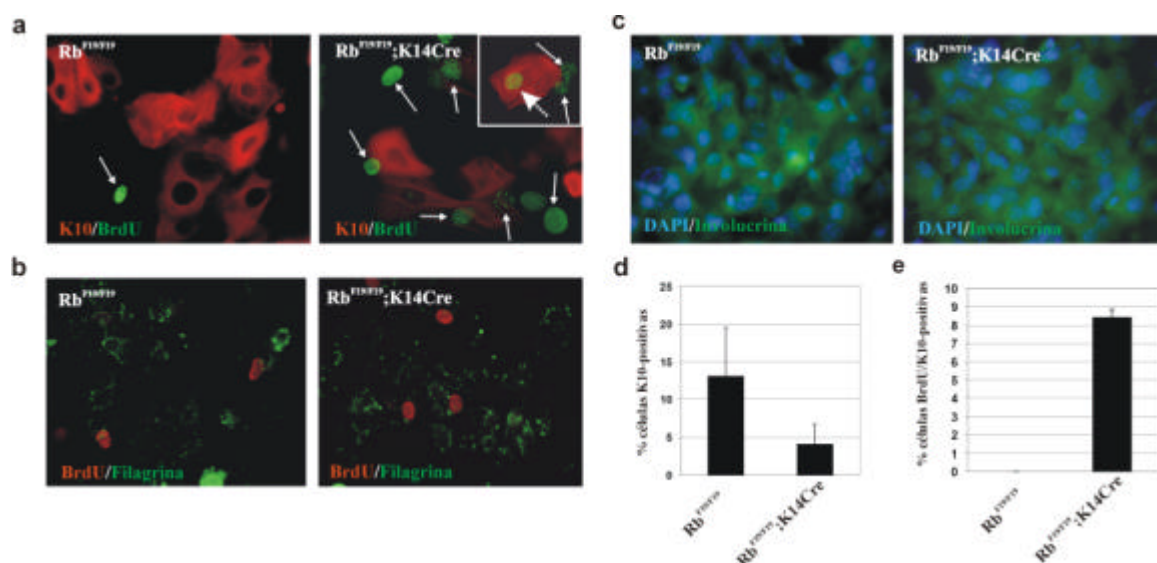


Fig. 46: Los queratinocitos *Rb^{F19/F19}*; *K14Cre* muestran una diferenciación alterada in vitro.

a-c) Análisis, mediante inmunofluorescencia, de la expresión de marcadores de diferenciación tempranos como la K10 (a), o tardíos como la filagrina (b) o la involucrina (c) en queratinocitos *Rb^{F19/F19}* y *Rb^{F19/F19}; K14Cre* sometidos a diferenciación durante 24 horas (K10) o 48 horas (involucrina y filagrina). Además, la expresión de K10 (a) se analizó conjuntamente con la incorporación de BrdU demostrando la existencia de células positivas para BrdU (flechas) o doble positivas para K10 y BrdU (ver recuadro, flecha punteada). d, e) Representación gráfica del porcentaje de células positivas para K10 (d) y del porcentaje de células doble positivas para K10 y BrdU en los genotipos representados bajo diferenciación durante 24 horas.

Estos datos demostraron la importancia exclusiva de *Rb* en el mantenimiento del estado postmitótico de los queratinocitos en diferenciación. Sin embargo, se podría argumentar si los queratinocitos deficientes en *Rb* realmente diferencian y si la re-entrada en el ciclo celular observada es real. Por ello, se comprobó si en cultivos de queratinocitos procedentes de animales *Rb^{F19/F19}* y *Rb^{F19/F19}; K14Cre* bajo diferenciación se expresaban marcadores de diferenciación tempranos, como la queratina K10, y tardíos, como la involucrina o la loricrina. Se observó que, efectivamente, tanto los queratinocitos

deficientes en *Rb* como los controles expresaban K10 (Fig. 46a), filagrina (Fig. 46b) e involucrina (Fig. 46c) en condiciones de diferenciación. A pesar de ello, aunque los niveles de expresión de involucrina y loricrina eran similares, el porcentaje de células que expresaban K10 en ausencia de *Rb* era menor que en el caso de los controles (Fig. 46a, d). Este efecto podría ser debido a que *Rb*, de una forma directa o indirecta, estuviera implicado en la regulación de la expresión de la queratina K10. Además, se observó, tal y como ocurría también *in vivo*, la existencia de células que, a pesar de expresar K10, aún se encontraban proliferando, situación que no se observó en ningún caso en los controles (Fig. 46a, e). Estos datos sugieren que la pérdida de *Rb* conduce a un desacoplamiento entre los procesos de proliferación y diferenciación tanto *in vivo* (Fig. 37) como *in vitro* (Fig. 46), ya que células que han iniciado un programa de diferenciación son capaces de seguir proliferando.

4.3.11 El desacople entre proliferación y diferenciación en queratinocitos deficientes en pRb puede ser debido a la elevada actividad de E2F.

La parada de ciclo mediada por *Rb* es completamente dependiente del bloqueo de la actividad de los factores de transcripción E2F. De hecho, la expresión de E2F1 en células quiescentes provoca la entrada de las células en la fase S del ciclo celular (Johnson y cols., 1993). Además, se ha descrito que el bloqueo de la actividad E2F durante la diferenciación es un requisito necesario para el correcto desarrollo de dicho proceso (Lipinski y Jacks, 1999). Por otro lado, en células HaCaT, línea humana inmortalizada de queratinocitos, inducidas a diferenciar se observó una disminución en la actividad de E2F (Paramio y cols., 2000). Para determinar la implicación de los factores E2F en el desacople entre proliferación y diferenciación observado en queratinocitos deficientes en *Rb*, se analizó por un lado, la expresión de diferentes factores E2F y por otro, la actividad E2F mediante un ensayo informador de actividad luciferasa en queratinocitos de todos los genotipos en condiciones de proliferación y tras 24 o 48 horas de diferenciación inducida por calcio (Fig. 47). Se observó que la expresión de E2F1 aumentaba en los queratinocitos *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{+/-}; *K14Cre* y *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}; *K14Cre* en comparación con el resto de genotipos. Por el contrario, la expresión de E2F4 y E2F5 no variaba en ningún caso (Fig. 47a). Por otro lado, la actividad E2F en cultivos asincrónicos en proliferación se encontró muy aumentada en los queratinocitos *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre* y *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{+/-}; *K14Cre*, en comparación a los controles *Rb*^{F19/F19}, *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{+/-} y *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}, siendo aún mayor tras la pérdida de los dos alelos de *p107*

(Fig. 47b). Tras el incremento de la concentración de Ca^{2+} en el medio, los queratinocitos $Rb^{F19/F19}$ sufren una drástica disminución de la actividad E2F de forma que, 48 horas después del estímulo, dicha actividad se reduce hasta un 70% respecto de la situación de proliferación (Fig. 47b). Sin embargo, en el caso de las células $Rb^{F19/F19}; p107+/-; K14Cre$ y $Rb^{F19/F19}; p107-/-; K14Cre$ la actividad E2F se mantiene elevada incluso 48 horas después de la diferenciación (Fig. 47b) pudiendo impedir, al menos parcialmente, la parada de ciclo inducida por el aumento de calcio (Fig. 45). Por el contrario, en el caso de los queratinocitos $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ sí se detecta una disminución en la actividad E2F en el mismo período de diferenciación que se correlaciona perfectamente con la parada de ciclo observada en estas células bajo este mismo estímulo (Fig. 47b).

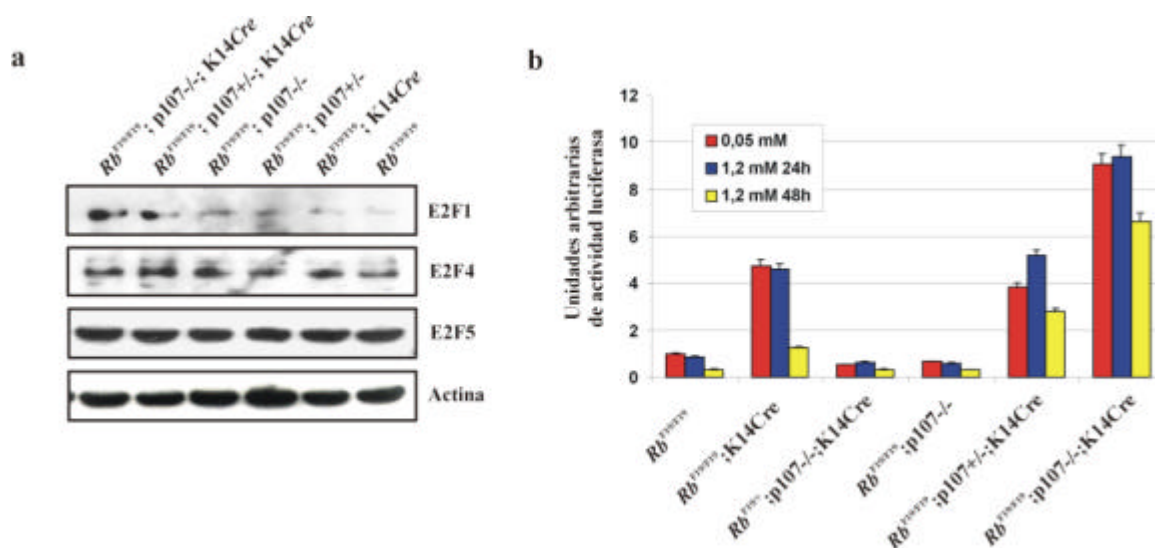


Fig. 47: Elevados niveles de actividad E2F durante la diferenciación de queratinocitos deficientes en pRb. a) Análisis de western blot frente a E2F1, E2F4, E2F5 y actina, como control de carga, en extractos de queratinocitos de todos los genotipos en proliferación. b) Análisis de actividad E2F mediante ensayo de actividad luciferasa realizado en queratinocitos de los genotipos representados en condiciones de proliferación y diferenciación a 24 y 48 horas.

Estos datos sugieren que, al menos parcialmente, la parada de ciclo previa al proceso de diferenciación epidérmica depende específicamente del bloqueo de la actividad de los factores E2F. En ausencia de *Rb*, el aumento en la expresión de *p107* puede actuar como proteína bloqueante de los factores E2F que, en condiciones normales se encuentran unidos a *Rb*. La pérdida de uno o los dos alelos de *p107* produce la liberación permanente de los factores E2F y, con ello, la imposibilidad de regularlos.

4.3.12 La pérdida aguda de pRb es suficiente para evitar la parada de ciclo inducida por la diferenciación.

Se ha demostrado recientemente que la pérdida aguda, pero no la pérdida crónica de *Rb*, es suficiente para la re-entrada en el ciclo celular en diversos procesos caracterizados por la parada proliferativa tales como la senescencia o la quiescencia (Sage y cols., 2003). Sin embargo, tras la pérdida aguda de *Rb* se produce una respuesta celular basada en un aumento progresivo de la expresión de p107 con el objetivo de compensar alguna de las funciones perdidas que normalmente realiza *Rb* (Sage y cols., 2003). Dado que la diferenciación también es un proceso caracterizado por una parada de ciclo irreversible, se analizó si en dicho proceso, la pérdida aguda de *Rb* impedía la parada proliferativa en respuesta al calcio. Con este objetivo se infectaron cultivos de queratinocitos procedentes de animales *Rb*^{F19/F19} con sobrenadantes de adenovirus codificantes para la recombinasa *Cre* o para la proteína fluorescente GFP y se analizó el porcentaje de células que incorporaban BrdU en condiciones de proliferación y diferenciación. Se realizaron análisis de PCR (Fig. 48a) y *western blot* (Fig. 48b) 48 horas tras la infección adenoviral para detectar la presencia del alelo recombinado (Fig. 48a), o la ausencia de proteína pRb (Fig. 48b; ver también Fig. 28). Además, también se analizaron los niveles de p107 observando que, tras 48 horas de pérdida aguda de *Rb*, no se inducía la expresión de p107, a diferencia de lo que ocurre en queratinocitos *Rb*^{F19/F19}; K14*Cre* (Fig. 48b). De hecho, en estos últimos, la pérdida de *Rb* se puede considerar como crónica ya que la expresión de la recombinasa comienza en la epidermis alrededor del día 14,5 de gestación y, por ello, los queratinocitos *Rb*^{F19/F19}; K14*Cre* obtenidos de recién nacidos han acomodado su situación celular a la pérdida de *Rb*. Debido a la ausencia total de pRb alrededor de 48 horas después de la infección adenoviral, todos los análisis posteriores se realizaron tomando como punto de partida este momento.

Se observó que la pérdida aguda de *Rb* inducía un ligero aumento en el porcentaje de células que incorporaban BrdU en condiciones de proliferación en comparación con los queratinocitos *Rb*^{F19/F19}; K14*Cre* y *Rb*^{F19/F19} infectados con adeno-GFP (Fig. 48c). Como se mencionó anteriormente, la diferenciación inducida por calcio produce una parada de ciclo similar en queratinocitos *Rb*^{F19/F19} y *Rb*^{F19/F19}; K14*Cre* infectados con un adeno-GFP 48 y 72 horas después del estímulo (Fig. 48; ver también Fig. 45). Sin embargo, en los queratinocitos infectados con el adeno-*Cre*, en los que se produce una pérdida aguda de *Rb*, no se induce la parada proliferativa incluso 72 horas después del aumento de calcio (Fig. 48c).

Estos datos demuestran que durante la diferenciación del queratinocito, de forma similar a como ocurre durante la quiescencia o la senescencia en fibroblastos (Sage y cols., 2003), la compensación funcional de p107 observada tanto *in vivo* como *in vitro* en respuesta a la pérdida de *Rb*, no ocurre cuando dicha pérdida acontece de manera aguda. Esto se debe probablemente a que la célula necesita de un tiempo para generar una respuesta adecuada, y consistente en el incremento en la expresión de p107.

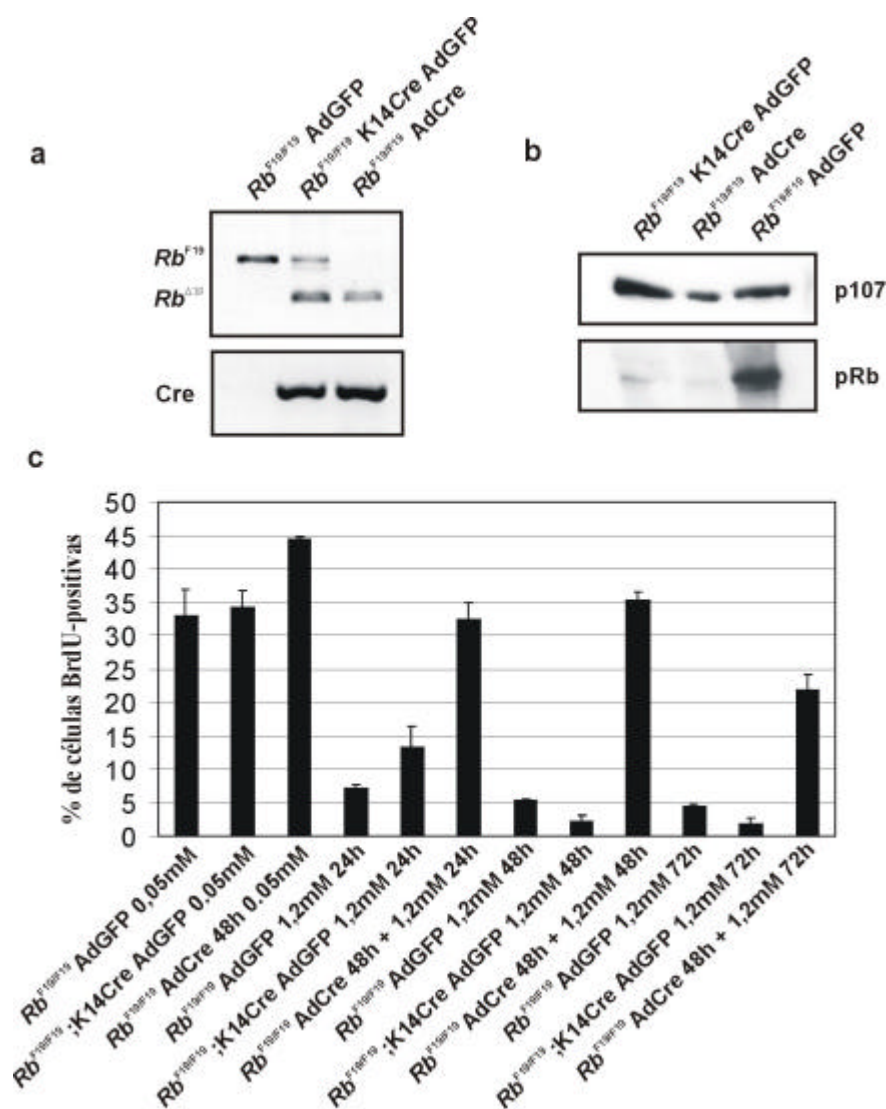


Fig. 48: Efecto diferencial de la pérdida aguda de *Rb* sobre la pérdida crónica. a) Análisis de PCR del alelo de *Rb* y de la recombinasa *Cre* a partir de ADN genómico obtenido de cultivos primarios de queratinocitos infectados con adenovirus codificantes para *Cre* o para *GFP*. b) Análisis de western blot de extractos obtenidos de los cultivos de queratinocitos anteriormente mencionados. c) Resumen gráfico de los porcentajes de incorporación de *BrdU* en cultivos de queratinocitos infectados con adenovirus codificantes para *GFP* o *Cre* en situaciones de proliferación (0,05 mM), o diferenciación (1,2 mM) a diferentes tiempos (24, 48 o 72 horas).

4.4 PAPEL DE pRb EN LA CARCINOGENESIS EPIDERMICA.

4.4.1 pRb no coopera con Ras en la formación de tumores epidérmicos *in vivo*.

Como ya se mencionó anteriormente, *Rb* fue aislado de un tipo de tumor hereditario, el retinoblastoma, aunque también se han encontrado mutaciones en el gen *Rb* en otros tumores humanos tales como osteosarcomas, cáncer de pulmón (SCLC), próstata o mama (Harbour y cols., 1988; Lee y cols., 1988, Bookstein y cols., 1990). Existen además varios modelos transgénicos que sobreexpresan determinadas proteínas virales (HPV E7, HPV E6, E1A) o proteínas implicadas en la vía de *Rb* (E2F1, ciclina D1) que producen de forma espontánea o en cooperación con otras proteínas (p53, Ras) tumores epidérmicos (Missero y cols., 1993; Arbeit y cols., 1994; Auewarakul y cols., 1994; Pierce y cols., 1998a; Pierce y cols., 1998b; Robles y cols., 1996). Por ello, se propuso como objetivo analizar la implicación de pRb en los procesos de carcinogénesis de piel utilizando como modelo el protocolo de carcinogénesis de DMBA/TPA.

En ningún animal adulto *Rb*^{F19/F19}; K14*Cre* o *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{+/-}; K14*Cre* se observó la aparición espontánea de tumores de piel (en poblaciones de más de 100 animales y con edades de hasta 1,5 años). Sólo en casos esporádicos, indistinguibles de las proporciones de aparición de tumores en animales controles *Rb*^{F19/F19}, se observó la aparición de algún papiloma, linfoma o adenoma sebáceo (ver <http://tumor.informatics.jax.org/straining.html>, donde se puede observar la aparición de tumores espontáneos en el fondo genético FVB). Algunos de estos tumores son negativos para la expresión de K14 por lo que la delección de *Rb* no influye en la aparición del tumor.

A continuación, se determinó la posible cooperación funcional existente entre pRb y Ras en la formación de tumores de piel. Para ello, se seleccionaron un total de 33 animales (18 animales *Rb*^{F19/F19} y 15 animales *Rb*^{F19/F19}; K14*Cre*) con una edad comprendida entre las 8-10 semanas que fueron iniciados con una dosis de DMBA. Como ya se describió en la introducción, el tratamiento tópico de DMBA produce una mutación altamente específica en el codón 61 del gen *Harvey-Ras* provocando la aparición de una forma mutante permanentemente activa (Balmain y Pragnell, 1983; Quintanilla y cols., 1986; Roop y cols., 1986). De esta forma, se pudo determinar si la pérdida de *Rb* junto con la presencia de la forma activa de Ras en la epidermis inducía de forma espontánea y, sin la acción de un promotor tumoral como el TPA, tumores *in vivo*. Pasados 9-10 meses después de la aplicación del DMBA, los animales fueron analizados y sacrificados. Se

observó que la pérdida de *Rb* no suponía ningún cambio en la tasa tumoral de una epidermis control iniciada con DMBA, detectándose exclusivamente 2 y 3 papilomas en los animales $Rb^{F19/F19}$ y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$, respectivamente (Fig. 49a). Además, la aplicación del mutágeno no suponía la aparición de ningún fenotipo epidérmico a largo plazo tanto en presencia, como en ausencia de *Rb* (Fig. 49b).

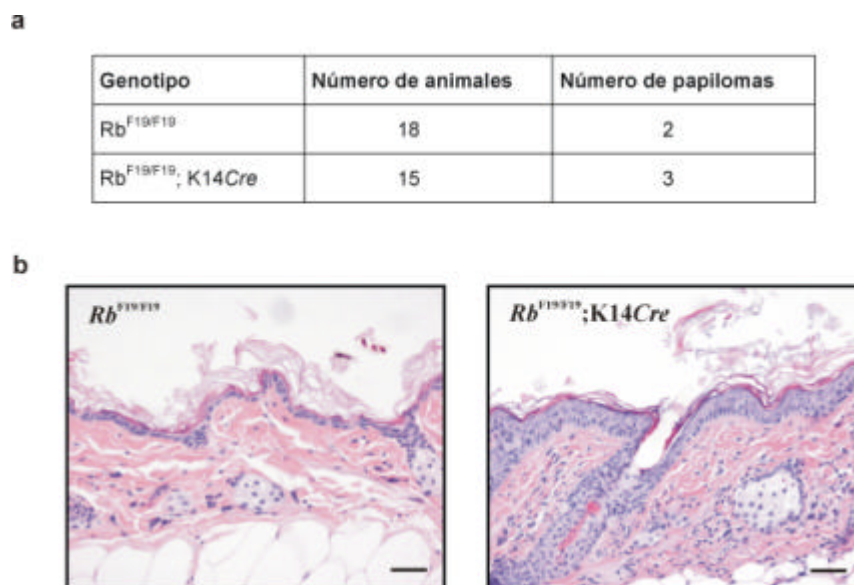


Fig. 49: El tratamiento de la epidermis con DMBA no induce la aparición de tumores en ausencia de *pRb* *in vivo*. a) Tabla esquemática en la que se representa el número de animales de cada genotipo tratado con DMBA así como el número de papilomas obtenidos tras una media de 9 meses tras el tratamiento. b) Secciones histológicas representativas de pieles obtenidas de animales $Rb^{F19/F19}$ y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ después de 9 meses tras el tratamiento con DMBA.

4.4.2 La pérdida de *pRb* en epidermis produce la aparición de menos tumores y de menor tamaño, aunque con mayor malignidad, durante el protocolo de DMBA/TPA.

Con el objetivo de determinar el papel de *pRb* en la carcinogénesis epidérmica se realizó un protocolo de DMBA/TPA en animales $Rb^{F19/F19}$ y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$. Este protocolo es uno de los paradigmas en la investigación del cáncer debido a su naturaleza secuencial en la génesis y progresión tumoral y la similitud de los tumores obtenidos con ciertos tumores humanos (ver introducción). Se seleccionaron un total de 30 animales $Rb^{F19/F19}$ y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$, siendo 15 animales de cada genotipo. El protocolo de DMBA/TPA se realizó tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos con una única dosis de DMBA y sucesivas aplicaciones de TPA en un número de 2 por semana durante un total de 10 semanas. Alrededor de la octava semana después de la

iniciación se observó la aparición de los primeros papilomas en ambos genotipos y se realizó un seguimiento semanal del número de los tumores así como el tamaño de los mismos. Este seguimiento se realizó mediante la representación gráfica del número medio de tumores de cada genotipo de forma semanal contados a partir de la iniciación con DMBA (Fig. 50a).

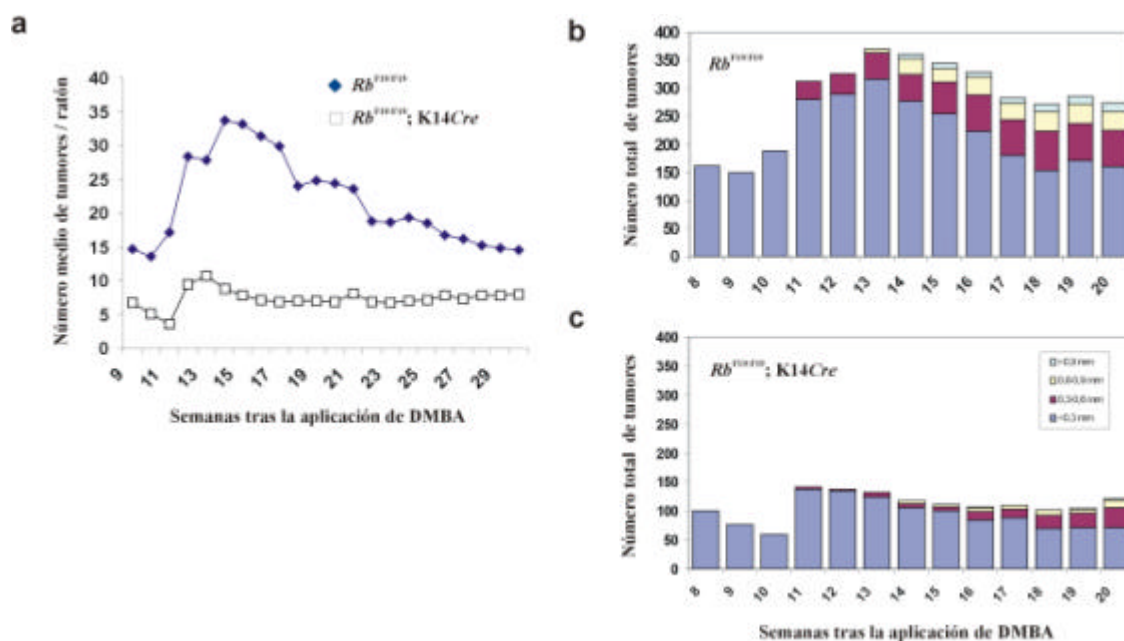


Fig. 50: Los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ forman menos tumores pero son más malignos durante el protocolo de DMBA/TPA a) Representación gráfica del número medio de tumores obtenidos en animales $Rb^{F19/F19}$ (línea rombos azules) y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ (línea cuadrados blancos) durante el protocolo de carcinogénesis DMBA/TPA. b, c) Clasificación basada en el tamaño de los tumores obtenidos anteriormente mencionados y medidos de forma semanal en animales $Rb^{F19/F19}$ (b) y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ (c).

El tamaño de los tumores se representó en una gráfica conjunta subdividiendo todos los tumores de cada genotipo en cuatro tamaños diferentes (<0,3mm, 0,3-0,6mm, 0,6-0,9mm y >0,9mm), analizándolos también de forma semanal (Fig. 50b, c). Sorprendentemente, se observó que la pérdida de *Rb* en la epidermis no producía un aumento en el número de tumores tal y como sería de esperar por tratarse de un gen supresor de tumores, sino una disminución (Fig. 50a). Además, en ausencia de *Rb* los tumores producidos eran más pequeños que los observados en los animales $Rb^{F19/F19}$ (Fig. 50b, c).

En el protocolo de DMBA/TPA se produce un gran número de papilomas por ratón muchos de los cuales regresan y desaparecen por tratarse de papilomas benignos.

Aún así, algunos de ellos, debido a la acumulación de mutaciones en determinados genes, progresan y malignizan hacia carcinomas escamosos. La regresión de muchos de estos papilomas puede observarse en la gráfica del número medio de tumores por ratón ya que alrededor de la semana 15 se produce una disminución progresiva de este valor (Fig. 50a). La tasa de conversión maligna, es decir el porcentaje de papilomas que progresan y malignizan, es normalmente difícil de determinar de forma visual sobre el ratón. Por ello, una vez terminado el protocolo de carcinogénesis se sacrificaron los animales y los tumores fueron procesados para su análisis histológico. Se observaron mediante microscopía alrededor de 300 tumores entre ambos genotipos clasificándolos según su morfología y malignidad. Básicamente, se les incluyó en tres categorías: Papilomas, Papilomas premalignos y Carcinomas escamosos (SCC) (Fig. 51a).

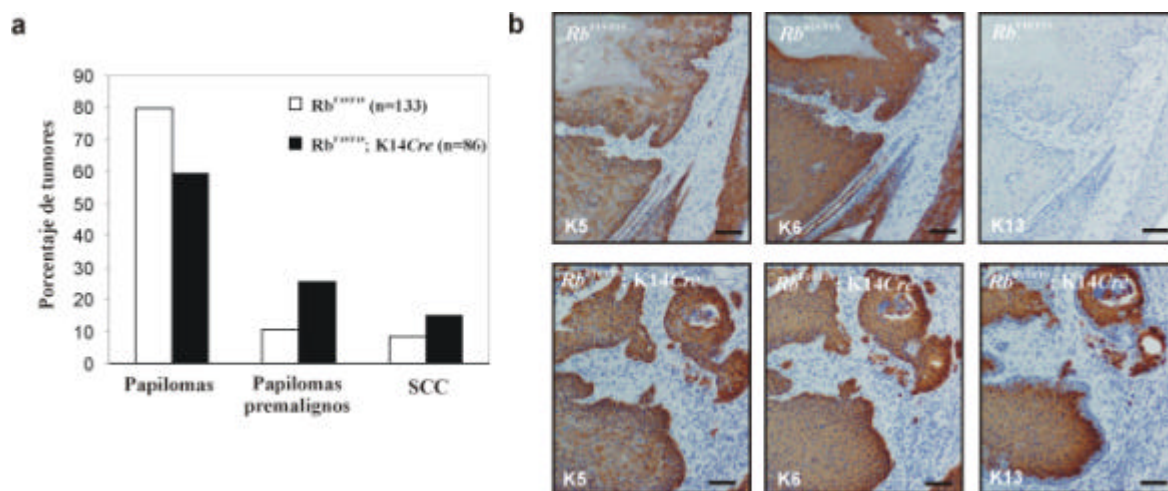


Fig. 51: Los papilomas deficientes en pRb tienen una mayor tasa de conversión maligna.

a) Porcentaje de la totalidad de los tumores obtenidos en el protocolo de DMBA/TPA en los animales $Rb^{F19/F19}$ y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ clasificados según el grado de malignidad en papilomas, papilomas premalignos y SCCs. b) Tinciones inmunohistoquímicas realizadas en papilomas representativos procedentes de animales $Rb^{F19/F19}$ y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ frente a K5, K6 y K13. Barra= 150 μ m.

A pesar de que los papilomas y los SCCs son claramente diferenciables entre sí, dentro de los papilomas premalignos se incluyeron tumores que, aunque histológicamente son similares a papilomas, presentaban claros focos de infiltración, signos inequívocos de malignización tumoral. Además, se realizaron análisis inmunohistoquímicos para detectar la presencia de determinadas queratinas como la queratina K13 característica de papilomas en estado avanzado de malignización (Nischt y cols., 1988) o la queratina K6

asociada a células hiperproliferativas y la queratina K5 localizada en células epiteliales normalmente basales. Por ello, aunque los papilomas expresaban en gran cantidad K5 y K6 únicamente los papilomas clasificados como premalignos expresaban K13 (Fig. 51b).

Se observó que el porcentaje de papilomas premalignos y SCCs en el caso de los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ era mayor que en los controles $Rb^{F19/F19}$ (Fig. 51a). De esta forma se pudo concluir que la ausencia de Rb en la epidermis produce un aumento en la tasa de malignización, siendo alrededor del doble tanto en la aparición de papilomas premalignos como de SCCs (Fig. 51a).

4.4.3 La disminución en el número de tumores en los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ puede ser debida a un menor número de células madre epidérmicas.

Existen numerosos experimentos que apoyan la hipótesis de que los tumores epidérmicos derivan de células madre en las cuáles se producen los cambios génicos necesarios que llevan a su transformación y malignización (Morris y cols., 1997; Morris y cols., 2000). Esto queda demostrado mediante el protocolo de DMBA/TPA ya que, independientemente de cuánto tiempo después se realice la etapa de promoción con el TPA, la cinética de aparición y el número o tamaño de los tumores son similares en todos los casos (DiGiovanni, 1992). Estos datos indican que la promoción se realiza sobre células que retienen las alteraciones génicas, en este caso la mutación en $Ha-Ras$. Estas células únicamente pueden ser células madre epidérmicas ya que la epidermis de ratón se renueva aproximadamente cada 2-3 semanas. Por ello, la disminución en el número de tumores originados en ausencia de Rb puede ser reflejo de una alteración en el número de células madre epidérmicas. Con el objetivo de comprobarlo, se realizó un experimento clásico para determinar de forma sencilla el estado del compartimento de células con capacidad pluripotencial. Dicho experimento consiste en la administración de 4 inyecciones, una cada 12 horas, de una dilución de BrdU. Así, se consigue que la práctica totalidad de las células de la epidermis queden marcadas. Las células que, 30 y 75 días después del marcaje, aún retienen la BrdU incorporada en su ADN son células que, concretamente en el momento del marcaje, se encontraban dividiendo pero, o no se han vuelto a dividir, o lo han hecho pocas veces. Esta característica es propia de las células con capacidad pluripotencial o LRCs. Se observó que tanto a 30 (Fig. 52a) como a 75 días (Fig. 52b) después de las inyecciones de BrdU, las pieles de los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ contenían un menor número de LRCs, concretamente cerca de cuatro veces menos, en comparación con los controles $Rb^{F19/F19}$.

Estos datos podrían dar una explicación al menor número de tumores observados en los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$, ya que habría un menor número de células iniciadas mediante el DMBA que, posteriormente originarían los tumores. No obstante, la disminución en el número de LRCs podría deberse a otras causas diferentes a una reducción en la población de células madre (ver discusión). Por ello, se están realizando análisis de diferentes marcadores que caracterice la población de células madre epidérmicas en los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$.

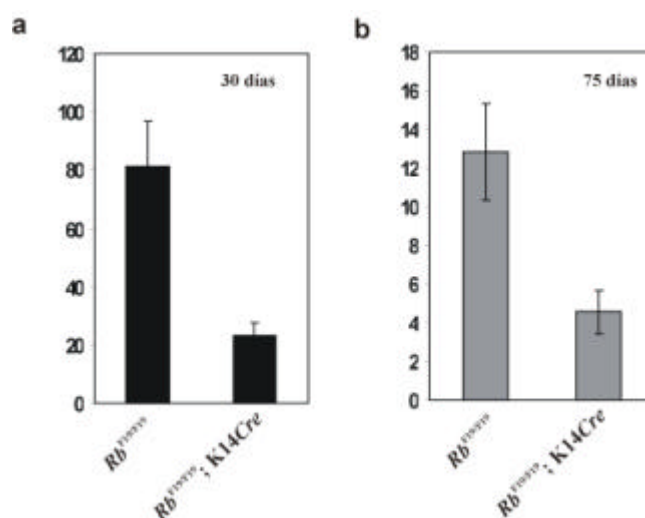


Fig. 51: Alteraciones en el compartimento de células madre debido a la ausencia de pRb. a, b) Análisis del número de LRCs presentes en la epidermis de los animales $Rb^{F19/F19}$ y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$. La gráfica se representa como el porcentaje de folículos que contienen células positivas a la incorporación de BrdU realizado tanto a 30 (a) como a 75 (b) días después de las inyecciones.

4.4.4 La ausencia de pRb induce un aumento en la apoptosis, posiblemente mediado por p53, en los tumores epidérmicos.

Debido a la implicación de Rb en los procesos de proliferación y apoptosis se estudiaron ambos procesos en los tumores obtenidos en los animales $Rb^{F19/F19}$ y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$. El grado de proliferación se determinó mediante el porcentaje de incorporación de BrdU en las células basales en el caso de los papilomas y en las células totales en los SCCs. Se analizaron un total de 15 papilomas (Fig. 53a; ejemplo representativo) y 15 SCCs (Fig. 53a; ejemplo representativo), seleccionados en diferentes animales de cada genotipo para evitar los efectos individuales de cada ratón. De esta forma, se intentó reducir el efecto de posibles diferencias intra-individuo que no fueran debidas a la pérdida intrínseca de Rb .

Se observó, a diferencia de lo que ocurre cuando se compara la epidermis de los animales $Rb^{F19/F19}$ y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$, que no existían diferencias significativas en el grado de incorporación de BrdU, y por tanto la proliferación del tumor, con independencia del genotipo o del tipo de tumor. Sin embargo, este dato sería inconsistente con la diferencia en los tamaños de los tumores observados entre ambos genotipos (Fig. 53b).

Por otro lado, también se analizó el número de células apoptóticas en los mismos tumores mencionados anteriormente mediante la técnica de TUNEL, aunque en este caso mediante técnicas de inmunofluorescencia. Además, se utilizó una tinción específica frente a la queratina K5 con el objetivo de discriminar exactamente la localización de las zonas epiteliales de las zonas de estroma del tumor. Se observó que los papilomas deficientes en Rb tenían un mayor número de células apoptóticas basales que los papilomas control (Fig. 54a, b). Curiosamente, en ambos genotipos existe un gran número de células del estroma, que se encuentran en apoptosis en los papilomas (Fig. 54a). Ello es debido a la acumulación de células inflamatorias productoras de citoquinas que inducen la muerte de los fibroblastos o de células localizadas en la matriz dérmica. Por el contrario, en el caso de los SCCs el mayor porcentaje de células apoptóticas se observó en tumores control mientras que los SCCs deficientes en Rb mostraron un menor porcentaje de apoptosis (Fig. 54a, b).

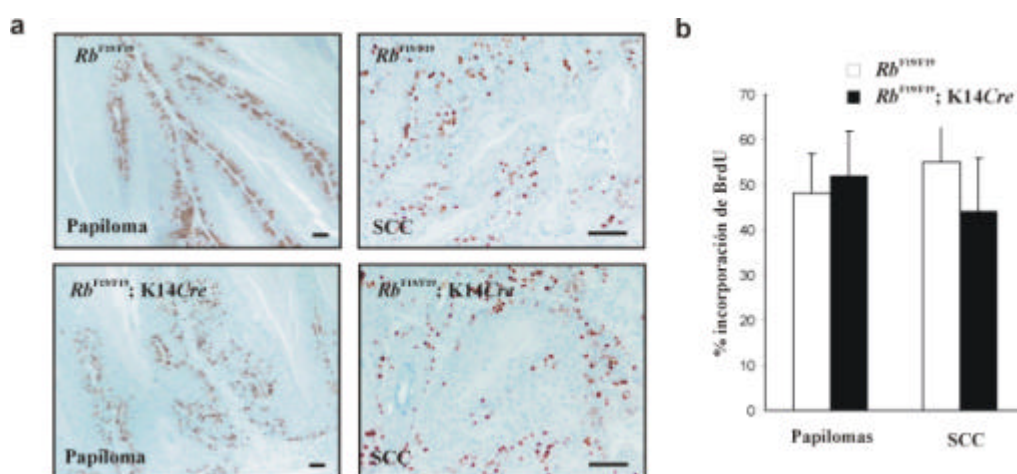


Fig. 53: El grado de incorporación de BrdU es independiente del tipo de tumor y de la presencia o ausencia de pRb. a) Ejemplo representativo de una tinción inmunohistoquímica realizada frente a BrdU en los tumores representados. b) Porcentaje medio de incorporación de BrdU en papilomas y SCCs obtenidos en $Rb^{F19/F19}$ y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$. Al menos se analizaron 15 tumores de cada tipo. Barra= 150 μ m.

Una de las proteínas mediadora de los procesos apoptóticos celulares más importante es p53, una fosfoproteína nuclear encargada de mediar una respuesta al daño en el genoma. Su activación induce, bien la parada de ciclo celular, bien la apoptosis o muerte celular dependiendo del tipo y grado de la agresión (Sionov y Haupt, 1999). La funcionalidad de p53 ha sido ampliamente analizada en los tumores obtenidos mediante el protocolo de DMBA/TPA (Ruggeri y cols., 1991). En estos estudios se comprobó que ningún papiloma e incluso SCCs de aparición temprana (30 semanas tras la iniciación) presentaba mutaciones en el gen de p53, siendo la proteína totalmente funcional (Ruggeri y cols., 1991). Sin embargo, sí se observaron mutaciones que producen alteraciones en la funcionalidad de p53 en un porcentaje de entre el 25-50% de tumores de aparición tardía (50-60 semanas tras la iniciación) (Ruggeri y cols., 1991). Además, estos tumores normalmente se caracterizaban por poseer un fenotipo poco diferenciado y más maligno, sugiriendo que la transición de papiloma a carcinoma epidermoide se caracteriza por la pérdida funcional de algunos genes como el de p53 (Klein-Szanto, 1989; Bremmer y Balmain, 1990; Ruggeri y cols., 1991). Esto queda demostrado porque ratones deficientes en p53 sometidos a carcinogénesis química (DMBA/TPA) tienen una mayor tasa de conversión maligna (Kemp y cols., 1993).

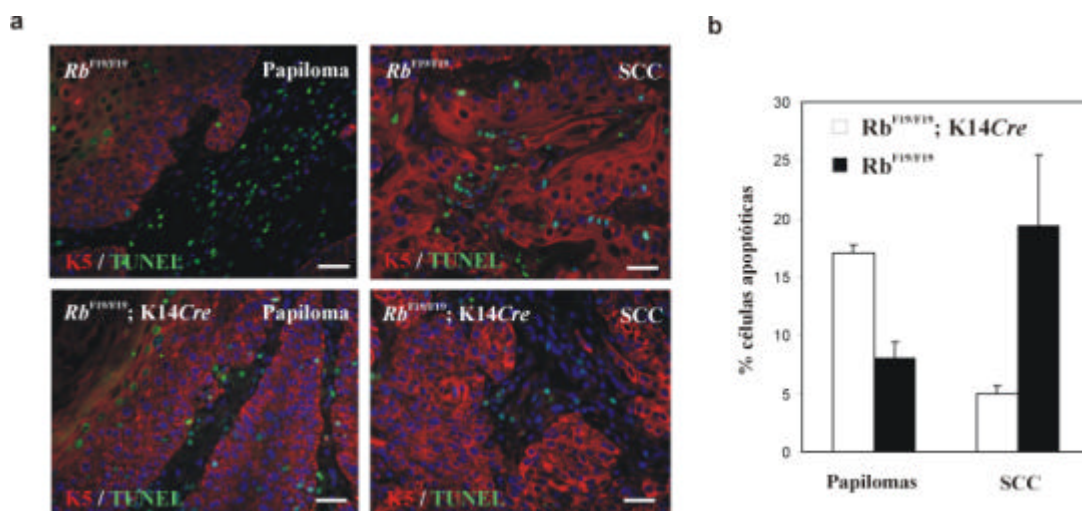


Fig. 54: Los papilomas deficientes en pRb tienen una mayor tasa apoptótica. a) Ejemplo representativo de una tinción inmunofluorescente realizada para detectar células apoptóticas (TUNEL, color verde) y K5 (color rojo) en los tumores representados. b) Porcentaje medio de células apoptóticas en papilomas y SCCs obtenidos en $Rb^{F19/F19}$ y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$. Al menos se analizaron 10 tumores de cada tipo. Barra= 150 μ m.

Con la base de estos datos previos, se analizó la expresión de p53 mediante análisis inmunohistoquímico como posible mediador apoptótico en los tumores derivados de los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$. La vida media de p53 es muy corta siendo necesaria una señal de estabilización, mediada normalmente por la inhibición de mdm2, una proteína que favorece la ubiquitinación de p53 y, por tanto, su degradación (Yap y cols., 1999). Se analizó la expresión de p53 en un total de 27 papilomas y 16 carcinomas entre ambos genotipos (Fig. 55a). Se observó que, en el caso de los papilomas deficientes en Rb existían elevados niveles de p53 nuclear en comparación con los papilomas control (Fig. 55a-c). Como ya se mencionó anteriormente, la presencia de mutaciones y la consecuente inactivación del gen de p53 en los papilomas originados mediante el protocolo de DMBA/TPA es improbable (Ruggeri y cols., 1991). Este dato sugiere que la proteína p53 detectada en los papilomas deficientes en Rb se encuentra realmente estabilizada y, por tanto, es funcional. Por ello, la estabilización de p53 se puede correlacionar con el aumento observado en el porcentaje de células apoptóticas (Fig. 54, 55). Sin embargo, no se puede descartar que p53 se encuentre mutada, ya que numerosas mutaciones de p53 conducen a su estabilización.

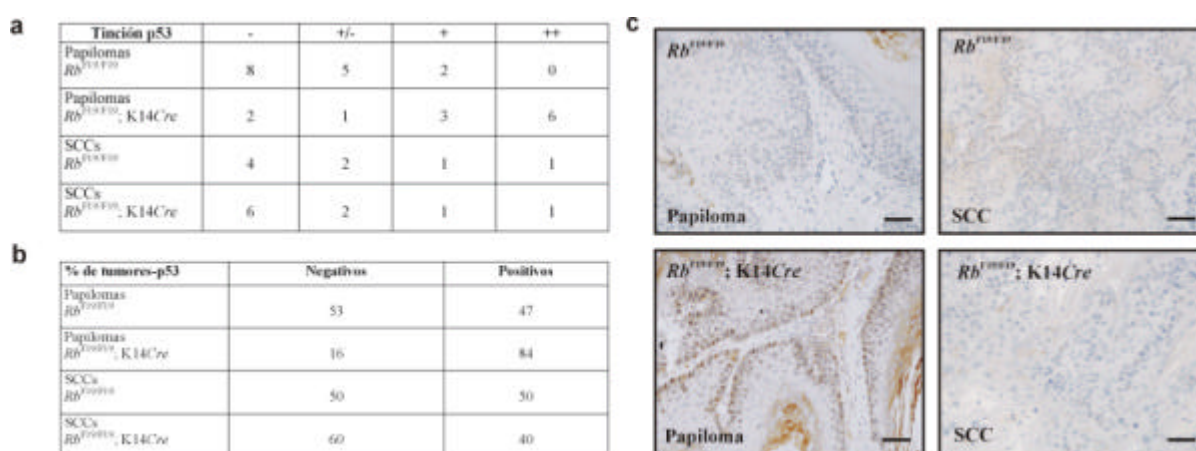


Fig. 55: Los papilomas deficientes en pRb tienen elevados niveles de p53 nuclear. a) Tabla esquemática del número de tumores analizados para la detección de p53. Clave: - (ausencia de tinción); +/- (tinción escasa o localizada en una zona determinada del tumor); + (tinción mayoritaria del tumor); ++ (tinción en todo el tumor de forma intensa). b) Porcentaje medio de tumores considerados negativos (-) y positivos (+/-, + y ++) en papilomas obtenidos en los animales $Rb^{F19/F19}$ y $Rb^{F19/F19}; K14Cre$. c) Ejemplo representativo de una tinción inmunohistoquímica realizada frente a p53 en los tumores de los genotipos representados. Barra= 150 μ m.

