

PAPEL DE INHIBIDORES DE LA QUINASA DE MITOSIS CDK1 EN LA DIFERENCIACIÓN EPIDERMÓIDE

**ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA**

IDIVAL

Instituto de Investigación Sanitaria de Valdecilla

TESIS DOCTORAL

Isabel de Pedro González

Director

Dr Alberto Gandarillas Solinís

Santander, Noviembre 2018

PAPEL DE INHIBIDORES DE LA QUINASA DE MITOSIS CDK1 EN LA DIFERENCIACIÓN EPIDERMÓIDE



ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

IDIVAL
Instituto de Investigación Sanitaria de Valdecilla

TESIS DOCTORAL

Isabel de Pedro González

Director

Dr Alberto Gandarillas Solinís

Santander, Noviembre 2018

PAPEL DE INHIBIDORES DE LA QUINASA DE MITOSIS CDK1 EN LA DIFERENCIACIÓN EPIDERMÓIDE

DIRECTOR

Alberto Gandarillas Solinís

**Tesis Doctoral presentada por Isabel de Pedro González para optar al
grado de Doctor por la Universidad de Cantabria**

Santander, Noviembre 2018

El Dr. Albero Gandarillas Solinís, investigador principal del grupo Ciclo Celular,
Células Madre y Cáncer del Instituto de Investigación Sanitaria de Valdecilla.

CERTIFICA:

Que la licenciada Isabel de Pedro González ha realizado bajo su dirección el
presente trabajo de Tesis Doctoral titulado:

“Papel de inhibidores de la quinasa de mitosis Cdk1 en la diferenciación
epidermoide”

Que considera que este trabajo reúne los requisitos de originalidad y calidad
científica necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado por el
interesado, al objeto de poder optar al grado de Doctor por la Universidad de
Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado.
Santander, Noviembre 2018.

Fdo. Alberto Gandarillas

Esta Tesis ha sido financiada con las siguientes ayudas:

El grupo de Ciclo celular, Células madre y Cáncer junto con el Instituto de Salud Carlos III-FIS/CIBER, con los proyectos PI14/09000) y PI11/02070.

A mis padres y hermanos.

*“A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar
sería mucho menos si le faltara una gota”*

Madre Teresa de Calcuta

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le doy las gracias al doctor Alberto Gandarillas por confiar en mí y darme la oportunidad de estar escribiendo esto hoy. Muchas gracias Alberto por recibirme en tu laboratorio y dejarme formar parte de este equipo. Te agradezco de verdad todo el tiempo que has invertido en enseñarme a pensar y empujarme a volar. Durante todo este tiempo, he aprendido algo más que de ciencia. Gracias por guiar mis pasos.

A mis compañeras de laboratorio. A Pilar Alonso, gracias por ayudarme en mis primeros pasos. A Laura Ceballos, gracias Lauri por toda la ayuda en este tiempo y por hacer fácil lo difícil. A Pilar Mollinedo, una más de nosotras. Gracias Pilar por venir siempre con una sonrisa. A Ana Freije, por lo profesional y por lo personal. Gracias Ana por guiarme por el bonito pero duro camino de la investigación, por enseñarme todo lo que sé y por la infinita paciencia. Las risas, las *psico-charlas* tan necesarias, los ratos de procrastinar y otros tantos momentos, quedan para la memoria de lo que ha sido un camino duro pero gracias a esto un poquito menos. A Rut Molinuevo, mi Ruti, gracias por ser tan tú siempre, por hacer los lunes menos lunes con tus historias y por la ayuda y el apoyo durante este tiempo. A Natalia Sanz, mi Nata. Gracias por llegar, como dijo Rut y por estar, siempre. Gracias por todos los buenos momentos, esos ratos de animalario, por esas conversaciones entre cabinas y por todo, amiga. Ana, Rut, Natalia, gracias chiquis, sólo por conoceros ha merecido la pena.

A mi familia, en especial a mis padres. Papá, Mamá, sois la base de todo y los responsables de que haya podido llegar hasta aquí. Necesitaría muchas páginas para poder agradeceros todo lo que habéis hecho y seguíis haciendo por mí. Gracias por todo el esfuerzo, por todo el empeño y por ser siempre una prioridad para vosotros. A mis hermanos Marcos y Pablo, gracias por los ánimos, el cariño y por mostrar que estáis un poquito orgullosos de mí. Os quiero infinito. A Luisa, tu tampoco podías faltar aquí, eres imprescindible ya lo sabes. A mis ti@s, prim@s y a mis abuelos, en especial a ti *güelito* Antonio, siempre pendiente de mis progresos. Me hubiese encantado que estuvieses aquí para verlo.

A mis amigas, mi pequeño *aquelarre*. Gracias chicas por cada palabra de ánimo y por celebrar conmigo cada paso dado. Carlotin, gracias porque tú te has llevado la peor parte, por ser y por estar, no hay palabras. Rous, tú también. Gracias a las dos por poner el hombro. A Lydia (Samuelín no me olvido de ti), Carla, Claudia, Esther, Leyre, suerte de teneros. Bea, Laura, Marta, gracias. A Belén, porque en la distancia siempre estás, gracias. A Nerea, por ponerle ritmo a este último año. A Leti, gracias por formar parte del camino. A Lu, por preocuparse siempre por mí, por esas sonrisas y por ser la persona más buena que he conocido este tiempo. Gracias.

A mis chic@s de escalada, por los pocos días de escalada pero los muchos de graciosa. Gracias por ponerle color a la semana, por los calis y por las risas. En esos momentos todo parecía mucho más fácil. Muchas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La piel	1
1.1.1 Funciones de la piel	1
1.1.2 Estructura de la piel	1
1.1.2.1 Hipodermis	2
1.1.2.2 Dermis	2
1.1.2.3 Epidermis	3
1.1.3 Diferenciación epidérmica	5
1.2 Cáncer de piel	7
1.2.1 Carcinoma basocelular (BCC)	8
1.2.2 Carcinoma escamoso (SCC)	8
1.2.3 Alteraciones carcinomas de piel	9
1.2.3.1 Genes implicados en los carcinomas de piel	9
1.3 Radiación ultravioleta y daño en el ADN	10
1.3.1 Tipos de radiaciones ultravioleta	10
1.3.2 Vías de activación en respuesta al DDR	11
1.3.3 Respuesta celular al daño generado en el ADN	12

1.4 Ciclo celular	13
1.4.1 Fases del ciclo celular	13
1.4.2 Control del ciclo celular	15
1.4.2.1 Componentes del sistema de control	15
1.4.2.2 Complejos Ciclina-Cdk en el ciclo celular	16
1.4.2.3 Otros mecanismos de control del ciclo celular	17
1.4.2.4 Puntos de control del ciclo celular	19
1.4.2.4.1 Punto de control de G1/S	20
1.4.2.4.2 Punto de control de la fase S	20
1.4.2.4.3 Punto de control de G2/M	21
1.4.2.4.4 Punto de control de la mitosis	23
1.4.3 Endorreplicación	23
1.4.4 Control Mitosis-Diferenciación (CMD)	26
1.4.5 Regulación de Cdk1.....	28
1.4.6 Papel de Wee1 en el ciclo celular.....	29
1.4.7 Papel de p21	31
1.4.7.1 Actividad p21 en el ciclo celular	31
1.4.7.2 Regulación de p21	33
1.4.7.3 Funciones de p21	34
1.4.7.3.1 Papel de p21 en apoptosis	34
1.4.7.3.2 Papel de p21 en senescencia	35
1.4.7.3.3 Papel de p21 en diferenciación	35
1.4.7.3.4 Papel de p21 en transcripción	36
1.4.7.4 Papel de p21 en cáncer	36
1.4.7.5 Papel de p21 en queratinocitos	37

2. OBJETIVOS	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS	45
3.1 Cultivos celulares	45
3.2 Líneas celulares	47
3.3 Construcciones lentivirales	47
3.4 Construcciones retrovirales	48
3.5 Radiación ultravioleta	48
3.6 Citometría de flujo	49
3.7 Ciclo celular	49
3.7.1 Contenido en ADN	47
3.7.2 Replicación del ADN	48
3.8 Expresión de proteínas	48
3.9 Inmunofluorescencia	49
3.10 Análisis por Western Blot	49
3.10.1 Análisis de proteínas insolubles	51
3.11 RT-Qpcr	53
3.11.1 Obtención ARN mensajero	53
3.11.2 Obtención del ADN complementario	53
3.12 Ensayos cometa	54
3.13 Ensayos de clonogenicidad	54

4. RESULTADOS	60
4.1 Alteraciones del Control Mitosis-Diferenciación (CMD) en el carcinoma epidermoide de piel	60
4.2 Análisis del Checkpoint de Mitosis-Diferenciación en respuesta a dosis no letales de radiación ultravioleta (UV)	62
4.3 Papel de p21 en el Control Mitosis-Diferenciación (CMD)	65
4.3.1 Caracterización de p21 en la respuesta al estrés de replicación	65
4.3.2 Papel de p21 en el CMD en respuesta al estrés de replicación en ausencia de p53	75
4.3.3 Análisis del ciclo celular de queratinocitos en respuesta a la inhibición de p53 y p21	82
4.3.4 Respuesta al daño en el ADN causado por estrés de replicación tras la pérdida de p53 y p21	85
4.4 Papel de Wee1 en el Control Mitosis-Diferenciación (CMD)	88
4.4.1 Caracterización del papel de p21 en respuesta al estrés de replicación ...	88
4.4.2 Papel de Wee1 en ausencia de p21 en el CMD	92
4.5 Papel de los inhibidores de Cdk1 en respuesta a la radiación ultravioleta (UV)	93
5. DISCUSIÓN	100
6. CONCLUSIONES	110
7. BIBLIOGRAFÍA	113

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APC: Complejo promotor de la anafase

ARN: Ácido ribonucleico

ATM: Ataxia-telangiectasia mutado.