En el caso de los SCCs es más complicado diferenciar una tendencia ya que, la falta de inmunoreactividad a p53 puede ser debida a una ausencia en la señal de estabilización, dependiente o no de *Rb*, o bien a una mutación inactivante en el gen de p53 (Fig. 55a, b, c). Por otro lado, la inmunoreactividad de p53 en el caso de SCCs o incluso en los papilomas, podría suponer la existencia de formas mutadas de p53 que fueran estables. No obstante, aunque no se ha analizado el *status* del gen de p53 en su secuencia, la aparente tendencia de los papilomas deficientes en *Rb* a progresar a fenotipos más malignos, podría sugerir que, la ausencia de *Rb* constituya una fuerza selectiva hacia la pérdida de p53. Además, el menor número de SCCs positivos para p53 también se correlaciona con la disminución en el porcentaje de células apoptóticas en los mismos tumores (Fig. 54, 55).

5. *DISCUSIÓN*

*Cuatro cosas no pueden ser escondidas
durante mucho tiempo: la ciencia,
la estupidez, la riqueza y la pobreza.*

Averroes.

5.1 LA EPIDERMIS COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN.

La epidermis es un epitelio estratificado y queratinizado formado por una capa basal proliferativa cuyos queratinocitos migran hacia las capas suprabasales durante el proceso de diferenciación al que se ven sometidos. La separación espacial que existe entre los queratinocitos que se encuentran en proliferación o en diferenciación, así como la perfecta caracterización molecular mediante marcadores específicos de cada uno de estos procesos, convierten a la epidermis en un modelo único para el estudio de proteínas implicadas en la proliferación y la diferenciación.

Los miembros de la familia de retinoblastoma han sido descritos como moduladores esenciales en la progresión del ciclo celular (Weinberg, 1995). Además, también se han implicados en diversos aspectos de la diferenciación celular (Lipinski y Jacks, 1999). Debido a las alteraciones encontradas en proteínas que modulan la actividad de esta familia en un gran número de tumores epiteliales humanos, así como los trabajos previos de nuestro grupo que demostraron la implicación de esta familia en la proliferación, diferenciación, senescencia y carcinogenesis de la epidermis *in vitro*, el trabajo de esta Tesis Doctoral se dirigió a determinar el papel fisiológico que la familia de retinoblastoma, lleva a cabo en la epidermis *in vivo* mediante el uso de animales deficientes en cada uno de los miembros o en combinación de los mismos.

La letalidad embrionaria de los animales deficientes en *Rb*, debida a una proliferación ectópica y apoptosis masiva de células del SNC y SNP, así como a una eritropoiesis defectiva, impide el estudio de tejidos cuyo desarrollo embrionario acontece posteriormente o durante la vida adulta. Éste es el caso de la epidermis, cuya morfogénesis comienza alrededor del día 14,5 dpc. Para solventar este problema se han desarrollado estrategias, entre ellas el sistema Cre/LoxP, dirigidas a la eliminación de una proteína determinada de forma específica de tejido. El modelo animal de tipo condicional de *Rb* (Fig. 27) se ha usado con éxito para determinar el papel de esta proteína *in vivo* en una variedad de tejidos tales como en telencéfalo (Ferguson y cols., 2002), en el sistema nervioso central (McPherson y cols., 2003), en células granulares del cerebelo (Marino y cols., 2000) o en células neuroendocrinas (Vooijs y cols., 2002). En este estudio se ha utilizado un modelo transgénico que sobreexpresa de forma específica la recombinasa Cre en epitelios estratificados mediante el promotor de la queratina K14 (Fig. 28; Jonkers y

cols., 2001). La delección específica mediada por Cre en los queratinocitos epidérmicos lleva a la pérdida de la proteína pRb en los mismos (Figs. 29 y 30).

Para el estudio del papel de p107 y p130 en la epidermis se optó por la utilización de modelos deficientes de tipo convencional. Los animales p107^{-/-}; p130^{+/+} o p107^{+/-}; p130^{-/-} no muestran ninguna alteración fenotípica en el fondo genético C57BL/6 (Lee y cols., 1996; Cobrinik y cols., 1996). Por el contrario, los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} son letales perinatales debido posiblemente a fallos en el proceso de osificación endocondral (Fig. 9; Cobrinik y cols., 1996; Laplantine y cols., 2002; Rossi y cols., 2002). Estos animales también han sido utilizados para demostrar la presencia de alteraciones en la activación de linfocitos T por la droga estimulante concavalina-A (Mulligan y cols., 1998).

Mediante el uso de estos modelos animales se ha conseguido determinar la existencia de un papel esencial de los miembros de la familia de retinoblastoma en los procesos de proliferación, diferenciación, morfogénesis y carcinogénesis de la epidermis. Además, se ha podido discriminar entre funciones claramente compensadas funcionalmente por otros miembros de la familia así como funciones específicas para cada uno de los mismos.

5.2 EFECTOS AUTÓNOMOS Y NO AUTÓNOMOS DEBIDOS A LA PÉRDIDA DE p107 Y p130 EN LA EPIDERMIS.

Los animales p107^{+/-}; p130^{+/-} no tienen alteraciones en la morfogénesis de los folículos pilosos (Fig. 12). Sin embargo, los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} tienen una clara disminución en el número así como un retraso en el desarrollo de los mismos (Fig. 12). El fenotipo de los folículos deficientes en p107 y p130 es realmente complejo, ya que prácticamente se restaura en trasplantes de piel p107^{-/-}; p130^{-/-} realizados en ratones NOD-SCID, tanto en número de folículos, que incluso aumenta, como en el desarrollo del folículo durante la formación de la fase anagénica (Figs. 15-17).

El desarrollo de los folículos pilosos es un proceso que implica una serie de interacciones moleculares entre células mesenquimales y células epiteliales. La realización de trasplantes permite diferenciar cuál de estos compartimentos celulares se encuentra alterado, ya que las células dérmicas del animal receptor invadirán la piel trasplantada y participarán en la formación de la piel madura. De hecho, las células de la papila dérmica presentes en los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} expresaban p107 y p130,

sugiriendo que los fibroblastos del receptor se organizaban para originar una papila dérmica madura capaz de inducir el anagén de los folículos desarrollados a partir de la epidermis donante (Fig. 17). Estos resultados indicaban que, probablemente una alteración en la señalización molecular procedente de las células dérmicas, es la responsable de las alteraciones foliculares observadas en los animales p107^{-/-}; p130^{-/-}. No obstante, la existencia de folículos aberrantes y las alteraciones en la orientación y en el ciclaje de los folículos, sugiere que no todo el fenotipo folicular se restaura en una dermis normal y, que las alteraciones en ambos componentes, mesenquimal y epitelial pueden contribuir a ello (Fig. 16). Por otro lado, las alteraciones en la diferenciación terminal observadas en la epidermis de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} se mantienen en los trasplantes del mismo genotipo, sugiriendo que estas alteraciones se deben a un efecto autónomo debido a la pérdida de p107 y p130 en los queratinocitos epidérmicos (Figs. 11 y 18). Sin embargo, en el caso de los folículos pilosos, las alteraciones son debidas a una señalización defectiva no autónoma.

5.3 LOS DEFECTOS FOLICULARES OBSERVADOS EN LOS ANIMALES p107^{-/-}; p130^{-/-} NO SE DEBEN A ALTERACIONES EN LA FAMILIA DE RECEPTORES DE TNF- α .

La perfecta señalización epitelio-mesénquima es necesaria para un correcto desarrollo de los diferentes derivados ectodérmicos. La alteración de esta señalización en los folículos de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} sugería la existencia de defectos similares en otros derivados del mismo tipo. De hecho, la ausencia de p107 y p130 provoca alteraciones en el desarrollo del diente o de las vibrisas, órganos en los que se producen interacciones moleculares, entre el epitelio y el subyacente mesodermo, similares a las descritas en el caso de los folículos (Jernvall y Thesleff, 2000). Existen numerosos modelos animales que presentan alteraciones en el desarrollo de los folículos pilosos así como en los derivados dentales. Por ejemplo, los animales que tienen mutaciones *tabby/downless* presentan alteraciones en el desarrollo de los folículos y los dientes (Miard y cols., 1999; Pispá y cols., 1999; Headon y Overbeek, 1999; Laurikkala y cols., 2001, 2002) lo que demuestra la presencia de vías comunes en la génesis de estos órganos. En concreto, las alteraciones observadas en los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} son similares a las descritas en estos modelos animales. Sin embargo, no se detectaron alteraciones ni en la expresión ni en la localización de todas estas proteínas en los

folículos pilosos de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} en comparación con los animales control p107^{+/-}; p130^{+/-} (Fig. 14). Además, la actividad mediada por EDAR a través de los factores de transcripción NF- κ B, necesaria también para el desarrollo de los folículos y otros derivados ectodérmicos (Schmidt-Ullrich y cols., 2001), tampoco se ve alterada en la epidermis de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} (Fig. 14) descartando la implicación de la señalización mediada por EDA/EDAR en el fenotipo observado en los folículos de estos animales.

5.4 LOS FOLÍCULOS DEFICIENTES EN p107 Y p130 TIENEN UNA EXPRESIÓN DISMINUIDA DE BMP4.

Existen varias vías canónicas implicadas en la morfogénesis, el desarrollo y el ciclaje de los folículos pilosos tales como la vía de Wnt y la de Shh (Chiang y cols., 1999; Fuchs y cols., 2001) o la participación de factores solubles tales como FGFs (du Cros, 1993; Rosenquist y Martin, 1996; Suzuki y cols., 2000; Ota y cols., 2002), o miembros de la superfamilia de TGF β /BMPs (Blessing y cols., 1993; Paus y cols., 1997; Botchkarev y cols., 1999, 2001, 2002; Kulesa y cols., 2000; Foitzik y cols., 1999, 2000). En un análisis de la expresión de varias proteínas implicadas en todas estas vías de señalización únicamente se detectó una disminución en la expresión de BMP4 (Fig. 20). Modelos animales deficientes en *noggin*, proteína inhibitoria de la actividad BMP, han demostrado que la desregulación positiva de BMP inhibe el desarrollo de folículos secundarios, tipo de folículos mayoritarios en el ratón, e impide una correcta expresión de moléculas claves en la formación del folículo como Shh, Lef1, β -catenina o p75NTR (Botchkarev y cols., 1999, 2001, 2002). Por otro lado, la sobreexpresión de Noggin en las células de la matriz del folículo mediante el promotor del factor Msx2, sugieren un papel de BMP4 en la proliferación y diferenciación del folículo anagénico (Kulesa y cols., 2000). Sin embargo, los defectos observados en los folículos de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} no parecen deberse a una alteración directa mediada por Noggin ya que, tanto los folículos primarios como los secundarios, se encuentran afectados no detectándose alteraciones en la expresión de β -catenina, Lef1 o p75NTR (Fig. 21). Éste último además tiene una regulación independiente de BMP4 lo que apoyaría una actividad de *noggin* normal en la epidermis de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} (Botchkarev, 1999). Por otro lado, la expresión de HGF se encuentra muy disminuida en los folículos deficientes en p107 y p130

(Fig. 21). La localización de BMP4 y HGF es similar durante el desarrollo de *Xenopus* (Aberger y cols., 1997). Por otro lado, BMP2, pero no BMP4, es capaz de regular negativamente la expresión de HGF durante el desarrollo del primordio de la extremidad (Scaal y cols., 1999). En este caso no es posible discriminar si BMP4, de forma directa o indirecta, regula la expresión de HGF o viceversa. No obstante, el hecho de que HGF induzca el crecimiento del folículo piloso sugiere que podría tener cierta relevancia en el fenotipo folicular de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-}.

BMP4 parece tener un papel dual en el desarrollo del folículo piloso así como en el diente. Por un lado, la actividad excesiva de BMP inhibe el desarrollo del folículo (Botchkarev y cols., 1999, 2001, 2002) mientras que por otro, la señalización mediada por BMP es necesaria para la correcta formación del mismo (Kulesa y cols., 2000). De hecho, factores de transcripción tales como *Dlx3* o *Msx2*, regulados diferencialmente por BMP, son necesarios para la formación del folículo así como también del derivado dental (Satokata y cols., 2000; Park y Morasso, 2002). Además, *Msx2*, al igual que BMP4 (Enomoto-Iwamoto y cols., 1998; Minina y cols., 2001), participa en los procesos de condrogénesis y osteogénesis, concretamente, en la osificación endocondral (Satokata y cols., 2000), un proceso que se encuentra alterado en los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} (Cobrinik y cols., 1996). La implicación de estos factores en el desarrollo del fenotipo folicular de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} será estudiado en el futuro.

Las aparentes funciones contradictorias de BMP4 en el desarrollo del folículo y del derivado dental, pueden ser debidas a una expresión secuencial o diferencial en el mesénquima o en el epitelio (Feng y cols., 2002; Zhang y cols., 2002). En particular, la expresión de BMP4 en las células mesenquimales depende de secuencias que contienen sitios de reconocimiento para factores de transcripción Sp1 o para retinoblastoma (Feng y cols., 2002; Zhang y cols., 2002). Aunque no se puede descartar la implicación de ambos compartimentos, epitelial o mesenquimal, en la expresión disminuida de BMP4, el hecho de que en los trasplantes deficientes en p107 y p130 se restaure la expresión de BMP4, HGF y Noggin, apunta a que la señalización dependiente del componente mesenquimal es la mayor responsable del fenotipo (Fig. 21).

Por último, la ausencia de cambios en la expresión de algunas proteínas dependientes de la señalización de BMP4, tales como Lef1 o Shh, relevantes en el desarrollo folicular, sugiere que otros factores pueden compensar la disminución de BMP4 o que esta reducción no es suficiente para variar los niveles de dichas proteínas. Por ejemplo, en experimentos de hibridación de oligonucleótidos realizados en células

que sobreexpresan factores E2F se observó una disminución en los niveles de BMP4 (Muller y cols., 2001). Por otro lado, otra proteína modulada por BMP4 recientemente identificada, Δ Np63 (Bakkers y cols., 2002), se encuentra disminuida en los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} (Fig. 22). Los ratones deficientes en p63 carecen de epidermis así como de derivados ectodérmicos (Mills y cols., 1999; Yang y cols., 1998). Además, existen síndromes humanos caracterizados por alteraciones en el desarrollo folicular y dental cuya causa son mutaciones en el gen de p63 (Brunner y cols., 2002a; 2002b; van Bokhoven y McKeon, 2002). Sin embargo, la relación causal entre la disminución en la expresión de Δ Np63 y BMP4 y el fenotipo observado en los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} no se ha determinado.

5.5 LA EPIDERMIS DE LOS ANIMALES p107^{-/-}; p130^{-/-} TIENE ALTERACIONES EN LA VÍA DE β -CATENINA DEBIDAS A LA SOBREEXPRESIÓN DE FRAT.

Otra de las vías claramente implicadas en la morfogénesis, desarrollo y ciclaje de los folículos pilosos es la señalización mediada por Wnt/ β -catenina (Fuchs y Raghavan, 2002; Millar, 2002; Alonso y Fuchs; 2003). La unión de las proteínas Wnt a sus receptores de membrana, las proteínas Frizzled, activa una vía de transducción que lleva a la estabilización de la β -catenina citoplásmica permitiendo su translocación nuclear. La β -catenina nuclear forma un complejo de transcripción activo con los factores de la familia Lef/TCF permitiendo la expresión de determinadas proteínas (Wodarz y Nusse, 1998). Tanto β -catenina como Lef1 se localizan de forma nuclear tan pronto como la formación del folículo acontece (DasGupta y Fuchs, 1999; Merril y cols., 2001). La pérdida de β -catenina de forma específica en la epidermis impide la formación del folículo piloso mientras que la expresión de una forma constitutivamente activa en la epidermis induce un proceso de foliculogénesis *de novo* (Huelsen y cols., 2001; Gat y cols., 1998). Por otro lado, la activación transitoria de β -catenina es suficiente para la inducción de la fase anagénica del folículo postnatal, demostrando así, la importancia de esta proteína en los procesos de ciclaje de los folículos (Van Mater y cols., 2003). Debido al fenotipo observado en los folículos de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-}, se analizó la expresión y la localización de β -catenina en estos animales. Se observó que, aunque la localización nuclear en las células de la matriz era la descrita anteriormente (DasGupta y Fuchs, 1999;

Zhu y Watt, 1999; Merrill y cols., 2001), β -catenina también se localizaba de forma nuclear en los queratinocitos de la capa basal y no asociada en los complejos de adhesión en los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} (Fig. 23). Nuestros datos demostraron que la estabilización de β -catenina en la epidermis de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} (Figs. 24, 25) se debía a la sobreexpresión de Frat, una proteína inhibidora de la quinasa GSK3 β (Jonkers y cols., 1997; Yost y cols., 1998). Además, la expresión de Frat en queratinocitos, al igual que en células COS-7 (Li y cols., 1999), es suficiente para inducir la actividad transcripcional dependiente de Lef1 (Fig. 24). Esto se debe a la inducción de la traslocación nuclear de β -catenina (Fig. 25), tal y como se ha observado en otros modelos (Hino y cols., 2003). No obstante, a pesar de que la expresión de Frat se localiza en todas las capas de la epidermis de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-}, únicamente β -catenina es capaz de translocarse al núcleo de los queratinocitos de la capa basal pero no al núcleo de las células suprabasales en las que permanece asociada a los desmosomas (Fig. 25). Ello puede ser debido a efectos diferenciales de la actividad de Frat en queratinocitos proliferativos o en diferenciación, o a cambios en proteínas importantes en la regulación de β -catenina tales como variaciones locales en E-cadherina o GSK3 β .

La localización nuclear de β -catenina en los queratinocitos basales de la epidermis de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} de 18,5 dpc no inducía foliculogénesis *de novo*, más bien el fenotipo era el contrario, es decir, se caracterizaba por un menor número de folículos menos desarrollados (Fig. 12). Sin embargo, la aparición de nuevos folículos en el modelo transgénico que sobreexpresa la forma activa de β -catenina en la epidermis, únicamente sucede durante el primer ciclaje, pero no durante la morfogénesis folicular embrionaria (Gat y cols., 1998). Estos resultados sugieren que la acumulación nuclear de β -catenina durante el desarrollo embrionario en las células epidérmicas, no es suficiente para inducir la formación de nuevos folículos. Es posible que otras señales moleculares, presentes durante los posteriores ciclajes del folículo, no estén presentes en los folículos embrionarios, impidiendo al igual que en los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} la formación de nuevos folículos. Además, la ausencia de p107 y p130 puede producir alteraciones en los moduladores transcripcionales que interaccionan con β -catenina tales como factores de la familia Lef1/TCF (Wodarz y Nusse, 1998), represores transcripcionales de la familia TLE (Levanon y cols., 1998) o acetiltransferasas como CBP/p300 (Hecht y cols., 2000).

En este momento se desconoce si la inducción de Frat en la epidermis de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-}, es directa o indirecta. Es posible que los complejos

p107/E2F4, 5 o p130/E2F4, 5 repriman de alguna forma el promotor de Frat o bien que la liberación de los mismos factores E2F4, 5 como consecuencia de la pérdida de p107 y p130, promueva la activación transcripcional de Frat. De hecho, una comunicación personal procedente del laboratorio del Dr. Anton Berns confirmó la presencia de sitios E2F en el promotor de, al menos, Frat1 lo que refuerza la hipótesis de la regulación directa por E2F.

Por último, la expresión de Frat así como la localización nuclear ectópica de β -catenina se restaura en los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-} (Fig. 26). La similitud existente entre estos resultados y los obtenidos en referencia a BMP4 sugieren la posibilidad de una interconexión entre la vía de Wnt y de BMP. Recientemente, se ha demostrado que BMP4 es capaz de inducir la expresión de Dickkopf1, un inhibidor difusible de Wnt (Grotewold y Ruther, 2002a; Grotewold y Ruther, 2002b). Sin embargo, la relación entre Frat y BMP4, si existe, es compleja de establecer. Por ejemplo, en los animales deficientes en *noggin*, los cuales tienen desregulados la actividad BMP2/4, se detecta una disminución en la expresión de β -catenina, Shh y p75NTR (Botchkarev y cols., 2002). Además, otras vías pueden estar afectadas ya que, en los trasplantes p107^{-/-}; p130^{-/-}, se detectan diferentes alteraciones en los folículos pilosos aún estando restablecidas la expresión y la localización de BMP4, Frat o β -catenina. La verdadera relación entre todas estas vías se estudiará en el futuro.

5.6 LA PÉRDIDA DE pRb EN LA EPIDERMIS PRODUCE LA PROLIFERACIÓN ECTÓPICA DE LOS QUERATINOCITOS.

La deficiencia de pRb en la epidermis induce una hiperplasia generalizada acompañada de hiperqueratosis (Fig. 33). La hiperplasia observada sugiere la existencia de alteraciones en la proliferación de los queratinocitos. De hecho, en la capa basal de la epidermis de los animales *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre* se observó un aumento en la incorporación de BrdU, reflejo de la proliferación de un tejido, en comparación con sus hermanos *Rb*^{F19/F19} (Fig. 34). La entrada ectópica en fase S del ciclo celular ya se había descrito en el modelo deficiente en *Rb* de tipo convencional así como en algunos de los tejidos analizados mediante modelos deficientes de tipo condicional (Ferguson y cols., 2002; McPherson y cols., 2003). Este efecto es dependiente del tejido en el que se haya suprimido la expresión de pRb, ya que, en las células neuroendocrinas deficientes en *Rb*,

obtenidas mediante la expresión específica de Cre, no se detectó variación en la incorporación de BrdU (Vooijs y cols., 2002). Por otro lado, la proliferación ectópica en tejidos deficientes en *Rb* es, a diferencia de la apoptosis, dependiente de la ausencia de pRb en una forma autónoma. De hecho, se ha observado que la delección específica de *Rb* en el sistema nervioso central produce alteraciones en el ciclo celular (entrada ectópica en fase S) sin inducción de apoptosis (McPherson y cols., 2003). Ello es debido a que la apoptosis observada en los embriones deficientes en *Rb* es inducida por la hipoxia provocada por el fallo en el transporte de oxígeno, siendo un efecto no autónomo a la pérdida de *Rb* (McPherson y cols., 2003). La utilización de modelos deficientes de tipo condicional ayuda a discriminar entre efectos autónomos debidos a la pérdida intrínseca de la proteína o no autónomos debido a causas extrínsecas a la pérdida de la misma.

5.7 COMPENSACIÓN FUNCIONAL ENTRE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA DE RETINOBLASTOMA EN LA EPIDERMIS.

En los queratinocitos *Rb*^{F19/F19}; K14*Cre* se observó un aumento en la expresión de p107, aunque no de p130 (Fig. 30). Este incremento se ha observado en otros tipos celulares deficientes en pRb ya que el gen de *p107* se encuentra regulado negativamente por los complejos represores pRb/E2F (Hurford y cols., 1997; Dannenberg y cols., 2000). En este caso, p107 podría adquirir funciones que normalmente realiza pRb en el queratinocito. El aumento de p107 en respuesta a la pérdida de pRb hace sospechar de la existencia de compensación funcional entre estos dos miembros de la familia. La compensación funcional entre miembros de la familia de retinoblastoma ha sido ampliamente descrita tanto *in vivo*, mediante los modelos animales deficientes, como *in vitro*. Por ello, para determinar si p107 compensaba funcionalmente *in vivo* la pérdida de *Rb* en epidermis se cruzaron los animales *Rb*^{F19/F19}; K14*Cre* con animales deficientes en p107 de tipo convencional (Fig. 31). A pesar de que la deficiencia en *Rb* no produce variaciones en los niveles de mortalidad embrionaria así como en determinados parámetros fisiológicos (vida media, peso...), los animales deficientes en pRb y p107 eran letales alrededor del día 10 después del nacimiento (Fig. 32). Resulta improbable que la letalidad observada en los animales *Rb*^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14*Cre* se deba a las alteraciones observadas en la epidermis. Además, la pérdida de pRb y p107 no altera las propiedades de barrera de la epidermis y, por tanto, no se produce una deshidratación generalizada como sería consecuencia de la misma (Ruiz y cols., en prensa). No obstante, la epidermis

no es el único tejido epitelial donde se elimina *Rb*, por lo que la pérdida conjunta de *Rb* y *p107* en otro tejido (paladar, esófago, estómago aglandular, células epiteliales del timo...) podría ser la responsable de la letalidad postnatal de los animales *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}; *K14Cre*. A pesar de que datos preliminares demuestran la existencia de alteraciones fenotípicas en el timo, la causa real de la letalidad de los animales *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}; *K14Cre* no ha sido completamente dilucidada hasta la fecha.

El fenotipo epidérmico de los animales *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre* se ve agravado por la pérdida de alelos de *p107* (Figs. 32 y 33). Tanto la hiperplasia o la hiperqueratosis como el grado de proliferación de los queratinocitos basales se ven agravados de forma dosis-dependiente por la pérdida progresiva de uno o dos alelos de *p107* (Figs. 33 y 34). Sin embargo, la presencia de un solo alelo funcional de *Rb* revierte todo el fenotipo existente en los animales *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}; *K14Cre* (Figs. 32-34). Esto demuestra que *p107* realiza una función compensatoria como respuesta a la pérdida de *pRb* *in vivo* (Fig. 10; Ruiz y cols., 2003). Sin embargo, la compensación mediada por *p107* en respuesta a la pérdida de *Rb* también es específica del tejido. De hecho, la deficiencia conjunta de *pRb* y *p107* en las células fotorreceptoras de la retina no produce alteraciones fenotípicas claras (Vooijs y cols., 2002). No obstante, *p107* no puede compensar todas las funciones de *Rb* ya que los animales *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre* tienen un fenotipo muy evidente. La pérdida de *Rb* produce la liberación de factores E2F activadores (E2F1-3) que pueden ser acomplejados en parte por *p107* (ver más adelante). Sin embargo, la interacción de *pRb* con otras proteínas, independientemente de los factores E2F, abre un abanico de posibilidades acerca de los auténticos causantes de dicho fenotipo.

Resulta sorprendente que no se observe un aumento en la expresión de *p130* en queratinocitos deficientes en *Rb* y *p107* (Fig. 30) de igual modo a que no se observa un aumento de la expresión de *pRb* en los animales *p107*^{-/-}; *p130*^{-/-} (Fig. 9). Estos datos sugieren que, únicamente la pérdida de *pRb*, es capaz de inducir la expresión de otro miembro de la familia como mecanismo compensatorio. Ello puede deberse a que *p107* sea el único gen de la familia capaz de regularse por la actividad de los propios factores E2F (Hurford y cols., 1997). La epidermis de los animales *p130*^{-/-} es normal (Fig. 9; Ruiz y cols., 2003), por lo que sus funciones también se pueden compensar, al igual que en los animales *p107*^{-/-}, por cualquiera de los otros dos miembros de la familia existentes. No obstante, la deficiencia conjunta de *p107* y *p130* produce la aparición de un fenotipo epidérmico caracterizado por una disminución en el tamaño así como en el número de gránulos de queratohialina (Fig. 10; Ruiz y cols., 2003). Las alteraciones observadas en el

estrato granuloso se mantuvieron en los trasplantes de piel p107^{-/-}; p130^{-/-} (Fig. 16). Éstos, se caracterizan por una hiperplasia severa, hiperqueratosis y paraqueratosis, esto último sugiriendo alteraciones en la diferenciación terminal (Fig. 18, ver más adelante). Además, el grado de proliferación del trasplante p107^{-/-}; p130^{-/-} era mucho mayor que el del trasplante control p107^{+/-}; p130^{+/-} (Fig. 19). La pérdida conjunta de p107 y p130 debe controlar, de alguna forma, el grado de proliferación de la epidermis impidiendo la correcta formación de los complejos represores p107/E2F o p130/E2F, de manera que se produce una desregulación generalizada de genes implicados en la transición G1-S, tal y como ocurre en fibroblastos (Hurford y cols., 1997). De forma similar, los condrocitos deficientes en p107 y p130 se caracterizan por una alteración de la proliferación (Cobrinik y cols., 1996).

El fenotipo epidérmico de los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} sugiere la existencia de funciones específicas para cada uno de estos miembros. De hecho, en ningún caso se observaron alteraciones similares a las descritas para los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} en ausencia de pRb y/o p107. Esto indica que p130, además, tiene algún papel relevante y exclusivo en aspectos de la proliferación y/o diferenciación. Por el contrario, la compensación funcional de pRb en epidermis se lleva a cabo específicamente por p107 ya que, datos preliminares obtenidos mediante la generación de animales *Rb*^{F19/F19}; p130^{-/-}; *K14Cre*, demuestran que no existe un agravamiento del fenotipo de los animales *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre* por la pérdida de p130.

5.8 pRb, p107 y p130 TIENEN FUNCIONES ESPECÍFICAS EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE LA DIFERENCIACIÓN.

Como ya se ha mencionado, en los animales *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre* se observó la presencia de células suprabasales que incorporaban BrdU (Fig. 34). Este fenómeno se agravaba de forma dependiente de la ausencia de uno o dos alelos de *p107* (Fig. 34). El queratinocito basal proliferativo sufre una parada de ciclo previa al proceso de diferenciación y a su migración hacia capas suprabasales. Sin embargo, en ausencia de pRb, las células que están diferenciando continúan proliferando. Del mismo modo, células diferenciadas del telencéfalo deficientes en *Rb*, también continúan proliferando (Ferguson y cols., 2002). La proliferación anómala de células suprabasales, nunca observada en la epidermis de los animales *Rb*^{F19/F19}, hace suponer la existencia de alteraciones en la diferenciación. De hecho, en los animales *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre* se observó

una diferenciación anormal caracterizada por una expansión de la capa basal K5-positiva, por la expresión ectópica de K6 en la epidermis interfolicular y por la presencia de células que co-expresan K10/K5 y K10/K6 (Fig. 35). Este fenotipo también se ve agravado de forma dosis-dependiente por la pérdida de alelos de *p107* (Fig. 35). Se ha descrito que, en situaciones de hiperproliferación, la expresión de la queratina K10 puede disminuir a expensas de la expresión ectópica de otras queratinas como la queratina K6. De hecho, en los animales *Rb^{F19/F19}; p107+/-; K14Cre* y de forma más drástica, en los *Rb^{F19/F19}; p107-/-; K14Cre* se observó una disminución de las células que expresan este marcador de diferenciación temprana (Fig. 35).

Por otro lado, el estudio de la expresión de marcadores de diferenciación tardíos demostró la ausencia de alteraciones en animales *Rb^{F19/F19}; K14Cre* o *Rb^{F19/F19}; p107+/-; K14Cre* (Fig. 36). Únicamente se observó una disminución en la expresión de involucrina en los animales *Rb^{F19/F19}; p107-/-; K14Cre* (Fig. 35). Sin embargo, el panorama es totalmente distinto cuando se analizan los animales deficientes en *p107* y/o *p130*. La epidermis de los animales *p107+/-; p130+/-* carece de alteraciones en cualquiera de los marcadores de diferenciación analizados (Fig. 11). Por el contrario, los animales *p107-/-; p130-/-* tienen una disminución generalizada de los marcadores de diferenciación terminal, loricrina y filagrina, pero no de marcadores de diferenciación temprana como la queratina K10 (Fig. 11). Estas alteraciones se mantienen de una forma significativa en los trasplantes *p107-/-; p130-/-* (Fig. 18). Éstos, se caracterizan por una expresión suprabasal de K5, expresión ectópica de K6 y K13, una queratina asociada a epitelios simples, junto con una disminución generalizada de los marcadores de diferenciación terminal, loricrina y filagrina (Fig. 18).

Todos estos resultados demuestran la existencia de funciones específicas para cada uno de los miembros de la familia de retinoblastoma en la diferenciación epidérmica. Por un lado, *p107* y *p130* parecen proteínas implicadas en las etapas de la diferenciación terminal mientras que por otro, *pRb* parece controlar las etapas de diferenciación temprana (Ruiz y cols, 2003; Ruiz y cols, en prensa).

5.9 AUSENCIA DE ALTERACIONES EN EL CICLO CELULAR DEBIDAS A LA AUSENCIA DE pRb Y/O p107.

El uso de cultivos primarios de queratinocitos permite la obtención de datos que no pueden extraerse de la epidermis *in vivo* (Fig. 42). Mediante el análisis de curvas de

crecimiento se determinó que, los queratinocitos $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$ y, en menor medida, los $Rb^{F19/F19}; p107^{+/-}; K14Cre$, poseían cierta ventaja proliferativa frente al resto de genotipos analizados (Fig. 43). Sin embargo, el análisis del perfil de ciclo celular de cultivos asincrónicos de queratinocitos demostró la ausencia de variaciones en los porcentajes de células localizadas en las diferentes fases del ciclo (Fig. 44). A pesar de que ciertos trabajos describen una entrada acelerada en la fase S del ciclo celular en fibroblastos primarios deficientes en Rb (Herrera y cols., 1996), trabajos más recientes demuestran que en cultivos asincrónicos, el perfil de ciclo es indistinguible del observado en células control (Dannenber y cols., 2000; Sage y cols., 2000). Estos resultados sugerirían que pRb tiene un papel relevante en la entrada al ciclo celular desde un estado quiescente (Herrera y cols., 1996). Sin embargo, a diferencia de los queratinocitos, los fibroblastos deficientes en pRb y p107 sí parecen tener una entrada acelerada en el ciclo celular (Fig. 44; Dannenber y cols., 2000). El hecho de que los queratinocitos $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$ proliferen más rápido en cultivo, sin presentar un perfil de ciclo diferente al de las células control, se debe a que emplean un menor tiempo en atravesar todas las fases del ciclo celular, en lugar de tener acelerada alguna de las fases del mismo, en concreto, la fase S (Fig. 43).

5.10 PAPEL ESENCIAL DE pRb EN EL INICIO Y EL MANTENIMIENTO DEL ESTADO DE DIFERENCIACIÓN DE LOS QUERATINOCITOS *IN VIVO*.

La parada de ciclo celular terminal precede el inicio del proceso de diferenciación epidérmica. Los datos mostrados en este trabajo demuestran que ambos procesos, proliferación y diferenciación, se encuentran desacoplados en ausencia de pRb, ya que en los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ se observó la existencia de queratinocitos que expresaban marcadores de diferenciación tempranos como K10 y se encontraban todavía proliferando (Fig. 37). Además, se trata de células que, realmente se encuentran en un proceso de diferenciación ya que han perdido la expresión de K5 (Fig. 37). La presencia de células proliferando en capas suprabasales, una vez más, se agravaba en ausencia de una copia de $p107$ en animales adultos (Fig. 37). De forma similar, también se observó la existencia de células positivas para la expresión de K10 que continuaban proliferando en cultivos primarios de queratinocitos sometidos a diferenciación inducida por calcio (Fig. 46).

Los resultados *in vivo* e *in vitro* sustentan la hipótesis de un papel dual de pRb en la diferenciación epidérmica:

- Por un lado, la existencia de células suprabasales diferenciadas que incorporan BrdU en los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ hace suponer que pRb tiene un papel relevante en el inicio de la parada de ciclo previa a la diferenciación (Fig. 37). De forma similar, se ha descrito mediante la delección específica de *Rb* en el telencéfalo, la existencia de células que expresan nestina, un marcador pan-neuronal, y que, además, incorporan BrdU (Ferguson y cols., 2002). No obstante, en los queratinocitos deficientes en *Rb* la compensación funcional mediada por el aumento en la expresión de p107 es necesaria y suficiente para inducir *in vitro* una parada en el ciclo celular dependiente de calcio (Fig. 45). De hecho, células deficientes en *Rb* y *p107* son incapaces de detener la proliferación en respuesta a señales de diferenciación (Fig. 45). Además, la pérdida aguda de pRb en queratinocitos mediante la infección con un adenovirus que expresa la recombinasa Cre, provoca un fallo en la parada de ciclo mediada por calcio (Fig. 48). Posiblemente esto se debe a que la célula necesita un tiempo para aclimatarse a la pérdida de *Rb*, induciendo para ello, la expresión de p107 (Sage y cols., 2003). Sin embargo, durante este tiempo, la célula resulta incapaz de realizar la parada de ciclo como respuesta a la diferenciación mediada por el incremento de calcio. De forma similar, se ha observado que la pérdida aguda de *Rb* impide una parada de ciclo como respuesta a procesos como la quiescencia o la senescencia (Sage y cols., 2003). La diferencia entre la pérdida aguda o crónica de una proteína resulta realmente importante en una situación *in vivo*, en la que la célula tiene que responder de una manera eficaz a mutaciones en genes esenciales. Así, una incorrecta aclimatación a la nueva situación podría provocar una desregulación generalizada que conduciría al desarrollo de procesos neoplásicos.

- Por otro lado, pRb es necesario y suficiente para el mantenimiento del estado postmitótico de los queratinocitos sometidos a diferenciación terminal (Fig. 45). Este efecto parece exclusivo de pRb ya que los elevados niveles de p107 en queratinocitos $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ no son suficientes para mantener el queratinocito en un estado de diferenciación. Resultados similares se han descrito en la re-entrada en el ciclo celular de miocitos diferenciados deficientes en *Rb* (Schneider y cols., 1994).

Los efectos que pRb tiene en determinados aspectos de la diferenciación parecen deberse al aumento de expresión, la liberación, y por tanto, a la activación permanente de factores E2F (Fig. 47). La sobreexpresión en queratinocitos humanos de proteínas virales como E1A, HPVE7 o el antígeno T, que unen e inactivan pRb, p107 y p130, y por tanto, produce la liberación de factores E2F, reduce la capacidad de diferenciar de estas células (Taylor-Papadimitriou y cols., 1982; McCance y cols., 1988; Barrandon y cols., 1989).

Los queratinocitos $Rb^{F19/F19}; p107+/-; K14Cre$ y $Rb^{F19/F19}; p107-/-; K14Cre$ son incapaces de iniciar una parada de ciclo celular en respuesta al calcio, ya que la actividad E2F permanece elevada durante todo este proceso (Fig. 47b). Sin embargo, los queratinocitos $Rb^{F19/F19}; K14Cre$, de forma similar a los queratinocitos $Rb^{F19/F19}$, sufren una disminución de la actividad E2F. pRb se une e inhibe preferentemente las formas activadoras de E2F (E2F1-3) mientras que p107 y p130 se unen a las formas inhibitoras de E2F (4, 5) (Nevins, 1998). Sin embargo, la pérdida de uno de los miembros de la familia de retinoblastoma supone un reordenamiento en los complejos formados con los factores E2F. Así, linfocitos T deficientes en p130, en los que se detectaban complejos p130/E2F4, se caracterizan por la existencia de complejos p107/E2F4 (Mulligan y cols., 1998). Además, los linfocitos T p107-/-; p130-/- tienen complejos pRb/E2F4 que no se detectarían en una situación normal (Mulligan y cols., 1998). Del mismo modo, los complejos pRb/E2F3 observados en cultivos asincrónicos de fibroblastos primarios deficientes en *Rb*, se substituyen por los complejos p107/E2F3 (Lee y cols., 2002). En el caso de los queratinocitos deficientes en *Rb* la compensación funcional por p107 parece limitante, ya que depende del número de alelos y, por tanto, de la cantidad de proteína disponible en la célula. La actividad E2F en queratinocitos $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ es muy elevada en comparación con la observada en las células $Rb^{F19/F19}$ (Fig. 47b). Sin embargo, dicha actividad aumenta drásticamente con la pérdida de ambos alelos de *p107* (Fig. 47b). Estos datos sugieren que p107 probablemente forma complejos con una parte de las formas activas de E2F que normalmente acompleja pRb (Fig. 47b). La utilización de ensayos de retardo de movilidad en gel será esencial en el futuro para discriminar las diferentes poblaciones de complejos pRb, p107 o p130 acomplejada a los factores E2F.

5.11 POSIBLE REGULACIÓN POSITIVA MEDIADA POR pRb EN LA EXPRESIÓN DE LA QUERATINA K10.

La hiperplasia observada en la epidermis de los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$, y en mayor medida con la pérdida progresiva de alelos de p107, se caracteriza por una disminución en el número de células que expresan K10. Del mismo modo, aunque de una forma más aparente, en los queratinocitos $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ sometidos a diferenciación inducida por calcio también se observó una disminución en las células positivas para la expresión de K10. Datos previos de nuestro laboratorio demostraron que la co-expresión de p107 y pRb en células HaCaT, una línea de queratinocitos humana, inducía la

expresión de K10 (Paramio y cols., 1998). El mecanismo por el cuál, de una forma directa o indirecta, pRb y/o p107 podrían modular la expresión de K10, es desconocido hasta el momento. Se sabe que los miembros de la familia de retinoblastoma pueden modular la actividad de determinados factores de transcripción implicados en la diferenciación celular (Lipinski y Jacks, 1999). Por ejemplo, pRb interacciona físicamente con el factor MyoD para permitir una correcta expresión de marcadores de diferenciación tardíos en células musculares (Novitch y cols., 1996). Del mismo modo, la interacción de pRb con los factores C/EBP es necesaria para la inducción de la diferenciación de fibroblastos embrionarios de pulmón a células adiposas. (Chen y cols., 1996). Además, se ha descrito que el factor de transcripción C/EBP β , el cuál interacciona con pRb y p107, participa en la activación transcripcional de K10 (Maytin y cols., 1999; Zhu y cols., 1999; Charles y cols., 2001) y controla la proliferación en queratinocitos (Zhu y cols., 1999). Por tanto, se podría postular la existencia de una relación desconocida entre la funcionalidad de pRb y la expresión de K10.

Datos previos de nuestro laboratorio demostraron que la sobreexpresión de la queratina K10 en células epiteliales producía de forma específica una parada de ciclo celular. Además, esta parada de ciclo es dependiente de la presencia de un alelo funcional de *Rb* (Paramio y cols., 1999). Por otro lado, los animales deficientes en K10 se caracterizan por una hiperplasia epidérmica severa (Reichelt y cols., 2002) mientras que animales transgénicos que sobreexpresan K10 en el epitelio basal de la epidermis se caracterizan por hipoplasia y un bajo nivel proliferativo de los queratinocitos basales (Santos y cols., 2002). Mediante la generación de animales transgénicos *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre*; *K5hK10* (Fig. 38) se demostró que la parada de ciclo mediada por K10 *in vivo* es exclusivamente dependiente de pRb. Sin embargo, no todos los efectos mediados por la expresión de K10 son dependientes de *Rb*, ya que en los animales *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre*; *K5hK10* se observó un aumento de la hiperplasia epidérmica en comparación con la observada en los animales *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre* (Fig. 38). La interacción de K10 con proteínas señalizadoras como Akt/PKB (Paramio y cols., 2001) u otras aún no descritas pueden dar respuesta a los fenotipos observados. Por último, ya que la expresión de K10 en los transgénicos *K5hK10* impide la formación de tumores generados mediante un protocolo de DMBA/TPA (Santos y cols. 2002), sería plausible pensar que la pérdida de la expresión de K10 en tumores epiteliales se debiera a la inactivación funcional de la vía de *Rb*.

En el caso de los animales deficientes en *p107* y/o *p130* no se detectaron variaciones en la expresión de K10 en embriones de 18,5 dpc con independencia del genotipo analizado (Fig. 11). Sin embargo, en los trasplantes *p107*^{-/-}; *p130*^{-/-} sí se detectaron células suprabasales en las que la expresión de K10 había desaparecido (Fig. 18). No obstante, la expresión de K5 no es completa en todas las capas suprabasales y posiblemente estas células, a diferencia de los que ocurre con las células suprabasales deficientes en *Rb*, no co-expresa con K10, reflejando una situación de hiperproliferación en las que las primeras etapas de la diferenciación acontecen de una forma normal. Estos aspectos serán estudiados en el futuro con más detenimiento.

5.12 pRb PUEDE CONTROLAR EL BALANCE ENTRE LAS DIFERENTES POBLACIONES CELULARES DE LA EPIDERMIS.

En los folículos pilosos de los diferentes modelos animales deficientes en las proteínas de retinoblastoma se han observado fenotipos muy complejos siendo específicos de las proteínas delecionadas. Los animales *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre* se caracterizan por una hiperplasia de la vaina radicular externa, que se vuelve más severa con la pérdida progresiva de alelos de *p107* (Fig. 33). Los animales recién nacidos *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}; *K14Cre* carecen de vibrisas, cuya estructura se encuentra totalmente desorganizada (Fig. 32). Además, son incapaces de desarrollar pelo tanto 10 días después del nacimiento (Fig. 32) como durante el período adulto, tal y como se analizó en pieles deficientes en *pRb* y *p107* trasplantadas en ratones desnudos *nu/nu* (Fig. 41). La ausencia de pelo en los animales *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}; *K14Cre* parece ser debida en parte, a una apoptosis masiva, acompañada de una disminución en la proliferación, de las células de la matriz folicular (Fig. 39). Esta masiva inducción de apoptosis puede deberse a la actividad incontrolada de factores E2F y, concretamente de E2F1 (Fig. 47). De hecho, ratones transgénicos que sobreexpresan específicamente el factor E2F1 en la epidermis mediante el promotor K5, tienen una apoptosis masiva, dependiente de p53, de la misma región folicular (Pierce y cols., 1998a; Pierce y cols., 1998b). En el caso de los animales *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre* y *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{+/-}; *K14Cre* no se detectaron variaciones en la proliferación o apoptosis de los folículos pilosos en comparación con los controles *Rb*^{F19/F19} (Fig. 39). A pesar de ello, en ambos genotipos se observó que el pelo no era normal ya que presentaba un color mate y era ralo. La expresión de determinadas proteínas implicadas en la formación del pelo, como las detectadas por los anticuerpos AE13 y AE15, era similar en todos los genotipos

analizados. De hecho, determinadas células de los animales $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$ eran capaces de diferenciar y expresar dichos marcadores (Fig. 40). No obstante, la expresión de otras proteínas que participen en la formación del pelo, podría estar alterada, afectando de esta forma a la calidad del mismo.

Por otro lado, en el caso de los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$, y más profusamente en los $Rb^{F19/F19}; p107^{+/-}; K14Cre$, se observó con la edad una pérdida progresiva del pelo, con la aparición de calvas en los animales $Rb^{F19/F19}; p107^{+/-}; K14Cre$ (Fig. 41). Este fenotipo podría estar relacionado con una progresiva hiperplasia, dependiente del número de alelos de $p107$, de las glándulas sebáceas (Fig. 41). De hecho, en los trasplantes $Rb^{F19/F19}; p107^{-/-}; K14Cre$ es difícil observar estructuras foliculares ya que han sido completamente suplantadas por glándulas sebáceas hiperplásicas (Fig. 41). Otros modelos transgénicos, como el que sobreexpresa c-Myc en la capa basal de la epidermis, presenta un fenotipo similar al de los $Rb^{F19/F19}; p107^{+/-}; K14Cre$, ya que, en estos animales se produce una pérdida progresiva de pelo también asociada a una hiperplasia de las glándulas sebáceas (Waikel y cols., 2001; Arnold y Watt, 2001). Además, en los animales $K14-Myc2$, de forma similar a como ocurre en los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$, también existe una reducción en el número de células madre (ver más adelante). La célula madre epidérmica es capaz de diferenciar hacia células basales interfoliculares, células foliculares o células sebáceas. Es posible que, en ausencia de Rb así como por la sobreexpresión de c-Myc, la diferenciación hacia célula sebácea se encuentre favorecida de algún modo produciendo una hiperplasia de la glándula en detrimento de las células foliculares. De hecho, la expresión de c-Myc se ve regulada positivamente por los factores E2F (Hiebert y cols., 1989). La ausencia de Rb podría, no solo producir una alteración en la población de células madre epidérmicas, sino que también podría alterar de forma significativa el balance existente entre las diferentes poblaciones celulares derivadas de las mismas.

5.13 pRb NO COOPERA CON RAS EN LA FORMACIÓN DE TUMORES EPIDÉRMICOS.

El protocolo de carcinogénesis química de DMBA/TPA ha supuesto uno de los paradigmas esenciales en el estudio y la comprensión de la naturaleza secuencial del desarrollo tumoral. En este modelo, la aparición de carcinomas escamosos ocurre a través de diferentes etapas. Tras la mutación en el gen *Ha-Ras* mediante el tratamiento con

DMBA (Balmain y Pragnell, 1983; Quintanilla y cols., 1986; Roop y cols., 1986), las células iniciadas se expanden como resultado de un estímulo proliferativo, mediado por la administración de TPA, desarrollando papilomas tras 10-12 semanas en determinadas cepas sensibles como la SENCAR. La mayoría de estos papilomas regresan y desaparecen, pero algunos progresan hacia carcinomas escamosos de diferente malignidad. Muchos trabajos han demostrado la implicación de varias proteínas en este modelo algunas de las cuales regulan la vía de retinoblastoma, tales como ciclina D1 (Robles y cols., 1998) o CDK4 (Lazarov y cols., 2002; Rodríguez-Puebla y cols., 2002). Del mismo modo, se ha tratado de determinar el papel de *Rb* durante el protocolo de carcinogénesis DMBA/TPA. Se ha descrito que la sobreexpresión de E2F1 así como de CDK4 en la epidermis coopera con Ras en la formación de tumores epidérmicos (Pierce y cols., 1998a; Lazarov y cols., 2002). Por tanto, sería esperable que la pérdida de *Rb*, la cuál induce la liberación de E2F1 e incrementa la actividad E2F (Fig. 47), produjera un efecto similar en la formación tumoral. Sin embargo, el tratamiento con DMBA en epidermis de los animales *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre* no produce la aparición de tumores epidérmicos (Fig. 49). Esta aparente contradicción, se puede explicar por el hecho de que los niveles de E2F alcanzados en el modelo K5-E2F1 pueden ser muy superiores, e incluso no fisiológicos, en comparación con los existentes en los animales *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre*. En un modelo más aproximado a lo que sucedería *in vivo*, la pérdida de *Rb* no cooperaría con Ras en la formación de tumores epidérmicos.

5.14 LOS TUMORES DEFICIENTES EN pRb OBTENIDOS EN EL PROTOCOLO DMBA/TPA SE CARACTERIZAN POR UNA ESTABILIZACIÓN DE p53.

El tratamiento de DMBA/TPA en animales *Rb*^{F19/F19} y *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre* demostró, contrariamente a lo esperado, que la pérdida de *Rb* en la epidermis induce el desarrollo de un menor número de tumores, así como un menor tamaño de los mismos, en comparación con los animales *Rb*^{F19/F19} (Fig. 50). Algunos datos preliminares demuestran que las variaciones observadas en los tamaños de los tumores no se deben a alteraciones en los procesos angiogénicos que pudieran repercutir en el número o tamaño de los vasos del tumor. Por otro lado, existen numerosos experimentos que apoyan la hipótesis de que los tumores epidérmicos derivan de células madre en las cuáles se producen los cambios génicos necesarios que llevan a su transformación y malignización (Morris y cols., 1997;

Morris y cols., 2000). El hecho de que los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ tengan menos LRCs sugeriría que la población de células madre se encuentra disminuida (Fig. 52). Esto implicaría a un menor número de células susceptibles de ser iniciadas y, por tanto, de originar un tumor. No obstante, el número de LRCs puede ser diferente al de las células madre. Como se ha descrito en los resultados, el número de LRCs se contabiliza como el número de células que retienen la marca de la incorporación de BrdU a largo plazo. Si retienen dicha marca significa que sufren pocas divisiones en dicho período de tiempo, una de las características de las células madre. Sin embargo, es posible que células que tienen alteraciones en la proliferación, como es el caso de los queratinocitos deficientes en Rb , diluyan la marca de la BrdU al estar sometidas a una excesiva proliferación, sin variar por ello el número de células madre. De hecho, pRb, del mismo modo a como participa en el mantenimiento del estado postmitótico de los queratinocitos en diferenciación, podría estar implicado en mantener a la célula madre en el estado de quiescencia característico de la misma. Estos aspectos se estudiarán en el futuro con una caracterización más exhaustiva, mediante marcadores característicos, de la población madre epidérmica en ausencia de Rb .

Se determinó que los tumores deficientes en Rb no tenían variaciones en el grado de proliferación en comparación con los tumores de los animales $Rb^{F19/F19}$ independientemente del grado de malignidad (Fig. 53). Esto se debe a que el desajuste proliferativo existente en un tumor impide discriminar diferencias debidas, por ejemplo, a la pérdida de Rb , dado que una gran parte de las células del tumor se encuentran proliferando activamente (Fig. 53). Sin embargo, sí se detectaron diferencias en el número de células apoptóticas presentes en los tumores deficientes en Rb . De forma muy significativa, la población apoptótica aumentaba drásticamente en los papilomas obtenidos en los animales $Rb^{F19/F19}; K14Cre$ (Fig. 54). El incremento de la tasa apoptótica en los tumores deficientes en Rb puede justificar el menor tamaño de los mismos en comparación con los tumores obtenidos en los animales $Rb^{F19/F19}$. Además, la apoptosis detectada parecía depender de la estabilización de p53 en dichos papilomas (Fig. 55). Se ha descrito que los papilomas obtenidos mediante el protocolo DMBA/TPA carecen de mutaciones en el gen de p53 (Ruggeri y cols., 1991) detectándose únicamente durante el proceso de malignización a carcinoma escamoso (Ruggeri y cols., 1991). Por ello, la proteína p53 detectada en los papilomas deficientes en Rb debe ser funcional y mediadora de la apoptosis. No obstante, el estudio funcional de moléculas que regulan y que son reguladas por p53 así como el análisis genético de determinados exones de p53,

determinarán la posible existencia de mutaciones en dicho gen así como la funcionalidad de p53.

Por otro lado, solo se pudo detectar p53 en un bajo número de carcinomas escamosos, incluyendo los SCCs deficientes en *Rb* (Fig. 55). Como se ha mencionado antes, las mutaciones de p53 son características del proceso de malignización de los papilomas. De hecho, ratones deficientes en p53 tienen una mayor tasa de conversión maligna que los ratones control (Kemp y cols., 1993). Algo similar ocurre en el caso de los animales *Rb*^{F19/F19}; *K14Cre* ya que el porcentaje de papilomas pre-malignos así como el de los SCCs es mayor que en los *Rb*^{F19/F19} (Fig. 27) sugiriendo que la tasa de conversión maligna también es mayor. Además, los SCCs deficientes en *Rb* tienen un menor porcentaje de células apoptóticas en comparación con los SCCs control (Fig. 54). Todos estos datos podrían apuntar a que en una primera etapa, durante la formación de los papilomas, se produce una estabilización de p53 dependiente de la ausencia de *Rb*. Sin embargo, existiría una presión selectiva hacia la pérdida de p53 lo que redundaría en el aumento de la malignidad y la disminución de la apoptosis observado. El análisis que se está realizando en este momento de animales *Rb*^{F19/F19}; *p53*^{F1-10/F1-10}; *K14Cre* ayudará a determinar la importancia real de p53 en el desarrollo de tumores epidérmicos.

6. *CONCLUSIONES*

*La ciencia se compone de errores,
que a su vez, son los pasos hacia la verdad.*

Julio Verne.

En esta Tesis Doctoral se ha realizado un exhaustivo análisis del papel de la familia de retinoblastoma en los procesos de proliferación, diferenciación, morfogénesis y carcinogénesis de piel *in vivo* mediante el uso de animales deficientes en cada uno de los miembros de la familia por separado, o en combinación. Así, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- La deficiencia de p107 o p130 no produce ninguna alteración fenotípica en la epidermis. Sin embargo, la deficiencia combinada de ambas proteínas produce un fallo en la diferenciación terminal de la epidermis así como graves alteraciones en el desarrollo de determinados derivados ectodérmicos tales como el folículo piloso o el diente.
- El retraso en el desarrollo, así como el menor número, de los folículos pilosos observado en los animales p107^{-/-}; p130^{-/-} se restauró mediante la utilización de trasplantes de piel deficiente en p107 y p130 en ratones inmunodeficientes NOD-SCID. De esta forma, se demostró que la señalización del componente mesenquimal es determinante en el desarrollo del fenotipo de los folículos p107^{-/-}; p130^{-/-}.
- La pérdida de ambas proteínas, p107 y p130, produce una disminución en la expresión del morfógeno BMP4, que podría ser el responsable del fenotipo folicular. Además, también se produce un aumento en la expresión de Frat que produce la acumulación de β -catenina en el núcleo de los queratinocitos basales de la epidermis p107^{-/-}; p130^{-/-}. Por otro lado, la expresión de BMP4 y Frat se restaura en la piel trasplantada deficiente en p107 y p130, lo cuál redonda en un papel esencial de las células mesenquimales en el desarrollo del fenotipo folicular de los animales deficientes en p107 y p130.
- La pérdida de pRb en la epidermis produce una hiperplasia moderada acompañada de alteraciones en la proliferación y diferenciación. Este fenotipo se agrava de forma dosis-dependiente por la pérdida de alelos de *p107*, lo que demuestra que p107 en la epidermis compensa la mayor parte de las funciones de pRb en su ausencia.
- La pérdida de pRb y p107 en la epidermis produce alteraciones en la diferenciación temprana lo que demuestra la existencia de una especificidad para cada uno de los miembros de la familia de retinoblastoma en diferentes etapas de

la diferenciación. pRb tiene un papel dual en la diferenciación: por un lado, regula la parada de ciclo celular previa al proceso de diferenciación mientras que por otro, mantiene el estado postmitótico de los queratinocitos diferenciados. Las alteraciones observadas en ausencia de pRb y/o p107 en la diferenciación pueden deberse a una elevada actividad E2F.

- pRb y p107 también participan en el desarrollo del folículo piloso, ya que la pérdida de ambas proteínas impide la formación del pelo. Ello puede deberse a la masiva inducción de apoptosis en la matriz, zona proliferativa del folículo. Además, las células foliculares degeneran con el tiempo y el folículo es substituido por células sebáceas.
- La pérdida de pRb induce una disminución en el número de LRCs, las células que potencialmente se consideran como células madre en la epidermis.
- La ausencia de pRb en la epidermis induce la aparición de menos tumores y de menor tamaño, aunque más malignos, durante el protocolo de carcinogénesis de piel DMBA/TPA. Esto se asocia a una mayor tasa apoptótica en los papilomas deficientes en pRb, fenómeno posiblemente mediado por p53.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aberger, F., Weidinger, G. y Richter, K. (1997) A member of the Met/HGF-receptor family is expressed in a BMP-4-like pattern in the ectoderm of *Xenopus gastrulae*. *Biochem Biophys Res Commun*, **231**: 191-5.
- Aldaz, C.M., Trono, D., Larcher, F., Slaga, T.J. y Conti, C.J. (1989) Sequential trisomization of chromosomes 6 and 7 in mouse skin premalignant lesions. *Mol Carcinog*, **2**: 22-6.
- Alonso, L. y Fuchs, E. (2003) Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev*, **17**: 1189-200.
- Arbeit, J.M., Munger, K., Howley, P.M. y Hanahan, D. (1994) Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J Virol*, **68**: 4358-68.
- Arnold, I. y Watt, F.M. (2001) c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Curr Biol*, **11**: 558-68.
- Auewarakul, P., Gissmann, L. y Cid-Arregui, A. (1994) Targeted expression of the E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus type 16 in the epidermis of transgenic mice elicits generalized epidermal hyperplasia involving autocrine factors. *Mol Cell Biol*, **14**: 8250-8.
- Bailleul, B., Surani, M.A., White, S., Barton, S.C., Brown, K., Blessing, M., Jorcano, J.L. y Balmain, A. (1990) Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a ras oncogene from a suprabasal keratin promoter. *Cell*, **62**: 697-708.
- Baker, J.C., Beddington, R.S. y Harland, R.M. (1999) Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits bmp4 expression and activates neural development. *Genes Dev*, **13**: 3149-59.
- Bakkers, J., Hild, M., Kramer, C., Furutani-Seiki, M. y Hammerschmidt, M. (2002). Zebrafish DeltaNp63 is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm. *Dev Cell*, **2**: 617-27.
- Balmain, A., Krumlauf, R., Vass, J.K. y Birnie, G.D. (1982) Cloning and characterisation of the abundant cytoplasmic 7S RNA from mouse cells. *Nucleic Acids Res*, **10**: 4259-77.
- Balmain, A. y Pragnell, I.B. (1983) Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene. *Nature*, **303**: 72-4.
- Barrandon, Y., Morgan, J.R., Mulligan, R.C. y Green, H. (1989) Restoration of growth potential in paraclones of human keratinocytes by a viral oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 4102-6.
- Beijersbergen, R.L., Carlee, L., Kerkhoven, R.M. y Bernards, R. (1995) Regulation of the retinoblastoma protein-related p107 by G1 cyclin complexes. *Genes Dev*, **9**: 1340-53.
- Bilbao, G., Zhang, H., Contreras, J.L., Zhou, T., Feng, M., Saito, I., Mountz, J.D. y Curiel, D.T. (1999) Construction of a recombinant adenovirus vector encoding Fas ligand with a CRE/Loxp inducible system. *Transplant Proc*, **31**: 792-3.

Bitgood, M.J. y McMahon, A.P. (1995) Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*, **172**: 126-38.

Blessing, M., Rütther, U. y Franke, W. W. (1993) Ectopic synthesis of epidermal cytokeratins in pancreatic islet cells of transgenic mice interferes with cytoskeletal order and insulin production. *J. Cell Biol*, **120**: 743-755.

Bookstein, R., Rio, P., Madreperla, S.A., Hong, F., Allred, C., Grizzle, W.E. y Lee, W.H. (1990) Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**: 7762-6.

Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Roth, W., Nakamura, M., Chen, L.H., Herzog, W., Lindner, G., McMahon, J.A., Peters, C., Lauster, R., McMahon, A.P. y Paus, R. (1999) Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. *Nat Cell Biol*, **1**: 158-64.

Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Nakamura, M., Huber, O., Funa, K., Lauster, R., Paus, R. y Gilchrist, B.A. (2001) Noggin is required for induction of the hair follicle growth phase in postnatal skin. *FASEB J*, **15**: 2205-14.

Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Sharov, A.A., Funa, K., Huber, O. y Gilchrist, B.A. (2002) Modulation of BMP signaling by noggin is required for induction of the secondary (nontylotrich) hair follicles. *J Invest Dermatol*, **118**: 3-10.

Botchkareva, N.V., Botchkarev, V.A., Chen, L.H., Lindner, G. y Paus, R. (1999) A role for p75 neurotrophin receptor in the control of hair follicle morphogenesis. *Dev Biol*, **216**: 135-53.

Braylan, R.C., Benson, N.A., Nourse, V. y Kruth, H.S. (1982) Correlated analysis of cellular DNA, membrane antigens and light scatter of human lymphoid cells. *Cytometry*, **2**: 337-43.

Bremner, R. y 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**: 407-17.

Brunner, H. G., Hamel, B.C. y Bokhoven Hv, H. (2002a) p63 gene mutations and human developmental syndromes. *Am J Med Genet*, **112**, 284-90.

Brunner, H. G., Hamel, B.C. y Van Bokhoven, H. (2002b) The p63 gene in EEC and other syndromes. *J Med Genet*, **39**, 377-81.

Byrne, C., Tainsky, M. y Fuchs, E. (1994) Programming gene expression in developing epidermis. *Development*, **120**: 2369-83.

Cadigan, K.M. y Nusse, R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, **11**: 3286-305.

Chan, E.F., Gat, U., McNiff, J.M. y Fuchs, E. (1999) A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat Genet*, **21**: 410-3.

- Charles, A., Tang, X., Crouch, E., Brody, J.S. y Xiao, Z.X. (2001) Retinoblastoma protein complexes with C/EBP proteins and activates C/EBP-mediated transcription. *J Cell Biochem*, **83**: 414-25.
- Chen, P.L., Scully, P., Shew, J.Y., Wang, J.Y. y Lee, W.H. (1989) Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell*, **58**: 1193-8.
- Chen, P.L., Riley, D.J., Chen, Y. y Lee, W.H. (1996) Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev*, **10**: 2794-804.
- Chiang, C., Swan, R.Z., Grachtchouk, M., Bolinger, M., Litingtung, Y., Robertson, E.K., Cooper, M.K., Gaffield, W., Westphal, H., Beachy, P.A. y Dlugosz, A.A (1999) Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev Biol*, **205**: 1-9.
- Cinti, C., Claudio, P.P., Howard, C.M., Neri, L.M., Fu, Y., Leoncini, L., Tosi, G.M., Maraldi, N.M. y Giordano, A. (2000) Genetic alterations disrupting the nuclear localization of the retinoblastoma-related gene RB2/p130 in human tumor cell lines and primary tumors. *Cancer Res*, **60**: 383-9.
- Clarke, A.R., Maandag, E.R., van Roon, M., van der Lugt, N.M., van der Valk, M., Hooper, M.L., Berns, A. y te Riele, H. (1992) Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature*, **359**: 328-30.
- Classon, M. y Dyson, N. (2001) p107 y p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp Cell Res*, **264**: 135-47.
- Claudio, P.P., Howard, C.M., Pacilio, C., Cinti, C., Romano, G., Minimo, C., Maraldi, N.M., Minna, J.D., Gelbert, L., Leoncini, L., Tosi, G.M., Hicheli, P., Caputi, M., Giordano, G.G. y Giordano, A. (2000) Mutations in the retinoblastoma-related gene RB2/p130 in lung tumors and suppression of tumor growth in vivo by retrovirus-mediated gene transfer. *Cancer Res*, **60**: 372-82.
- Cobrinik, D., Whyte, P., Peeper, D.S., Jacks, T. y Weinberg, R.A. (1993) Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding protein. *Genes Dev*, **7**: 2392-404.
- Cobrinik, D., Lee, M.H., Hannon, G., Mulligan, G., Bronson, R.T., Dyson, N., Harlow, E., Beach, D., Weinberg, R.A. y Jacks, T. (1996) Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev*, **10**: 1633-44.
- Conti, C.J., Aldaz, C.M., O'Connell, J., Klein-Szanto, A.J. y Slaga, T.J. (1986) Aneuploidy, an early event in mouse skin tumor development. *Carcinogenesis*, **7**: 1845-8.
- Cotsarelis, G., Sun, T.T. y Lavker, R.M. (1990) Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell*, **61**: 1329-37.
- Dale, B.A., Resing, K.A. y Lonsdale-Eccles, J.D. (1985) Filaggrin: A keratin filament associated protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, **455**: 330-342.

- Dannenbergh, J.H., van Rossum, A., Schuijff, L y te Riele, H. (2000) Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev*, **14**: 3051-64.
- DasGupta, R. y Fuchs, E. (1999) Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development*, **126**: 4557-68.
- Datta, S.R., Brunet, A. y Greenberg, M.E. (1999) Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev*, **13**: 2905-27.
- de Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R. y Leone, G. (2003) Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem*, **278**: 42041-9.
- Dhouailly, D., Xu, C., Manabe, M., Schermer, A. y Sun, T.T. (1989) Expression of hair-related keratins in a soft epithelium: subpopulations of human and mouse dorsal tongue keratinocytes express keratin markers for hair-, skin- and esophageal-types of differentiation. *Exp Cell Res*, **181**: 141-58.
- DiGiovanni, J. (1992) Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Ther*, **54**: 63-128.
- du Cros, D.L. (1993) Fibroblast growth factor influences the development and cycling of murine hair follicles. *Dev Biol*, **156**: 444-53.
- Duglosz, A.A. y Yuspa, S H. (1993) Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J Cell Biol*, **120**: 217-25.
- Dyson, N. (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, **12**: 2245-62.
- Eastman, Q. y Grosschedl, R. (1999) Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol*, **11**: 233-40.
- Eckert, R.L. y Rorke, E.A. (1989) Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Envir. Health Perspect*, **80**: 109-116.
- Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Mukudai, Y., Kawakami, Y., Nohno, T., Higuchi, Y., Takemoto, S., Ohuchi, H., Noji, S. y Kurisu, K. (1998) Bone morphogenetic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *J Cell Biol*, **140**: 409-18.
- Ewen, M.E., Xing, Y.G., Lawrence, J.B. y Livingston, D.M. (1991) Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell*, **66**: 1155-64.
- Fantini, F. y Johansson, O. (1995) Neurochemical markers in human cutaneous Merkel cells. An immunohistochemical investigation. *Exp Dermatol*, **4**: 365-71.

- Feng, J.Q., Zhang, J., Tan, X., Lu, Y., Guo, D. y Harris, S.E. (2002) Identification of cis-DNA regions controlling Bmp4 expression during tooth morphogenesis in vivo. *J Dent Res*, **81**: 6-10.
- Ferguson, K.L., Vanderluit, J.L., Hebert, J.M., McIntosh, W.C., Tibbo, E., MacLaurin, J.G., Park, D.S., Wallace, V.A., Vooijs, M., McConnell, S.K. y Slack, R.S. (2002) Telencephalon-specific Rb knockouts reveal enhanced neurogenesis, survival and abnormal cortical development. *EMBO J*, **21**: 3337-46.
- Folk, J.E. y Chung, S.I. (1973) Molecular and catalytic properties of transglutaminases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **38**: 109-191.
- Foitzik, K., Paus, R., Doetschman, T. y Dotto, G.P. (1999) The TGF-beta2 isoform is both a required and sufficient inducer of murine hair follicle morphogenesis. *Dev Biol*, **212**: 278-89.
- Foitzik, K., Lindner, G., Mueller-Roever, S., Maurer, M., Botchkareva, N., Botchkarev, V., Handjiski, B., Metz, M., Hibino, T., Soma, T., Dotto, G.P. y Paus, R. (2000) Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta1 in vivo. *FASEB J*, **14**: 752-60.
- Franke, W.W.; Cowin, P.; Schmelt, M. y Kapprell, H.P. (1987) The desmosomal plaque and the cytoskeleton. *CIBA Found. Symp*, **125**: 26-48.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M. y Dryja, T.P. (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, **323**: 643-6.
- Fuchs, E.V. y Green, H. (1980) Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, **19**: 1033-42.
- Fuchs, E. (1990) Epidermal differentiation: The bare essentials. *J. Cell Biol*, **111**: 2807-14.
- Fuchs, E., Merrill, B.J., Jamora, C. y DasGupta, R. (2001) At the roots of a never-ending cycle. *Dev Cell*, **1**: 13-25.
- Fuchs, E. y Raghavan, S. (2002) Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet*, **3**: 199-209.
- Fung, Y.K., Murphree, A.L., T'Ang, A., Qian, J., Hinrichs, S.H. y Benedict, W.F. (1987) Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science*, **236**: 1657-61.
- Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L. y Fuchs, E. (1998) De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell*, **95**: 605-14.
- Ghazizadeh, S. y Taichman, L.B. (2001) Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J*, **20**: 1215-22.

- Grotewold, L. y Ruther, U. (2002a) The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J*, **21**: 966-75.
- Grotewold, L. y Ruther, U. (2002b) Bmp, Fgf and Wnt signalling in programmed cell death and chondrogenesis during vertebrate limb development: the role of Dickkopf-1. *Int J Dev Biol*, **46**: 943-7.
- Grubauer, H.G., Feingold, K.R., Harris, R. M. y Elias, P.M. (1989) Lipid content and lipid type as determinants of the epidermis permeability barrier. *J. Lipid Res*, **30**: 89-96.
- Hannon, G.J., Demetrick, D. y Beach, D. (1993) Isolation of the Rb-related p130 through its interaction with CDK2 and cyclins. *Genes Dev*, **7**: 2378-91.
- Harbour, J.W., Lai, S.L., Whang-Peng, J., Gazdar, A.F., Minna, J.D. y Kaye, F.J. (1988) Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science*, **241**: 353-7.
- Harbour, J.W. y Dean, DC. (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*, **14**: 2393-409.
- Hardy, MH. (1992) The secret life of the hair follicle. *Trends Genet*, **8**: 55-61.
- Harper, J.W. y Elledge, S.J. (1996) Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **6**: 56-64.
- Hashimoto, K. (1969) Cellular envelopes of keratinized cells of the human epidermis. *Arch. Clin. and Exp. Dermatol*, **235**: 374-383.
- Hauser, P.J., Agrawal, D., Flanagan, M. y Pledger, W.J. (1997) The role of p27kip1 in the in vitro differentiation of murine keratinocytes. *Cell Growth Differ*, **8**: 203-11.
- Headon, D.J. y Overbeek, P.A. (1999) Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nat Genet*, **22**: 370-4.
- Hecht, A., Vleminckx, K., Stemmler, M.P., van Roy, F. y Kemler, R. (2000) The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J*, **19**: 1839-50.
- Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P.M., Holbrook, K. y Yuspa, S.H. (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*, **19**: 245-254.
- Hennings, H. y Yuspa, S.H. (1985) Two-stage tumor promotion in mouse skin: an alternative interpretation. *J Natl Cancer Inst*, **74**: 735-40.
- Herrera, R.E., Sah, V.P., Williams, B.O., Makela, T.P., Weinberg, R.A. y Jacks, T. (1996) Altered cell cycle kinetics, gene expression, and G1 restriction point regulation in Rb-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **16**: 2402-7.

- Hino, S., Michiue, T., Asashima, M. y Kikuchi, A. (2003) Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *J Biol Chem*, **278**: 14066-73.
- Hiebert, S.W., Lipp, M. y Nevins, J.R. (1989) E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 3594-8.
- Hsieh, J.K., Chan, F.S., O'Connor, D.J., Mittnacht, S., Zhong, S. y Lu, X. (1999) RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell*, **3**: 181-93.
- Huelsken, J., Vogel, R., Erdmann, B., Cotsarelis, G. y Birchmeier, W. (2001) beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*, **105**: 533-45
- Hurford, R.K. Jr, Cobrinik, D., Lee, M.H. y Dyson, N. (1997) pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes. *Genes Dev*, **11**: 1447-63.
- Ikeda, M.A., Jakoi, L. y Nevins, J.R. (1996) A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 3215-20.
- Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A. y Weinberg, R.A. (1992) Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*, **359**: 295-300.
- Jernvall, J. y Thesleff, I. (2000) Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*, **92**: 19-29.
- Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D. y Nevins, J.R. (1993) Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*, **365**: 349-52.
- Jonhson, D.G. y Schneider-Broussard, R. (1998) Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front Biosci*, **3**: 447-8.
- Jonkers, J., Korswagen, H.C., Acton, D., Breuer, M. y Berns, A. (1997) Activation of a novel proto-oncogene, Frat1, contributes to progression of mouse T-cell lymphomas. *EMBO J*, **16**: 441-50.
- Jonkers, J., Meuwissen, R., van der Gulden, H., Peterse, H., van der Valk, M. y Berns, A. (2001) Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet*, **29**: 418-25.
- Kemp, C.J., Donehower, L.A., Bradley, A. y Balmain, A. (1993) Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors. *Cell*, **74**: 813-22.
- Kiess, M., Gill, R.M. y Hamel, P.A. (1995) Expression and activity of the retinoblastoma protein (pRB)-family proteins, p107 and p130, during L6 myoblast differentiation. *Cell Growth Differ*, **6**: 1287-98.

- Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R. y Nishizuka, Y. (1983) Protein kinase C as a possible receptor protein of tumour-promoting phorbol esters. *J. Biol Chem*, **258**: 11442-11445.
- Kimber, I., Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Bhushan, M. y Griffiths, C.E. (2000) Cytokines and chemokines in the initiation and regulation of epidermal Langerhans cell mobilization. *Br J Dermatol*, **142**: 401-12.
- Klein-Szanto, A.J. (1989) Pathology of human and experimental skin tumors. *Carcinog Compr Surv*, **11**: 19-53.
- Kojima, T., Morikawa, Y., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Senba, E. y Kitamura, T. (2000) TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *J Biol Chem*, **275**: 20742-7.
- Koster, M.I., Kim, S., Mills, A.A., DeMayo, F.J. y Roop, D.R. (2004) p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev*, **18**: 126-31.
- Kulesa, H., Turk, G. y Hogan, B.L. (2000) Inhibition of Bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle. *EMBO J*, **19**: 6664-74.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R. y Berns, A. (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*, **19**: 4293.
- Laplantine, E., Rossi, F., Sahni, M., Basilico, C. y Cobrinik, D. (2002) FGF signaling targets the pRb-related p107 and p130 proteins to induce chondrocyte growth arrest. *J Cell Biol*, **158**: 741-50.
- Laurikkala, J., Mikkola, M., Mustonen, T., Aberg, T., Koppinen, P., Pispa, J., Nieminen, P., Galceran, J., Grosschedl, R. y Thesleff, I. (2001) TNF signaling via the ligand-receptor pair ectodysplasin and edar controls the function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during tooth organogenesis. *Dev Biol*, **229**: 443-55.
- Laurikkala, J., Pispa, J., Jung, H.S., Nieminen, P., Mikkola, M., Wang, X., Saarialho-Kere, U., Galceran, J., Grosschedl, R. y Thesleff, I. (2002) Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Edar. *Development*, **129**: 2541-53.
- Lavker, R.M. y Sun, T. (1983) Epidermal stem cells. *J. Invest. Derm*, **81**: 121-7.
- Lazarov, M., Kubo, Y., Cai, T., Dajee, M., Tarutani, M., Lin, Q., Fang, M., Tao, S., Green, C.L. y Khavari, P.A. (2002) CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis. *Nat Med*, **8**: 1105-14.
- LeCouter, J.E., Kablar, B., Hardy, W.R., Ying, C., Megeney, L.A., May, L.L. y Rudnicki, M.A. (1998a) Strain-dependent myeloid hyperplasia, growth deficiency, and accelerated cell cycle in mice lacking the Rb-related p107 gene. *Mol Cell Biol*, **18**: 7455-65.

- LeCouter, J.E., Kablar, B., Whyte, P.F., Ying, C. y Rudnicki, M.A. (1998b) Strain-dependent embryonic lethality in mice lacking the retinoblastoma-related p130 gene. *Development*, **125**: 4669-79.
- Lee, E.Y., To, H., Shew, J.Y., Bookstein, R., Scully, P. y Lee, W.H. (1988) Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science*, **241**: 218-21.
- Lee, E.Y., Chang, C.Y., Hu, N., Wang, Y.C., Lai, C.C., Herrup, K., Lee, W.H. y Bradley, A. (1992) Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature*, **359**: 288-94.
- Lee, M.H., Williams, B.O., Mulligan, G., Mukai, S., Bronson, R.T., Dyson, N., Harlow, E. y Jacks, T. (1996) Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb. *Genes Dev*, **10**: 1621-32.
- Lee, W.H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L.J., Shew, J.Y. y Lee, E.Y. (1987) Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science*, **235**: 1394-9.
- Lees, E., Faha, B., Dulic, V., Reed, S.I. y Harlow, E. (1992) Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes Dev*, **6**: 1874-85.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozzney, J.M. y Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*, **16**: 4743-56.
- Leigh, I.M., Birgitte Lane, E. y Watt, F.M (eds.) (1994) *The keratinocyte handbook*. Pgs. 131-152. Cambridge University Press: Cambridge.
- Leis, H., Segrelles, C., Ruiz, S., Santos, M. y Paramio, J.M. (2002) Expression, localization, and activity of glycogen synthase kinase 3beta during mouse skin tumorigenesis. *Mol Carcinog*, **35**: 180-5.
- Levanon, D., Goldstein, R.E., Bernstein, Y., Tang, H., Goldenberg, D., Stifani, S., Paroush, Z. y Groner, Y. (1998) Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 11590-5.
- Lewandoski, M. (2001) Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet*, **2**: 743-55.
- Li, L., Yuan, H., Weaver, C.D., Mao, J., Farr, G.H. 3rd, Sussman, D.J., Jonkers, J., Kimelman, D. y Wu, D. (1999) Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J*, **18**: 4233-40.
- Lindner, G., Menrad, A., Gherardi, E., Merlino, G., Welker, P., Handjiski, B., Roloff, B. y Paus, R. (2000) Involvement of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor signaling in hair follicle morphogenesis and cycling. *FASEB J*, **14**: 319-32

- Lipinski, M.M. y Jacks T. (1999) The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene*, **18**: 7873-82.
- Lipinski, M.M., Macleod, K.F., Williams, B.O., Mullaney, T.L., Crowley, D. y Jacks, T. (2001) Cell-autonomous and non-cell-autonomous functions of the Rb tumor suppressor in developing central nervous system. *EMBO J*, **20**: 3402-13.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H.B., Allak, B.A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A. y Jonkers, J. (2001) Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 9209-14.
- Lukas, J., Petersen, B.O., Holm, K., Bartek, J. y Helin, K. (1996) Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol*, **16**: 1047-57.
- Lundberg, A.S. y Weinberg, R.A. (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*, **18**: 753-61.
- Lynch, M.H., O'Guin, W.M., Hardy, C., Mak, L. y Sun, TT. (1986) Acidic and basic hair/nail ("hard") keratins: their colocalization in upper cortical and cuticle cells of the human hair follicle and their relationship to "soft" keratins. *J Cell Biol*, **103**: 2593-606.
- MacPherson, D., Sage, J., Crowley, D., Trumpp, A., Bronson, R.T. y Jacks, T. (2003) Conditional mutation of Rb causes cell cycle defects without apoptosis in the central nervous system. *Mol Cell Biol*, **23**: 1044-53.
- Mann, S.J. (1962) Prenatal formation of hair follicles types. *Anat Rec*, **144**: 135-141.
- Marino, S., Vooijs, M., van Der Gulden, H., Jonkers, J. y Berns, A. (2000) Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev*, **14**: 994-1004.
- Maytin, E.V., Lin, J.C., Krishnamurthy, R., Batchvarova, N., Ron, D., Mitchell, P.J., Habener, J.F. (1999) Keratin 10 gene expression during differentiation of mouse epidermis requires transcription factors C/EBP and AP-2. *Dev Biol*, **216**: 164-81.
- McCance, D.J., Kopan, R., Fuchs, E. y Laimins, L.A. (1988) Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**: 7169-73.
- Mehrel, T., Hohl, D., Rothnagel, J.A. y cols. (1990). Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell*, **61**: 1103-12.
- Merrill, B.J., Gat, U., DasGupta, R. y Fuchs, E. (2001) Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev*, **15**: 1688-705.
- Miard, S., Peterkova, R., Vonesch, J.L., Peterka, M., Ruch, J.V. y Lesot, H. (1999) Alterations in the incisor development in the Tabby mouse. *Int J Dev Biol*, **43**: 517-29.

- Millar, S.E. (2003) WNTs: multiple genes, multiple functions *J Invest Dermatol*, **120**: 7-8.
- Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R. y Bradley, A. (1999) p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, **398**: 708-13.
- Minina, E., Wenzel, H.M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A.P. y Vortkamp, A. (2001) BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*, 2001 **128**: 4523-34.
- Missero, C., Serra, C., Stenn, K. y Dotto, G.P. (1993) Skin-specific expression of a truncated E1a oncoprotein binding to p105-Rb leads to abnormal hair follicle maturation without increased epidermal proliferation. *J Cell Biol*, **121**: 1109-20.
- Moll, A.C., Imhof, S.M., Bouter, L.M. y Tan, K.E. (1997) Second primary tumors in patients with retinoblastoma. A review of the literature. *Ophthalmic Genet*, **18**: 27-34.
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B. y Krepler, R. (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, **31**: 11-24.
- Morgan, D.O. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature*, **374**: 131-4.
- Morris, R.J., Tryson, K.A. y 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**: 226-9.
- Morris, R.J., Coulter, K., Tryson, K. y Steinberg, S.R. (1997) Evidence that cutaneous carcinogen-initiated epithelial cells from mice are quiescent rather than actively cycling. *Cancer Res*, **57**: 3436-43.
- Muller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D. y Helin, K. (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev*, **15**: 267-85.
- Mulligan, G.J., Wong, J. y Jacks, T. (1998) p130 is dispensable in peripheral T lymphocytes: evidence for functional compensation by p107 and pRB. *Mol Cell Biol*, **18**: 206-20.
- Mulligan, G. y Jacks, T. (1998) The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends Genet*, **14**: 223-9.
- Nehls, M., Pfeifer, D., Schorpp, M., Hedrich, H. y Boehm, T. (1994) New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature*, **372**: 103-7.
- Nevins, J.R. (1998) Toward an understanding of the functional complexity of the E2F y retinoblastoma families. *Cell Growth Differ*, **9**: 585-93.

- Nischt, R., Roop, D.R., Mehrel, T., Yuspa, S.H., Rentrop, M, Winter, H. y Schweizer, J. (1988) Aberrant expression during two-stage mouse skin carcinogenesis of a type I 47-kDa keratin, K13, normally associated with terminal differentiation of internal stratified epithelia. *Mol Carcinog*, **1**: 96-108.
- Novitch, B.G., Mulligan, G.J., Jacks, T. y Lassar, A.B. (1996) Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle. *J Cell Biol*, **135**: 441-56.
- Ormerod y cols. (1987) *Cytometry*, **8**: 637-41.
- Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K. y Barrandon, Y. (2001) Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*, **104**: 233-45.
- Ota, Y., Saitoh, Y., Suzuki, S., Ozawa, K., Kawano, M. y Imamura, T. (2002) Fibroblast growth factor 5 inhibits hair growth by blocking dermal papilla cell activation. *Biochem Biophys Res Commun*, **290**: 169-76
- Pan, H., Yin, C., Dyson, N.J., Harlow, E., Yamasaki, L. y Van Dyke, T. (1998) Key roles for E2F1 in signaling p53-dependent apoptosis and in cell division within developing tumors. *Mol Cell*, **2**: 283-92.
- Paramio, J.M., Laín, S., Segrelles, C., Lane, E. B. y Jorcano, J.L. (1998) Differential expression and functionally co-operative roles for the retinoblastoma family of proteins in epidermal differentiation. *Oncogene*, **17**: 949-58.
- Paramio, J.M., Casanova, M.L., Segrelles, C., Mittnacht, S., Lane, E.B. y Jorcano, J.L. (1999) Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cell Biol*, **19**: 3086-94.
- Paramio, J.M., Segrelles, C., Casanova, M.L. y Jorcano, J.L. (2000) Opposite functions for E2F1 and E2F4 in human epidermal keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*, **275**: 41219-26.
- Paramio, J.M., Segrelles, C., Ruiz, S., Martin-Caballero, J., Page, A., Martinez, J., Serrano, M. y Jorcano, J.L. (2001a) The ink4a/arf tumor suppressors cooperate with p21cip1/waf in the processes of mouse epidermal differentiation, senescence, and carcinogenesis. *J Biol Chem*, **276**: 44203-11.
- Paramio, J.M., Segrelles, C., Ruiz, S. y Jorcano, J.L. (2001b) Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol*, **21**: 7449-59.
- Park, G.T. y Morasso, M.I. (2002) Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) transactivates Dlx3 through Smad1 and Smad4: alternative mode for Dlx3 induction in mouse keratinocytes. *Nucleic Acids Res*, **30**: 515-22.

- Parkinson, E.K. y Emmerson, A. (1982) The effects of tumour promoters on the multiplication and morphology of cultured human epidermal keratinocytes. *Carcinogenesis*, **3**: 525-31.
- Parsa, R., Yang, A., McKeon, F. y Green, H. (1999). Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, **113**, 1099-105.
- Paus, R., Foitzik, K., Welker, P., Bulfone-Paus, S. y Eichmuller S. (1997) Transforming growth factor-beta receptor type I and type II expression during murine hair follicle development and cycling. *J Invest Dermatol*, **109**: 518-26.
- Paus, R., Muller-Rover, S., Van Der Veen, C., Maurer, M., Eichmuller, S., Ling, G., Hofmann, U., Foitzik, K., Mecklenburg, L. y Handjiski, B. (1999) A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol*, **113**: 523-32.
- Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F. y De Luca, M. (2001). p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3156-61.
- Perez, P., Page, A. y Jorcano, J.L. (2000) Role of phosphorylated p50-NF-kappaB in the ultraviolet response of mouse skin. *Mol Carcinog*, **27**: 272-9.
- Peters, G. (1994) The D-type cyclins and their role in tumorigenesis. *J Cell Sci Suppl*, **18**: 89-96.
- Phillips, A.C., Ernst, M.K., Bates, S., Rice, N.R. y Vousden, K.H. (1999) E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol Cell*, **4**: 771-81.
- Pierce, A.M., Fisher, S.M., Conti, C.J. y Johnson, D.G. (1998a) Deregulated expression of E2F1 induces hyperplasia and cooperates with ras in skin tumor development. *Oncogene*, **16**: 1267-76.
- Pierce, A.M., Gimenez-Conti, I.B., Schneider-Broussard, R., Martinez, L.A., Conti, C.J. y Johnson, D.G. (1998b) Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 8858-63.
- Pispa, J., Jung, H.S., Jernvall, J., Kettunen, P., Mustonen, T., Tabata, M.J., Kere, J. y Thesleff, I. (1999) Cusp patterning defect in Tabby mouse teeth and its partial rescue by FGF. *Dev Biol*, **216**: 521-34.
- Plewig, G., Jansen, T. y Schurer, N.Y. (1997) Stratum corneum. *Hautarzt*, **48**: 510-20.
- Portella, G., Liddell, J., Crombie, R., Haddow, S., Clarke, M., Stoler, A.B. y Balmain, A. (1994-5) Molecular mechanisms of invasion and metastasis during mouse skin tumour progression. *Invasion Metastasis*, **14**: 7-16.
- Potten, C.S. y Morris, R.J. (1988) Epithelial stem cells "in vivo". *J. Cell Sci. Supplement*, **10**: 45-62.

- Potts, R.O. y Francour, M.L. (1991) The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *J. Invest. Derm*, **96**: 495-499.
- Purkis, P.E., Steel, J.B., Mackenzie, I.C., Nathrath, W.B.J., Leigh, I.M. y Lane, E.B. (1990). Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J. Cell Sci.*, **97**: 39-50.
- Qin, X.Q., Livingston, D.M., Kaelin, W.G. Jr y Adams, P.D. (1994) Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**: 10918-22.
- Qin, X.Q., Livingston, D.M., Ewen, M., Sellers, W.R., Arany, Z. y Kaelin, W.G. Jr. (1995) The transcription factor E2F-1 is a downstream target of RB action *Mol Cell Biol*, **15**: 742-55.
- Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M. y Balmain, A. (1986) Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature*, **322**: 78-80.
- Ramirez, A., Bravo, A., Jorcano, J.L. y Vidal, M. (1994) Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development. *Differentiation*, **58**: 53-64.
- Rheinwald, J.G. y Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, **6**: 331-43.
- Reichelt, J. y Magin, T.M. (2002) Hyperproliferation, induction of cMyc and 14-3-3sigma, but no cell fragility in keratin-10-null mice. *J Cell Sci*, **115**: 2639-50.
- Resing, K.A. y Dale, B.A. (1991) Proteins of keratohyalin. In *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of skin*. Ed L. A. Goldsmith, pp. 148-167 N. Y.: Oxford University Press.
- Rice, R.H. y Green, H. (1979) Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: Activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell*, **18**: 681-694.
- Richon, V.M., Lyle, R.E. y McGehee, R.E. Jr. (1997) Regulation and expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **272**: 10117-24.
- Robanus-Maandag, E., Dekker, M., van der Valk, M., Carrozza, M.L., Jeanny, J.C., Dannenberg, J.H., Berns, A. y te Riele, H. (1998) p107 is a suppressor of retinoblastoma development in pRb-deficient mice. *Genes Dev*, **12**: 1599-609.
- Robles, A.I., Larcher, F., Whalin, R.B., Murillas, R., Richie, E., Gimenez-Conti, I.B., Jorcano, J.L. y Conti, C.J. (1996) Expression of cyclin D1 in epithelial tissues of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and severe thymic hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 7634-8.