ATR: ATM relativo a Rad3

BCC: Carcinoma basocelular

BrdU: Bromodeoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine)

cADN: ADN complementario

CEGFP: Ciclina E fusionada a GFP

CKIs: Inhibidores de Cdk

CMD: Control Mitosis-Diferenciación

CDK: Quinasa dependiente de Ciclina

DBS: "Double Strand Breaks"

DDR: "DNA Damage response"

DMEN: Dulbecco's modified eagle medium

DMSO: Dimetilsulfoxido

DNA-PK: Proteína quinasa dependiente de ADN

EDTA: "Ethylenediaminetetraacetic acid"

ETOH: Etanol

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

FBS: "Fetal Bovine Serum" (Suero Bovino Fetal)

FCE: Factor de crecimiento epidérmico

FHO: Formaldehído

FOX M1: "Forkhead box protein M1"

GFP: "Green fluorescent protein"

H2AX: "Histone H2A variant X"

IF: Inmunofluorescencia

IgG: Inmunoglobulina

Invol: Involucrina

IP: Ioduro de Propidio

K1, K5, K8, K10, K14, K16: Queratina 1, 5, 8, 10, 14, 16.

MB: Membrana basal

MDM2: Murine double minute 2

MEOH: Metanol

MRN: Complejo Mre11-Rad50-Nbs1

MSCC: Carcinoma escamoso metastásico

NER: reparación por excisión de nucleótidos

NMSC: Cáncer de piel no melanocítico

NMSCC: Carcinoma escamoso no metastásico

NOIR: no irradiado.

Nz: Nocodazol.

OID: Oncogene- Induced Differentiation

PBS: Phosphate-buffered saline

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

P/S: Penicilina/Estreptomicina

PCNA: Antígeno de proliferación nuclear

PFA: Paraformaldehído

PI3K: Fosfoinositol 3 quinasa

Plk: Polo-like quinasa

pRb: Proteína de Retinoblastoma fosforilado.

PTCH: Ptch 1 (Patched 1)

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPA: Proteína de replicación A

RT-PCR: Real Time PCR

S/AS: Sentido/Antisentido

SAC: Spindle Assembly Checkpoint

SBD: Suero bovino donar

SCC: Carcinoma escamoso

SCC12F: Línea de carcinoma escamoso

SFB: Suero fetal bovino

Shh: Sonic hedgehog

shRNA: Small harpin RNA

shp53: Small harpin RNA específico para p53

shp21: Small hairpin RNA específico para p21 (shp21 I, II, III, IV)

shwee1: Small hairpin RNA específico para Wee1

ssADN: ADN de cadena sencilla

TA: temperatura ambiente

Tris: Tris (hydroxymethyl) aminometano

TTBS: Tween tris-buffered saline

UV: Radiación Ultravioleta

WB: Western Blot

γ H2AX: H2AX fosforilado

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA PIEL

1.1.1 Funciones de la piel

La piel es un órgano complejo que ejerce un efecto de barrera semipermeable, protegiendo el cuerpo frente a distintos agentes (físicos y químicos), permitiendo el intercambio de algunas sustancias del organismo con el medio externo y evitando la pérdida de agua (Ogawa and Hsu 2013). Una de sus funciones principales es la protección frente a las radiaciones ultravioleta (UV) y frente a la acción de microorganismos.

Además de proteger, es capaz de termoregular el cuerpo, reaccionando frente a los cambios externos de temperatura y manteniendo estable la temperatura corporal a través de mecanismos como la sudoración o los escalofríos. Su acción inmunitaria a través de las células de Langerhans, participa en la respuesta inmune de la piel y participa también en la alergia por contacto. La piel posee también una importante función sensorial, a través de su inervación permite el desarrollo del sentido del tacto.