- Rocco, J.W. y Sidransky, D. (2001) p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res*, **264**: 42-55.
- Rodriguez-Puebla, M.L., Miliani de Marval, P.L., LaCava, M., Moons, D.S., Kiyokawa, H. y Conti, C.J. (2002) Cdk4 deficiency inhibits skin tumor development but does not affect normal keratinocyte proliferation. *Am J Pathol*, **161**: 405-11.
- Roop, D.R., Lowy, D.R., Tambourin, P.E., Strickland, J., Harper, J.R., Balaschak, M., Spangler, E.F. y Yuspa, S.H. (1986) An activated Harvey ras oncogene produces benign tumours on mouse epidermal tissue. *Nature*, **323**: 822-4.
- Roop, D. R., Krieg, T. M., Mehrel, T., Cheng, C. K. y Yuspa, S.H. (1988) Transcriptional control of high molecular weight keratin gene expression in multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res*, **48**: 3245-52.
- Rosenquist, T.A. y Martin, G.R. (1996) Fibroblast growth factor signalling in the hair growth cycle: expression of the fibroblast growth factor receptor and ligand genes in the murine hair follicle. *Dev Dyn*, **205**: 379-86.
- Rossi, F., MacLean, H.E., Yuan, W., Francis, R.O., Semenova, E., Lin, C.S., Kronenberg, H.M. y Cobrinik, D. (2002) p107 and p130 Coordinately regulate proliferation, Cbfa1 expression, and hypertrophic differentiation during endochondral bone development. *Dev Biol*, **247**: 271-85.
- Ruggeri, B., Caamano, J., Goodrow, T., DiRado, M., Bianchi, A., Trono, D., Conti, C.J. y Klein-Szanto, A.J. (1991) Alterations of the p53 tumor suppressor gene during mouse skin tumor progression. *Cancer Res*, **51**: 6615-21.
- Ruiz, S., Segrelles, C., Bravo, A., Santos, M., Perez, P., Leis, H., Jorcano, J.L. y Paramio, J.M. (2003) Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130. *Development*, **130**: 2341-53.
- Ruiz, S., Santos, M., Segrelles, C., Leis, H., Jorcano, J.L., Berns, A., Paramio, J.M. y Vooijs, M. Unique and overlapping functions of Rb and p107 in the control of epidermal proliferation and differentiation. *Development*, en prensa.
- Sage, J., Miller, A.L., Perez-Mancera, P.A., Wysocki, J.M. y Jacks, T. (2003) Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature*, **424**: 223-8.
- Santos, M., Paramio, J.M., Bravo, A., Ramirez, A. y Jorcano, J.L. (2002) The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. *J Biol Chem*, **277**: 19122-30.
- Satokata, I., Ma, L., Ohshima, H., Bei, M., Woo, I., Nishizawa, K., Maeda, T., Takano, Y., Uchiyama, M., Heaney, S., Peters, H., Tang, Z., Maxson, R. y Maas, R. (2000) Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet*, **24**: 391-5.

- Sauer, B. y Henderson, N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**: 5166-70.
- Scaal, M., Bonafede, A., Dathe, V., Sachs, M., Cann, G., Christ, B. y Brand-Saberi, B. (1999) SF/HGF is a mediator between limb patterning and muscle development. *Development*, **126**: 4885-93.
- Schneider, J.W., Gu, W., Zhu, L., Mahdavi, V. y Nadal-Ginard, B. (1994) Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb^{-/-} muscle cells. *Science*, **264**: 1467-71.
- Schmidt-Ullrich, R., Aebischer, T., Hulsken, J., Birchmeier, W., Klemm, U. y Scheidereit, C. (2001) Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices. *Development*, **128**: 3843-53.
- Shih, H.H., Tevosian, S.G. y Yee, A.S. (1998) Regulation of differentiation by HBP1, a target of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, **18**: 4732-43.
- Segrelles, C., Ruiz, S., Perez, P., Murga, C., Santos, M., Budunova, I.V., Martinez, J., Larcher, F., Slaga, T.J., Gutkind, J.S., Jorcano, J.L. y Paramio, J.M. (2002) Functional roles of Akt signaling in mouse skin tumorigenesis. *Oncogene*, **21**: 53-64.
- Shan, B. y Lee, W.H. (1994) Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Mol Cell Biol*, **14**: 8166-73.
- Sionov, R.V. y Haupt, Y. (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*, **18**: 6145-57.
- Smith, E.J., Leone, G., DeGregori, J., Jakoi, L. y Nevins, J.R. (1996) The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a G0 cell state from a G1 cell state. *Mol Cell Biol*, **16**: 6965-76.
- Soriano, P. (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*, **21**: 70-1.
- Srivastava, A.K., Durmowicz, M.C., Hartung, A.J., Hudson, J., Ouzts, L.V., Donovan, D.M., Cui, C.Y. y Schlessinger, D. (2001) Ectodysplasin-A1 is sufficient to rescue both hair growth and sweat glands in Tabby mice. *Hum Mol Genet*, **10**: 2973-81.
- Stanley, J.R. y Yuspa, S.H. (1983) Specific epidermal protein markers are modulated during calcium-induced terminal differentiation. *J Cell Biol*, **96**: 1809-14.
- Steinert, P.M., Steven, A.C. y Roop, D.R. (1985) The molecular biology of intermediate filaments. *Cell*, **42**: 411-20.
- St-Jacques, B., Dassule, H.R., Karavanova, I., Botchkarev, V.A., Li, J., Danielian, P.S., McMahon, J.A., Lewis, P.M., Paus, R. y McMahon, A.P. (1998) Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr Biol*, **8**: 1058-68.

- Stoler, A.; Kopan, R., Duvic, M. y Fuchs, E. (1988) Use of monospecific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal epidermal differentiation. *J. Cell Biol*, **107**: 427-46.
- Stanley, J.R. y Yuspa, S.H. (1983) Specific epidermal protein markers are modulated during calcium-induced terminal differentiation. *J. Cell Biol*, **96**: 1809-14.
- Suzuki, S., Ota, Y., Ozawa, K. y Imamura, T. (2000) Dual-mode regulation of hair growth cycle by two Fgf-5 gene products. *J Invest Dermatol*, **114**: 456-63.
- Takahashi, K., Yan, B., Yamanishi, K., Imamura, S. y Coulombe, P.A. (1998) The two functional keratin 6 genes of mouse are differentially regulated and evolved independently from their human orthologs. *Genomics*, **53**: 170-83.
- Taylor, G., Lehrer M.S., Jensen, P.J., Sun, T.T. y Lavker, R.M. (2000) Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*, **102**: 451-61.
- Taylor-Papadimitriou, J., Purkis, P., Lane, E.B., McKay, I.A. y Chang, S.E. (1982) Effects of SV40 transformation on the cytoskeleton and behavioural properties of human keratinocytes. *Cell Differ*, **11**: 169-80.
- Thomas, G.M., Frame, S., Goedert, M., Nathke, I., Polakis, P. y Cohen, P. (1999) A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin. *FEBS Lett*, **458**: 247-51.
- Thyagarajan, B., Guimaraes, M.J., Groth, A.C. y Calos, M.P. (2000) Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene*, **244**: 47-54.
- Tseng, C.P., Kim, Y.J., Kumar, R. y Verma, A.K. (1994) Involvement of protein kinase C in the transcriptional regulation of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-inducible genes modulated by AP-1 or non-AP-1 transacting factors. *Carcinogenesis*, **15**: 707-715.
- Trimarchi, J.M., Fairchild, B., Wen, J. y Lees, J.A. (2001) The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 1519-24.
- van Bokhoven, H. y McKeon, F. (2002) Mutations in the p53 homolog p63: allele-specific developmental syndromes in humans. *Trends Mol Med*, **8**: 133-9.
- Van Mater, D., Kolligs, F.T., Dlugosz, A.A. y Fearon, E.R. (2003) Transient activation of beta-catenin signaling in cutaneous keratinocytes is sufficient to trigger the active growth phase of the hair cycle in mice. *Genes Dev*, **17**: 1219-24.
- Vooijs, M., te Riele, H., van der Valk, M. y Berns, A. (2002) Tumor formation in mice with somatic inactivation of the retinoblastoma gene in interphotoreceptor retinol binding protein-expressing cells. *Oncogene*, **21**: 4635-45.
- Waikel, R.L., Kawachi, Y., Waikel, P.A., Wang, X.J. y Roop, D.R. (2001) Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nat Genet*, **28**: 165-8.

- Wang, J., Guo, K., Wills, K.N. y Walsh, K. (1997) Rb functions to inhibit apoptosis during myocyte differentiation. *Cancer Res*, **57**: 351-4.
- Watson y cols. (1987) *Cytometry*, **8**: 1-8.
- Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**: 323-30.
- Weiss, R.A., Eichner, R. y Sun, T.T. (1984) Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *J Cell Biol*, **98**: 1397-406.
- Willert, K., Shibamoto, S. y Nusse, R. (1999) Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. *Genes Dev*, **13**: 1768-73.
- Wodarz, A. y Nusse, R. (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**: 59-88.
- Wu, X. y Levine, A.J. (1994) p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**: 3602-6.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dotsch, V., Andrews, N.C., Caput, D. y McKeon, F. (1998) p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*, **2**: 305-16.
- Yap, D.B., Hsieh, J.K., Chan, F.S. y Lu, X. (1999) mdm2: a bridge over the two tumour suppressors, p53 and Rb. *Oncogene*, **18**: 7681-9.
- Yost, C., Farr, G.H. 3rd, Pierce, S.B., Ferkey, D.M., Chen, M.M. y Kimelman, D. (1998) GBP, an inhibitor of GSK-3, is implicated in *Xenopus* development and oncogenesis. *Cell*, **93**: 1031-41.
- Yuspa, S.H., Ben, T., Hennings, H. y Lichti, U. (1980) Phorbol ester tumor promoters induce epidermal transglutaminase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **97**: 700-8.
- Yuspa, S.H., Ben, T. y Hennings, H. (1983) The induction of epidermal transglutaminase and terminal differentiation by tumor promoters in cultured epidermal cells. *Carcinogenesis*, **4**: 1413-8.
- Yuspa, S.H., Kilkenny, A.E., Steinert, P.M. y Roop, D.R. (1989). Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentration *in vitro*. *Journal of Cell Biology*, **109**, 1207-17.
- Yuspa, S.H. (1994) The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis-Thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res*, **54**: 1178-89.

Zhang, S.L., DuBois, W., Ramsay, E.S., Bliskovski, V., Morse, H.C. 3rd, Taddesse-Heath, L., Vass, W.C., DePinho, R.A. y Mock, B.A. (2001) Efficiency alleles of the Pctrl modifier locus for plasmacytoma susceptibility. *Mol Cell Biol*, **21**: 310-8.

Zhang, J., Tan, X., Contag, C.H., Lu, Y., Guo, D., Harris, S.E. y Feng, J.Q. (2002) Dissection of promoter control modules that direct Bmp4 expression in the epithelium-derived components of hair follicles. *Biochem Biophys Res Commun*, **293**: 1412-9.

zur Hausen, H. (1996) Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, **1288**: 55-78.

Zhu, A.J. y Watt, F.M. (1999) beta-catenin signalling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion. *Development*, **126**: 2285-98.

Zhu, S., Yoon, K., Sterneck, E., Johnson, P.F. y Smart, R.C. (2002) CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 207-12.

8. *ANEXO*

Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130

Sergio Ruiz¹, Carmen Segrelles¹, Ana Bravo³, Mirentxu Santos¹, Paloma Perez², Hugo Leis^{1,2,3}, Jose L. Jorcano¹ and Jesús M. Paramio^{1,*}

¹Program on Cell and Molecular Biology and Gene Therapy. CIEMAT, Avenue Complutense 22, E28040 Madrid, Spain

²Instituto de Biomedicina de Valencia. Jaime Roig 11, 46010-Valencia, Spain

³Department of Animal Pathology, Veterinary School, University of Santiago de Compostela, E27002 Lugo, Spain

*Author for correspondence (e-mail: jesusm.paramio@ciemat.es)

Accepted 26 February 2003

SUMMARY

The functions of p107 and p130, members of the retinoblastoma family, include the control of cell cycle progression and differentiation in several tissues. Our previous studies suggested a role for p107 and p130 in keratinocyte differentiation *in vitro*. We now extend these data using knockout animal models. We found impaired terminal differentiation in the interfollicular keratinocytes of p107/p130-double-null mice epidermis. In addition, we observed a decreased number of hair follicles and a clear developmental delay in hair, whiskers and tooth germs. Skin grafts of p107/p130-deficient epidermis onto *NOD/scid* mice showed altered differentiation and hyperproliferation of the interfollicular keratinocytes, thus demonstrating that

the absence of p107 and p130 results in the deficient control of differentiation in keratinocytes in a cell-autonomous manner. Besides normal hair formation, follicular cysts, misoriented and dysplastic follicles, together with aberrant hair cycling, were also observed in the p107/p130 skin transplants. Finally, the hair abnormalities in p107/p130-null skin were associated with altered Bmp4-dependent signaling including decreased Δ Np63 expression. These results indicate an essential role for p107 and p130 in the epithelial-mesenchymal interactions.

Key words: Mouse, Keratinocytes, p107, p130

INTRODUCTION

The skin plays an essential role as a protective barrier between the organism and the environment. This function is exerted by the epidermis and stems from a finely regulated differentiation program that takes place progressively as committed cells in the basal compartment move upwards to the epidermal surface. This process is characterized by the sequential expression of different proteins, coincident with the phenotypic evolution from basal cell to the mature, nonviable squame. Proliferative basal cells express the keratin pair K5+K14 switching to the pair K1+K10 expression when differentiation and migration begin. Finally, loricrin and filaggrin are expressed during the latest differentiation stages (reviewed by Byrne, 1997; Byrne et al., 1994; Fuchs, 1998; Fuchs and Byrne, 1994). Taken together, the epidermis represents a perfectly suited model for studying proliferation and differentiation. However, the molecular mechanisms governing epidermal differentiation are still largely unknown.

The skin is also characterized by the presence of epidermal appendages. Among them, the hair follicles are of a particular interest. These structures develop through a series of epithelium-mesenchyme interactions (reviewed by Fuchs, 1998; Fuchs et al., 2001; Fuchs and Raghavan, 2002; Hardy, 1992; Millar, 2002), which are similar to those regulating the morphogenesis of other ectodermal organs such as tooth

(reviewed by Jernvall and Thesleff, 2000). Among the different signals involved in hair morphogenesis, recent experimental evidences have demonstrated that several components of the Wnt pathway are essential. In fact, the downstream effectors of Wnt signaling, β -catenin and Lef1, are expressed in epithelial and mesenchymal compartments as soon as hair follicle formation is induced (Huelsken et al., 2001; Zhou et al., 1995). In addition, the specific ablation of the gene for β -catenin in epidermis results in a deficiency in hair follicle formation (Huelsken et al., 2001), whereas non-degradable β -catenin expression in skin leads to de novo hair formation (Gat et al., 1998). Mice that lack Lef1, do not develop whiskers and show a reduced number of body hairs (van Genderen et al., 1994), and the increased expression of Lef1 in the epidermis of transgenic animals leads to defects in the positioning and orientation of hair follicles (Zhou et al., 1995). Finally, the expression of dickkopf 1, a potent diffusible inhibitor of Wnt action, in the skin of transgenic mice produces a complete failure of placode formation prior to morphological or molecular signs of hair differentiation (Andl et al., 2002). In addition to Wnt, a number of other key signaling pathways, including those modulated by fibroblast growth factors (FGFs) (du Cros, 1993; Ota et al., 2002; Rosenquist and Martin, 1996; Suzuki et al., 2000), bone morphogenetic proteins (BMPs) (Blessing et al., 1993; Botchkarev et al., 2001; Botchkarev et al., 1999; Botchkarev et al., 2002; Kulesa et al., 2000), TGF β

(Foitzik et al., 2000; Foitzik et al., 1999; Paus et al., 1997) and Shh (Bitgood and McMahon, 1995; Chiang et al., 1999; St-Jacques et al., 1998), participate a reiterative manner during the hair follicle development (reviewed by Millar, 2002). More recently, different members of the TNF α receptor superfamily (Headon and Overbeek, 1999; Kojima et al., 2000; Koppinen et al., 2001; Laurikkala et al., 2001; Laurikkala et al., 2002; Mikkola et al., 1999; Monreal et al., 1999; Naito et al., 2002; Schneider et al., 2001; Thesleff and Mikkola, 2002) and subsequent signaling through NF κ B family of transcription factors (Schmidt-Ullrich et al., 2001) have also been involved in hair follicle morphogenesis and cycling. Finally, the transcriptional co-activator p63 (reviewed by Brunner et al., 2002b; Irwin and Kaelin, 2001; Levrero et al., 2000; Marin and Kaelin, 2000; van Bokhoven and Brunner, 2002; Yang et al., 2002; Yang and McKeon, 2000) is of crucial importance for correct development of ectodermal appendages and mutations in the *P63* gene (*TP73L* – Human Gene Nomenclature Database) are found in a number of human syndromes that are characterized by defects in hair and teeth (reviewed by Brunner et al., 2002b; van Bokhoven and McKeon, 2002). This protein, the most recently discovered member of the p53 family, is expressed in embryonic ectoderm and in the basal, proliferative layer of epidermis (Parsa et al., 1999; Pellegrini et al., 2001), and appears to be a keratinocyte stem cell marker (Lee and Kimelman, 2002; Pellegrini et al., 2001). In agreement, besides other anomalies, the *p63*-knockout mouse lacks epidermis, apparently owing to the loss of stem cells required for the tissue (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999). However, the actual molecular functions of p63 (*Tcp1* – Mouse Genome Informatics) in hair growth and development have not been yet delineated.

Cell cycle withdrawal is a common prerequisite for terminal differentiation in most tissues. Consequently, those molecules implicated in cell cycle regulation might have additional functions modulating cell differentiation. This hypothesis has been clearly confirmed in the case of the retinoblastoma family of proteins. This includes pRb, p107 (*Rbl1* – Mouse Genome Informatics) and p130 (*Rbl2* – Mouse Genome Informatics). All these proteins modulate cell cycle progression during G1 through their ability to bind and inhibit different members of the E2f transcription factor family (Classon and Dyson, 2001; Weinberg, 1995), although with different affinity, as E2f1-3 bind preferentially to pRb, whereas E2f4 and E2f5 bind to p107 and p130 (Classon and Dyson, 2001). In addition, these proteins regulate different aspects of the differentiation process in a number of tissues (reviewed by Classon and Dyson, 2001; Lipinski and Jacks, 1999), as demonstrated by the analyses of mice lacking the different members of the retinoblastoma family. Rb-deficient animals die between day 13 and 15 of gestation, displaying overt defects in erithroid, neuronal and lens development (Clarke et al., 1992; Jacks et al., 1992; Lee et al., 1992). By contrast, mice deficient in p107 or p130 develop normally and do not display any overt phenotype (Cobrinik et al., 1996; Lee et al., 1996), indicating that, in most tissues, either p107 or p130 is dispensable for development, and suggesting a functional overlap between them. In agreement, mice that lack both proteins die immediately after birth and display defects in bone development, associated with impaired chondrocyte differentiation (Cobrinik et al., 1996). However, *Rbl1/p107*-deficient embryos die earlier than their

Rbl1^{-/-} littermates supporting the notion that p107 can substitute some of the functions of pRb in differentiation, allowing the extended survival observed in *Rbl1*-deficient embryos (Lee et al., 1996). Interestingly, the developmental consequences of p107 or p130 deficiency might be determined by the genetic background (LeCouter et al., 1998; LeCouter et al., 1996).

With respect to the possible functions of the retinoblastoma family in skin, we have reported that p107 and p130 are differentially expressed and participate during in vitro human keratinocyte terminal differentiation process (Paramio et al., 1998; Paramio et al., 2000). To investigate in more detail the relevance of the functionality of these proteins in epidermal differentiation in vivo, we have analyzed the skin in mice lacking p107 and/or p130. Our present results confirm that p107 and p130 are necessary to proper epidermal terminal differentiation and, in addition, are essential mediators in the inductive signals between epithelium and mesenchyme and important regulators of several morphogens involved in such inductive interactions.

MATERIALS AND METHODS

Mice and histological procedures

The mice with the different genotypes were generated and identified by PCR as described (Cobrinik et al., 1996; Lee et al., 1996). Skin samples or whole embryos at 14.5, 16.5 and 18.5 dpc (days post coitum) from wild-type and p107/p130-null mice were fixed in 10% buffered formalin or 70% ethanol, and embedded in paraffin wax. Sections (5 μ m) were stained with Hematoxylin/Eosin or processed for immunohistochemistry and analyzed with a Zeiss Axiophot microscope.

Immunohistochemical methods

Immunohistochemistry was performed on deparaffinized sections using antibodies against K10 (K8.60 mAb, 1/75 dilution, Sigma), loricrin (1/500 dilution of a monospecific rabbit polyclonal antibody, Covance) and filaggrin (1/500 dilution of a monospecific rabbit polyclonal antibody, Covance). Δ Np63 was detected using 4A4 mAb (1/150 dilution; Santa Cruz Biotechnology) in formalin-fixed samples. Bmp4 and noggin antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (1/50 dilution), p75NTR (Ngfr – Mouse Genome Informatics) from Covance (1/500 dilution) and Hgf from R&D (1/50 dilution), and were used in formalin-fixed samples after microwave treatment. The expression of EDAR and XEDAR (R&D) and TROY/TAJ (Santa Cruz Biotechnology) (1/100 dilution) was monitored in ethanol fixed tissue sections. Proliferation was monitored by PCNA staining using PC10 mAb (generous gift of Dr D. P. Lane). p107 and p130 were detected in formalin-fixed sections using specific rabbit polyclonal antibodies (1/150 dilution; Santa Cruz Biotechnology). Horseradish-labeled secondary antibodies were purchased from Jackson Immunoresearch Laboratories and used 1:2000 dilution. The positive staining was visualized using Vector DAB kit, and slides were counterstained with Hematoxylin. Negative control slides were obtained by replacing the primary antibody with PBS (data not shown).

Northern blotting

Total RNA from frozen skin samples was isolated by guanidine isothiocyanate-phenol-chloroform extraction. Northern blots containing total RNA (15 μ g/lane) were probed for expression of the different signaling molecules using full-length cDNA as probes. The membranes were also hybridized with a 7S RNA probe to verify that equal amounts of mRNA were loaded and transferred.

Mouse skin grafts

Dorsal full thickness skin pieces of 2-3 cm² were obtained from 18.5 dpc p107/p130-null mice or double heterozygous littermates as control. Donor skin pieces were grafted onto a wound created by removing a similar-sized piece of full thickness back skin in female immunodeficient *NOD/scid* (*Prkdc* – Mouse Genome Informatics) recipient mice. Graft and host skin edges were joined using surgical silk suture and the grafted area was covered with a thin layer of NewSkin (Medtech, Jackson) as the only protective dressing. This procedure allows graft-take monitoring and produces normal-haired donor skin. Graft recipient animals were routinely monitored for hair growth and sacrificed 2-8 weeks after grafting. The graft-containing area was excised and processed for histopathology or immunohistochemical analysis as described above.

Band shift analysis

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed by incubating whole-cell extracts from mouse skin with a labeled oligonucleotide corresponding to a palindromic κ B: 5'-GATCCAA-CGGCAGGGGAATCCCCTCTCCTTA-3'.

Complexes were separated on 5.5% native polyacrylamide gels in 0.25 \times Tris-borate-EDTA buffer, dried and exposed to Hyperfilm-MP (Amersham) at -70°C. The composition of the κ B complexes in newborn mouse skin has been previously described (Budunova et al., 1999; Perez et al., 2000).

RESULTS

Altered epidermal terminal differentiation in p107/p130 double null animals

Mice deficient in p107 and p130 die after birth and display defective endochondral development (Cobrinik et al., 1996). However, no phenotypic alterations have been yet described in vivo in the skin of these animals. Given the involvement of the Rb and E2f families in differentiation of cultured human keratinocytes (Paramio et al., 1998; Paramio et al., 2000), we have analyzed the epidermis of p107 and/or p130 knockout mice. No alterations were found in the epidermis of animals lacking p107 or p130 compared with heterozygous littermates (data not shown), indicating that, as in other tissues, there exists compensation among the different members of the retinoblastoma family (Cobrinik et al., 1996). On the contrary, the epidermis of animals lacking both p107 and p130 displayed several abnormalities. We observed a reduction in the number and size of keratohyalin granules suggestive of altered terminal differentiation of the epidermal keratinocytes (Fig. 1A,A',B,B'). To confirm this aspect we monitored the expression of several terminal differentiation markers. We found a decreased expression of filaggrin (Fig. 1D,D') and loricrin (Fig. 1E,E') in p107/p130-deficient epidermis. Conversely, we found that K10, an early marker of the process, is expressed in the first suprabasal layer in the epidermis of all the animals irrespective of their genotype (Fig. 1C,C'). These results indicate that, in agreement with our in vitro previous data (Paramio et al., 1998), the absence of p107 and p130 impairs the normal process of epidermal terminal differentiation, but not the commitment of the process.

Delayed hair follicle and tooth development in p107/p130-null animals

In p107/p130-null skin, there is also a generalized decrease

in the number of the hair follicles (Fig. 2A,A',D). During their morphogenesis, hair follicles can be classified in different developmental stages (reviewed by Muller-Rover et al., 2001; Paus et al., 1999). Based on this classification, we also characterized a clear developmental delay in hair follicle formation (Fig. 2E). This delay was evident as soon as day 14.5 dpc, at which the number of hair germs was severely reduced (Fig. 2B,B'), and persisted at days 16.5 and 18.5 dpc (data not shown and Fig. 2A,A'). In mice, the pelage consists of different types of hair with different morphology that are also formed at different times during embryogenesis. Primary or tylotrich (guard) are induced by day 14.5 dpc, whereas the morphogenesis of secondary or nontylotrich (awl and zigzag) hair follicles starts by day 16.5 dpc. The fact that the differences between control and double-deficient mice occur at these different embryonic stages (Fig. 2D) strongly suggested that the morphogenesis and development of both tylotrich and nontylotrich hair follicles is affected in p107/p130-null skin. In addition, a similar delayed development was also observed in the whiskers, specialized hairs of the murine snout (Fig. 2C,C').

The hair follicle morphogenesis depends on several processes similar to those acting during development of tooth germs (reviewed by Jernvall and Thesleff, 2000), and in many cases the mutations that give rise to hair defects, such as those in *Lef1* (van Genderen et al., 1994) or *tabby-downless* also display alterations in tooth (Headon and Overbeek, 1999; Laurikkala et al., 2001; Laurikkala et al., 2002; Miard et al.,

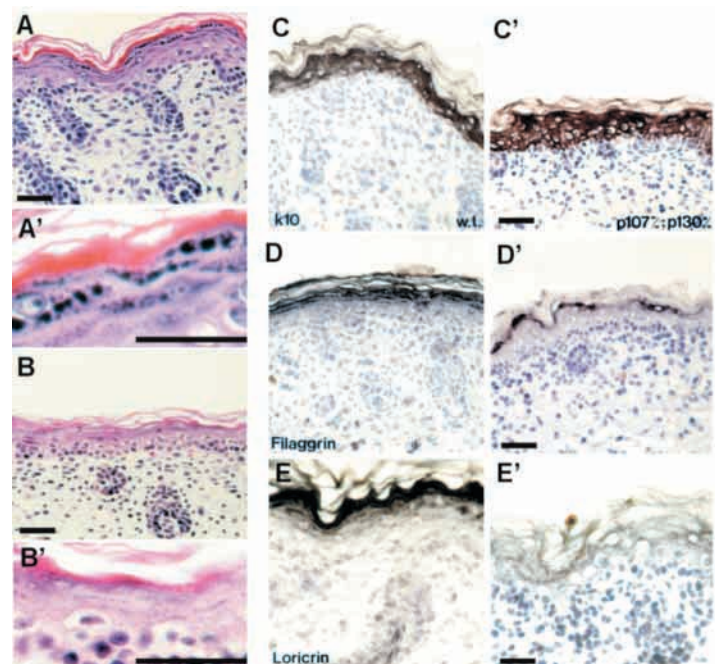


Fig. 1. Epidermal abnormalities and altered differentiation in p107/p130 knockout mice. Newborn skin sections of double heterozygous (A,A') and p107/p130-null mice (B,B'). Note the decrease in the number and size of keratohyalin granules of the stratum granulosum in p107/p130-null animals (B') compared with its respective littermate (A'). Expression of the epidermal differentiation markers in double heterozygous (C-E) and p107/p130-null animals (C'-E') showing a similar expression of K10 (C,C') and a decrease in the expression of the terminal differentiation-markers filaggrin (D,D') and loricrin (E,E'). (A,A',B,B') Hematoxylin-Eosin staining. Scale bars: 100 μ m.

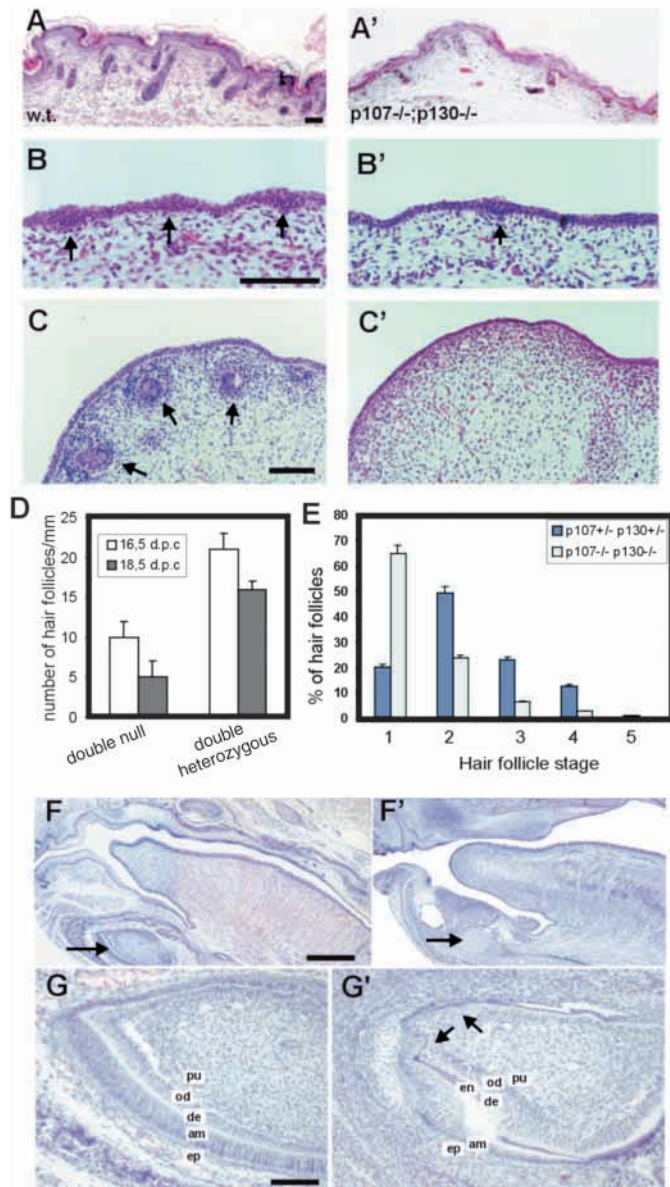


Fig. 2. Alterations in hair follicles and tooth germs in p107/p130 knockout mice. Hematoxylin/Eosin skin sections of wild type (A-C) and 107/130 null (A'-C') 18.5 dpc (A,A') and 14.5 dpc (B,B') embryos showing the decrease in hair germs (see arrows). Snout of wild-type (C) and 107/130 null (C') 14.5 dpc embryos showed a developmental delay of the whiskers. (D) Quantitative analysis of the number of hair follicles in the skin of 18.5 and 16.5 dpc embryos. (E) Analysis of the developmental stage of hair follicles in 18.5 dpc embryos. Data in D and E come from the quantification of three different sections of at least three different animals and are shown as mean \pm s.d. The hair follicle stages are as reported (Muller-Rover et al., 2001; Paus et al., 1999). Hematoxylin/Eosin medial sections from the heads of wild type (F,G) and 107/130 null (F',G') 18.5 dpc embryos. A few 107/130-null embryos showed anodontia with the presence of undifferentiated mesenchymal tissue in the site of incisors (compare arrows in F' with those in F). When present, tooth germ in 107/130-null embryos displayed variable degrees of microdontia associated with hypoplasia and disorganization of the odontoblast layer (compare arrows in G' with those in G). pu, dental pulp; od, odontoblast layer; de, dentine; am, ameloblast layer; ep, enamel pulp. Scale bars: 100 μ m in A,C,C',G,G'; 50 μ m in B,B'; 500 μ m in F,F'.

1999; Pispá et al., 1999; Thesleff and Mikkola, 2002). Consequently, we have analyzed the possible alterations in the development of tooth germs in p107/p130-deficient mice. We commonly observed severe alterations characterized by incisors microdontia (Fig. 2G,G') and a few cases of anodontia, which in the most extreme situation leads to the complete absence of the incisors (arrows in Fig. 2F,F'). In addition, when present, tooth germs also displayed severe histological defects such as hypoplasia of the odontoblast layer (od in Fig. 2G,G'), with poorly differentiated and disorganized cells (arrows in Fig. 2G', compare with 2G).

Many of the alterations found in p107/p130-deficient mice were similar to those found in mice bearing mutations in TNF α -like superfamily mediated signaling, including Eda-Edar, Xedar, Troy, etc. (Headon and Overbeek, 1999; Laurikkala et al., 2001; Laurikkala et al., 2002; Miard et al., 1999; Pispá et al., 1999; Thesleff and Mikkola, 2002) or in the downstream NF κ B transcription factor family (Schmidt-Ullrich et al., 2001); consequently, we analyzed the expression of the receptors Edar (Fig. 3A,A'), Xedar (Fig. 3B,B') and Troy/Taj (Fig. 3C,C') in control and in p107/p130-deficient epidermis at 18.5 dpc. However, no differences were observed between control and mutant hair follicles. In agreement, EMSA analysis also showed similar endogenous NF κ B activity among the different genotypes (Fig. 3D).

Collectively these observations indicate that the absence of the retinoblastoma relatives p107 and p130 altered the development of some specialized organs that depends on inductive interactions between epithelium and the underlying mesenchyme; this effect does not seem to be related to alterations in Eda/Edar or NF κ B-dependent signaling.

Hair formation in p107/p130-deficient skin transplants

The early death of p107/p130-deficient mice precludes the analysis of epidermis and epidermal appendages in adults and the phenotypic evolution of the observed defects. To avoid this problem, we grafted p107/p130 epidermis onto *NOD/scid* mice. Hair growth in these transplants was evident four weeks after grafting in control and in p107/p130-deficient transplants (Fig. 4A,A', respectively). Histological analysis demonstrated that, primary and secondary hairs are formed in both (Fig. 4B; data not shown). In p107/p130-deficient grafts, most of the hairs were morphologically normal with no alterations in any of the different cell populations (Fig. 4B). In addition, most anagen hair bulbs (Fig. 4C') were indistinguishable from those of controls (Fig. 4C). However, a number of several abnormalities were also frequently detected in p107/p130-deficient transplants. First, we noticed that four weeks after grafting the number of hairs (Fig. 5A,A') exceeded that of controls (Fig. 5B) by an average of three times. In addition, a severe interfollicular hyperplasia, which is in some areas associated to parakeratosis, was observed in mutant transplants (Fig. 5C). Secondly, besides the formation of normal hairs, we also noticed multiple hair abnormalities such as multiple hair follicles sharing a unique hair channel (Fig. 5D), twisted hair follicles lying in parallel to the epidermal surface (Fig. 5E), multiple follicular keratin-filled cysts (Fig. 5F), and hyperplastic sebaceous glands (Fig. 5G). Finally, we also observed a major number of follicles in anagen phase compared with controls (six times increase, on average). To

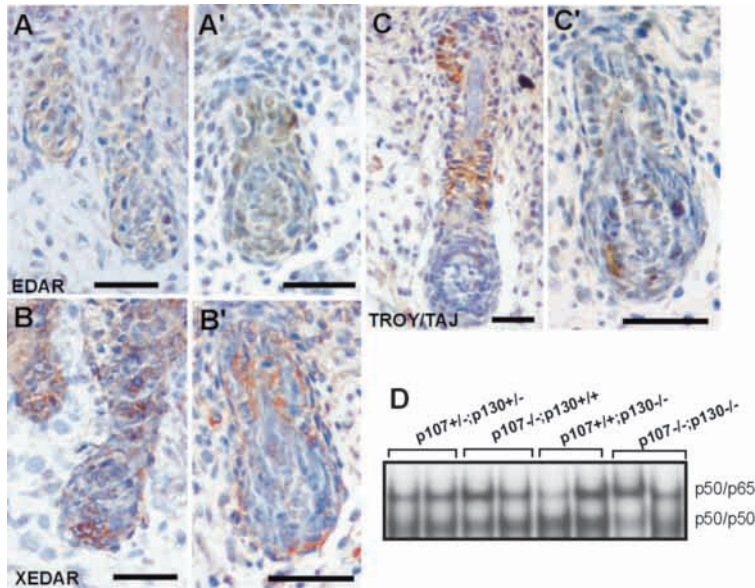


Fig. 3. Normal expression of Edar, Xedar and Troy/Taj and NFκB signaling in p107/p130 knockout mice skin. Immunohistochemical detection of Edar (A,A'), Xedar (B,B') and Troy/Taj (C,C') in hair follicles of 18.5 dpc control (A-C) and mutant (A'-C') embryos showing no alterations. Scale bars: 50 μm. (D) EMSA analysis for NFκB binding activity of skin protein extracts from mouse of the quoted genotypes, showing no differences between them.

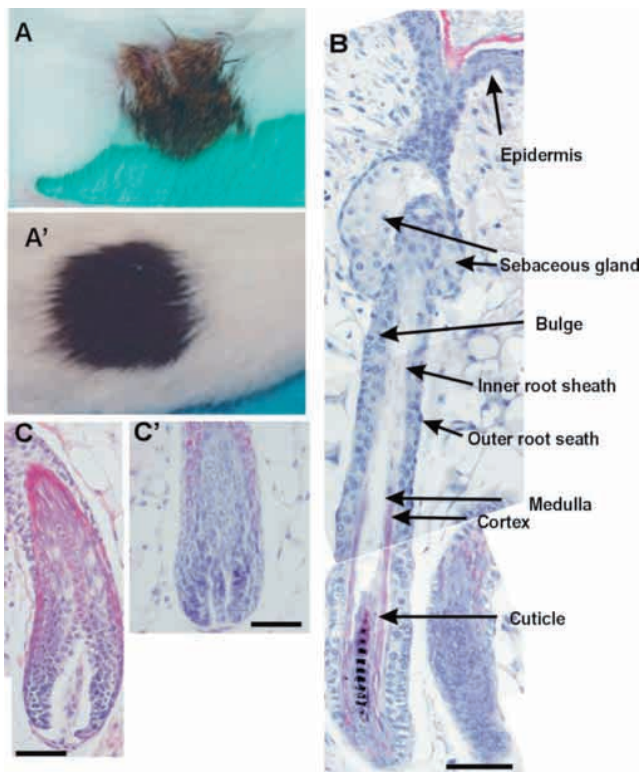


Fig. 4. Normal hair growth in grafts of p107/p130-null epidermis. Growth of hair coat in the grafts from control (A') and p107/p130-doubly deficient mice (A) was evident four weeks after transplantation. Sections of skin grafts from p107/p130-doubly deficient mice (B,C) showed normal anagen hair follicles without alterations in any of the different epithelial layers (B) and hair bulbs (C) undistinguishable from those of control transplants (C). Scale bars: 50 μm.

monitor if hair cycling was affected in p107/p130-deficient transplants, we analyzed grafts at different times after transplantation. We observed that the vast majority of hairs formed 2 and 3 weeks after transplantation were already in anagen phase (Fig. 5H,I, respectively); however, owing to the severe inflammation, which is associated to the process of wound healing, we can not directly attribute this alteration to intrinsic abnormalities. Conversely, we observed that 8 weeks after grafting, while the vast majority of hairs in control samples were in resting telogen phase (Fig. 5J); in mutant samples almost all hairs were still in anagen phase (Fig. 5K). Taken together, these results indicate that, although the formation of normal hair occurs in p107/p130 grafts, a number of abnormalities affecting hair morphogenesis and development, as well as hair cycling, also arise in the absence of these proteins.

As commented above, the morphogenesis of hair follicles occurs during embryogenesis and relies on a series of signals sent between the mesenchymal cells and the overlying surface epithelial cells that cause fate changes in both cell populations (reviewed by Fuchs, 1998; Fuchs et al., 2001; Fuchs and Raghavan, 2002; Hardy, 1992; Millar, 2002). In control skin, the expression of p107 and p130, besides interfollicular keratinocytes, was detected in several cell types of the hair follicle, including the epithelial outer and inner root sheaths and the cortex, as well as the mesenchymal dermal papilla cells (Fig. 6A,B). Consequently, the hair developmental abnormalities of p107/p130-deficient mice can thus be attributed to alterations in the epithelial and/or in the mesenchymal compartments, as both are defective in these proteins. However, graft experiments can also help to discriminate between these possibilities. In fact, we observed that p107 and p130 proteins were expressed in the dermal papilla of hair follicles in null grafts (Fig. 6C,D), indicating that fibroblasts from the recipient reconstituted a follicular dermal papilla precursor, allowing the donor epithelium to develop into a mature anagen hair follicle. Therefore, the hair follicle abnormalities found in mutant skin are probably due to a defect in the mesenchyme that is restored in the transplants.

Altered keratinocyte differentiation and proliferation in the interfollicular epidermis of p107/p130-deficient skin transplants

The severe epidermal hyperplasia found in transplants (Fig. 5B; Fig. 6C,D,E) suggests altered differentiation of the interfollicular keratinocytes. To confirm this suggestion, we studied the expression of several epidermal differentiation markers. We observed that keratin K5 expression, which is confined to the basal layer in control grafts (not shown), was expanded in p107/p130-null grafts (Fig. 7A). K10 was uniformly present in all the suprabasal cells of control grafts, whereas in mutant transplants K10-negative areas were detected in the suprabasal layers (Fig. 7B). The keratin K6, which is expressed only in the hair follicles in normal adult epidermis as in control grafts (not shown), was present not only in the hair follicles but also throughout all the suprabasal layers in interfollicular epidermis of p107/p130-null grafts

(Fig. 7C). Finally, loricrin and filaggrin expression were severely decreased in p107/p130-deficient grafts (Fig. 7D; data not shown). Alterations in epidermal differentiation are commonly associated with altered proliferation. To study this, PCNA staining was performed in the transplants. We observed clear nuclear staining in control grafts four weeks after transplantation (Fig. 7E) that never exceeded 15% of the basal cells. However, in p107/p130-deficient transplants almost all

the basal cells of the epidermis displayed a clear strong PCNA staining (Fig. 7F). The labeling also was clearly increased in normal and aberrant hair follicles (Fig. 7F). In addition, we also detected clear PCNA expression in suprabasal cells of the interfollicular epidermis (Fig. 7F').

Collectively, these data demonstrate that the absence of p107 and p130 leads to impaired differentiation and increased proliferation in epidermal keratinocytes.

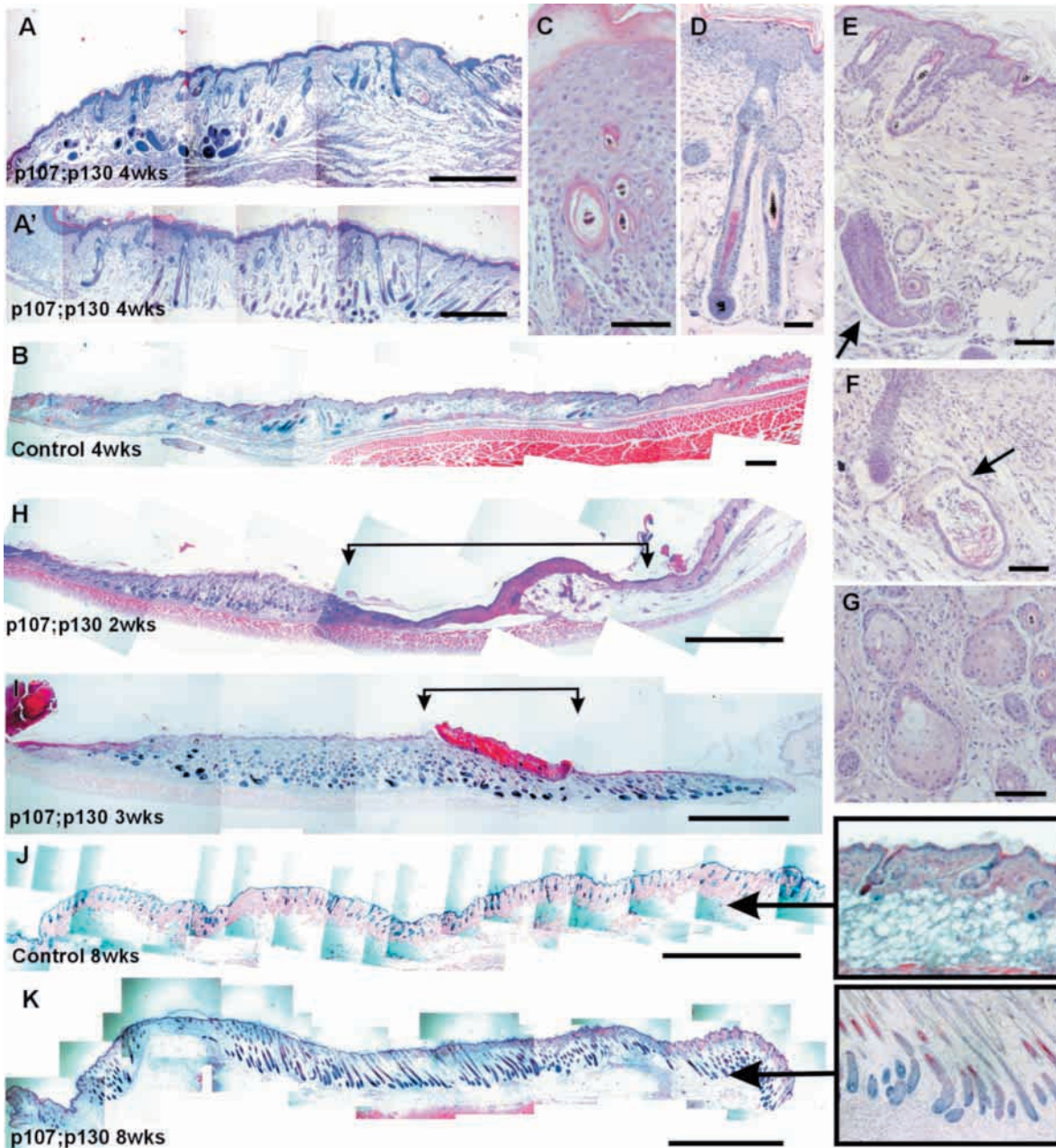


Fig. 5. Alterations in epidermis, aberrant hair follicle morphogenesis and hair cycling in grafts of p107/p130-null epidermis. Increased number of hair follicles in p107/p130-doubly deficient mice grafts (A,A') compared with controls (B) was evident 4 weeks after transplantation. In addition, a number of abnormalities, including epidermal hyperplasia and parakeratosis (C), dysplastic hairs sharing a unique hair canal (D), misoriented follicles (arrow in E), follicular cysts (arrows in F), and hyperplastic sebaceous glands (G) were commonly detected in p107/p130-doubly deficient grafts. Transplants from p107/p130-deficient skin almost exclusively displayed anagen hair follicles at 2 (H) and 3 (I) weeks after transplantation. Eight weeks after transplantation, control grafts (J) display most of the hair follicles in a resting telogen phase (see inset, right), while in p107/p130-deficient grafts (K), the vast majority of hair follicles persisted in anagen (see inset, right). Scale bars: 500 μ m in A,A'; 1 mm in B,H-K; 100 μ m in C-G. Brackets in H and J indicate the wound margin.

Altered expression of hair morphogens in absence of p107 and p130

Among the different signals required for normal hair development are Shh (Bitgood and McMahon, 1995; Chiang

et al., 1999; St-Jacques et al., 1998) and the components of the Wnt signaling pathway (reviewed by Fuchs et al., 2001; Fuchs and Raghavan, 2002; Millar, 2002). We thus monitored their expression by northern analyses. No major alterations were found in the expression of Shh, β -catenin, axin, Lef1 and Fwd1

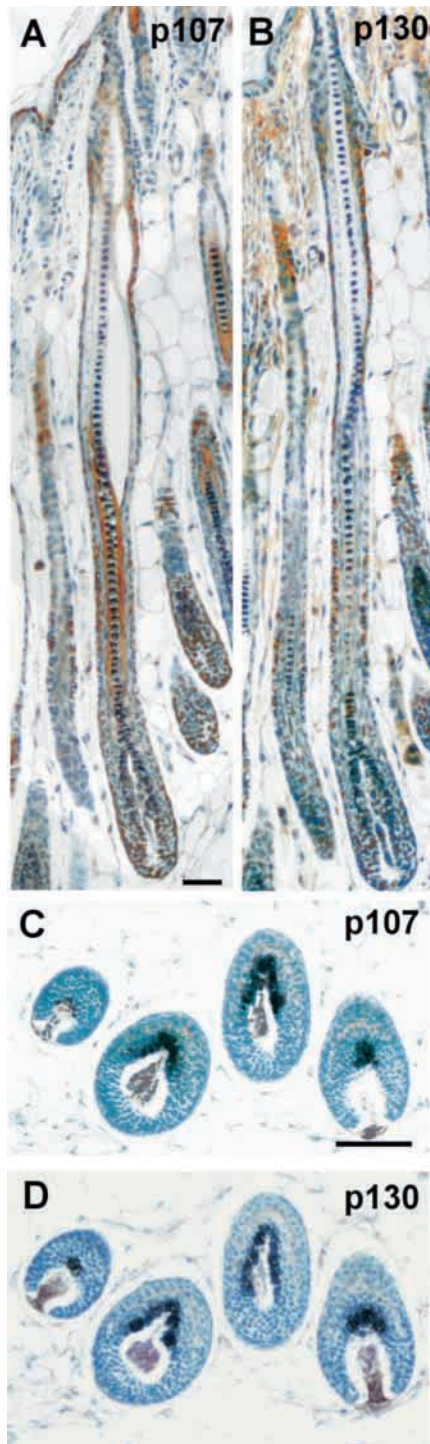


Fig. 6. Expression of p107 and p130 in anagen hair follicles. Immunohistochemical detection of p107 (A,C) and p130 (B,D) in control anagen hair follicles (A,B) and in hair bulbs from p107/p130-doubly deficient grafts (C,D). Note that in mutant grafts p107 (C) and p130 (D) immunoreactivity is detected in the nuclei of fibroblast forming the dermal papilla. Scale bars: 50 μ m.

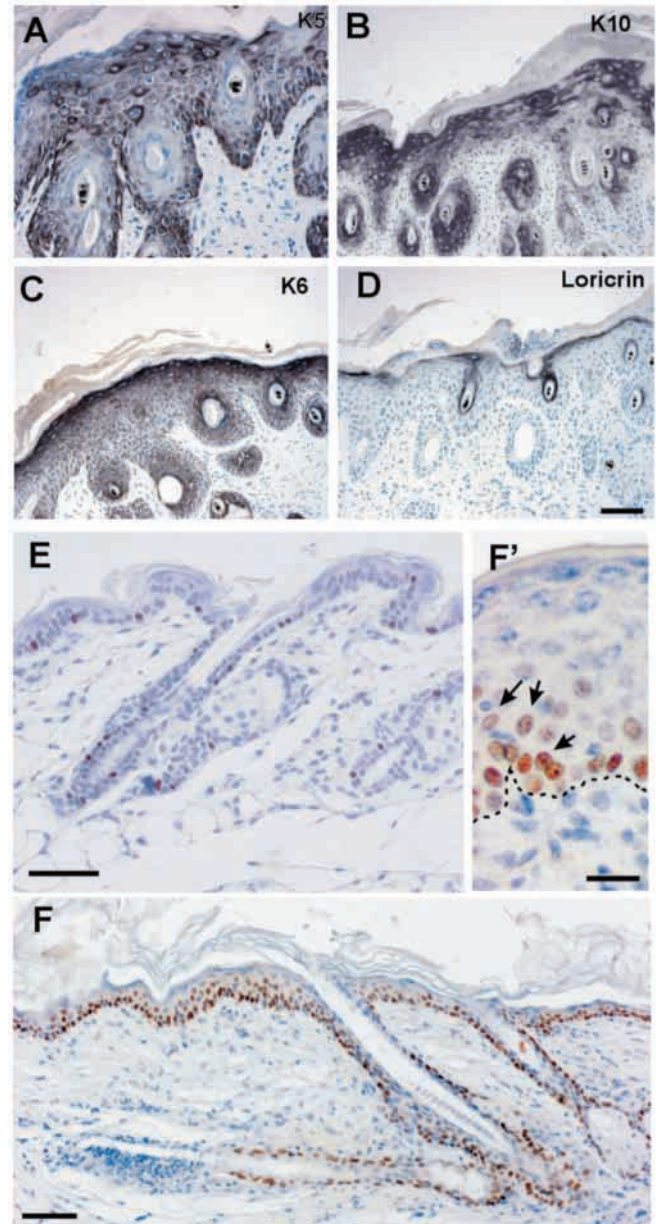


Fig. 7. Altered differentiation and proliferation of keratinocytes in transplants of p107/p130-deficient skin. K5 was expressed not only at the basal layer but also in scattered suprabasal cells (A). K10 was not expressed in the expected continuous suprabasal pattern (B). K6 was expressed in suprabasal layers of interfollicular epidermis (C). Loricrin expression was dramatically reduced (D). Proliferation was confined to a few keratinocytes in the basal layer of interfollicular epidermis and in the outer root sheath of hair follicles in control grafts (E), whereas the vast majority of these cells are actively proliferating in p107/p130-doubly deficient grafts (F). In addition, proliferating cells were also detected in some cells of the suprabasal layer of interfollicular epidermis in mutant transplants (arrows in F'). Scale bars: 100 μ m in D,E; 200 μ m in F; 25 μ m in F'.

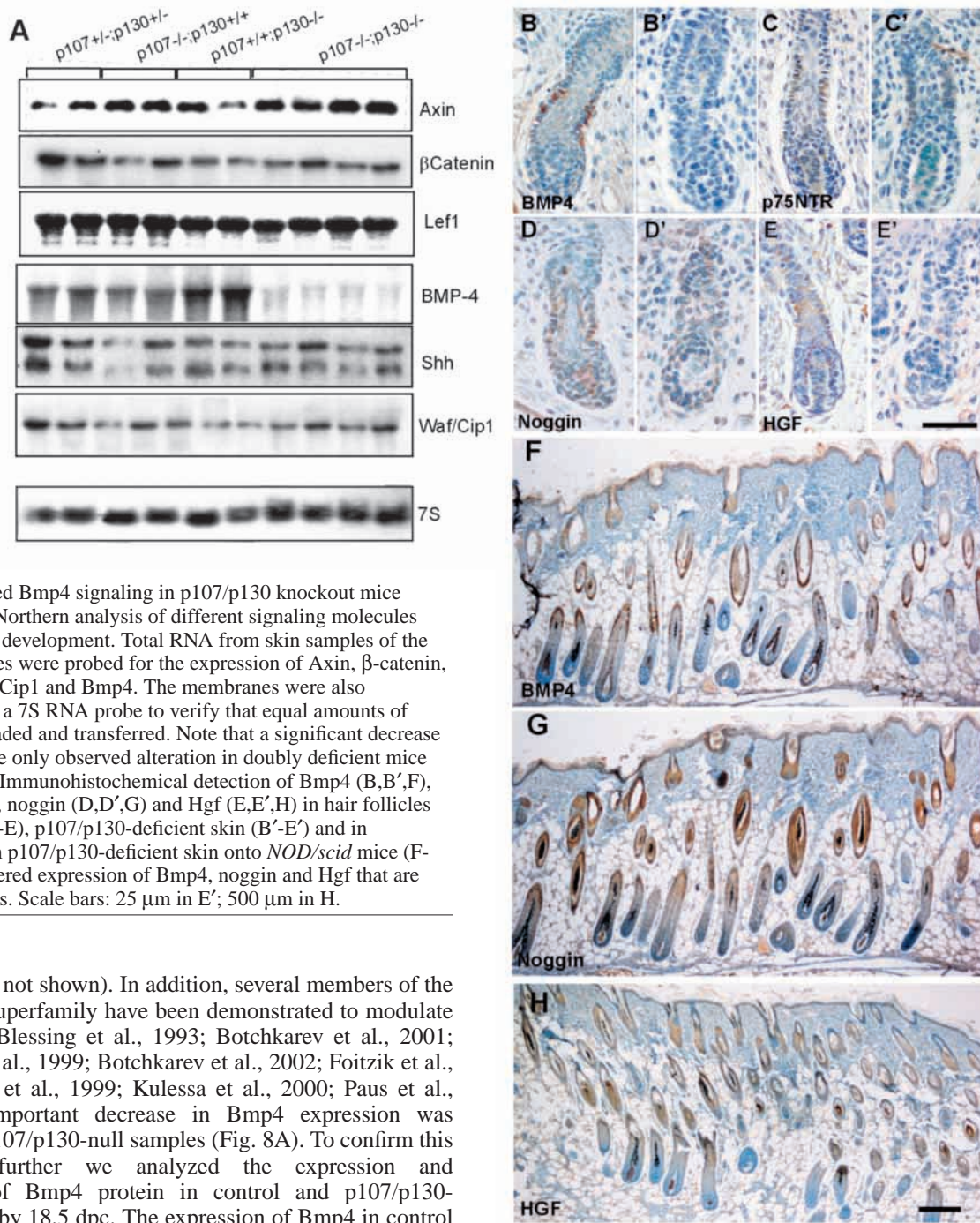


Fig. 8. Decreased Bmp4 signaling in p107/p130 knockout mice epidermis. (A) Northern analysis of different signaling molecules involved in hair development. Total RNA from skin samples of the quoted genotypes were probed for the expression of Axin, β -catenin, Lef1, Shh, Waf/Cip1 and Bmp4. The membranes were also hybridized with a 7S RNA probe to verify that equal amounts of mRNA were loaded and transferred. Note that a significant decrease in Bmp4 was the only observed alteration in doubly deficient mice samples. (B-H) Immunohistochemical detection of Bmp4 (B,B',F), p75NTR (C,C'), noggin (D,D',G) and Hgf (E,E',H) in hair follicles from control (B-E), p107/p130-deficient skin (B'-E') and in transplants from p107/p130-deficient skin onto *NOD/scid* mice (F-H). Note the altered expression of Bmp4, noggin and Hgf that are restored in grafts. Scale bars: 25 μ m in E'; 500 μ m in H.

(Fig. 8A; data not shown). In addition, several members of the BMP/TGF β superfamily have been demonstrated to modulate hair growth (Blessing et al., 1993; Botchkarev et al., 2001; Botchkarev et al., 1999; Botchkarev et al., 2002; Foitzik et al., 2000; Foitzik et al., 1999; Kulesa et al., 2000; Paus et al., 1997). An important decrease in Bmp4 expression was observed in p107/p130-null samples (Fig. 8A). To confirm this observation further we analyzed the expression and localization of Bmp4 protein in control and p107/p130-deficient skin by 18.5 dpc. The expression of Bmp4 in control skin (Fig. 8B) is in accordance with previous reports (Botchkarev et al., 2002; Kulesa et al., 2000). However, we failed to detect Bmp4 protein (Fig. 8B') in the hair follicles of the mutant skin, in agreement with the northern results. In hair follicles, the Bmp4-dependent signaling is modulated by a number of different morphogens, including noggin, p75NTR (Ngfr – Mouse Genome Informatics), Lef1 and Hgf, whose expression is also affected by Bmp4 (Botchkarev et al., 2001; Botchkarev et al., 1999; Botchkarev et al., 2002; Botchkareva et al., 1999; Kulesa et al., 2000; Lindner et al., 2000; Zhao et al., 2000). We have thus analyzed the expression and localization of these molecules in control and in p107/p130-deficient hair follicles. We did not detect any significant

changes in p75NTR and Lef1 expression in mutant hair follicles (Fig. 8C,C'; data not shown). By contrast, the expression and localization of noggin and Hgf were severely perturbed in mutant hair follicles when compared with controls (Fig. 8D,D',E,E'). These results suggest that, in the absence of p107 and p130, there is a defective Bmp4-dependent signaling that affects hair follicle morphogenesis and development.

Finally, as in grafted p107/p130 skin, we have observed the rescue of the hair growth defect, the above suggestion would implicate that in these grafts Bmp4 signaling should be restored. In fact analysis of the expression of Bmp4, noggin

and Hgf in the transplants (Fig. 8F-H) demonstrate the appropriate expression of these molecules.

Decreased expression of Δ Np63 in p107;130 deficient mouse epidermis

We next investigated the possible consequences of the observed alteration in Bmp4-dependent signaling. Among the possible targets of Bmp4 signaling, Δ Np63 has been recently identified in zebrafish as an ectoderm-specific direct transcriptional target (Bakkers et al., 2002). Moreover, two main aspects of p63 are of particular interest for the present study. First, there is a clear association of *P63* mutations with different human syndromes characterized by altered deficient hair and tooth growth (reviewed by Brunner et al., 2002a; Brunner et al., 2002b; van Bokhoven and McKeon, 2002). Second, in normal epidermis and in hair follicles, the Δ Np63 variant is preponderant and appears restricted to cells with high proliferative potential and is absent from the cells that are undergoing terminal differentiation (Parsa et al., 1999; Pellegrini et al., 2001). Consequently, given the observed alterations in the morphogenesis of hair and tooth (Fig. 2) and in keratinocyte proliferation (Fig. 7), together with the altered Bmp4 signaling (Fig. 8), it is possible to speculate that altered Δ Np63 expression might occur in p107/p130 mutant skin. In control embryos at day 18.5, Δ Np63 expression was observed in the nuclei of all basal cells in the interfollicular epidermis and also in the rudimentary follicles (Fig. 9A). Interestingly, immunoreactivity in the positive cells is not homogeneous, as some cells display increased Δ Np63 (arrows in Fig. 9A). In addition, Δ Np63 expression decreases as the cells enter the differentiation program and migrate into the suprabasal layers (Fig. 9A) as previously reported (Parsa et al., 1999; Pellegrini et al., 2001). However, a severe reduction in the expression of Δ Np63 was found in p107/p130-deficient keratinocytes (Fig. 9B). Conversely, one would expect that, if the reduced Δ Np63 expression was related to delayed development of the hairs in p107/p130-deficient skin, such expression would be restored in the transplants, given the restored hair growth observed in them. In fact, immunohistochemical analyses corroborate such hypothesis as Δ Np63 was found to be normally expressed in the grafted skin (Fig. 9C).

DISCUSSION

The actual roles of retinoblastoma protein family in epidermis have not been yet fully determined. However, data obtained with cultured cells and in transgenic mice expressing modulators or targets of Rb family members, such as E2f (Pierce et al., 1998; Wang et al., 2001; Wang et al., 2000), viral oncogenes, such as HPV E7 (Greenhalgh et al., 1994) or E1A (Missero et al., 1993), or altered expression of cyclin-dependent kinase inhibitors (Di Cunto et al., 1998; Missero et al., 1995; Paramio et al., 2001) strongly support the existence of such roles. We have previously shown that the three pocket proteins are functionally involved in the process of in vitro differentiation of human keratinocytes, probably through the interaction with specific E2f members (Paramio et al., 1998; Paramio et al., 2000). We have focused on the roles of p107 and p130 in epidermis in vivo. We have found that the absence of any of these molecules do not cause phenotypic alterations,

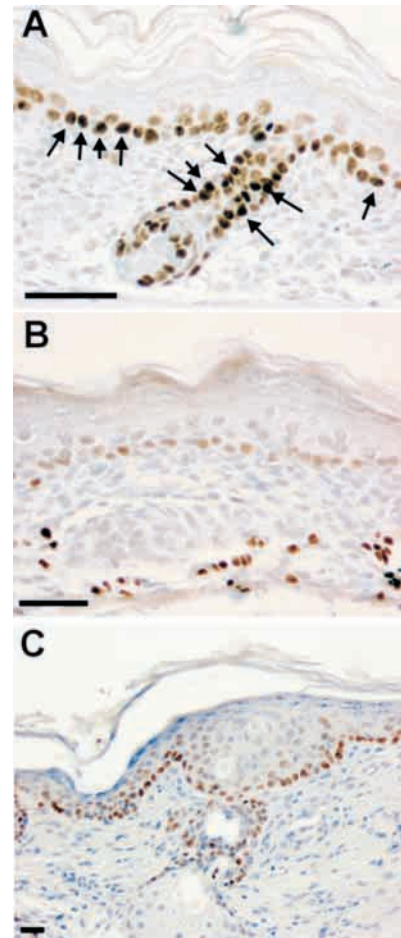


Fig. 9. Reduced expression of Δ Np63 in p107/p130 knockout mice epidermis is restored in transplants. The expression and localization of Δ Np63 were monitored in epidermis of control (A), doubly deficient mice (B) and skin grafts of doubly deficient mice on *NOD/scid* mice (C). Note that Δ Np63 expression is severely reduced in p107/p130-null epidermis and that this is restored in grafts. Scale bars: 25 μ m.

indicating that, as previously reported for other tissues (Cobrinik et al., 1996), there is functional compensation between these two proteins in skin. In agreement, the simultaneous absence of p107 and p130 produces severe skin abnormalities characterized by defects in epidermal terminal differentiation (Fig. 1) and reduced number and delayed morphogenesis of hair follicles (Fig. 2). Finally, we also show that the altered development of the hair follicle lies in defective interactions between the epithelium and the mesenchyme that also affect other organs requiring inductive interactions between these elements, such as whiskers and tooth germs (Fig. 2).

In agreement with our previous results (Paramio et al., 1998; Paramio et al., 2000), we found impaired terminal differentiation in absence of p107 and p130. At present, we do not know the molecular basis for such alteration; however, given that this seems to be a cell autonomous effect, as demonstrated in epidermal grafts, it is possible to speculate that this is mediated by direct interference with the epidermal

differentiation program. In fact, several epidermal-specific proteins are regulated by transcriptional elements such as Sp1 or C/EBP (Byrne et al., 1994; Kaufman et al., 2002; Kumar and Butler, 1999; Maytin and Habener, 1998; Maytin et al., 1999; Oh and Smart, 1998; Park and Morasso, 1999; Sinha and Fuchs, 2001; Zhu et al., 2002), which are themselves modulated by retinoblastoma family proteins (Charles et al., 2001; Chen et al., 1996; Classon et al., 2000; Decesse et al., 2001; Rohde et al., 1996; Udvadia et al., 1995). Conversely, we previously observed decreased E2f4 expression in terminally differentiating human keratinocytes, and most of the protein is bound by p107 and p130 (Paramio et al., 2000). Consequently, a possible explanation for the observed alterations would be that E2f4 expression facilitates epidermal differentiation commitment, whereas its expression at later stages would inhibit the process. However, recent data suggest that the mechanisms acting in mouse and human keratinocytes may differ, and complexes of E2f5 with p130 and histone deacetylases may be responsible for terminal differentiation of cultured mouse keratinocytes (D'Souza et al., 2001). The ongoing experiments will help to discern these possibilities and to determine the possible causes of such altered differentiation in epidermal keratinocytes as a consequence of p107 and p130 deficiency.

The altered development of the hair follicles and the incisors observed in p107/p130-deficient mice is of a particular interest. To our knowledge, this is the first evidence that these two proteins are involved in morphogenetic events. However, this observation is not totally surprising as E2f proteins mediate morphogenesis in *Drosophila* and *Xenopus* (Asano and Wharton, 1999; Hirose et al., 2001; Page et al., 2001; Suzuki and Hemmati-Brivanlou, 2000). More recently, the involvement of the retinoblastoma family in the control of morphogenesis has been highlighted by the finding that these proteins can form complexes with developmental factors that contain paired-like homeodomains (Wiggan et al., 1998). Interestingly, one of these factors, Alx4, displays an expression pattern that is restricted to sites of epithelial-mesenchymal interactions (Hudson et al., 1998; Qu et al., 1997a; Qu et al., 1997b). The possible functional relationship between p107 and/or p130 and Alx4 would merit future investigations.

The proper development of hair follicles and tooth require a large number of sequential interactions between the epithelial and mesenchymal cells that finally involve a tremendous plethora of different molecules belonging to several interconnected pathways (reviewed by Fuchs et al., 2001; Jernvall and Thesleff, 2000; Millar, 2002). The analysis of the expression of some of such molecules revealed a decreased expression of Bmp4 and altered Bmp4-dependent signaling (Fig. 8), but not in Eda/edar or in NFkB-dependent signaling (Fig. 3). We also found that, besides Bmp4, p107/p130-deficient hair follicles also displayed altered expression of noggin and Hgf, but not p75NTR (Fig. 8). Although at present we cannot rule out the possibility that these alterations, or those affecting other pathways regulating hair morphogenesis, might be the responsible for the findings in p107/p130-deficient mice, most of the phenotypic findings can be explained in terms of such diminished Bmp4 signaling.

Mice that lack the BMP antagonist noggin (Botchkarev et al., 2001; Botchkarev et al., 1999; Botchkarev et al., 2002) demonstrated that unregulated BMP proteins inhibit secondary

hair development, show increased proliferation and reduced p75NTR, β -catenin and Lef1 expression in hair follicles, and also show reduced keratin K10 expression in the interfollicular keratinocytes. However, we observed that the absence of p107 and p130 inhibits both primary and secondary hair follicle development, without alterations in p75NTR, β -catenin and Lef1 expression (Fig. 8) and the effects on keratin K10 were only detected in deficient grafts (Fig. 7). Consequently, it is possible to discard noggin as a mediator of the phenotypic alterations found in skin of p107/p130-null mice. However, we found altered Hgf expression (Fig. 8). Whether this alteration might be upstream or downstream of Bmp4 signaling remains to be elucidated. In this regard, it is worth mentioning that both proteins are similarly expressed during *Xenopus* development (Aberger et al., 1997), but Bmp4, in contrast to Bmp2, cannot downregulate Hgf during limb bud morphogenesis (Scaal et al., 1999). The discrimination among these possibilities is a difficult task primarily due to the early embryonic lethality displayed by Hgf-deficient mice (Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995). However, the fact that Hgf induces hair growth (Lindner et al., 2000; Shimaoka et al., 1995) would support a possible role for Hgf in the hair phenotype of the p107/p130-null mice. The functional relationship between BMPs and Hgf remains to be elucidated.

Bmp4 appears to play a dual role as an inhibitor and also an activator of hair and tooth development. Recent data also demonstrated that proper BMP signaling is required for appropriate hair formation and development (He et al., 2002; Kulesa et al., 2000). In agreement, Dlx3 and Msx2, which are activated by BMP signaling (Park and Morasso, 2002), are required for hair and tooth formation, and are associated with defective endochondral bone formation (Satokata et al., 2000). In this regard, it is worth mentioning that Bmp4 signaling is required for the maintenance of the differentiated postmitotic status of chondrocytes during endochondral ossification (Enomoto-Iwamoto et al., 1998; Minina et al., 2001), a process that is altered in p107/p130-null mice (Cobrinik et al., 1996).

The apparent opposite functions of Bmp4 during hair and tooth development might be due to different and sequential expression sites, either mesenchyme or epithelium, observed during the development of these organs, and which appear to be modulated by different transcriptional processes (Feng et al., 2002; Zhang et al., 2002). In particular, the expression in the mesenchyme seems to be modulated by sequences that contain putative sites for retinoblastoma and Sp1 binding (Feng et al., 2002; Zhang et al., 2002), which may account for the observed altered expression. In this regard, although we cannot discard that both the epithelium and the mesenchyme are responsible for the hair phenotype, the fact that in mutant skin grafts hair growth (Fig. 4) and the expression of Bmp4, noggin and Hgf (Fig. 8) are restored clearly points to mesenchymal defective signaling. This is further supported by the finding that dermal papilla cells in the mutant transplants express p107 and p130 (Fig. 6), suggesting that recipient fibroblasts have reconstituted a follicular dermal papilla precursor that allows the donor epithelium to develop anagen hair follicles.

Bmp4 signaling induces the expression of different target genes among which Lef1 and Waf/Cip1 (Jernvall et al., 1998; Kratochwil et al., 1996) appears to be highly relevant for hair and tooth formation. However, we do not detect decreased expression of any of these two genes in p107/p130-null mice

skin (Fig. 8 and data not shown). This is probably due to the fact that other factors can compensate the decreased Bmp4 expression or, alternatively, that such reduction is not enough to cause the repression of these genes. However, our data are in agreement with the increased Lef1 and decreased Bmp4 gene expression found using high-density oligonucleotide arrays to identify genes changed in response to activation of E2f species (Muller et al., 2001). More recently, Δ Np63 has been characterized as a transcriptional target of Bmp4 signaling (Bakkers et al., 2002). In agreement, we also detect decreased expression of Δ Np63 in the basal layer of the p107/p130-null epidermis (Fig. 9). Mice that lack the *p63* gene, are devoid of most epidermis and epidermal derivatives (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999), and mutations in the *P63* gene are found in a number of human syndromes characterized by defects in hair and teeth (reviewed by Brunner et al., 2002a; Brunner et al., 2002b; van Bokhoven and McKeon, 2002). The possible causal relationship between such reduced Δ Np63 levels and the hair phenotype will be the subject of future investigation.

Collectively, we present here evidence for functional activities of the retinoblastoma family members in epidermis and epidermal appendages modulating not only differentiation and proliferation processes but also remarkably important morphogenetic events that lead to the formation of specialized ectodermal organs.

Mice lacking p107 or p130 were kindly provided by Dr T. Jacks (MIT). We acknowledge Jesús Martínez and the personnel of the animal facility of CIEMAT for the excellent care of the animals, and to Isabel de los Santos and Pilar Hernández for the histological preparations. This work is partially supported by Grants SAF2002-01037 from MCYT and 08.1/0054/2001.1 from CAM.

REFERENCES

- Aberger, F., Weidinger, G. and Richter, K. (1997). A member of the Met/HGF-receptor family is expressed in a BMP-4-like pattern in the ectoderm of *Xenopus* gastrulae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 191-195.
- Andl, T., Reddy, S. T., Gaddapara, T. and Millar, S. E. (2002). WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev. Cell* **2**, 643-653.
- Asano, M. and Wharton, R. P. (1999). E2F mediates developmental and cell cycle regulation of ORC1 in *Drosophila*. *EMBO J.* **18**, 2435-2448.
- Bakkers, J., Hild, M., Kramer, C., Furutani-Seiki, M. and Hammerschmidt, M. (2002). Zebrafish DeltaNp63 is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm. *Dev. Cell* **2**, 617-627.
- Bitgood, M. J. and McMahon, A. P. (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* **172**, 126-138.
- Blessing, M., Nanney, L. B., King, L. E., Jones, C. M. and Hogan, B. L. (1993). Transgenic mice as a model to study the role of TGF-beta-related molecules in hair follicles. *Genes Dev.* **7**, 204-215.
- Botchkarev, V. A., Botchkareva, N. V., Nakamura, M., Huber, O., Funa, K., Lauster, R., Paus, R. and Gilchrist, B. A. (2001). Noggin is required for induction of the hair follicle growth phase in postnatal skin. *FASEB J.* **15**, 2205-2214.
- Botchkarev, V. A., Botchkareva, N. V., Roth, W., Nakamura, M., Chen, L. H., Herzog, W., Lindner, G., McMahon, J. A., Peters, C., Lauster, R. et al. (1999). Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. *Nat. Cell Biol.* **1**, 158-164.
- Botchkarev, V. A., Botchkareva, N. V., Sharov, A. A., Funa, K., Huber, O. and Gilchrist, B. A. (2002). Modulation of BMP signaling by noggin is required for induction of the secondary (nontylotrich) hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 3-10.
- Botchkareva, N. V., Botchkarev, V. A., Chen, L. H., Lindner, G. and Paus, R. (1999). A role for p75 neurotrophin receptor in the control of hair follicle morphogenesis. *Dev. Biol.* **216**, 135-153.
- Brunner, H. G., Hamel, B. C. and Bokhoven, H. (2002a). P63 gene mutations and human developmental syndromes. *Am. J. Med. Genet.* **112**, 284-290.
- Brunner, H. G., Hamel, B. C. and van Bokhoven, H. (2002b). The p63 gene in EEC and other syndromes. *J. Med. Genet.* **39**, 377-381.
- Budunova, I. V., Perez, P., Vaden, V. R., Spiegelman, V. S., Slaga, T. J. and Jorcano, J. L. (1999). Increased expression of p50-NF-kappaB and constitutive activation of NF-kappaB transcription factors during mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* **18**, 7423-7431.
- Byrne, C. (1997). Regulation of gene expression in developing epidermal epithelia. *BioEssays* **19**, 691-698.
- Byrne, C., Tainsky, M. and Fuchs, E. (1994). Programming gene expression in developing epidermis. *Development* **120**, 2369-2383.
- Charles, A., Tang, X., Crouch, E., Brody, J. S. and Xiao, Z. X. (2001). Retinoblastoma protein complexes with C/EBP proteins and activates C/EBP-mediated transcription. *J. Cell Biochem.* **83**, 414-425.
- Chen, P. L., Riley, D. J., Chen, Y. and Lee, W. H. (1996). Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev.* **10**, 2794-2804.
- Chiang, C., Swan, R. Z., Grachtchouk, M., Bolinger, M., Litingtung, Y., Robertson, E. K., Cooper, M. K., Gaffield, W., Westphal, H., Beachy, P. A. et al. (1999). Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev. Biol.* **205**, 1-9.
- Clarke, A. R., Maandag, E. R., van Roon, M., van der Lugt, N. M., van der Valk, M., Hooper, M. L., Berns, A. and te Riele, H. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* **359**, 328-330.
- Classon, M. and Dyson, N. (2001). p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp. Cell Res.* **264**, 135-147.
- Classon, M., Kennedy, B. K., Mulloy, R. and Harlow, E. (2000). Opposing roles of pRB and p107 in adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10826-10831.
- Cobrinik, D., Lee, M. H., Hannon, G., Mulligan, G., Bronson, R. T., Dyson, N., Harlow, E., Beach, D., Weinberg, R. A. and Jacks, T. (1996). Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev.* **10**, 1633-1644.
- Decesse, J. T., Medjkane, S., Datto, M. B. and Cremisi, C. E. (2001). RB regulates transcription of the p21/WAF1/CIP1 gene. *Oncogene* **20**, 962-971.
- Di Cunto, F., Topley, G., Calautti, E., Hsiao, J., Ong, L., Seth, P. K. and Dotto, G. P. (1998). Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science* **280**, 1069-1072.
- D'Souza, S. J., Pajak, A., Balazsi, K. and Dagnino, L. (2001). Ca²⁺ and BMP-6 signaling regulate E2F during epidermal keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **276**, 23531-23538.
- du Cros, D. L. (1993). Fibroblast growth factor influences the development and cycling of murine hair follicles. *Dev. Biol.* **156**, 444-453.
- Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Mukudai, Y., Kawakami, Y., Nohno, T., Higuchi, Y., Takemoto, S., Ohuchi, H., Noji, S. and Kurisu, K. (1998). Bone morphogenetic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *J. Cell Biol.* **140**, 409-418.
- Feng, J. Q., Zhang, J., Tan, X., Lu, Y., Guo, D. and Harris, S. E. (2002). Identification of cis-DNA regions controlling Bmp4 expression during tooth morphogenesis in vivo. *J. Dent. Res.* **81**, 6-10.
- Foitzik, K., Lindner, G., Mueller-Roeber, S., Maurer, M., Botchkareva, N., Botchkarev, V., Handjiski, B., Metz, M., Hibino, T., Soma, T. et al. (2000). Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta1 in vivo. *FASEB J.* **14**, 752-760.
- Foitzik, K., Paus, R., Doetschman, T. and Dotto, G. P. (1999). The TGF-beta2 isoform is both a required and sufficient inducer of murine hair follicle morphogenesis. *Dev. Biol.* **212**, 278-289.
- Fuchs, E. (1998). Beauty is skin deep: the fascinating biology of the epidermis and its appendages. *Harvey Lect.* **94**, 47-77.
- Fuchs, E. and Byrne, C. (1994). The epidermis: rising to the surface. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 725-736.
- Fuchs, E., Merrill, B. J., Jamora, C. and DasGupta, R. (2001). At the roots of a never-ending cycle. *Dev. Cell* **1**, 13-25.
- Fuchs, E. and Raghavan, S. (2002). Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 199-209.
- 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.
- Greenhalgh, D. A., Wang, X. J., Rothnagel, J. A., Eckhardt, J. N., Quintanilla, M. I., Barber, J. L., Bundman, D. S., Longley, M. A., Schlegel, R. and Roop, D. R.** (1994). Transgenic mice expressing targeted HPV-18 E6 and E7 oncogenes in the epidermis develop verrucous lesions and spontaneous, rasHa-activated papillomas. *Cell Growth Differ.* **5**, 667-675.
- Hardy, M. H.** (1992). The secret life of the hair follicle. *Trends Genet.* **8**, 55-61.
- He, W., Li, A. G., Wang, D., Han, S., Zheng, B., Goumans, M. J., Ten Dijke, P. and Wang, X. J.** (2002). Overexpression of Smad7 results in severe pathological alterations in multiple epithelial tissues. *EMBO J.* **21**, 2580-2590.
- Headon, D. J. and Overbeek, P. A.** (1999). Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nat. Genet.* **22**, 370-374.
- Hirose, F., Ohshima, N., Shiraki, M., Inoue, Y. H., Taguchi, O., Nishi, Y., Matsukage, A. and Yamaguchi, M.** (2001). Ectopic expression of DREF induces DNA synthesis, apoptosis, and unusual morphogenesis in the *Drosophila* eye imaginal disc: possible interaction with Polycomb and trithorax group proteins. *Mol. Cell Biol.* **21**, 7231-7242.
- Hudson, R., Taniguchi-Sidle, A., Boras, K., Wiggan, O. and Hamel, P. A.** (1998). Alx-4, a transcriptional activator whose expression is restricted to sites of epithelial-mesenchymal interactions. *Dev. Dyn.* **213**, 159-169.
- 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.
- Irwin, M. S. and Kaelin, W. G.** (2001). p53 family update: p73 and p63 develop their own identities. *Cell Growth Differ.* **12**, 337-349.
- Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E. M., Bronson, R. T., Goodell, M. A. and Weinberg, R. A.** (1992). Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* **359**, 295-300.
- Jernvall, J., Aberg, T., Kettunen, P., Keranen, S. and Thesleff, I.** (1998). The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* **125**, 161-169.
- Jernvall, J. and Thesleff, I.** (2000). Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech. Dev.* **92**, 19-29.
- Kaufman, C. K., Sinha, S., Bolotin, D., Fan, J. and Fuchs, E.** (2002). Dissection of a complex enhancer element: maintenance of keratinocyte specificity but loss of differentiation specificity. *Mol. Cell Biol.* **22**, 4293-4308.
- Kojima, T., Morikawa, Y., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Senba, E. and Kitamura, T.** (2000). TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *J. Biol. Chem.* **275**, 20742-20747.
- Koppinen, P., Pispa, J., Laurikkala, J., Thesleff, I. and Mikkola, M. L.** (2001). Signaling and subcellular localization of the TNF receptor Edar. *Exp. Cell Res.* **269**, 180-192.
- Kratochwil, K., Dull, M., Farinas, I., Galceran, J. and Grosschedl, R.** (1996). Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Dev.* **10**, 1382-1394.
- Kulesa, H., Turk, G. and Hogan, B. L.** (2000). Inhibition of Bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle. *EMBO J.* **19**, 6664-6674.
- Kumar, A. P. and Butler, A. P.** (1999). Enhanced Sp1 DNA-binding activity in murine keratinocyte cell lines and epidermal tumors. *Cancer Lett.* **137**, 159-165.
- Laurikkala, J., Mikkola, M., Mustonen, T., Aberg, T., Koppinen, P., Pispa, J., Nieminen, P., Galceran, J., Grosschedl, R. and Thesleff, I.** (2001). TNF signaling via the ligand-receptor pair ectodysplasin and edar controls the function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during tooth organogenesis. *Dev. Biol.* **229**, 443-455.
- Laurikkala, J., Pispa, J., Jung, H. S., Nieminen, P., Mikkola, M., Wang, X., Saarialho-Kere, U., Galceran, J., Grosschedl, R. and Thesleff, I.** (2002). Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Edar. *Development* **129**, 2541-2553.
- LeCouter, J. E., Kablar, B., Whyte, P. F., Ying, C. and Rudnicki, M. A.** (1998). Strain-dependent embryonic lethality in mice lacking the retinoblastoma-related p130 gene. *Development* **125**, 4669-4679.
- LeCouter, J. E., Whyte, P. F. and Rudnicki, M. A.** (1996). Cloning and expression of the Rb-related mouse p130 mRNA. *Oncogene* **12**, 1433-1440.
- Lee, E. Y., Chang, C. Y., Hu, N., Wang, Y. C., Lai, C. C., Herrup, K., Lee, W. H. and Bradley, A.** (1992). Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* **359**, 288-294.
- Lee, H. and Kimelman, D.** (2002). A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish. *Dev. Cell* **2**, 607-616.
- Lee, M. H., Williams, B. O., Mulligan, G., Mukai, S., Bronson, R. T., Dyson, N., Harlow, E. and Jacks, T.** (1996). Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb. *Genes Dev.* **10**, 1621-1632.
- Levrero, M., de Laurenzi, V., Costanzo, A., Gong, J., Wang, J. Y. and Melino, G.** (2000). The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J. Cell Sci.* **113**, 1661-1670.
- Lindner, G., Menrad, A., Gherardi, E., Merlino, G., Welker, P., Handjiski, B., Roloff, B. and Paus, R.** (2000). Involvement of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor signaling in hair follicle morphogenesis and cycling. *FASEB J.* **14**, 319-332.
- Lipinski, M. M. and Jacks, T.** (1999). The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* **18**, 7873-7882.
- Marin, M. C. and Kaelin, W. G., Jr** (2000). p63 and p73: old members of a new family. *Biochim. Biophys. Acta.* **1470**, M93-M100.
- Maytin, E. V. and Habener, J. F.** (1998). Transcription factors C/EBP alpha, C/EBP beta, and CHOP (Gadd153) expressed during the differentiation program of keratinocytes in vitro and in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 238-246.
- Maytin, E. V., Lin, J. C., Krishnamurthy, R., Batchvarova, N., Ron, D., Mitchell, P. J. and Habener, J. F.** (1999). Keratin 10 gene expression during differentiation of mouse epidermis requires transcription factors C/EBP and AP-2. *Dev. Biol.* **216**, 164-181.
- Miard, S., Peterkova, R., Vonesch, J. L., Peterka, M., Ruch, J. V. and Lesot, H.** (1999). Alterations in the incisor development in the Tabby mouse. *Int. J. Dev. Biol.* **43**, 517-529.
- Mikkola, M. L., Pispa, J., Pekkanen, M., Paulin, L., Nieminen, P., Kere, J. and Thesleff, I.** (1999). Ectodysplasin, a protein required for epithelial morphogenesis, is a novel TNF homologue and promotes cell-matrix adhesion. *Mech. Dev.* **88**, 133-146.
- Millar, S. E.** (2002). Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 216-225.
- Mills, A. A., Zheng, B., Wang, X. J., Vogel, H., Roop, D. R. and Bradley, A.** (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **398**, 708-713.
- Minina, E., Wenzel, H. M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A. P. and Vortkamp, A.** (2001). BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* **128**, 4523-4534.
- Missero, C., Calautti, E., Eckner, R., Chin, J., Tsai, L. H., Livingston, D. M. and Dotto, G. P.** (1995). Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5451-5455.
- Missero, C., Serra, C., Stenn, K. and Dotto, G. P.** (1993). Skin-specific expression of a truncated E1a oncoprotein binding to p105-Rb leads to abnormal hair follicle maturation without increased epidermal proliferation. *J. Cell Biol.* **121**, 1109-1120.
- Monreal, A. W., Ferguson, B. M., Headon, D. J., Street, S. L., Overbeek, P. A. and Zonana, J.** (1999). Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat. Genet.* **22**, 366-369.
- Muller, H., Bracken, A. P., Vernell, R., Moroni, M. C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J. D. and Helin, K.** (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev.* **15**, 267-285.
- Muller-Rover, S., Handjiski, B., van der Veen, C., Eichmuller, S., Foitzik, K., McKay, I. A., Stenn, K. S. and Paus, R.** (2001). A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 3-15.
- Naito, A., Yoshida, H., Nishioka, E., Satoh, M., Azuma, S., Yamamoto, T., Nishikawa, S. and Inoue, J.** (2002). TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8766-8771.
- Oh, H. S. and Smart, R. C.** (1998). Expression of CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP) is associated with squamous differentiation in epidermis and isolated primary keratinocytes and is altered in skin neoplasms. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 939-945.
- Ota, Y., Saitoh, Y., Suzuki, S., Ozawa, K., Kawano, M. and Imamura, T.** (2002). Fibroblast growth factor 5 inhibits hair growth by blocking dermal papilla cell activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 169-176.
- Page, B. D., Guedes, S., Waring, D. and Priess, J. R.** (2001). The C. elegans

- E2F- and DP-related proteins are required for embryonic asymmetry and negatively regulate Ras/MAPK signaling. *Mol. Cell* **7**, 451-460.
- Paramio, J. M., Lain, S., Segrelles, C., Lane, E. B. and Jorcano, J. L.** (1998). Differential expression and functionally co-operative roles for the retinoblastoma family of proteins in epidermal differentiation. *Oncogene* **17**, 949-957.
- Paramio, J. M., Segrelles, C., Casanova, M. L. and Jorcano, J. L.** (2000). Opposite functions for E2F1 and E2F4 in human epidermal keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **275**, 41219-41226.
- Paramio, J. M., Segrelles, C., Ruiz, S., Martin-Caballero, J., Page, A., Martinez, J., Serrano, M. and Jorcano, J. L.** (2001). The ink4a/arf tumor suppressors cooperate with p21cip1/waf in the processes of mouse epidermal differentiation, senescence, and carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 44203-44211.
- Park, G. T. and Morasso, M. I.** (1999). Regulation of the Dlx3 homeobox gene upon differentiation of mouse keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 26599-26608.
- Park, G. T. and Morasso, M. I.** (2002). Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) transactivates Dlx3 through Smad1 and Smad4: alternative mode for Dlx3 induction in mouse keratinocytes. *Nucleic Acids Res.* **30**, 515-522.
- Parsa, R., Yang, A., McKeon, F. and Green, H.** (1999). Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 1099-1105.
- Paus, R., Foitzik, K., Welker, P., Bulfone-Paus, S. and Eichmuller, S.** (1997). Transforming growth factor-beta receptor type I and type II expression during murine hair follicle development and cycling. *J. Invest. Dermatol.* **109**, 518-526.
- Paus, R., Muller-Rover, S., van Der Veen, C., Maurer, M., Eichmuller, S., Ling, G., Hofmann, U., Foitzik, K., Mecklenburg, L. and Handjiski, B.** (1999). A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 523-532.
- Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F. and de Luca, M.** (2001). p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3156-3161.
- Perez, P., Page, A. and Jorcano, J. L.** (2000). Role of phosphorylated p50-NF-kappaB in the ultraviolet response of mouse skin. *Mol. Carcinog.* **27**, 272-279.
- Pierce, A. M., Fisher, S. M., Conti, C. J. and Johnson, D. G.** (1998). Deregulated expression of E2F1 induces hyperplasia and cooperates with Ras in skin tumor development. *Oncogene* **16**, 1267-1276.
- Pispa, J., Jung, H. S., Jernvall, J., Kettunen, P., Mustonen, T., Tabata, M. J., Kere, J. and Thesleff, I.** (1999). Cusp patterning defect in Tabby mouse teeth and its partial rescue by FGF. *Dev. Biol.* **216**, 521-534.
- Qu, S., Li, L. and Wisdom, R.** (1997a). Alx-4: cDNA cloning and characterization of a novel paired-type homeodomain protein. *Gene* **203**, 217-223.
- Qu, S., Niswender, K. D., Ji, Q., van der Meer, R., Keeney, D., Magnuson, M. A. and Wisdom, R.** (1997b). Polydactyly and ectopic ZPA formation in Alx-4 mutant mice. *Development* **124**, 3999-4008.
- Rohde, M., Warthoe, P., Gjetting, T., Lukas, J., Bartek, J. and Strauss, M.** (1996). The retinoblastoma protein modulates expression of genes coding for diverse classes of proteins including components of the extracellular matrix. *Oncogene* **12**, 2393-2401.
- Rosenquist, T. A. and Martin, G. R.** (1996). Fibroblast growth factor signalling in the hair growth cycle: expression of the fibroblast growth factor receptor and ligand genes in the murine hair follicle. *Dev. Dyn.* **205**, 379-386.
- Satokata, I., Ma, L., Ohshima, H., Bei, M., Woo, L., Nishizawa, K., Maeda, T., Takano, Y., Uchiyama, M., Heaney, S. et al.** (2000). Mx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat. Genet.* **24**, 391-395.
- Scaal, M., Bonafede, A., Dathé, V., Sachs, M., Cann, G., Christ, B. and Brand-Saberi, B.** (1999). SF/HGF is a mediator between limb patterning and muscle development. *Development* **126**, 4885-4893.
- Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E. and Birchmeier, C.** (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373**, 699-702.
- Schmidt-Ullrich, R., Aebischer, T., Hulsken, J., Birchmeier, W., Klemm, U. and Scheidereit, C.** (2001). Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendages. *Development* **128**, 3843-3853.
- Schneider, P., Street, S. L., Gaide, O., Hertig, S., Tardivel, A., Tschopp, J., Runkel, L., Alevizopoulos, K., Ferguson, B. M. and Zonana, J.** (2001). Mutations leading to X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia affect three major functional domains in the tumor necrosis factor family member ectodysplasin-A. *J. Biol. Chem.* **276**, 18819-18827.
- Shimaoka, S., Tsuboi, R., Jindo, T., Imai, R., Takamori, K., Rubin, J. S. and Ogawa, H.** (1995). Hepatocyte growth factor/scatter factor expressed in follicular papilla cells stimulates human hair growth in vitro. *J. Cell Physiol.* **165**, 333-338.
- Sinha, S. and Fuchs, E.** (2001). Identification and dissection of an enhancer controlling epithelial gene expression in skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 2455-2460.
- St-Jacques, B., Dassule, H. R., Karavanova, I., Botchkarev, V. A., Li, J., Danielian, P. S., McMahon, J. A., Lewis, P. M., Paus, R. and McMahon, A. P.** (1998). Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr. Biol.* **8**, 1058-1068.
- Suzuki, A. and Hemmati-Brivanlou, A.** (2000). Xenopus embryonic E2F is required for the formation of ventral and posterior cell fates during early embryogenesis. *Mol. Cell* **5**, 217-229.
- Suzuki, S., Ota, Y., Ozawa, K. and Imamura, T.** (2000). Dual-mode regulation of hair growth cycle by two Fgf-5 gene products. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 456-463.
- Thesleff, I. and Mikkola, M. L.** (2002). Death receptor signaling giving life to ectodermal organs. *Sci. STKE* **2002**, E22.
- Udvadia, A. J., Templeton, D. J. and Horowitz, J. M.** (1995). Functional interactions between the retinoblastoma (Rb) protein and Sp-family members: superactivation by Rb requires amino acids necessary for growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3953-3957.
- Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T. and Kitamura, N.** (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* **373**, 702-705.
- van Bokhoven, H. and Brunner, H. G.** (2002). Splitting p63. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 1-13.
- van Bokhoven, H. and McKeon, F.** (2002). Mutations in the p53 homolog p63: allele-specific developmental syndromes in humans. *Trends Mol. Med.* **8**, 133-139.
- van Brenderen, C., Okamura, R. M., Farinas, I., Quo, R. G., Parslow, T. G., Bruhn, L. and Grosschedl, R.** (1994). Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev.* **8**, 2691-2703.
- Wang, D., Russell, J. L. and Johnson, D. G.** (2000). E2F4 and E2F1 have similar proliferative properties but different apoptotic and oncogenic properties in vivo. *Mol. Cell Biol.* **20**, 3417-3424.
- Wang, D., Russell, J., Xu, H. and Johnson, D. G.** (2001). Deregulated expression of DP1 induces epidermal proliferation and enhances skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* **31**, 90-100.
- Weinberg, R. A.** (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
- Wiggan, O., Taniguchi-Sidle, A. and Hamel, P. A.** (1998). Interaction of the pRB-family proteins with factors containing paired-like homeodomains. *Oncogene* **16**, 227-236.
- Yang, A., Kaghad, M., Caput, D. and McKeon, F.** (2002). On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet.* **18**, 90-95.
- Yang, A. and McKeon, F.** (2000). P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 199-207.
- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C. et al.** (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**, 714-718.
- Zhang, J., Tan, X., Contag, C. H., Lu, Y., Guo, D., Harris, S. E. and Feng, J. Q.** (2002). Dissection of promoter control modules that direct Bmp4 expression in the epithelium-derived components of hair follicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1412-1419.
- Zhao, X., Zhang, Z., Song, Y., Zhang, X., Zhang, Y., Hu, Y., Fromm, S. H. and Chen, Y.** (2000). Transgenically ectopic expression of Bmp4 to the Mx1 mutant dental mesenchyme restores downstream gene expression but represses Shh and Bmp2 in the enamel knot of wild type tooth germ. *Mech. Dev.* **99**, 29-38.
- Zhou, P., Byrne, C., Jacobs, J. and Fuchs, E.** (1995). Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes Dev.* **9**, 700-713.
- Zhu, S., Yoon, K., Sterneck, E., Johnson, P. F. and Smart, R. C.** (2002). CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 207-212.

Your article (030460R1) from

=====

Developmental Dynamics Published by John Wiley & Sons, Inc.

Dear Author,

Your article page proofs for Developmental Dynamics are ready for review. John Wiley & Sons has made this article available to you online for faster, more efficient editing.

In order for Developmental Dynamics to maintain our free color figure policy, it is often necessary to reduce figures from their original, submitted format. We ask you then to pay particular attention to the resolution, size, legibility, and general quality of your color proofs as they appear in this proof; please include a note of any necessary changes to the figures in your corrections.

Please follow the instructions below and you will be able to access a PDF version of your article as well as relevant accompanying paperwork.

First, make sure you have a copy of Adobe Acrobat Reader software to read these files. This is free software and is available for user downloading at <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep.html>.

Open your web browser, and enter the following web address:
<http://rapidproof.cadmus.com/RapidProof/retrieval/index.jsp>

You will be prompted to log in, and asked for a password. Your login name will be your email address, and your password will be ----

Example:

Login: your e-mail address

Password: ----

The site contains one file, containing:

- Author Instructions Checklist
- Adobe Acrobat Users - NOTES tool sheet
- Reprint Order form
- A copy of your page proofs for your article

Print out this file, and fill out the forms by hand. (If you do not wish to order reprints, please mark a "0" on the reprint order form.) Read your page proofs carefully and:

- indicate changes or corrections in the margin of the page proofs
- answer all queries (footnotes A,B,C, etc.) on the last page of the PDF proof
- proofread any tables and equations carefully
- check your figure legends for accuracy (as many color figures are reduced and stacked to conserve size and price, please be sure to carefully examine the placement and rendering of each figure)

Within 48 hours, please return via fax or express mail all materials to the

address given below. This will include:

- 1) Page proofs with corrections
- 2) Reprint Order form

Return to:

Patrick Snajder
Production Editor
John Wiley & Sons, Inc.
111 River Street, Hoboken, NJ 07030

Phone: 201-748-8807
Fax: 201-748-6825

Technical problems? If you experience technical problems downloading your file or any other problem with the website listed above, please contact Doug Frank (frankd@cadmus.com, phone: 717-721-2615).

Questions regarding your article? Please don't hesitate to contact me with any questions about the article itself, or if you have trouble interpreting any of the questions listed at the end of your file. **REMEMBER TO INCLUDE YOUR ARTICLE NO. (030460R1) WITH ALL CORRESPONDENCE.** This will help both of us address your query most efficiently.

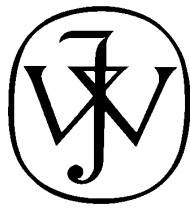
As this e-proofing system was designed to make the publishing process easier for everyone, we welcome any and all feedback. Thanks for participating in our e-proofing system!

This e-proof is to be used only for the purpose of returning corrections to the publisher.

Sincerely,

Patrick Snajder
Production Editor
John Wiley & Sons, Inc.
111 River Street, Hoboken, NJ 07030

Phone: 201-748-8807
Fax: 201-748-6825



WILEY

Publishers Since 1807

111 RIVER STREET, HOBOKEN, NJ 07030

DEVELOPMENTAL DYNAMICS PRODUCTION

*****IMMEDIATE RESPONSE REQUIRED*****

Please follow these instructions to avoid delay of publication.

READ PROOFS CAREFULLY

This will be your only chance to review these proofs.

Please note that the volume and page numbers shown on the proofs are for position only.

ANSWER ALL QUERIES ON PROOFS (Queries for you to answer are attached as the last page of your proof.)

Mark all corrections directly on the proofs. Note that excessive author alterations may ultimately result in delay of publication and extra costs may be charged to you.

CHECK FIGURES AND TABLES CAREFULLY

Check size, numbering, and orientation of figures.

All images in the PDF are downsampled (reduced to lower resolution and file size) to facilitate Internet delivery. These images will appear at higher resolution and sharpness in the printed article.

COMPLETE REPRINT ORDER FORM

Fill out the attached reprint order form. It is important to return the form even if you are not ordering reprints. Reprints will be shipped 4-6 weeks after your article appears in print.

ADDITIONAL COPIES

If you wish to purchase additional copies of the journal in which your article appears, please contact Jill Gottlieb at (201) 748-8839, fax (201) 748-6021, or E-mail at jgottlieb@wiley.com

RETURN WITHIN 48 HOURS OF RECEIPT VIA FAX TO

201-748-6825

or direct questions to:

Patrick Snajder, Production Editor

Developmental Dynamics

Phone: 201-748-8807

Refer to journal acronym (DVDY) and article production number

Softproofing for advanced Adobe Acrobat Users - NOTES tool

NOTE: ADOBE READER FROM THE INTERNET DOES NOT CONTAIN THE NOTES TOOL USED IN THIS PROCEDURE.

Acrobat annotation tools can be very useful for indicating changes to the PDF proof of your article. By using Acrobat annotation tools, a full digital pathway can be maintained for your page proofs.

The NOTES annotation tool can be used with either Adobe Acrobat 3.0x or Adobe Acrobat 4.0. Other annotation tools are also available in Acrobat 4.0, but this instruction sheet will concentrate on how to use the NOTES tool. Acrobat Reader, the free Internet download software from Adobe, DOES NOT contain the NOTES tool. In order to softproof using the NOTES tool you must have the full software suite Adobe Acrobat Exchange 3.0x or Adobe Acrobat 4.0 installed on your computer.

Steps for Softproofing using Adobe Acrobat NOTES tool:

1. Open the PDF page proof of your article using either Adobe Acrobat Exchange 3.0x or Adobe Acrobat 4.0. Proof your article on-screen or print a copy for markup of changes.
2. Go to File/Preferences/Annotations (in Acrobat 4.0) or File/Preferences/Notes (in Acrobat 3.0) and enter your name into the "default user" or "author" field. Also, set the font size at 9 or 10 point.
3. When you have decided on the corrections to your article, select the NOTES tool from the Acrobat toolbox and click in the margin next to the text to be changed.
4. Enter your corrections into the NOTES text box window. Be sure to clearly indicate where the correction is to be placed and what text it will effect. If necessary to avoid confusion, you can use your TEXT SELECTION tool to copy the text to be corrected and paste it into the NOTES text box window. At this point, you can type the corrections directly into the NOTES text box window. **DO NOT correct the text by typing directly on the PDF page.**
5. Go through your entire article using the NOTES tool as described in Step 4.
6. When you have completed the corrections to your article, go to File/Export/Annotations (in Acrobat 4.0) or File/Export/Notes (in Acrobat 3.0). Save your NOTES file to a place on your harddrive where you can easily locate it. **Name your NOTES file with the article number assigned to your article in the original softproofing e-mail message.**
7. **When closing your article PDF be sure NOT to save changes to original file.**
8. To make changes to a NOTES file you have exported, simply re-open the original PDF proof file, go to File/Import/Notes and import the NOTES file you saved. Make changes and re-export NOTES file keeping the same file name.
9. When complete, attach your NOTES file to a reply e-mail message. Be sure to include your name, the date, and the title of the journal your article will be printed in.



REPRINT BILLING DEPARTMENT 111 RIVER STREET HOBOKEN, NJ 07030

PHONE: (201) 748-8789; FAX: (201) 748-6326

E-MAIL: reprints@wiley.com

PREPUBLICATION REPRINT ORDER FORM

Please complete this form even if you are not ordering reprints. This form **MUST** be returned with your corrected proofs and original manuscript. Your reprints will be shipped approximately 4 weeks after publication. Reprints ordered after printing will be substantially more expensive.

JOURNAL Developmental Dynamics VOLUME _____ ISSUE _____

TITLE OF MANUSCRIPT _____

MS. NO. DVDY- _____ NO. OF AUTHOR(S) _____
PAGES

No. of Pages	100 Reprints	200 Reprints	300 Reprints	400 Reprints	500 Reprints
	\$	\$	\$	\$	\$
1-4	336	501	694	890	1052
5-8	469	703	987	1251	1477
9-12	594	923	1234	1565	1850
13-16	714	1156	1527	1901	2273
17-20	794	1340	1775	2212	2648
21-24	911	1529	2031	2536	3037
25-28	1004	1707	2267	2828	3388
29-32	1108	1894	2515	3135	3755
33-36	1219	2092	2773	3456	4143
37-40	1329	2290	3033	3776	4528

**REPRINTS ARE ONLY AVAILABLE IN LOTS OF 100. IF YOU WISH TO ORDER MORE THAN 500 REPRINTS, PLEASE CONTACT OUR REPRINTS DEPARTMENT AT (201) 748-8789 FOR A PRICE QUOTE.

Please send me _____ reprints of the above article at \$ _____

Please add appropriate State and Local Tax (Tax Exempt No. _____) \$ _____
for United States orders only.

Please add 5% Postage and Handling \$ _____

TOTAL AMOUNT OF ORDER** \$ _____

***International orders must be paid in currency and drawn on a U.S. bank*

Please check one: Check enclosed Bill me Credit Card
If credit card order, charge to: American Express Visa MasterCard

Credit Card No _____ Signature _____ Exp. Date _____

BILL TO: Name _____ **SHIP TO:** (Please, no P.O. Box numbers) Name _____
Institution _____ Institution _____
Address _____ Address _____

Purchase Order No. _____ Phone _____ Fax _____
E-mail _____

Functional Link Between Retinoblastoma Family of Proteins and the Wnt Signaling Pathway in Mouse Epidermis

Sergio Ruiz, Carmen Segrelles, Mirentxu Santos, M. Fernanda Laura, and Jesús M. Paramio*

The retinoblastoma family of proteins (pRb, p107, and p130) modulates cell cycle progression and differentiation of several tissues. We have demonstrated recently that p107 and p130 regulate keratinocyte terminal differentiation and hair follicle morphogenesis and development *in vivo*. This last aspect appears to be mediated by defective signaling from the mesenchyme and is associated with altered bone morphogenetic protein-4 (BMP4) -dependent signaling. However, many alterations were also found in the epithelial compartment. Given the importance of β catenin in hair biology and in BMP signaling, we studied its expression in p107/p130-deficient skin. Although normal expression of β catenin was found in p107/p130-deficient hair follicles, we found increased nuclear accumulation of β catenin in the basal keratinocytes of the p107/p130-deficient mice skin. Biochemical analysis revealed that such an increase in β catenin was due to the disruption of Axin/GSK3 β / β catenin complexes promoted by the increased expression of Frat, the mouse homologue of GSK3 β binding protein (GBP), in epidermis, precluding the degradation of β catenin. Collectively, these data represent the first evidence that retinoblastoma family and Wnt signaling pathways might be interconnected by functional links in skin. *Developmental Dynamics* 00:000–000, 2004. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

Key words: epidermis; hair follicle; β catenin; Frat; retinoblastoma; Lef/TCF

Received 12 December 2003; Revised 21 January 2004; Accepted 22 January 2004

INTRODUCTION

Fu

AQ: 1

The retinoblastoma family of proteins (pRB, p107, p130) modulates the G₁ to S phase transition (Weinberg, 1995). Besides their functions as negative modulators of cell cycle progression, the proteins of the retinoblastoma family modulate different aspects of differentiation such as clonal expansion, permanent cell cycle withdrawal, and induction of tissue-specific gene expression (reviewed in Lipinski and Jacks, 1999). Most of these aspects have been inferred from the data obtained in mice lacking the different members of the retinoblastoma family. pRb-

deficient animals die between day 13 and 15 of gestation, displaying overt defects in erythroid, neuronal, and lens development (Clarke et al., 1992; Jacks et al., 1992; Lee et al., 1992). However, recent data obtained using tissue-specific ablation of *Rb* gene have suggested that these defects are due to a non-cell autonomous effect rather than direct effects in neurons and erythropoiesis (MacPherson et al., 2003; Wu et al., 2003). Mice deficient in p107 or p130 develop normally and do not display any overt phenotype (Cobrinik et al., 1996; Lee et al., 1996), indicating that, in most of the

tissues, either p107 or p130 are dispensable for development, suggesting a functional overlap between them. In agreement, mice lacking both proteins die immediately after birth and display shortened limbs and defects in bone development, associated with impaired chondrocyte differentiation (Cobrinik et al., 1996). Of interest, it has been reported that the genetic background may determine the developmental consequences of p107 or p130 deficiency (LeCouter et al., 1998a,b).

Mammalian skin is composed of three different epithelial compart-

Program on Cell and Molecular Biology and Gene Therapy, CIEMAT, Madrid, Spain

Grant sponsor: MCYT; Grant number: SAF2002-01037; Grant sponsor: CAM; Grant number: 08.1/0054/2001.1.

*Correspondence to: Jesús M. Paramio, Program on Cell and Molecular Biology and Gene Therapy, CIEMAT, Ave. Complutense 22, E28040 Madrid, Spain. E-mail: jesusm.paramio@ciemat.es

DOI 10.1002/dvdy.20065

Published online 00 Month 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

ments: interfollicular epidermis, hair follicles, and sebaceous associated glands. The epidermis is a stratified epithelium, where the proliferative cells are confined to a single basal layer and the nonproliferative differentiating cells are located in the suprabasal layers. The skin is specially characterized by the presence of epidermal appendages. In particular, the hair follicles are of particular interest. Hair follicle morphogenesis and development suggests a series of reciprocal inductive molecular interactions between the epithelium and the underlying mesenchyme (Hardy, 1992). Several families of morphogens, including fibroblast growth factors, bone morphogenetic proteins (BMPs), transforming growth factor-beta, and Sonic Hedgehog are expressed in developing hair follicles and play important roles in communication between epithelial and mesenchymal cells (for reviews, see Hardy, 1992; Fuchs, 1998; Fuchs et al., 2001; Fuchs and Raghavan, 2002; Millar, 2002; Alonso and Fuchs, 2003). More recently, members of the tumor necrosis factor-alpha receptor superfamily, *eda* and *edar* (*Tabby/downless* in mouse; Headon and Overbeek, 1999; Mikkola et al., 1999; Monreal et al., 1999; Laurikkala et al., 2002) and their subsequent signaling through NF κ B family of transcription factors (Courtois et al., 2001; Doffinger et al., 2001; Schmidt-Ullrich et al., 2001) have also been involved in hair follicle morphogenesis and cycling. Finally, several lines of evidence have also supported an essential role for Wnt-dependent signaling in hair morphogenesis.

The evidence for the involvement of Wnt signaling in regulating follicle development stems from the phenotypes of mice carrying gain- and loss-of-function mutations in downstream effector genes of the canonical Wnt signaling pathway, such as β catenin and Lef1. Binding of Wnt proteins to their receptors, Frizzled proteins, activates a conserved signaling pathway that allows the stabilization of cytoplasmic β catenin and its translocation to the nucleus. Nuclear β catenin forms active transcription complexes with the LEF/TCF family of DNA binding factors

(Wodarz and Nusse, 1998; Nusse, 1999). Nuclear localization of β catenin and its partner Lef1 appear in epithelial and mesenchymal compartments as soon as hair follicle formation is induced (DasGupta and Fuchs, 1999; Merrill et al., 2001). The specific ablation of *β catenin* gene in epidermis results in a deficiency in hair follicle formation (Huelsenken et al., 2001), whereas nondegradable β catenin expression in skin leads to de novo hair formation (Gat et al., 1998). In addition, mice lacking Lef, do not develop whiskers and show a reduced number of body hairs (van Genderen et al., 1994), and the increased expression of Lef1 in the epidermis of transgenic animals leads to defects in the positioning and orientation of hair follicles (Zhou et al., 1995). Transient activation of β catenin is sufficient to trigger the anagen phase in postnatal hair (Van Mater et al., 2003) and induce the specific expression of hair keratins (Merrill et al., 2001). Finally, the ectopic expression of Dickkopf 1, a potent diffusible inhibitor of Wnt action, in the epidermis of transgenic mice produces a complete failure of placode formation before morphological or molecular signs of hair differentiation (Andl et al., 2002). Taken together, these results have revealed the essential role of the Wnt pathway in hair follicle morphogenesis and development.

Regarding the possible role of the retinoblastoma family in epidermis and epidermal appendages, we have reported their differential expression and cooperative roles during in vitro human keratinocyte differentiation (Paramio et al., 1998, 2000). More recently, we have shown that the epidermis of mice lacking p107 and p130 displays impaired terminal differentiation in vivo (Ruiz et al., 2003). In addition, double-null animals showed a reduced number and delayed development of hair follicles (Ruiz et al., 2003). The mechanisms underlying hair alteration appeared to be associated with impaired BMP4-dependent signaling. Graft experiments of p107/p130-deficient skin in *NOD/scid* mice revealed that this was mainly due to a mesenchymal defect, as hair formation and BMP4 expression were

restored (Ruiz et al., 2003). On the other hand, these graft experiments also demonstrated several alterations, such as abnormal hair follicles, epithelioid cysts, and altered hair cycling, that were also suggestive of altered epithelial signaling (Ruiz et al., 2003). Given the importance of Wnt signaling in hair follicle cell fate and the involvement of β catenin in regulating BMP signaling (Botchkarev et al., 2002; Kim et al., 2002; Schwartz et al., 2003; Soshnikova et al., 2003), we have studied the expression and localization of β catenin in p107- and/or p130-deficient skin. Our data demonstrate that the absence of p107 and p130 leads to aberrant β catenin nuclear localization in basal keratinocytes due to Fratz increased expression. These results suggest for the first time, the existence of a functional link between pocket protein family function and Wnt signaling pathway in epidermis.

RESULTS AND DISCUSSION

β catenin Is Localized in the Nuclei of Basal Cells in p107/p130 Null Skin

The epidermis of animals lacking both p107 and p130 display several abnormalities, including altered terminal differentiation and a generalized decrease in the number of the hair follicles, which also show a clear developmental delay (Fig. 1A,B, see also Ruiz et al., 2003). Our previous studies have demonstrated that the hair abnormalities in p107/p130-null skin were associated with altered BMP4-dependent signaling, including decreased Δ Np63 expression (Ruiz et al., 2003). Skin grafts of p107/p130-deficient epidermis onto *NOD/scid* mice showed restored BMP4 expression and normal hair formation. This finding indicates the existence of defective mesenchymal signaling during hair formation in the absence of p107 and p130. However, follicular cysts, misoriented and dysplastic follicles, together with aberrant hair cycling, were also observed in the p107/p130-deficient skin transplants (Fig. 1D), compared with control grafts (Fig. 1C), thus also indicating

defective epithelial compartment (Ruiz et al., 2003).

Given the relevance of β catenin, as an essential mediator of the Wnt pathway in the hair follicle biology and as a regulator of BMP4 expression (see Introduction section), we investigated their expression in the epidermis of p107/p130 null animals. Immunohistochemical analysis revealed a clear nuclear localization of β catenin in the basal keratinocytes of the epidermis of animals lacking both p107 and p130 (Fig. 2B,B') compared with double heterozygous animals (Fig. 2A,A'). This abnormal localization suggests that the absence of p107 and p130 might lead to alterations in the Wnt pathway in epidermis. However, in both genotypes, β catenin presented normal localization in hair follicles at 18.5 days post coitum (dpc), as described by others (DasGupta and Fuchs, 1999; Zhu and Watt, 1999; Merrill et al., 2001; Niemann et al., 2002).

Western blot analysis of whole skin extracts revealed no changes in the total amount of β catenin (Fig. 2C). This might be explained because most of β catenin is associated with adhesion complexes in normal epidermis (Fig. 2A'). In addition, the increase in β catenin observed in the basal layer could be compensated in the total amount by the decrease in the number of hair follicles in p107/p130 null skin, which normally contain high levels of β catenin (Fig. 2B).

Among the different molecular mechanisms responsible for the nuclear β catenin accumulation, Wnt pathway appears to be prominent. In the absence of Wnt signaling, β catenin forms a complex with Axin and the product of the APC tumor suppressor gene that promotes the phosphorylation of specific residues in the amino terminus of β catenin by glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β). The F-box protein Slimb/ β TrCP recognizes phosphorylated β catenin and drives it to degradation by the ubiquitin-proteasome system. On the contrary, Wnt signaling promotes the displacement of Axin and β catenin from GSK3 β complexes, precluding their phosphorylation and leading to nuclear β catenin accumulation. Nuclear β catenin bind to TCF/Lef1 transcrip-

tion factors to activate the transcription of specific target genes (reviewed in Cadigan and Nusse, 1997; Wodarz and Nusse, 1998; Eastman and Grosschedl, 1999; Nusse, 1999).

To analyze the pool of free β catenin, which is responsible for its nuclear translocation, we used a construct coding for the glutathione-S-transferase (GST) -tagged cytoplasmic fragment of E-cadherin. This fragment interacts with cytoplasmic β catenin but not with that complexed in adhesion structures (Orsulic et al., 1999). Pull-down experiments confirmed the increase in free β catenin and, thus, the nuclear accumulation detected by immunohistochemical methods in the basal layer of p107/p130 null epidermis (Fig. 2D). These data would implicate a decrease in phosphorylated β catenin. To test this aspect, we immunoprecipitated total β catenin from whole skin extracts, and the immunoprecipitates were probed by Western blot using antibodies that specifically recognize the amino-phosphorylated residues of β catenin. The results obtained demonstrated a clear decrease in the phosphorylated β catenin in the p107/p130 null animals (Fig. 2E).

The expression of a constitutively stable β catenin in epidermis of transgenic mice is associated with the apparition of newly formed hair follicles within the interfollicular epidermis (Gat et al., 1998). However, we found decreased number and delayed development of hair follicles in p107/p130 null mice together with an increase in nuclear β catenin. In this regard, it is important to remark that the new follicles in β catenin transgenic mice are only formed when the second hair cycle starts, while no phenotype occurred in hairs during embryogenesis (Gat et al., 1998). These data indicate that the nuclear accumulation of β catenin is not sufficient to induce the novo hair morphogenesis during embryonic development, and additional signals are required. These putative signals are probably absent in embryonic hair follicles, explaining why in the transgenic mice, as well as in the p107/p130 null skin, there is no ectopic hair formation at this age. In addition, the possible interaction of β catenin with different transcriptional modulators such as CBP/

p300, TLE, and/or Lef-1/TCF could also be altered in the p107/p130 null skin, explaining the absence of newly formed hair follicles. These aspects will merit future analysis.

Nuclear Localization of β Catenin Is Induced by Frat Protein Overexpression

We next investigated the mechanism by which p107 and p130 deficiency induced β catenin nuclear accumulation. Wnt signaling is able to modify GSK3 β activity, which regulates β catenin translocation to the nucleus by phosphorylation. Moreover, other signals can act directly on GSK3 β or indirectly on β catenin. The serine/threonine kinase Akt/PKB can phosphorylate and, thus, inhibit GSK3 β (reviewed in Datta et al., 1999). We found that the activity and the expression of Akt were similar in all the genotypes (Fig. 3A). Nonetheless, the decrease observed in phosphorylated β catenin (Fig. 2E) would indicate a decrease in GSK3 β activity on β catenin. We thus tested the expression of different Wnt signaling components, which may influence such activity. Western blot analysis demonstrated that the expression of Axin, Slimb/ β TrCP (Fig. 3C), GSK3 β (Fig. 3B), and β catenin (Fig. 2E) were similar in all the genotypes. Recently, a GSK3 β inhibitor, GBP (GSK3 β binding protein), was identified in *Xenopus* based on its ability to bind to GSK3 β and inhibit GSK3 β -mediated phosphorylation of specific substrates (Yost et al., 1998). The mammalian homologue Frat was cloned from its tumor-promoting activity in T-lymphocytes (Jonkers et al., 1997). Three different isoforms have been described in mice, and at least one of them, Frat1, is expressed at mRNA level in epidermis and vibrissae at newborn stage (Jonkers et al., 1999). However, Frat protein expression is very limited in the skin and cannot be detected by biochemical methods (Fig. 3C). Western blot analysis demonstrated overexpression of Frat in p107/p130 null animals (Fig. 3C).

It has been reported that Wnt signaling-induced GBP/Frat expression specifically inhibits the phosphorylation of β catenin and Axin driven by

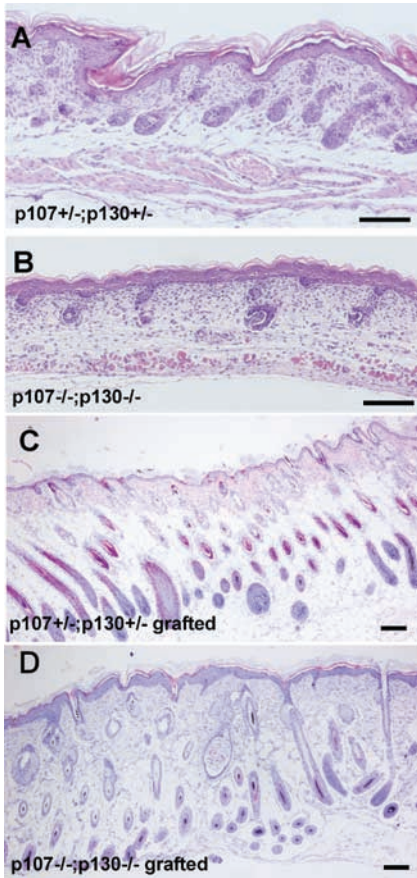


Fig. 1. Epidermal alterations in p107/p130-deficient mice and in p107/p130-deficient epidermis grafted onto NOD/scid mice. **A,B:** Hematoxylin–eosin skin sections of wild-type (**A**) and p107/p130 null (**B**) 18.5 days post coitum embryos showing the decrease in hair follicle and also a clear developmental delay in hair morphogenesis in absence of p107 and p130. **C:** Section of skin graft from control heterozygous mice showing normal anagen hair follicles. **D:** Skin graft from p107/p130 doubly deficient showing several abnormalities, including epidermal hyperplasia, dysplastic hairs sharing a unique hair canal, misoriented follicles, follicular cysts, and hyperplastic sebaceous glands were commonly detected in p107/p130 doubly deficient grafts. Scale bars = 150 μ m in A–D.

GSK3 β without inhibition of its activity to phosphorylate GS-1 (Li et al., 1999; Thomas et al., 1999), and this finding appears to be promoted by disruption of the Axin–GSK3 β – β catenin complexes. In fact, GSK3 β activity probed against GS-1 did not change in p107/p130 null animals (Fig. 3B). To test the presence of Axin–GSK3 β – β catenin complexes in p107 and/or p130 null epidermis, we performed immunoprecipitation–Western blot experiments. We found that

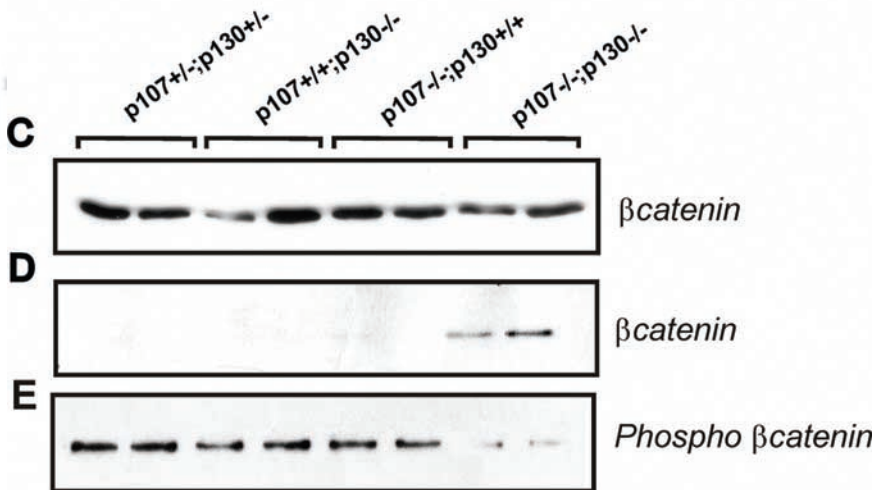
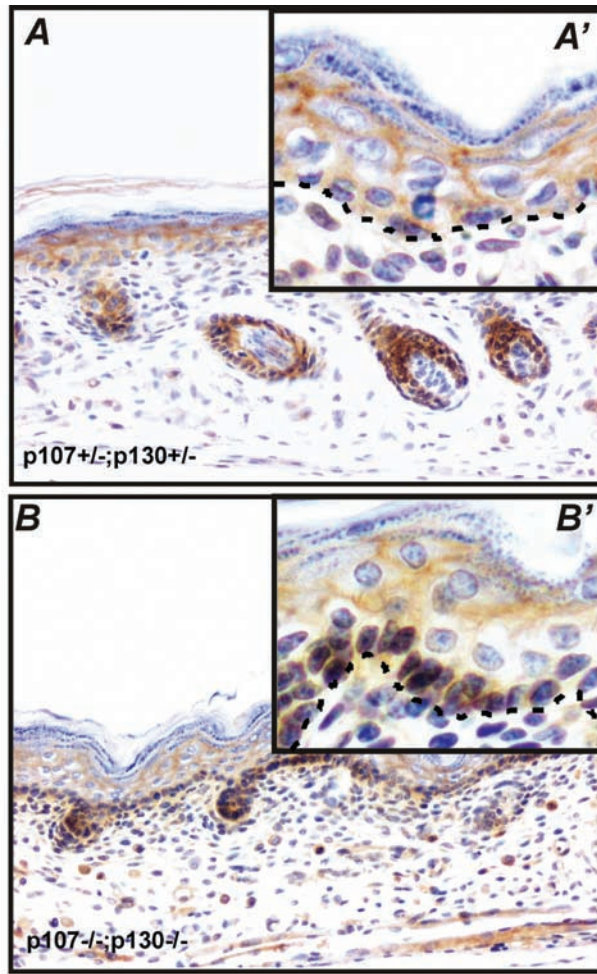


Fig. 2. Increased nuclear localization of β catenin in the basal layer of p107/p130 null epidermis. **A,B:** Immunohistochemical analysis of β catenin showed increased nuclear localization in the basal layer of p107/p130 null mice epidermis (**B,B'**), compared with wild-type littermates (**A,A'**). **C:** Western blot analysis of total β catenin protein in skin extracts of the stated genotypes. **D:** Pull-down experiment using a GST-bound cytoplasmic fragment of E-cadherin demonstrated an increase in the free β catenin pool in p107/p130 null mice epidermis. **E:** β Catenin in p107/p130 null animals is hypophosphorylated as demonstrated by Western blot using antibodies that specifically recognize the β catenin phosphorylated in Ser 33/37/45 and Thr 41.

ROF OG

ROF OG

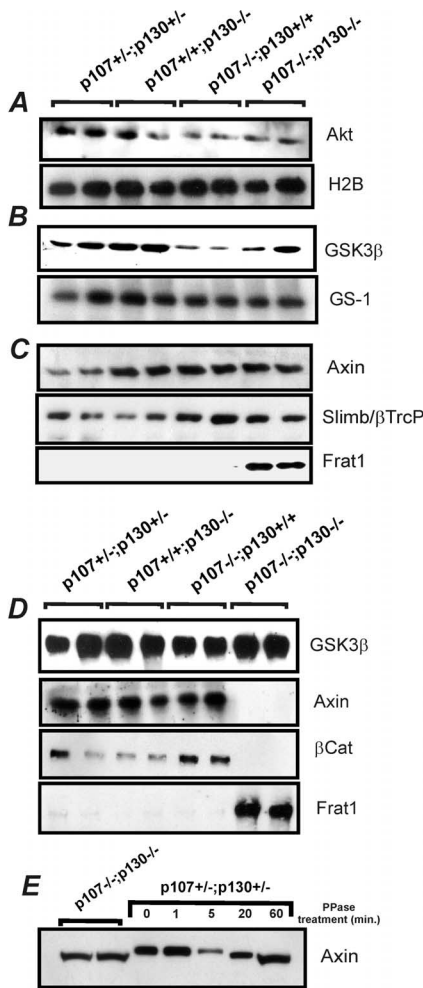


Fig. 3. Frat protein overexpression in the basal layer of p107/p130 null epidermis. **A:** Akt expression and kinase activity showing no changes among the different genotypes. **B:** Absence of major alterations in GSK3β expression and kinase activity against GS-1. **C:** Western blots of total skin extracts probed against the quoted components of the Wnt-pathway. **D:** GSK3β was immunoprecipitated from total skin extracts, and the immunocomplexes were subsequently probed with antibodies against GSK3β, Axin, βcatenin, and Frat as stated. Note the absence of Axin and βcatenin and the presence of Frat in GSK3β complexes in skin extracts of p107/p130 null animals. **E:** Western blot against Axin of p107/p130 null or double heterozygous skin extracts treated with phosphatase at the stated times, showing the shift of its apparent mobility, demonstrating the presence of hypophosphorylated Axin in p107/p130 null mice.

Axin and βcatenin were coprecipitated with GSK3β in all the genotypes except in p107/p130 null animals (Fig. 3D). On the contrary, Frat was only present in GSK3β-containing complexes in p107/p130 null an-

imals (Fig. 3D), indicating that such Frat overexpression disrupted the GSK3β–Axin–βcatenin complex, impairing the βcatenin phosphorylation and leading to its nuclear accumulation.

Finally, because Frat also appears to inhibit Axin phosphorylation (Thomas et al., 1999; Willert et al., 1999), we analyzed this aspect. Axin phosphorylation can be easily monitored by a partial shift in the apparent mobility of the protein (Willert et al., 1999). We found that Axin from p107/p130 null animals migrated faster than that from control littermates. In addition, the phosphatase treatment of the control extracts changes the Axin mobility to that observed in p107/p130 null animals (Fig. 3E). This finding suggested that Axin phosphorylation by GSK3β is also impaired in p107/p130 null animals.

Frat Protein Overexpression Is Sufficient to Induce Nuclear Translocation of βCatenin in Keratinocytes

To further confirm the above-commented data, a series of experiments were carried out. First, we analyzed the expression of Frat in the epidermis of mice lacking p107 and p130 and compared it with controls. We observed that, in control mice epidermis, Frat expression is restricted to some epithelial cells of the hair follicles (Fig. 4A), mainly in the lower part of the outer root sheath. In contrast, in double-null skin, Frat staining was clearly detected not only in the epithelial cells of the hair follicles but also in the interfollicular epidermis, predominantly in the basal layer (Fig. 4B).

The expression of Frat and nuclear βcatenin in the basal layer of the interfollicular epidermis led us to investigate if the increased expression of Frat would be responsible for the observed nuclear localization of βcatenin. Frat was expressed in wild-type primary keratinocytes by retroviral infection. We observed that Frat overexpression (Fig. 4C) leads to nuclear βcatenin accumulation, whereas only few cells displayed nuclear βcatenin upon infection with a mutant lacking the GSK3β-interact-

ing domain (ΔGBD; Fig. 4D). Finally, we also tested the ability of translocated endogenous βcatenin to activate Lef/TCF-dependent transcription. Wild-type primary keratinocytes were transfected with a reporter plasmid together with the above mentioned Frat constructs. It is worth mentioning that the p107/p130 double-null keratinocytes displayed reduced growth capabilities in vitro, thus precluding their use in similar experiments. We found that, in agreement with their ability to translocate βcatenin to nuclei, Frat and, to a minor extent, the ΔGBD mutant activated the transcription but only in the presence of cotransfected Lef1 protein (Fig. 4E). Taken together, these results demonstrate that the absence of p107 and p130 leads to increased Frat expression, and this finding is responsible for the observed nuclear βcatenin localization in the epidermis of p107/p130 null animals.

Expression and Localization of βCatenin and Frat Are Restored in Grafts

When p107/p130-deficient epidermis is grafted onto NOD/scid mice, hair growth is restored (Fig. 1D; Ruiz et al., 2003). However, several alterations in hair morphogenesis and cycling are present in these grafts (Fig. 1D), suggesting some epithelial alterations. Consequently, we investigated possible alterations in βcatenin and Frat expression in these transplanted skins. We found that the Frat overexpression displayed in p107/p130-deficient epidermis is not observed in the grafts (Fig. 5A,A'). On the contrary, the pattern of Frat expression in the anagen follicles (Fig. 5A) was similar to that observed in control mice (Fig. 4A) and in control grafts (not shown). In agreement with such restored expression, the localization of βcatenin was also restored and no ectopic expression of this protein was observed in the basal layer of the grafted epidermis (Fig. 5B,B'). Moreover, we observed normal expression of βcatenin and Lef-1 in the bulb of aberrant hair follicles (Fig. 5C and D, respectively). This finding indicates that the alterations observed in p107/p130-defi-

F4

F5

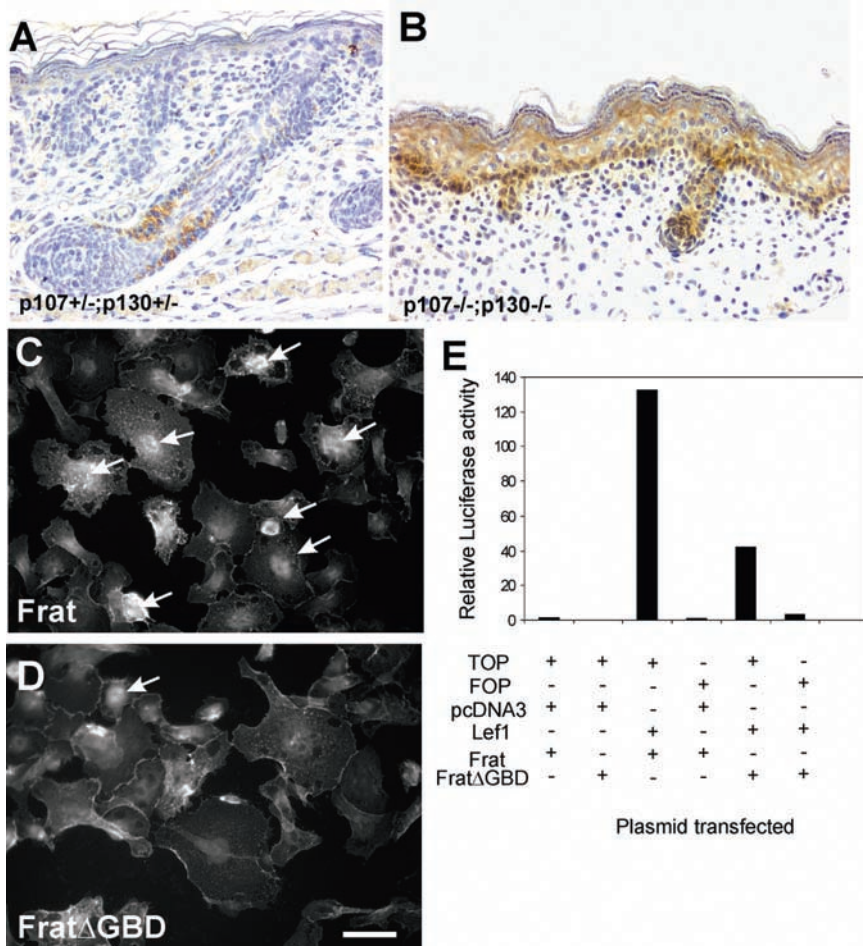
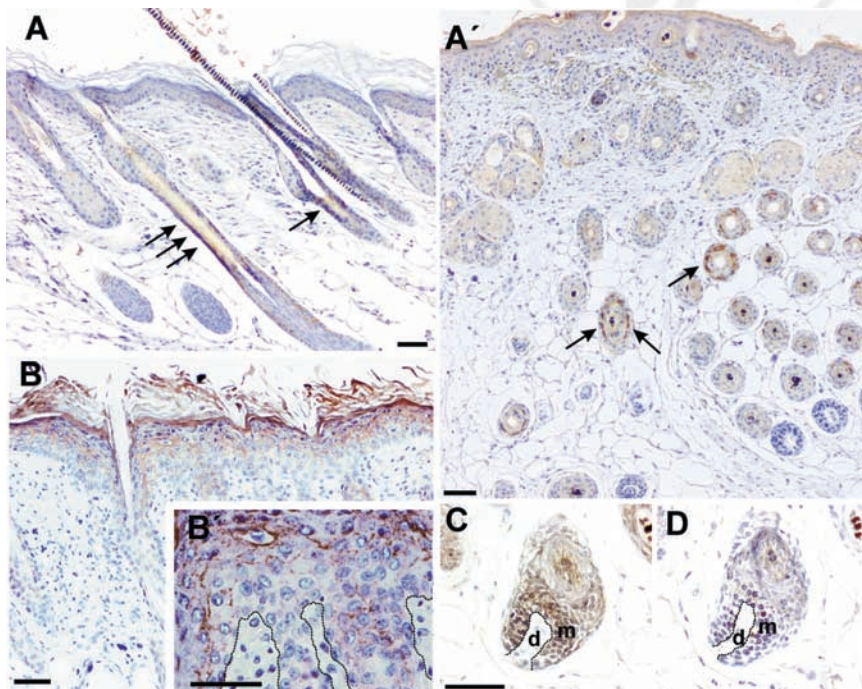


Fig. 4. Expression of Frat in p107/p130 keratinocytes might allow nuclear localization of β catenin. **A,B:** The expression of Frat was monitored in double-heterozygous (A) and in double-deficient (B) epidermis by immunohistochemical methods. Note that Frat expression in control mice is restricted to the lower part of the hair follicle and confined to some cells of the outer root sheath. In doubly deficient mice, a continuous expression of Frat was detected not only in hair follicles but also in most of the basal layer of the interfollicular epidermis. **C,D:** Primary keratinocytes derived from wild-type mice were transduced with retrovirus coding for full-length Frat (C) or a mutant form of Frat lacking the GSK3 β binding domain, Frat Δ GBD (D). The localization of β catenin was then monitored by immunofluorescence in the transduced cultures. Note that full-length Frat but not the mutant induces the nuclear localization of endogenous β catenin (arrows) in the keratinocytes, whereas only few cells transduced with the mutant construct (Frat Δ GBD) display nuclear β catenin staining (arrows). **E:** Frat cooperates with Lef1 to induce β catenin-dependent TCF transcriptional activation. Primary wild-type keratinocytes were transfected with the quoted plasmids, and the activation of the reporter construct TOPflash or control FOPflash construct was monitored by luciferase activity.

Fig. 5. Expression of Frat and β catenin is restored in grafts. **A-D:** Immunohistochemical localization of Frat (denoted by arrows in A, A'), β catenin (B,B',C), and Lef-1 (D) in p107/p130-deficient epidermis grafted onto NOD/scid mice, demonstrating the normal localization of these proteins in the transplants. In C and D, d denotes dermal papilla and m denotes matrix hair cells. Dashed lines in B', C, and D denote epithelial-mesenchymal junction. Scale bars = 100 μ m in A,B, in C (applies to C,D).



cient grafts (Fig. 1D, see also Ruiz et al., 2003) are not due to misexpression of β catenin or Lef-1.

In summary, here we present evidence that the absence of p107 and p130 retinoblastoma family members leads to aberrant nuclear localization of β catenin. This finding appears to proceed through the overexpression of Frat, which disrupts the pathway of β catenin degradation, allowing its nuclear accumulation. However, this process does not take place in grafted epidermis, thus suggesting the possible involvement of dermal signaling. In this regard, we have shown previously that a defective BMP4-dependent signaling in the dermis occurs in p107/p130-deficient skin, and this

defect is also restored in grafts (Ruiz et al., 2003). The parallelism between the altered expression of BMP4 and Frat in double-null epidermis and their restoration in grafts strongly might suggest a connection between these two molecules. Recently, it has been demonstrated that BMP4 is able to induce the Wnt antagonist Dickkopf-1 (Grotewold and Ruther, 2002a,b). However, the possible functional link between BMP4 and Frat, if any, remains to be elucidated. The possibility that other pathways besides BMP and Wnt are affected in p107/p130 epidermis is clearly demonstrated by the restored expression of BMP4 and β catenin/lef-1/Frat in the transplants together with several different anomalies. In this regard, the increased BMP2/4 activity promoted by *noggin* ablation leads to a decreased β catenin, *shh*, and p75NTR expression (Botchkarev et al., 2002). These possibilities will be addressed in future experiments.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice and Histological Procedures

The mice with the different genotypes were generated and identified by PCR as described (Cobrinik et al., 1996; Lee et al., 1996). Normal skin sections were fixed in 4% buffered formalin or 70% ethanol and embedded in paraffin. Five-micrometer-thick sections were stained with hematoxylin/eosin or processed for immunohistochemistry and analyzed with a Zeiss microscope.

Immunohistochemical Methods

Immunohistochemistry was performed on deparaffinized sections by using antibodies against β catenin (1/200 dilution of mouse monoclonal antibody (mAb), Transduction Laboratories) or Frat (S-20, Santa Cruz Biotechnology, diluted 1/100). Biotin-coupled secondary antibodies were purchased from Jackson Immunoresearch Laboratories and used at 1:5,000 dilution. The positive staining was visualized by using ABC elite kit (Vector) and Vector DAB kit. Slides were counterstained with he-

matoxylin. Negative control slides were obtained by replacing the primary antibody with phosphate buffered saline (data not shown).

Western Blot and Kinase Assays

Total protein skin or keratinocyte extracts were obtained in buffer A (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM ethyleneglycol tetraacetic acid, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β glycerolphosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, and 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride). A total of 25 μg of protein was used in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose (Amersham), and probed with antibodies against GSK3 β (Transduction Laboratories and Santa Cruz Biotech), β catenin (see above), Akt1/2, Axin, Slim/ β TrcP, or Frat (all purchased from Sta. Cruz Biotech and diluted 1/500 in TBS-T). Blots were developed by using WestPicoSignal (Pierce) following the manufacturers' recommendations. Akt and GSK3 β kinase assays were performed essentially as described (Leis et al., 2002; Segrelles et al., 2002) after immunoprecipitation of 50 μg of total protein skin extracts with anti-Akt or GSK3 β antibodies and by using histone 2B (Roche) or glycogen synthase 1 (Sigma) as substrates, respectively. For the analysis of phosphorylated β catenin, after immunoprecipitation, Western blots were probed with a mixture of antibodies that specifically recognize the β catenin phosphorylated in Ser 33/37/45 and Thr 41 (Cell Signaling). Pull-down experiments were performed by using a bacterially expressed GST-coupled cytoplasmic fragment of E-cadherin (generously provided by Dr. S. Pece). To analyze the GSK3 β complexes, we perform immunoprecipitation experiment against GSK3 β and the immunoprecipitates were probed by Western blot with the stated antibodies. The analysis of Axin phosphorylation by changes in apparent gel mobility was performed upon treatment of total protein extracts with calf intestine phosphatase (Roche).

Mouse Skin Grafts

Dorsal full-thickness skin pieces of 2–3 cm^2 were obtained from 18.5 dpc p107/p130 double-null mice or double heterozygous littermates as control. Donor skin pieces were grafted onto a wound created by removing a similar-sized piece of full-thickness back skin in female immunodeficient *NOD/scid* recipient mice. Graft and host skin edges were joined using surgical silk suture, and the grafted area was covered with a thin layer of NewSkin (Medtech, Jackson) as the only protective dressing. This procedure allows graft-take monitoring and produced normal haired donor skin. Graft recipient animals were routinely monitored for hair growth and killed by 2–8 weeks after grafting. The graft containing area was excised and processed for histopathology or immunohistochemical analysis as described above.

Luciferase Assays

Primary keratinocytes were cultured in 0.05 mM Ca^{2+} EMEM (GibcoBRL) supplemented with 4% chelex-treated fetal bovine serum, epidermal growth factor (10 ng/ml), and antibiotics. Transient transfections were performed with the Superfect reagent (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Forty-eight hours after transfection, cells were harvested for luciferase assays (Promega Dual-Luciferase Kit). Firefly luciferase values were standardized to *Renilla* luciferase values (pRL-SV40; Promega) to account for differences in transfection efficiency between samples. As a control, the β catenin/Lef1 reporter (TOPflash), was replaced by a mutant (FOPflash) reporter to ensure that values were dependent on the Lef1/Tcf-binding sites in the promoter. Expression plasmids coding for Lef-1 (kindly provided by Dr. A. Cano), Frat1, and GSK3 β -binding-defective mutant Frat1 (Frat Δ GBD; kindly provided by Dr. A. Berns) were used.

Immunofluorescence Analysis

Primary wild-type keratinocytes were grown onto glass coverslips for at least 24 hr. Afterward, cultures were infected with retroviruses cod-

ing for Frat1 or Frat1ΔGBD protein. Forty-eight hours after infection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and localization of βcatenin was monitored by immunofluorescence using a 1/200 dilution of mouse mAb (Transduction Laboratories) following a previously described protocol (Paramio et al., 2001).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Renée van Amerongen, Jos Jonkers, and Anton Berns for the critical reading of the manuscript, helpful suggestions, and the generous gift of reactivates. p107 and p130 null mice were generously provided by Dr. Tyler Jacks. We thank Salvatore Pece, Amparo Cano, and Rudi Grosschedl for the generous gift of reactivates. We also thank Jesús Martínez and the personnel of the animal husbandry facility for the excellent care of the animals, and Pilar Hernández for the histological preparations. J.M.P. received funding from MCYT and CAM.

REFERENCES

- Alonso L, Fuchs E. 2003. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev* 17:1189–1200.
- Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE. 2002. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev Cell* 2:643–653.
- Botchkarev VA, Botchkareva NV, Sharov AA, Funai K, Huber O, Gilchrist BA. 2002. Modulation of BMP signaling by noggin is required for induction of the secondary (nontylotrich) hair follicles. *J Invest Dermatol* 118:3–10.
- Cadigan KM, Nusse R. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11:3286–3305.
- Clarke AR, Maandag ER, van Roon M, van der Lugt NM, van der Valk M, Hooper ML, Berns A, te Riele H. 1992. Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 359:328–330.
- Cobrinik D, Lee MH, Hannon G, Mulligan G, Bronson RT, Dyson N, Harlow E, Beach D, Weinberg RA, Jacks T. 1996. Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev* 10:1633–1644.
- Courtois G, Smahi A, Israel A. 2001. NEMO/IKK gamma: linking NF-kappa B to human disease. *Trends Mol Med* 7:427–430.
- DasGupta R, Fuchs E. 1999. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development* 126:4557–4568.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13:2905–2927.
- Doffinger R, Smahi A, Bessia C, Geismann F, Feinberg J, Durandy A, Bodemer C, Kenwrick S, Dupuis-Girod S, Blanche S, Wood P, Rabia SH, Headon DJ, Overbeek PA, Le Deist F, Holland SM, Belani K, Kumararatne DS, Fischer A, Shapiro R, Conley ME, Reimund E, Kalhoff H, Abinun M, Munnich A, Israel A, Courtois G, Casanova JL. 2001. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. *Nat Genet* 27:277–285.
- Eastman Q, Grosschedl R. 1999. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol* 11:233–240.
- Fuchs E. 1998. Beauty is skin deep: the fascinating biology of the epidermis and its appendages. *Harvey Lect* 94:47–77.
- Fuchs E, Raghavan S. 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet* 3:199–209.
- Fuchs E, Merrill BJ, Jamora C, DasGupta R. 2001. At the roots of a never-ending cycle. *Dev Cell* 1:13–25.
- Gat U, DasGupta R, Degenstein L, Fuchs E. 1998. De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 95:605–614.
- Grotewold L, Ruther U. 2002a. Bmp, Fgf and Wnt signalling in programmed cell death and chondrogenesis during vertebrate limb development: the role of Dickkopf-1. *Int J Dev Biol* 46:943–947.
- Grotewold L, Ruther U. 2002b. The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J* 21:966–975.
- Hardy MH. 1992. The secret life of the hair follicle. *Trends Genet* 8:55–61.
- Headon DJ, Overbeek PA. 1999. Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nat Genet* 22:370–374.
- Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W. 2001. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* 105:533–545.
- Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. 1992. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359:295–300.
- Jonkers J, Korswagen HC, Acton D, Breuer M, Berns A. 1997. Activation of a novel proto-oncogene, Frat1, contributes to progression of mouse T-cell lymphomas. *EMBO J* 16:441–450.
- Jonkers J, van Amerongen R, van der Valk M, Robanus-Maandag E, Molenaar M, Destree O, Berns A. 1999. In vivo analysis of Frat1 deficiency suggests compensatory activity of Frat3. *Mech Dev* 88:183–194.
- Kim JS, Crooks H, Dracheva T, Nishanian TG, Singh B, Jen J, Waldman T. 2002. Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res* 62:2744–2748.
- Laurikkala J, Pispala J, Jung HS, Nieminen P, Mikkola M, Wang X, Saarialho-Kere U, Galceran J, Grosschedl R, Thesleff I. 2002. Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Ectod. *Development* 129:2541–2553.
- LeCouter JE, Kablar B, Hardy WR, Ying C, Megeney LA, May LL, Rudnicki MA. 1998a. Strain-dependent myeloid hyperplasia, growth deficiency, and accelerated cell cycle in mice lacking the Rb-related p107 gene. *Mol Cell Biol* 18:7455–7465.
- LeCouter JE, Kablar B, Whyte PF, Ying C, Rudnicki MA. 1998b. Strain-dependent embryonic lethality in mice lacking the retinoblastoma-related p130 gene. *Development* 125:4669–4679.
- Lee EY, Chang CY, Hu N, Wang YC, Lai CC, Herrup K, Lee WH, Bradley A. 1992. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 359:288–294.
- Lee MH, Williams BO, Mulligan G, Mukai S, Bronson RT, Dyson N, Harlow E, Jacks T. 1996. Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb. *Genes Dev* 10:1621–1632.
- Leis H, Segrelles C, Ruiz S, Santos M, Paramio JM. 2002. Expression, localization, and activity of glycogen synthase kinase 3beta during mouse skin tumorigenesis. *Mol Carcinog* 35:180–185.
- Li L, Yuan H, Weaver CD, Mao J, Farr GH III, Sussman DJ, Jonkers J, Kimelman D, Wu D. 1999. Axin and Frat1 interact with Dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J* 18:4233–4240.
- Lipinski MM, Jacks T. 1999. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* 18:7873–7882.
- MacPherson D, Sage J, Crowley D, Trumpp A, Bronson RT, Jacks T. 2003. Conditional mutation of Rb causes cell cycle defects without apoptosis in the central nervous system. *Mol Cell Biol* 23:1044–1053.
- Merrill BJ, Gat U, DasGupta R, Fuchs E. 2001. Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev* 15:1688–1705.
- Mikkola ML, Pispala J, Pekkanen M, Paulin L, Nieminen P, Kere J, Thesleff I. 1999. Ectodysplasin, a protein required for epithelial morphogenesis, is a novel TNF homologue and promotes cell-matrix adhesion. *Mech Dev* 88:133–146.
- Millar SE. 2002. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol* 118:216–225.
- Monreal AW, Ferguson BM, Headon DJ, Street SL, Overbeek PA, Zonana J. 1999. Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic

- ectodermal dysplasia. *Nat Genet* 22:366–369.
- Niemann C, Owens DM, Hulsken J, Birchmeier W, Watt FM. 2002. Expression of DeltaN Lef1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours. *Development* 129:95–109.
- Nusse R. 1999. WNT targets. Repression and activation. *Trends Genet* 15:1–3.
- Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. 1999. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci* 112:1237–1245.
- Paramio JM, Lain S, Segrelles C, Lane EB, Jorcano JL. 1998. Differential expression and functionally co-operative roles for the retinoblastoma family of proteins in epidermal differentiation. *Oncogene* 17:949–957.
- Paramio JM, Segrelles C, Casanova ML, Jorcano JL. 2000. Opposite functions for E2F1 and E2F4 in human epidermal keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 275:41219–41226.
- Paramio JM, Segrelles C, Ruiz S, Jorcano JL. 2001. Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 21:7449–7459.
- Ruiz S, Segrelles C, Bravo A, Santos M, Perez P, Leis H, Jorcano JL, Paramio JM. 2003. Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130. *Development* 130:2341–2353.
- Schmidt-Ullrich R, Aebischer T, Hulsken J, Birchmeier W, Klemm U, Scheidereit C. 2001. Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendages. *Development* 128:3843–3853.
- Schwartz DR, Wu R, Kardia SL, Levin AM, Huang CC, Shedden KA, Kuick R, Misk DE, Hanash SM, Taylor JM, Reed H, Hendrix N, Zhai Y, Fearon ER, Cho KR. 2003. Novel candidate targets of beta-catenin/T-cell factor signaling identified by gene expression profiling of ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res* 63:2913–2922.
- Segrelles C, Ruiz S, Perez P, Murga C, Santos M, Budunova IV, Martinez J, Larcher F, Slaga TJ, Gutkind JS, Jorcano JL, Paramio JM. 2002. Functional roles of Akt signaling in mouse skin tumorigenesis. *Oncogene* 21:53–64.
- Soshnikova N, Zechner D, Huelsken J, Mishina Y, Behringer RR, Taketo MM, Crenshaw EB, 3rd, Birchmeier W. 2003. Genetic interaction between Wnt/beta-catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes Dev* 17:1963–1968.
- Thomas GM, Frame S, Goedert M, Nathke I, Polakis P, Cohen P. 1999. A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin. *FEBS Lett* 458:247–251.
- van Genderen C, Okamura RM, Farinas I, Quo RG, Parslow TG, Bruhn L, Grosschedl R. 1994. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev* 8:2691–2703.
- Van Mater D, Kolligs FT, Dlugosz AA, Fearon ER. 2003. Transient activation of beta-catenin signaling in cutaneous keratinocytes is sufficient to trigger the active growth phase of the hair cycle in mice. *Genes Dev* 17:1219–1224.
- Willert K, Shibamoto S, Nusse R. 1999. Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. *Genes Dev* 13:1768–1773.
- Wodarz A, Nusse R. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:59–88.
- Wu L, De Bruin A, Saavedra HI, Starovic M, Trimboli A, Yang Y, Opavska J, Wilson P, Thompson JC, Ostrowski MC, Rosol TJ, Woollett LA, Weinstein M, Cross JC, Robinson ML, Leone G. 2003. Extra-embryonic function of Rb is essential for embryonic development and viability. *Nature* 421:942–947.
- Yost C, Farr GH III, Pierce SB, Ferkey DM, Chen MM, Kimelman D. 1998. GBP, an inhibitor of GSK-3, is implicated in Xenopus development and oncogenesis. *Cell* 93:1031–1041.
- Zhou P, Byrne C, Jacobs J, Fuchs E. 1995. Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes Dev* 9:700–713.
- Zhu AJ, Watt FM. 1999. beta-catenin signalling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion. *Development* 126:2285–2298.

Author Proof

AQ1-Please add Weinberg, 1995, to the reference list.



Author Proof

Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis

Sergio Ruiz¹, Mirentxu Santos¹, Carmen Segrelles¹, Hugo Leis¹, José Luis Jorcano¹, Anton Berns^{2,†}, Jesús M. Paramio^{1,†} and Marc Vooijs^{2,*}

¹Department of Cell and Molecular Biology and Gene Therapy, CIEMAT, Madrid E28040, Spain

²Division of Molecular Genetics and Centre of Biomedical Genetics, The Netherlands Cancer Institute, Plesmanlaan, 121 Amsterdam, 1086 CX, The Netherlands

*Present address: Department of Molecular Biology and Pharmacology, Washington University Medical School, St Louis, MO 63110, USA

†Authors for correspondence (e-mail: xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx)

Accepted 25 February 2004

Development 131, 000-000

Published by The Company of Biologists 2004

doi:10.1242/dev.01148

Summary

The retinoblastoma gene product, pRb, plays a crucial role in cell cycle regulation, differentiation and inhibition of oncogenic transformation. pRb and its closely related family members p107 and p130 perform exclusive and overlapping functions during mouse development. The embryonic lethality of *Rb*-null animals restricts the phenotypic analysis of these mice to mid-gestation embryogenesis. We employed the *Cre/loxP* system to study the function of *Rb* in adult mouse stratified epithelium. *Rb^{F19/F19};K14cre* mice displayed hyperplasia and hyperkeratosis in the epidermis with increased proliferation and aberrant expression of differentiation markers. In vitro, pRb is essential for the maintenance of the postmitotic state of terminally differentiated

keratinocytes, preventing cell cycle re-entry. However, p107 compensates for the effects of *Rb* loss as the phenotypic abnormalities of *Rb^{F19/F19};K14cre* keratinocytes in vivo and in vitro become more severe with the concurrent loss of *p107* alleles. p107 alone appears to be dispensable for all these phenotypic changes, as the presence of a single *Rb* allele in a *p107*-null background rescues all these alterations. Luciferase reporter experiments indicate that these phenotypic alterations might be mediated by increased E2F activity. Our findings support a model in which pRb in conjunction with p107 plays a central role in regulating epidermal homeostasis.

Key words: Mouse, Rb1, Rbl1, Rbl2,

Introduction

The Rb family of pocket proteins comprises three members pRb, p107 and p130 that have unique and overlapping functions in cell cycle control, differentiation and inhibition of oncogenic transformation (Classon and Harlow, 2002). Of these, *Rb* (*Rb1* – Mouse Genome Informatics) is the predominant family member found mutated in a significant number of human cancer types. Disruption of the ‘*Rb* pathway’ through direct *Rb* mutation or via mutations in upstream regulators of *Rb* function, such as in cyclin D1, *Cdk4* or *p16^{ink4a}* is a hallmark of sporadic cancer (Sherr and McCormick, 2002; Weinberg, 1995).

Rb encodes a nuclear phosphoprotein that actively represses genes required for the G1-S transition mainly through the binding to members of the E2F transcription factor family (Dyson, 1998). As cell cycle progresses, pRb is phosphorylated by cyclin/CDK complexes, resulting in the release of bound E2Fs and allowing the G1 to S progression. Accordingly, forced expression of pRb leads to growth arrest, and suppresses pRb-deficient tumor growth in mice (Riley et al., 1996). pRb inactivation is further regulated by two families of CDK inhibitors (CKIs) that regulate the CDK kinase activity (Harper and Elledge, 1996).

Most of the insights into the role of the Rb family in

proliferation and differentiation have been obtained from knockout models. Mice lacking pRb die in utero displaying defects in erythroid, neuronal and lens fiber cell differentiation (Clarke et al., 1992; Jacks et al., 1992; Lee et al., 1992). Whereas mice with null mutations in either *p107* (*Rbl1* – Mouse Genome Informatics) or *p130* (*Rbl2* – Mouse Genome Informatics) are viable and normal, mice lacking both *p107* and *p130* die at birth with defects in endochondral bone development associated with inappropriate cell cycle exit (Cobrinik et al., 1996; Lee et al., 1996). This indicates that p107 and p130 perform overlapping functions that cannot be carried out by pRb. Similarly, pRb may have overlapping functions with p130 that are not shared with p107 (Ciarmatori et al., 2001). Finally, mice deficient for both pRb and p107 show an aggravated *Rb*-null phenotype (Lee et al., 1996), and mouse embryo fibroblasts lacking all three Rb family members are immortal and do not respond to senescence inducing signals (Dannenbergh et al., 2000; Sage et al., 2000).

The epidermis is well suited to study proliferation and differentiation as both processes are compartmentalized. The proliferative cells are confined to a single basal layer and the non-proliferative differentiating cells are located in the suprabasal layers. At their final stage of differentiation, epidermal cells are shed from the skin. This process requires a

continuous replenishment of cells, which is fulfilled by epidermal stem cells. These stem cells display a low proliferative rate and give rise to all the epidermal cell subtypes (Fuchs et al., 2001).

The induction and maintenance of cell cycle arrest is crucial for normal tissue homeostasis and regulators of the cell cycle also modulate epidermal differentiation (Di Cunto et al., 1998; Paramio et al., 1998; Ruiz et al., 2003; Zhang et al., 1998; Zhang et al., 1999). Recently, the Rb family has been implicated in several aspects of differentiation processes such as terminal cell cycle exit, maintenance of the post-mitotic state and induction of tissue-specific gene expression (Lipinski and Jacks, 1999).

We and others have found a role for Rb family members during the *in vitro* differentiation of keratinocytes (Martinez et al., 1999; Paramio et al., 1998), involving the specific interaction with distinct E2F factors (D'Souza et al., 2001; Paramio et al., 2000). However, little is known about the function of this family during normal skin development and epidermal homeostasis *in vivo*. Transgenic mice expressing the viral oncoprotein HPV-E7, which binds and inactivates retinoblastoma family members, in epidermal cells develop epithelial cancer (Arbeit et al., 1994; Griep et al., 1993; Herber et al., 1996). In addition, *ink4^{A2.3};p21^{waf}* doubly-deficient mice display severe alterations in epidermal differentiation (Paramio et al., 2001b). However, these studies have only addressed the function of pRb family members in an indirect manner. More recently, Balsitis et al. (Balsitis et al., 2003) have shown that *Rb* ablation in the epidermis mimics many of the features displayed by transgenic mice expressing E7 protein in the skin. However, concomitant expression of E7 in pRb-deficient skin aggravates this phenotype, indicating that E7 exerts *Rb*-independent activities (Balsitis et al., 2003), possibly by inactivating p107 and/or p130.

We have begun to dissect the specific and overlapping roles of pRb family in skin by analyzing mouse mutants deficient for one or more members. We recently demonstrated that the concomitant absence of p107 and p130 impairs terminal differentiation of skin in mice, whereas the onset of differentiation was unaltered (Ruiz et al., 2003). The embryonic lethality of *Rb*-null mutant mice precludes the phenotypic analysis of pRb in the epidermis, whose morphogenesis starts at 14.5 dpc (Byrne et al., 1994). Using a conditional knockout approach based on the *Cre/loxP* system (Sauer and Henderson, 1988) we have examined the role of pRb and p107 in epithelial proliferation and differentiation by targeted deletion of *Rb* in stratified epithelia using keratin *K14*-driven Cre recombinase (*K14cre*) (Jonkers et al., 2001).

Our results demonstrate that pRb plays an essential role as a regulator of epidermal homeostasis. Importantly, the consequences of *Rb* loss differ dramatically between the closely related follicular and interfollicular epidermis. Finally, Rb and p107 have shared roles in the epidermis in which p107 can compensate for loss of Rb function in differentiation and proliferation.

Materials and methods

Mice and histological procedures

Rb^{F19/F19}, *K14cre*, ROSA-26 reporter and *p107^{-/-}* animals were genotyped as described (Jonkers et al., 2001; Marino et al., 2000).

Skin samples were fixed in 10% buffered formalin or in 70% ethanol, and embedded in paraffin wax. Sections (5 μ m) were stained with Haematoxylin/Eosin or processed for immunohistochemistry. Cryosections (8 μ m) were prepared from skin samples embedded in OCT medium. For BrdU studies, mice were injected (0.1 mg/g weight) 1 hour prior to sacrifice (Santos et al., 2002).

Antibodies and immunofluorescence

Immunofluorescence was performed using standard protocols on deparaffinized sections using antibodies against K10 (K8.60 mAb, 1/500 dilution, Sigma), K5 and K6 (both at 1/500 dilution, rabbit polyclonal antibody, Covance). BrdU incorporation was monitored in formalin-fixed sections as described (Santos et al., 2002). Horseradish-peroxidase, Texas-Red- and FITC-conjugated secondary antibodies were purchased from Jackson and used 1/4000, 1/500 and 1/50 dilution, respectively. Apoptosis was monitored using Apoptag kit (Oncor). Peroxidase was visualized using DAB kit (Vector). Control slides were obtained by replacing the primary antibody with PBS (data not shown). For *lacZ* staining, adult mouse tissues were briefly fixed in 0.2% PFA and equilibrated in 30% sucrose/PBS at 4°C and embedded in OCT compound. Cryosections (10 μ m) were stained for β -galactosidase activity as described (Jonkers et al., 2001).

Primary keratinocytes cultures

Primary keratinocytes were obtained from newborn mice skin and cultured in EMEM medium supplemented with 4% Chelex-treated fetal bovine serum (Biowhitaker), 0.05 mM of CaCl₂, EGF (10 ng/ml, Serono) and antibiotics. Differentiation was induced by adding Ca²⁺ up to 1.2 mM in the culture medium. BrdU was added to the medium (10 μ m) and cells were incubated for 1 hour after which cells were fixed and processed for immunohistochemistry. Three independent experiments were carried out and at least 1000 cells were scored on each. Keratinocyte growth analyses were performed by plating 10⁵ cells and counting cell numbers daily. Adenoviral infections were performed by incubating primary keratinocytes with Adeno-cre or Adeno-GFP supernatants for 2 hours in the presence of Polybrene in mixed DMEM/Optimem (50%) and 2.5% FCS. Afterwards, the medium was changed to standard lowCa²⁺ medium.

Western blot analysis

Primary keratinocytes were lysed in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 20 mM NaF, 1 μ g/ml aprotinin and leupeptin, 1 mM disodium pyrophosphate and 1 mM Na₃VO₄. Total protein (25 μ g) was used for SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose (Amersham) and probed with antibodies against pRb (PharMingen), p107 and p130 (Santa Cruz) all used at 1/1000 dilution. Actin (Santa Cruz) was used for normalization. Detection was performed using ECL (Pierce).

Luciferase assays

Plasmid pSV40-Renilla was obtained from Promega. pE2F-Luc was a generous gift from Dr X. Lu. Primary mouse keratinocytes were transfected using Superfect (Quiagen) with pSV-Renilla (0.1 μ g) and pE2F-Luc (2.4 μ g). Lysates were prepared and analyzed with the Dual Luciferase Reporter Assay system (Promega). Relative luciferase expression was determined as the ratio of firefly to *Renilla* luciferase activity. Transfections were performed in triplicate, and the mean and standard error were calculated for each condition. Two independent transfection experiments were performed and luciferase activity was normalized to the values obtained with control, *Rb^{F19/F19}*, cells cultured in low calcium.

Label-retaining cell analysis

Ten-day-old pups were injected with BrdU (20 μ l of a 12.5 mg/ml dilution in NaCl 0.9%) every 12 hours for a total of four injections. Skin sections were collected at 30 and 75 days after the last injection, and BrdU incorporation was measured as percentage of hair follicles

containing positive cells. Four different animals of $Rb^{F19/F19}$ and $Rb^{F19/F19};K14cre$ were used to count at least 100 follicles in each time point.

Dye penetration assay

The epidermal permeability barrier function was monitored as described previously (Hardman et al., 1998). Briefly, unfixed and freshly isolated new born mice were rinsed in PBS then immersed in 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β D-galactopyranoside (X-gal) reaction mix at pH 4.5 [100 mM NaPO₄, 1.3 mM MgCl₂, 3 mM K₃Fe(CN)₆, 3 mM K₄Fe(CN)₆ and 1 mg/ml X-gal] and incubated at room temperature overnight.

Results

Epithelial-specific inactivation of *Rb* leads to upregulation of p107

Mice with a conditional mutant *Rb* allele harboring *loxP* sequences surrounding exon 19 of the *Rb* gene (Fig. 1A) have been described (Marino et al., 2000; Vooijs et al., 2002a). The conditional deletion of exon 19 of *Rb* (Rb^{F19} ; Fig. 1A) results in a null allele ($Rb^{\Delta19}$) that phenocopies the embryonic lethality seen in *Rb*-knockout embryos and predisposes mice to tumor formation (Vooijs et al., 2002a; Vooijs et al., 2002b). To achieve epithelial specific inactivation of *Rb* we expressed Cre recombinase under the control of the keratin 14 promoter (Jonkers et al., 2001), which is normally expressed in basal cells of stratified epithelia (Byrne et al., 1994). To assess the cell type-specific recombination imposed by *K14cre* we crossed *K14cre* mice with *Rosa26* reporter (*R26R*) mice to obtain double transgenic *K14cre:R26R* animals (Soriano, 1999). X-gal staining demonstrated Cre activity throughout the follicular and interfollicular epidermis, and the epithelial linings of the tongue, palate, stomach, esophagus and thymic medullar epithelial cells (Fig. 1B-E, data not shown). The expression pattern of *K14cre* resembles the normal expression pattern of K14 (Byrne et al., 1994; Jonkers et al., 2001). No staining was observed in tissues that do not express K14 (data not shown).

To achieve epithelial-specific deletion and inactivation of *Rb*, we mated $Rb^{F19/F19}$ mice with *K14cre* transgenic mice. Cre-mediated *Rb* deletion in the offspring was readily detectable by PCR analyses on tail tip DNA and was only seen in *K14cre* transgenic mice (Fig. 1F).

To determine whether *K14cre* expression in the skin of $Rb^{F19/F19}$ mice resulted in pRb loss, we analyzed total cell

lysates from primary keratinocytes derived from neonate skin by immunoblotting (Fig. 1H). Whereas keratinocytes derived from $Rb^{F19/F19}$ mice expressed normal levels of pRb,

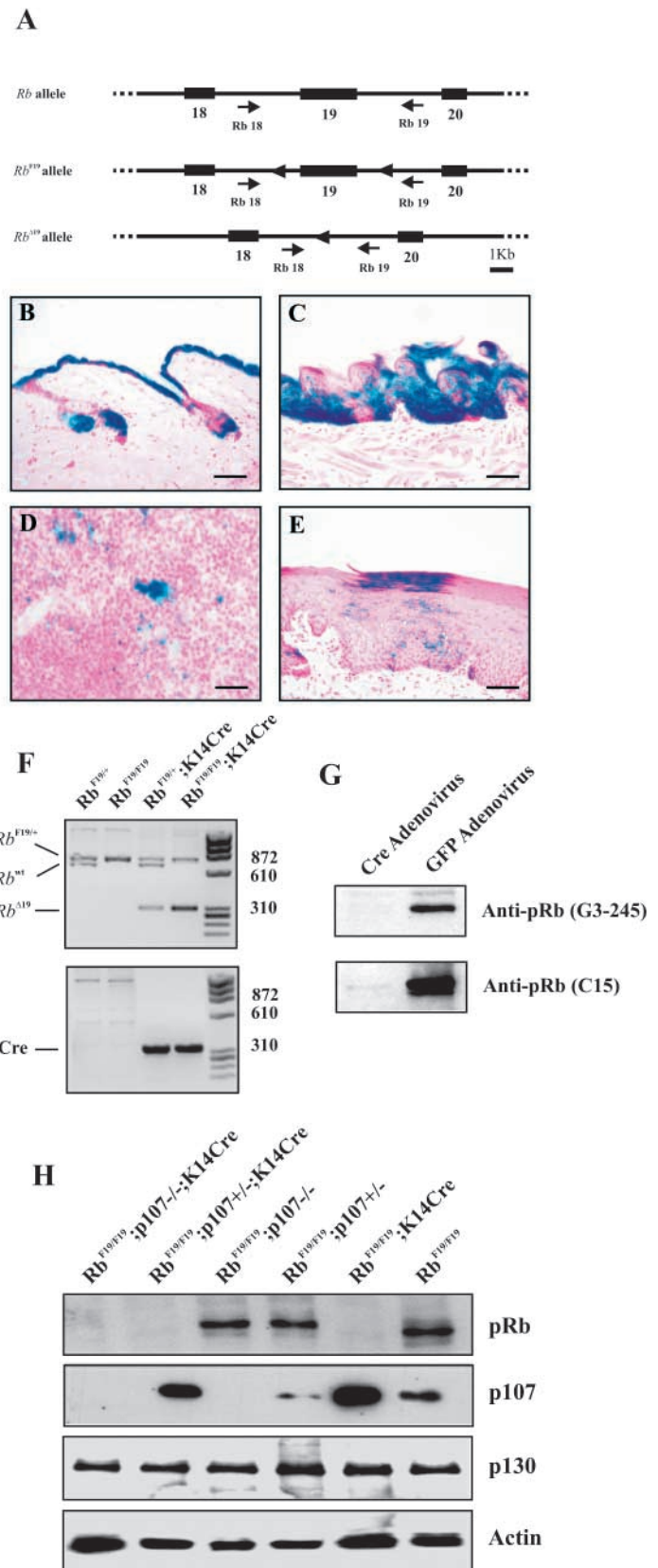
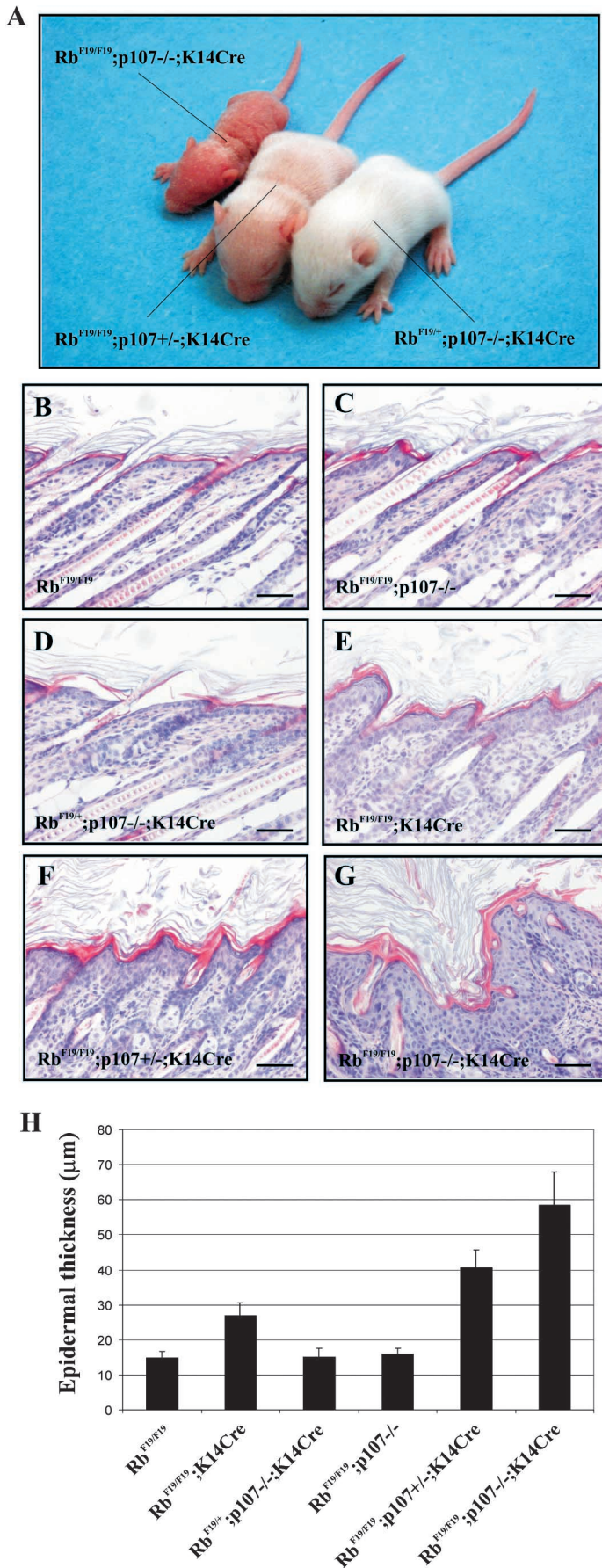


Fig. 1. Keratinocyte-specific Cre expression leads to pRb ablation in vivo. (A) Schematic representation of the wild-type, the floxed (F19) and the inactivated *Rb* allele ($\Delta 19$). Exons are indicated as numbered boxes and *loxP* sites as triangles. Rb18 and Rb19 indicate the primers used to characterize the different *Rb* alleles. (B-E) β -Galactosidase staining (blue) identifies Cre activity in X-Gal stained tissue sections from epidermis (B), tongue (C), thymic epithelium (D) and hard palate (E). (F) Cre-mediated recombination detected by PCR analysis on tails of $Rb^{F19/F19};K14cre$ mice. (G) Immunoblot analysis for pRb in $Rb^{F19/F19}$ keratinocytes 48 hours post-infection with Ad-GFP or Cre-coding adenovirus. (H) Immunoblot analysis for pRb family members on primary keratinocytes derived from newborn mice with the indicated genotypes. Scale bars: xxxxxxxxxxxx.



$Rb^{F19/F19};K14cre$, keratinocytes showed complete loss of pRb (Fig. 1H). To substantiate this observation, we isolated $Rb^{F19/F19}$ keratinocytes and infected them with adenoviruses encoding Cre or GFP (Akagi et al., 1997). Lysates from Cre- but not GFP-infected $Rb^{F19/F19}$ cells showed complete absence of pRb protein within 48 hours of infection (Fig. 1G). Antibodies recognizing either the C- or the N-terminal of pRb failed to detect any protein, indicating that the pRb $^{\Delta 19}$ protein or mRNA is very unstable in cultured cells. We did not detect any Cre-mediated deletion in parallel cultured dermal fibroblasts of $Rb^{F19/F19};K14cre$ mice (not shown), consistent with the absence of dermal staining in $K14cre:R26R$ mice.

Lysates from Rb deficient keratinocytes showed a strong increase in p107 levels (Fig. 1H), similar to that seen pRb-null fibroblasts (Dannenberg et al., 2000; Hurford et al., 1997; Sage et al., 2003). By contrast, in p107-null keratinocytes, we detected no increase in pRb protein levels (Fig. 1H). The upregulation of p107 in pRb-deficient keratinocytes suggested that p107 might functionally compensate for Rb loss. To address this aspect, we generated $Rb^{F19/F19};K14cre$ mice lacking one or both alleles of $p107$ (i.e. $p107^{+/-}$ and $p107^{-/-}$). As expected, neither pRb nor p107 protein could be detected in $Rb^{F19/F19};p107^{-/-};K14cre$ keratinocytes. We observed no changes in p130 expression among the different genotypes.

Phenotypic consequences of Rb and/or $p107$ loss in the skin

$Rb^{F19/F19};K14cre$ mice were born at the expected Mendelian ratio and were indistinguishable from $Rb^{F19/+}$ littermates in terms of external appearance until postnatal day 8 (P8), when $Rb^{F19/F19};K14cre$ start showing a slight reduction in pelage hair and scaling (data not shown). $Rb^{F19/F19};K14cre$ and $K14cre$ mice showed no detectable pathology, and served as controls (see below). This indicates that, in our experimental settings, the forced expression of Cre by itself does not contribute to any detectable phenotype (Loonstra et al., 2001).

The external appearance of the $Rb^{F19/F19};K14cre$ mice was aggravated with concurrent loss of one or both $p107$ alleles. Specifically, $Rb^{F19/F19};p107^{+/-};K14cre$ mice showed a clear reduction in pelage hair and started developing an obvious scaling, whereas $Rb^{F19/F19};p107^{-/-};K14cre$ showed essentially no hair, severe growth retardation and died between postnatal day 8 (P8) and P11 of an unknown cause (Fig. 2A). Importantly, whereas $Rb^{F19/F19};K14cre$ mice showed a $p107$ copy-number dependent aggravation of the

Fig. 2. Consequences of epidermal Rb ablation in vivo.

(A) External appearance of P8 mice with epidermal-specific Rb loss. (B-G) Haematoxylin-Eosin (H/E) stained skin sections from $Rb^{F19/F19}$ (B), $Rb^{F19/F19};p107^{-/-}$ (C), $Rb^{F19+/-};p107^{-/-};K14cre$ (D), $Rb^{F19/F19};K14cre$ (E), $Rb^{F19+/-};p107^{+/-};K14cre$ (F) and $Rb^{F19+/-};p107^{-/-};K14cre$ (G) mice at P8. There are no alterations in mice bearing one functional copy of Rb and the hyperplasia and hyperkeratosis promoted by epidermal pRb loss is evident, which becomes more progressive with the concomitant loss of p107. (H) Quantitative analysis of epidermal hyperplasia measured by epidermal thickness (in μm) taken from three different aged-matched mice of each genotype counting 2-4 sections in each (mean \pm s.d.). Scale bars: xxxxxxxxxxxx

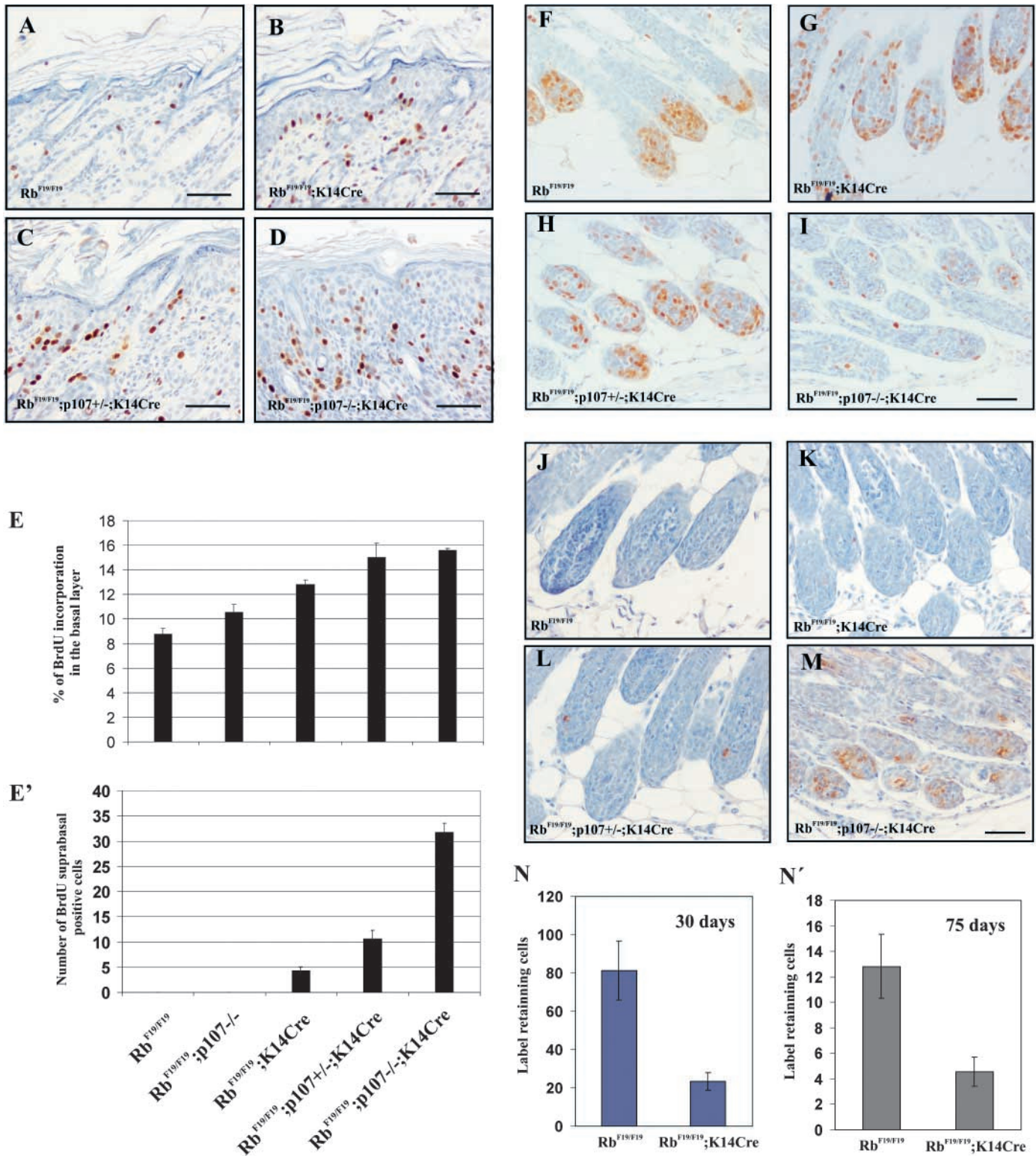


Fig. 3. Proliferation defects in epidermal *Rb*-deficient mice. (A-D) Representative sections showing BrdU incorporation in the epidermis of $Rb^{F19/F19}$ (A), $Rb^{F19/F19};K14Cre$ (B), $Rb^{F19/F19};p107^{+/-};K14Cre$ (C) and $Rb^{F19/F19};p107^{-/-};K14Cre$ (D). (E-E') Quantitative analysis of the percentage of BrdU-positive nuclei per mm of epidermis in the basal layer (E) and number of BrdU-positive nuclei per mm in suprabasal layer (E') of mice with the indicated genotypes. Three 10-day-old mice of each genotype were analyzed, scoring 2-4 sections in each (mean \pm s.d.). (F-I) Representative sections showing BrdU incorporation in hair follicles of 10 days old mice of each genotype. (J-M) Apoptosis detection (TUNEL) in hair follicles of 10-day-old mice of each genotype. Scale bars: 100 μ m. (N,N') Label-retaining population at 30 (N) and 75 (N') days after BrdU labeling in mice of the quoted genotypes. Data in N and N' come from the study of five different mice analyzing 2-4 independent sections from each animal (mean \pm s.d.)

external phenotype, a single wild-type *Rb* allele in *Rb^{F19/+};p107^{-/-};K14^{cre}* mice was sufficient to suppress this phenotype as these animals appear healthy, fertile and indistinguishable from wild type (Fig. 2A).

Histological examination of dorsal skin sections from *Rb^{F19/F19};K14^{cre}* at P10 revealed a thickened epidermis characterized by mild hyperplasia, hyperkeratosis and increased cellularity in the dermis (Fig. 2E). The progressive loss of one or both copies of *p107* (Fig. 2F,G) aggravated this phenotype in a copy-number-dependent manner. This was further substantiated in a quantitative manner by measuring epidermal thickness of dorsal skin in mice of the different genotypes (Fig. 2H). *Rb^{F19/F19}*, *Rb^{F19/F19};p107^{-/-}* and *Rb^{F19/+};p107^{-/-};K14^{cre}* skins are indistinguishable from those of wild-type animals and were used as controls throughout these studies (Fig. 2B-D, respectively).

No obvious histological abnormalities were observed in tongue, palate, stomach or esophagus from *Rb^{F19/F19};K14^{cre}* and *Rb^{F19/F19};p107^{+/-};K14^{cre}* adult animals; hence, we focused our analysis on the skin.

Proliferation defects in pRb-deficient skin

The increase in epidermal thickness and the hyperkeratosis suggest a defect in the regulation of proliferation and/or differentiation. To address this, we monitored BrdU incorporation at P10 in the basal layer of control mice, and *Rb^{F19/F19};K14^{cre}*, *Rb^{F19/F19};p107^{+/-};K14^{cre}* and *Rb^{F19/F19};p107^{-/-};K14^{cre}* littermates (Fig. 3A-D). We observed a progressive increase in BrdU incorporation in the basal layer of *Rb^{F19/F19}*, *Rb^{F19/F19};p107^{-/-}*, *Rb^{F19/F19};K14^{cre}* and *Rb^{F19/F19};p107^{+/-};K14^{cre}* (Fig. 3E). Remarkably, we found no significant increase in BrdU incorporation between *Rb^{F19/F19};p107^{+/-};K14^{cre}* (15.0 ± 1.1) and *Rb^{F19/F19};p107^{-/-};K14^{cre}* (15.6 ± 0.2) (Fig. 3E). This was unexpected because the epidermal thickness significantly differed between these genotypes (Fig. 2H). A possible explanation for this observation could be the continued proliferation of pRb/p107-deficient suprabasal cells that normally arrest and undergo terminal differentiation (Fig. 3D). To test this hypothesis, we also determined the number of BrdU-positive suprabasal cells in each genotype. A significant increase in the number of proliferating cells dependent on the number of *p107* alleles was observed (Fig. 3E'). These results suggest that *p107*, in a dose-dependent manner, plays a crucial role in regulating the cell cycle exit in the absence of *Rb* in vivo but only plays a modest role in controlling basal cell proliferation in wild-type cells.

Rb-loss leads to apoptosis in the lens, central nervous system (CNS) and peripheral nervous system (PNS) (Clarke et al., 1992; Jacks et al., 1992; Lee et al., 1992). However, specific deletion of *Rb* by Cre/loxP technology revealed that apoptosis is not in all instances a cell-autonomous feature (Ferguson et al., 2002; MacPherson et al., 2003; de Bruin et al., 2003). Therefore, we analyzed whether loss of pRb in the epidermis leads to apoptosis. Whereas in the interfollicular epidermis the absence of pRb or pRb/p107 did not result in increased apoptosis (data not shown) we observed massive apoptosis in the hair follicles of *Rb^{F19/F19};p107^{-/-};K14^{cre}* mice (Fig. 3J-M) with a concomitant reduction in BrdU incorporation (Fig. 3F-I). These alterations were not observed in any of the other genotypes (Fig. 3F-M) and probably account for the absence of hair pelage in these animals.

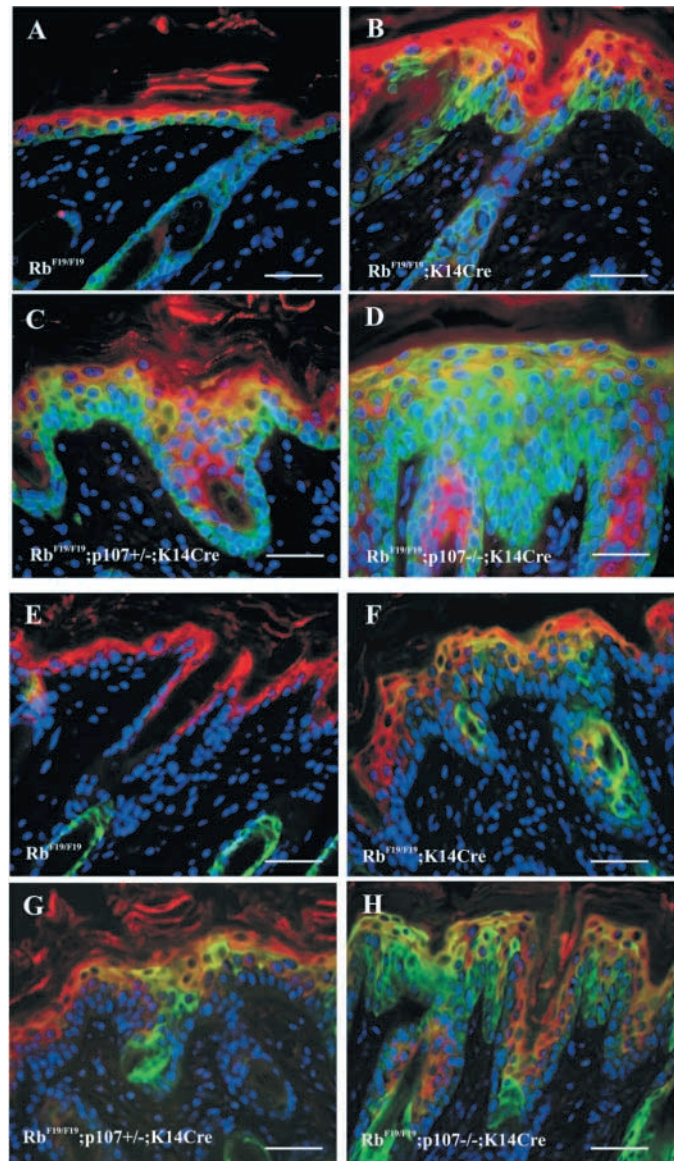


Fig. 4. Altered epidermal differentiation in *Rb*-deficient skin. (A-D) Double-immunofluorescence on P10 skin sections showing K5 (green) and K10 (red) or (E-H) K6 (green) and K10 (red) of *Rb^{F19/F19}* (A,E), *Rb^{F19/F19};K14^{cre}* (B,F), *Rb^{F19/F19};p107^{+/-};K14^{cre}* (C,G) and *Rb^{F19/F19};p107^{-/-};K14^{cre}* (D,H). Yellow staining indicates co-expression. DAPI (blue) was used to stain nuclei. Scale bars: 50 μ m.

Alterations in epidermal stem cells in the absence of pRb

The transiently amplifying cells ensure the continuous cell renewal required in the epidermis as cells are shed from the surface. One prediction that stems from this is that increased cellular turnover caused by pRb loss would gradually deplete these progenitors as well as the epidermal stem cell compartment. Therefore, we determined whether the epidermal stem cell compartment was affected by pRb loss by using a label-retaining technique (Cotsarelis et al., 1990; Taylor et al., 2000). In *Rb*-deficient skin, we found a consistent reduction in the number of labeled cells after 30 (Fig. 3N) and 75 days (Fig. 3N') post BrdU administration, compared with control

littermates. This could indicate a reduction in stem cell number as a consequence of pRb loss.

Differentiation defects in pRb-deficient skin

The abnormal proliferation of suprabasal cells in the skin of *Rb*^{F19/F19};*K14cre* prompted us to investigate whether there was any defect in differentiation. In normal epidermis, expression of keratin K5 is restricted to the basal layer, whereas expression of keratin K10 is found in the non-proliferative differentiated suprabasal layers (Fuchs and Green, 1980). Their expression patterns rarely overlap in normal mice (Fig. 4A). By contrast, in the *Rb*^{F19/F19};*K14cre* epidermis both the K5- and the K10-expressing cell layers are expanded, and cells co-expressing both K5 and K10 are regularly observed (Fig. 4B). This aberrant expression pattern is dramatically enhanced in *Rb*^{F19/F19};*p107*^{+/-};*K14cre* and *Rb*^{F19/F19};*p107*^{-/-};*K14cre* epidermis, respectively (Fig. 4C,D), where the K5-expressing cell layer was considerably expanded and few cells could be found that exclusively expressed K10 in the suprabasal layers. Importantly, most suprabasal cells co-expressed K10 and K5 and co-expression of these markers became more prominent with a reduction in p107 (compare Fig. 4B with D).

In epidermal hyperplasia, loss or downregulation of K10 is accompanied by the induction of keratin K6, a keratin normally expressed in hair follicles but not in the interfollicular epidermis (Takahashi et al., 1998; Weiss et al., 1984). We found that in *Rb*^{F19/F19};*K14cre* mice, patches of cells showed overlap of K6 and K10 expression throughout the hyperplastic epidermis (Fig. 4F). In *Rb*^{F19/F19};*p107*^{+/-};*K14cre* and *Rb*^{F19/F19};*p107*^{-/-};*K14cre* mice, there was a profound increase in ectopic K6 expression throughout the suprabasal layers accompanied by a decrease in K10-positive cells (Fig. 4G,H, respectively). By contrast, the expression of filaggrin and loricrin, two markers of terminal differentiation were comparable with wild-type mice (data not shown). Thus, despite the inappropriate proliferation and differentiation, pRb/p107-deficient keratinocytes appear to undergo some sort of terminal differentiation. We also examined whether the epidermal barrier was still intact in absence of *Rb* and or p107 using a dye penetration assay (Hardman et al., 1998). We found that dye penetration was similar between pRb/p107-deficient

and wild-type epidermis, indicating that the observed defect in differentiation does not lead to an impairment of skin barrier.

Differentiating epidermal *Rb*-deficient cells are ectopically dividing

The differentiation program in the epidermis takes place as the committed cells in the basal proliferative compartment arrest proliferation and move upwards towards the epidermal surface.

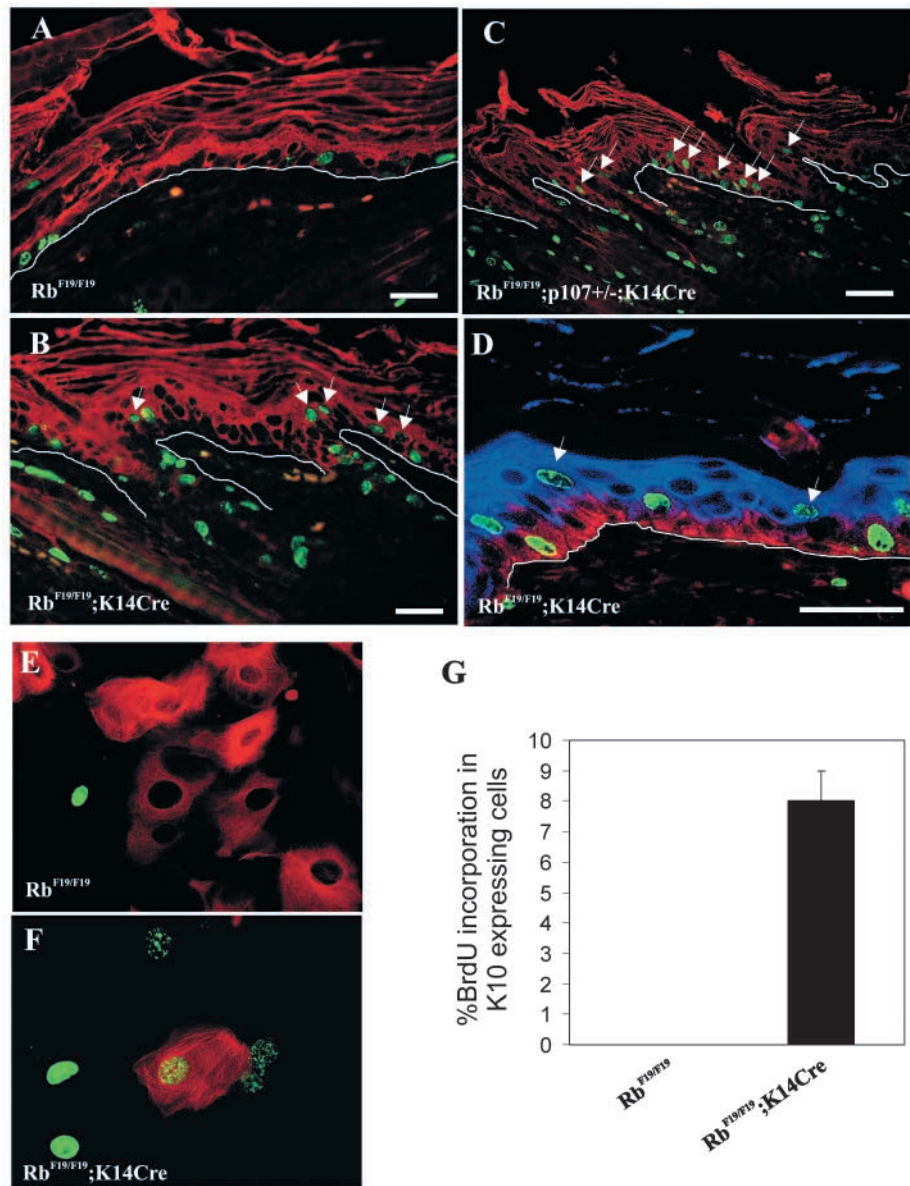


Fig. 5. Ectopic proliferation of differentiated *Rb*-deficient keratinocytes. (A-C,E,F) Double immunofluorescence against BrdU (green) and K10 (red) in the epidermis of adult *Rb*^{F19/F19} (A), *Rb*^{F19/F19};*K14cre* (B) and *Rb*^{F19/F19};*p107*^{+/-};*K14cre* mice (C); and in *Rb*^{F19/F19} (E) *Rb*^{F19/F19};*K14cre* (F) primary keratinocytes upon 24 hours of Ca²⁺-induced differentiation. Arrows indicate BrdU incorporation in K10-expressing cells. (D) Triple immunofluorescence against K5 (red), K10 (blue) and BrdU (green) showing BrdU incorporation in cells expressing K10, but not K5 (arrows). (G) Summary of the BrdU incorporation in K10-positive primary keratinocytes of the indicated genotypes. Data are from the analysis of three independent experiments scoring at least 500 cells. White lines in A-C indicate the dermal epidermal junction. Scale bars: 50 μ m.

This differentiation is accompanied by changes in keratin expression. Therefore, we monitored BrdU incorporation in K10-expressing cells, the earliest marker of differentiation that appears *in vivo* or *in vitro*, when primary keratinocytes were induced to differentiate by calcium (see below). We found that *in vivo* as well as in cultured keratinocytes, *Rb*-deficient K10-expressing cells continued to proliferate (indicated by arrows in Fig. 5B,D,F,G) a phenomena infrequently seen in wild type keratinocytes (Fig. 5A,E,G). Because we found that in pRb-deficient skin both proliferation and differentiation of epidermal cells was affected (see also below), we investigated

whether dividing suprabasal K10+ cells had lost some of their basal characteristics (i.e. loss of K5 expression), as would be expected from a normal differentiating cell or whether: (1) pRb-deficient K5+ basal cells continued to divide and inappropriately turned on K10 expression; or (2) pRb-deficient basal cells had failed to turn off K5+ expression when becoming K10+. Using triple immunofluorescence staining against K5, K10 and BrdU, we found BrdU incorporation in some K10+, K5- cells (arrows in Fig. 5D). This indicates that proliferation and differentiation are uncoupled processes in pRb-deficient skin.

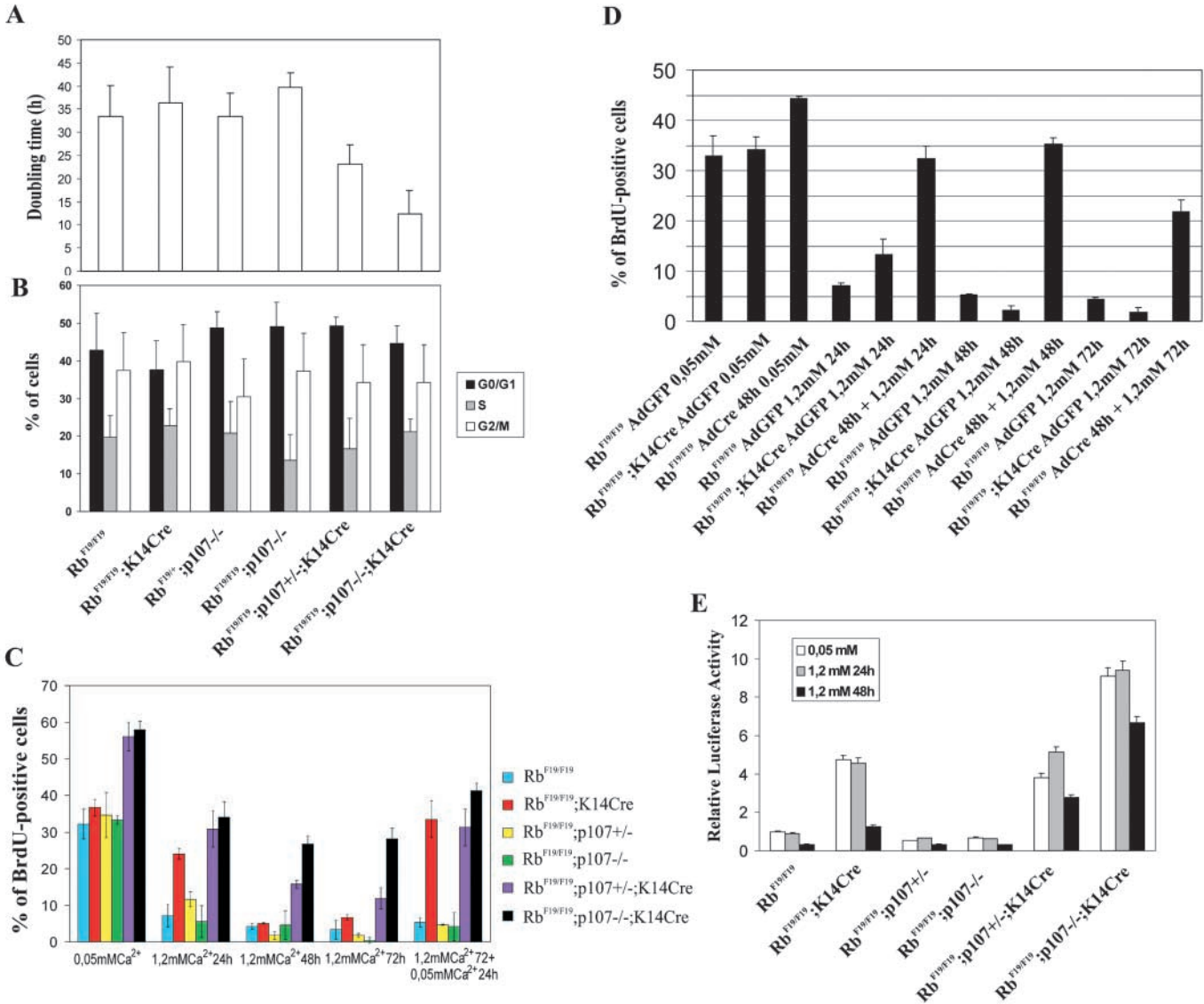


Fig. 6. Consequences of pRb and p107 loss in primary keratinocytes. (A) Doubling times of cultured primary keratinocytes showing a reduction in $Rb^{F19/F19};p107+/-;K14cre$ and $Rb^{F19/F19};p107-/-;K14cre$ with respect to wild-type and pRb-deficient cells. (B) FACS analysis of cell cycle profiles of asynchronous growing keratinocytes showing no significant differences among the different genotypes. Data are from the analysis of four independent experiments. In B, at least 10^5 cells were scored on each experiment (mean \pm s.d.). (C) Percentage of BrdU incorporation in keratinocytes growing under low (0.05 mM) and high (1.2 mM) Ca^{2+} medium for the indicated times and re-stimulated with low Ca^{2+} medium. (D) Percentage of BrdU incorporation in primary keratinocytes of the indicated genotypes after adeno cre or adeno GFP infection and **before culture** under the conditions indicated. Data come from the analysis of three independent experiments scoring at least 1000 cells on each condition (mean \pm s.d.). (E) Luciferase reporter activity of E2F of primary keratinocytes of the indicated genotypes cultured in low Ca^{2+} or upon Ca^{2+} -induced differentiation for 24 and 48 hours. Transfections were performed in triplicate, and the mean and standard error were calculated for each condition. Two independent transfection experiments were performed and luciferase activity was normalized to the values obtained with control, $Rb^{F19/F19}$, cells in low Ca^{2+} .

pRb/p107-deficient keratinocytes exhibit increased proliferation

To further characterize the defects observed in vivo we monitored the proliferation of primary keratinocytes derived from these mice. We found a moderate decrease in the doubling time of *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{+/-}; *K14cre* keratinocytes in comparison with the other genotypes (Fig. 6A) which became more pronounced with concurrent loss of p107. To investigate if this defect was due to alterations in any specific cell cycle phase, we performed flow cytometric analysis on asynchronous cultures. We did not find any significant alteration in G1, S or G2/M phases of the cell cycle in the absence of pRb and/or p107 (Fig. 6B). Moreover, we did not detect any change in a sub-G1 fraction indicative of apoptosis. This indicates that the increase in growth rate in pRb/p107-deficient keratinocytes might be due to an overall shortening of the cell cycle rather than an accelerated entry into S phase.

Rb-deficient keratinocytes cannot maintain a differentiation-associated permanent growth arrest

The aberrant proliferation in the suprabasal layers of pRb-deficient epidermis, and the BrdU incorporation observed in K10-expressing cells in vitro, prompted us to investigate whether pRb-deficient keratinocytes still respond to stimuli that induce growth arrest. Cultured mouse keratinocytes respond to increases in Ca²⁺ concentration in the medium (from 0.05 mM to 1.2 mM) by cell cycle arrest and expression of terminal differentiation markers (Hennings et al., 1980). We observed that *Rb*-deficient keratinocytes underwent a growth arrest similar to that observed in *Rb*^{F19/F19} keratinocytes, albeit with a 24 hour delay in their response (Fig. 6C). On the contrary, a high fraction of the pRb;p107-null keratinocytes remained refractory to the Ca²⁺-induced growth arrest over a period of 72 hours. Importantly, a single wild-type *p107* allele in pRb-deficient keratinocytes was sufficient to suppress the growth rate of *Rb*-deficient keratinocytes within 72 hours.

To address if the Ca²⁺-induced growth arrest reflected a permanent arrest characteristic of postmitotic terminally differentiated keratinocytes in vivo, wild-type and pRb-deficient keratinocytes treated for 72 hours in high Ca²⁺, were re-stimulated by low Ca²⁺ medium (0.05 mM) for 24 hours and assayed for BrdU incorporation. As expected, wild-type keratinocytes did not incorporate BrdU, demonstrating that Ca²⁺-induced differentiation is associated with a permanent cell cycle withdrawal. By contrast, pRb-deficient keratinocytes could completely overcome this growth arrest and be stimulated to divide to a similar extent as exponentially growing cells within 24 hours after removing Ca²⁺ (Fig. 6C). In *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{+/-}; *K14cre* keratinocytes, removal of Ca²⁺ resulted in a threefold increase in the growth fraction; however, only a moderate increase in BrdU incorporation was seen in *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}; *K14cre* keratinocytes.

It has been demonstrated that acute, but not permanent, loss of pRb in mouse embryo fibroblasts is sufficient to trigger cell cycle re-entry in cells grown under conditions which induce senescence or quiescence (Sage et al., 2003). To study if similar events take place during Ca²⁺-induced differentiation, we infected *Rb*^{F19/F19} keratinocytes with cre-encoding adenovirus. Cre recombinase expression leads to a complete reduction in pRb protein levels within 48 hours after infection (Fig. 1G). Interestingly, in these cells we could not detect any

compensatory increase in p107 or p130 levels, as was seen in primary keratinocytes with constitutive pRb loss (data not shown). A modest increase in BrdU incorporation was observed by comparing *Rb*^{F19/F19} keratinocytes 48 hours after Ad-cre infection with Ad-GFP infected *Rb*^{F19/F19} or *Rb*^{F19/F19}; *K14cre* primary keratinocytes (Fig. 6D). As demonstrated above, *Rb*^{F19/F19} and *Rb*^{F19/F19}; *K14cre* keratinocytes underwent a similar cell cycle arrest upon Ca²⁺-induced differentiation. By contrast, Ad-cre-infected *Rb*^{F19/F19} keratinocytes were completely refractory to a calcium induced arrest within 48 or 72 hours. These results demonstrate that, similar to senescent or quiescent embryo fibroblasts (Sage et al., 2003), a substantial functional compensation by p107 is not immediately installed after acute loss of pRB.

E2F activity is deregulated in Rb-deficient keratinocytes

During proliferation, growth arrest and differentiation, the activity of the E2F family of transcription factors is inhibited by interactions with pRb family members (Lipinski and Jacks, 1999). Because *Rb*-deficient keratinocytes were impaired in both the initiation and maintenance of a Ca²⁺-induced growth arrest, we investigated whether these defects were a consequence of deregulated E2F function. We measured E2F function in keratinocytes by transfection of an E2F-Luciferase reporter construct in wild type and pRb-deficient keratinocytes. In *Rb*^{F19/F19}; *K14cre* keratinocytes E2F activity was increased fivefold over controls and even further increased in cells lacking both pRb and p107 (Fig. 6E). Upon Ca²⁺ treatment, E2F activity is downregulated to wild-type levels in *Rb*-null keratinocytes closely following to the kinetics of growth arrest in these cells (Fig. 6C). However, in *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{+/-}; *K14cre* and *Rb*^{F19/F19}; *p107*^{-/-}; *K14cre* keratinocytes E2F activity remained high up to 48 hours after the addition of Ca²⁺ in accordance with their reduced sensitivity to Ca²⁺-induced differentiation (Fig. 6D,E).

Discussion

Germline inactivation of *Rb* in mice leads to mid-gestational lethality that precludes the analysis of pRb deficiency at later stages of development and in the adult animal. The use of conditional knockout approaches based on the *Cre/loxP* technology may help to circumvent this problem in vivo. We and others have validated this approach in a variety of tissues in vivo (Marino et al., 2000; Vooijs et al., 2002b; Ferguson et al., 2002; MacPherson et al., 2003). While this work was in review, others have also reported conditional inactivation of *Rb* in the epidermis (Balsitis et al., 2003). In this model, the *Rb*-deficiency phenotype was further aggravated by co-expression of the HPV E7 protein, suggesting that pRb inactivation in K14-E7 transgenics was not complete and that other targets of E7 probably inactivation of p107 and/or p130 are involved (Balsitis et al., 2003). By analyzing the single and combined effects of skin-specific deletion of *Rb* and *p107*, we were able to further dissect the role of pRb family members in the epidermis. We found that *Rb* loss in the epidermis leads to hyperplasia and hyperkeratosis (Fig. 2) associated with defects in proliferation and differentiation (Figs 3,4). Whereas the increased proliferation in the interfollicular epidermis leads to hyperplasia and inappropriate differentiation, loss of pRb in

conjunction with p107 in the hair follicles leads to profound apoptosis. This probably explains the hair loss seen in aged mice with *K14cre* induced *Rb* loss. Furthermore, apoptosis was enhanced in hair follicles lacking both *Rb* and p107. Transplantation of *Rb/p107*-deficient skins onto *nude* mice led to a further aggravation of the hyperplasia but no hair formed (data not shown). It has recently been demonstrated that the apoptosis seen in the CNS of pRb mutant embryos is non-cell autonomous (de Bruin et al., 2003). By contrast, our analysis shows that the apoptosis caused by loss of pRb in the hair follicles is cell autonomous. These results indicate remarkable differences in the consequences of pRb family loss in two closely related cell types: follicular and interfollicular keratinocytes.

Similar to pRb-deficient fibroblasts (Dannenberg et al., 2000; Hurford et al., 1997; Sage et al., 2003), we detected increased p107 levels in pRb-null keratinocytes, probably because of the release of transcriptional repression of *p107* by pRb/E2F complexes (Zhu et al., 1995). This suggests that the increase in p107 protein levels could be a mechanism to compensate for loss of pRb function. We tested this possibility, and found that concurrent loss of *p107* in a *Rb*-null epidermis aggravated the 'pRb-deficiency' phenotype (Figs 2, 3). Moreover, compensation by p107 occurs in a dose-dependent manner indicating that p107 levels are limiting in *Rb*-deficient cells. It has been demonstrated that E2F transcription factors that normally bind pRb (i.e. E2F1, E2F2, E2F3) may bind p107 in *Rb*-deficient cells (Lee et al., 2002). Our results support this observation and further indicate that functional compensation in *Rb*-deficient keratinocytes by p107 crucially depends on the absolute levels of p107 protein.

It is noteworthy to mention that one functional copy of *Rb* is sufficient to rescue defects associated with p107 deficiency, as *Rb^{F19/+};p107^{-/-};K14cre* keratinocytes behave normally in vitro and in vivo. This may be, in part, explained by the presence of functional p130 that could compensate for both pRb and p107 loss. This is in line with our recent finding that p107 and p130 perform crucial overlapping functions in the epidermis in vivo (Ruiz et al., 2003). The generation of mice lacking all pocket proteins in the epidermis will be needed to define the capacity of each of these family members to substitute for the others.

In the epidermis, the proliferative basal layer and differentiating suprabasal layers are spatially separated and terminal cell cycle arrest precedes the onset of differentiation. Our results indicate that, in the absence of *Rb*, differentiation and proliferation are uncoupled processes in vivo, since pRb-deficient cells actively proliferate while initiating the expression of differentiation markers (Fig. 5, Fig. 6C, D). Similarly, the analysis of pRb-deficiency in telencephalon also revealed that mitotic arrest is not required to initiate neural differentiation (Ferguson et al., 2002).

Epidermal homeostasis requires continuous self-renewal of keratinocytes by transit amplifying cells that are derived from stem cells. Most adult stem cells divide infrequently and give rise to committed progenitors. This feature permits the quantitation of stem cell niches by identification of label-retaining cells (Cotsarelis et al., 1990). Using this technique, we found a decrease in the label retaining cell population in *Rb^{F19/F19};K14cre* compared with wild-type mice. This might either indicate a depletion of epidermal stem cells or an

increased rate of cell division of epidermal stem cells in the absence of pRb, similar to that seen in basal layer keratinocytes. Currently we cannot distinguish between these possibilities.

Although epidermal differentiation ensues in *Rb*-deficient skin, it is highly perturbed, as demonstrated by the ectopic expression of K6, suprabasal expression of K5 and a reduction in the number of K10-expressing cells (Fig. 4). These defects became more pronounced in the absence of p107, which again indicates that p107 can partially compensate for *Rb*-loss in the epidermis. We detected no changes in the expression of terminal differentiation markers filaggrin or loricrin in pRb-deficient epidermis (data not shown). By contrast, in the epidermis of mice lacking p107 and p130 where the initial steps of differentiation are unaffected a clear defect in terminal differentiation is seen (Ruiz et al., 2003). These functional analyses fit nicely with the overlapping and unique expressing patterns and functions proposed for pRb family members in skin (Paramio et al., 1998).

Our results demonstrate a strong functional overlap between pRb and p107 genes in epidermis and illustrate a dose-dependent effect of p107 in vivo in the context of a pRb deficiency. In addition, these results illuminate functional differences between pRb and p107 in the ability to suppress epidermal hyperplasia and regulate differentiation. To date, we are not able to discriminate if proliferation or differentiation defects are due to the E2F release or to a failure in the active transcriptional repression mediated by pRb/E2F complexes. In addition interactions with transcription factors, different from E2F, might contribute to the resultant phenotype.

The mechanism whereby pRb family members directly or indirectly regulate the onset of differentiation is unknown at present. It is well established that *Rb* family members regulate the expression of differentiation markers through direct interaction with transcription factors, such as MyoD in muscle (Novitsch, 1996) and C/EBP β in lung fibroblasts (Chen, 1996). Interestingly, C/EBP β controls proliferation in keratinocytes and directly regulates the expression of K10 (Zhu, 1999; Maytin, 1999; Charles, 2001). However, we did not find any alterations in C/EBP β activity during differentiation of *Rb*-deficient keratinocytes compared with control cells (not shown), suggesting that this transcription factor is not deregulated in *Rb*-deficient keratinocytes.

Among the differentiation alterations observed in absence of pRb, the reduced expression of K10 (Fig. 4) might be of a particular relevance. Our recent work has demonstrated that this keratin may impose a cell cycle arrest in keratinocytes in a pRb-dependent manner (Paramio et al., 1999; Paramio et al., 2001a or b?; Santos et al., 2002). Here, we show that K10-expressing cells do not exhibit a proliferative arrest. Given that K10 induces a cell cycle arrest in vivo and suppresses tumor development (Santos et al., 2002), the possible loop between pRb and K10 merits further investigation.

The in vitro and in vivo analysis presented here support a dual role for pRb family members in keratinocyte differentiation. First, pRb is essential to initiate a growth arrest in response to differentiation signals. However, in the sustained absence of pRb, p107 is necessary and sufficient to initiate this proliferative arrest (Fig. 6C), probably owing to the increase in p107 levels that accompany permanent loss of pRb (Fig. 1H). Second, pRb is necessary and sufficient for the maintenance of

differentiation-induced postmitotic state in keratinocytes (Fig. 6C). A similar role for pRb and p107 in the maintenance of terminal differentiation of myocytes has also been reported (Schneider et al., 1994). It is currently not understood whether pRb has a unique role in maintaining terminal postmitotic state or whether p107 levels are simply not high enough to maintain a growth arrest. Sage and colleagues recently reported similar findings in fibroblasts with conditionally inactivated pRb (Sage et al., 2003). Maintenance of the quiescent state is essential for normal development and differentiation. Perturbations in this cellular control lead to inappropriate proliferation and expansion of cell compartments that are at increased risk of acquiring cancer prone mutations. These data may help to explain why *Rb*, but not *p107*, is predominantly found mutated in human tumors.

We express our gratitude to Hein te Riele and Ralph Meuwissen (Netherlands Cancer Institute, NKI) for providing *p107*-deficient and *K14cre* mice, respectively; Jesús Martínez and the personnel of the animal facility of CIEMAT and NKI for the excellent care of the animals; Pilar Hernández, Isabel de los Santos (CIEMAT) and John Zevenhoven (NKI) for the histological preparations; Loes Rijswijk (NKI) for help with skin grafting; and Dr X. Lu for the generous gift of E2F-luc plasmid. Dr Raphael Kopan (Washington University Saint Louis) is acknowledged for critically reading the manuscript. This work is partially supported by Grants SAF2002-01037 from MCYT and 08.1/0054/2001.1 from CAM to J.M.P. M.V. and A.B. are supported through a program grant from the Dutch Cancer Society (KWF).

References

- Akagi, K., Sandig, V., Vooijs, M., van der Valk, M., Giovannini, M., Strauss, M. and Berns, A. (1997). Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1766-1773.
- Alonso, L. and Fuchs, E. (2003). Stem cells of the skin epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **11**, 11.
- Arbeit, J. M., Munger, K., Howley, P. M. and Hanahan, D. (1994). Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J. Virol.* **68**, 4358-4368.
- Arnold, I. and Watt, F. M. (2001). c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Curr. Biol.* **11**, 558-568.
- Balsitis, S. J., Sage, J., Duensing, S., Munger, K., Jacks, T. and Lambert, P. F. (2003). Recapitulation of the effects of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene on mouse epithelium by somatic Rb deletion and detection of pRb-independent effects of E7 in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 9094-9103.
- 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.
- Byrne, C., Tainsky, M. and Fuchs, E. (1994). Programming gene expression in developing epidermis. *Development* **120**, 2369-2383.
- Ciarmatori, S., Scott, P. H., Sutcliffe, J. E., McLees, A., Alzuherri, H. M., Dannenberg, J. H., te Riele, H., Grummt, I., Voit, R. and White, R. J. (2001). Overlapping functions of the pRb family in the regulation of rRNA synthesis. *Mol. Cell Biol.* **21**, 5806-5814.
- Clarke, A. R., Maandag, E. R., van Roon, M., van der Lugt, N. M., van der Valk, M., Hooper, M. L., Berns, A. and te Riele, H. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* **359**, 328-330.
- Classon, M. and Harlow, E. (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 910-917.
- Cobrinik, D., Lee, M. H., Hannon, G., Mulligan, G., Bronson, R. T., Dyson, N., Harlow, E., Beach, D., Weinberg, R. A. and Jacks, T. (1996). Shared role of the pRb-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev.* **10**, 1633-1644.
- Cotsarelis, G., Sun, T. T. and Lavker, R. M. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* **61**, 1329-1337.
- Dannenberg, J. H., van Rossum, A., Schuijff, L. and te Riele, H. (2000). Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev.* **14**, 3051-3064.
- de Bruin, A., Wu, L., Saavedra, H. I., Wilson, P., Yang, Y., Rosol, T. J., Weinstein, M., Robinson, M. L. and Leone, G. (2003). Rb function in extraembryonic lineages suppresses apoptosis in the CNS of Rb-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6546-6551.
- Di Cunto, F., Topley, G., Calautti, E., Hsiao, J., Ong, L., Seth, P. K. and Dotto, G. P. (1998). Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science* **280**, 1069-1072.
- D'Souza, S. J., Pajak, A., Balazsi, K. and Dagnino, L. (2001). Ca²⁺ and BMP-6 signaling regulate E2F during epidermal keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **276**, 23531-23538.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12**, 2245-2262.
- Ferguson, K. L., Vanderluit, J. L., Hebert, J. M., McIntosh, W. C., Tibbo, E., MacLaurin, J. G., Park, D. S., Wallace, V. A., Vooijs, M., McConnell, S. K. et al. (2002). Telencephalon-specific Rb knockouts reveal enhanced neurogenesis, survival and abnormal cortical development. *EMBO J.* **21**, 3337-3346.
- Fuchs, E. and Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* **19**, 1033-1042.
- Fuchs, E., Merrill, B. J., Jamora, C. and DasGupta, R. (2001). At the roots of a never-ending cycle. *Dev. Cell* **1**, 13-25.
- Griep, A. E., Herber, R., Jeon, S., Lohse, J. K., Dubielzig, R. R. and Lambert, P. F. (1993). Tumorigenicity by human papillomavirus type 16 E6 and E7 in transgenic mice correlates with alterations in epithelial cell growth and differentiation. *J. Virol.* **67**, 1373-1384.
- Hardman, M. J., Sisi, P., Banbury, D. N. and Byrne, C. (1998). Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development* **125**, 1541-1552.
- Harper, J. W. and Elledge, S. J. (1996). Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 56-64.
- Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K. and Yuspa, S. H. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* **19**, 245-254.
- Herber, R., Liem, A., Pitot, H. and Lambert, P. F. (1996). Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J. Virol.* **70**, 1873-1881.
- Hurford, R. K., Jr, Cobrinik, D., Lee, M. H. and Dyson, N. (1997). pRb and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes. *Genes Dev.* **11**, 1447-1463.
- Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E. M., Bronson, R. T., Goodell, M. A. and Weinberg, R. A. (1992). Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* **359**, 295-300.
- Jonkers, J., Meuwissen, R., van der Gulden, H., Peterse, H., van der Valk, M. and Berns, A. (2001). Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat. Genet.* **29**, 418-425.
- Lee, E. Y., Chang, C. Y., Hu, N., Wang, Y. C., Lai, C. C., Herrup, K., Lee, W. H. and Bradley, A. (1992). Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and hematopoiesis. *Nature* **359**, 288-294.
- Lee, E. Y., Cam, H., Ziebold, U., Rayman, J. B., Lees, J. A. and Dynlacht, B. D. (2002). E2F4 loss suppresses tumorigenesis in Rb mutant mice. *Cancer Cell* **2**, 463-472.
- Lee, M. H., Williams, B. O., Mulligan, G., Mukai, S., Bronson, R. T., Dyson, N., Harlow, E. and Jacks, T. (1996). Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb. *Genes Dev.* **10**, 1621-1632.
- Lipinski, M. M. and Jacks, T. (1999). The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* **18**, 7873-7882.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A. and Jonkers, J. (2001). Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9209-9214.
- MacPherson, D., Sage, J., Crowley, D., Trumpp, A., Bronson, R. T. and Jacks, T. (2003). Conditional Mutation of Rb Causes Cell Cycle Defects without Apoptosis in the Central Nervous System. *Mol. Cell Biol.* **23**, 1044-1053.
- Marino, S., Vooijs, M., van Der Gulden, H., Jonkers, J. and Berns, A. (2000). Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic

- inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev.* **14**, 994-1004.
- Martinez, L. A., Chen, Y., Fischer, S. M. and Conti, C. J.** (1999). Coordinated changes in cell cycle machinery occur during keratinocyte terminal differentiation. *Oncogene* **18**, 397-406.
- Morris, R. J., Coulter, K., Tryson, K. and Steinberg, S. R.** (1997). Evidence that cutaneous carcinogen-initiated epithelial cells from mice are quiescent rather than actively cycling. *Cancer Res.* **57**, 3436-3443.
- 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.
- Paramio, J. M., Casanova, M. L., Segrelles, C., Mittnacht, S., Lane, E. B. and Jorcano, J. L.** (1999). Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol. Cell Biol.* **19**, 3086-3094.
- Paramio, J. M., Lain, S., Segrelles, C., Lane, E. B. and Jorcano, J. L.** (1998). Differential expression and functionally co-operative roles for the retinoblastoma family of proteins in epidermal differentiation. *Oncogene* **17**, 949-957.
- Paramio, J. M., Segrelles, C., Casanova, M. L. and Jorcano, J. L.** (2000). Opposite functions for E2F1 and E2F4 in human epidermal keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **275**, 41219-41226.
- Paramio, J. M., Segrelles, C., Ruiz, S. and Jorcano, J. L.** (2001a). Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKC ζ mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol. Cell Biol.* **21**, 7449-7459.
- Paramio, J. M., Segrelles, C., Ruiz, S., Martin-Caballero, J., Page, A., Martinez, J., Serrano, M. and Jorcano, J. L.** (2001b). The ink4a/arf tumor suppressors cooperate with p21cip1/waf in the processes of mouse epidermal differentiation, senescence, and carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 44203-44211.
- Riley, D. J., Nikitin, A. Y. and Lee, W. H.** (1996). Adenovirus-mediated retinoblastoma gene therapy suppresses spontaneous pituitary melanotroph tumors in Rb $^{+/-}$ mice. *Nat. Med.* **2**, 1316-321.
- Ruiz, S., Segrelles, C., Bravo, A., Santos, M., Perez, P., Leis, H., Jorcano, J. L. and Paramio, J. M.** (2003). Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130. *Development* **130**, 2341-2353.
- Sage, J., Miller, A. L., Perez-Mancera, P. A., Wysocki, J. M. and Jacks, T.** (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* **424**, 223-228.
- Sage, J., Mulligan, G. J., Attardi, L. D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E. and Jacks, T.** (2000). Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev.* **14**, 3037-3050.
- Santos, M., Paramio, J. M., Bravo, A., Ramirez, A. and Jorcano, J. L.** (2002). The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 19122-19130.
- Sauer, B. and Henderson, N.** (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5166-5170.
- Schneider, J. W., Gu, W., Zhu, L., Mahdavi, V. and Nadal-Ginard, B.** (1994). Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb $^{-/-}$ muscle cells. *Science* **264**, 1467-1471.
- Sherr, C. J. and McCormick, F.** (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**, 103-112.
- Soriano, P.** (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* **21**, 70-71.
- Takahashi, K., Yan, B., Yamanishi, K., Imamura, S. and Coulombe, P. A.** (1998). The two functional keratin 6 genes of mouse are differentially regulated and evolved independently from their human orthologs. *Genomics* **53**, 170-183.
- Taylor, G., Lehrer, M. S., Jensen, P. J., Sun, T. T. and Lavker, R. M.** (2000). Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* **102**, 451-461.
- Vooijs, M., Jonkers, J., Lyons, S. and Berns, A.** (2002a). Noninvasive imaging of spontaneous retinoblastoma pathway-dependent tumors in mice. *Cancer Res.* **62**, 1862-1867.
- Vooijs, M., te Riele, H., van der Valk, M. and Berns, A.** (2002b). Tumor formation in mice with somatic inactivation of the retinoblastoma gene in interphotoreceptor retinol binding protein-expressing cells. *Oncogene* **21**, 4635-4645.
- Waikel, R. L., Kawachi, Y., Waikel, P. A., Wang, X. J. and Roop, D. R.** (2001). Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nat. Genet.* **28**, 165-168.
- Watt, F. M.** (2001). Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 410-417.
- Weinberg, R. A.** (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
- Weiss, R. A., Eichner, R. and Sun, T. T.** (1984). Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *J. Cell Biol.* **98**, 1397-1406.
- Zhang, P., Wong, C., DePinho, R. A., Harper, J. W. and Elledge, S. J.** (1998). Cooperation between the Cdk inhibitors p27(KIP1) and p57(KIP2) in the control of tissue growth and development. *Genes Dev.* **12**, 3162-3167.
- Zhang, P., Wong, C., Liu, D., Finegold, M., Harper, J. W. and Elledge, S. J.** (1999). p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev.* **13**, 213-224.
- Zhu, L., Xie, E. and Chang, L. S.** (1995). Differential roles of two tandem E2F sites in repression of the human p107 promoter by retinoblastoma and p107 proteins. *Mol. Cell Biol.* **15**, 3552-3562.