1.1.2 Estructura de la piel

La piel (Figura 1), constituye la parte más externa del cuerpo y está formada principalmente por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis y la dermis están separadas por una matriz extracelular denominada membrana basal

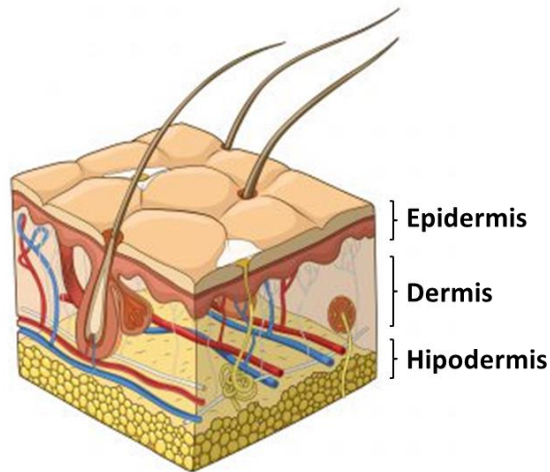


Figura 1. Capas de la piel: La capa más interna es la hipodermis o tejido subcutáneo, una estructura formada por tejido conectivo y adiposo; la capa más externa es la epidermis, un epitelio estratificado escamoso en contacto con el medio externo. Entre ambas, se encuentra la dermis, una capa rica en colágeno que sirve como soporte de la epidermis. <https://lasaludi.info/funciones-del-sistema-tegumentario.html>

1.1.2.1 Hipodermis

Se encuentra bajo la dermis y conecta la piel al tejido adyacente de huesos y músculos. Está formado por tejido conectivo y adiposo bien vascularizado; funciona como un lugar de almacenamiento que proporciona aislamiento y amortiguación para la epidermis.

1.1.2.2 Dermis

Inmediatamente superior a la hipodermis, está la dermis, rica en colágeno de tipo I y tipo III y organizada a su vez en dos capas: La más superior y más cercana a la epidermis, es la dermis papilar, formada por tejido conectivo areolar, que se proyecta hacia el estrato basal de la epidermis para formar papilas dérmicas. A continuación se encuentra la dermis reticular, más gruesa que la papilar y formada por tejido conectivo irregular.

Entre la dermis y la epidermis, que es la capa inmediatamente superior, se encuentra la membrana basal (MB). Es una capa intermedia, formada por una red de proteínas ensambladas, como colágeno tipo IV y laminina, secretadas por células de la epidermis (McMillan, Akiyama et al. 2003). Su función principal, además de proporcionar soporte, es controlar el paso de sustancias entre dermis y epidermis y servir de reservorio de algunas moléculas como citocinas y factores de crecimiento para la remodelación y mantenimiento de las estructuras de la piel (Breitkreutz, Mirancea et al. 2009).

1.1.2.3 Epidermis

La epidermis es la capa más externa de la piel y está formada principalmente por queratinocitos, células epiteliales altamente especializadas. Es un epitelio estratificado escamoso (Figura 2).

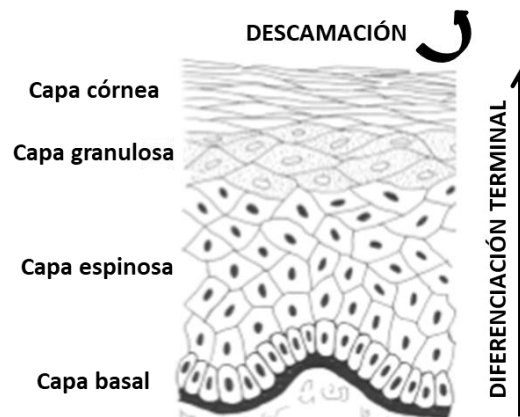


Figura 2. Capas de la epidermis: El proceso de diferenciación terminal de la piel tiene lugar a lo largo de las distintas capas de la epidermis; los queratinocitos abandonan la capa basal y migran por las capas suprabasales hasta que se despegan por descamación en la capa córnea. Esquema modificado de Wickett R y cols, 2006

El proceso de diferenciación de la piel es un proceso de auto-renovación celular mediante el cual las células dañadas son sustituidas por otras para el mantenimiento de la homeostasis del tejido. Durante el proceso de diferenciación terminal, los queratinocitos abandonan la capa basal de la epidermis y migran hacia las capas superiores hasta que se despegan por un proceso de descamación (Watt 1989, Blanpain and Fuchs 2009)

La epidermis está formada por varias capas o estratos:

- La más interna es el estrato basal, formado por una única línea de células en contacto con la membrana basal a través de uniones tipo hemidesmosomas y contactos focales. En la capa basal se encuentran las células madre epidérmicas que poseen una capacidad de proliferación ilimitada, imprescindible para el proceso de auto-renovación de la piel. Además de los queratinocitos, en la capa basal se encuentran otros tipos celulares como células de Merkel y melanocitos, que son las células productoras de melanina, el pigmento

que da color a la piel, y la protege frente a los rayos UV. Además, están las células de Merkel, que actúan como células receptoras y transmiten al cerebro la respuesta al tacto.

- El estrato espinoso, denominado también de Malpigio, se compone de unas ocho capas de queratinocitos; en su parte más basal poseen un aspecto poliédrico con núcleos redondeados, mientras que en capas superiores del estrato poseen un aspecto más aplanado. Los queratinocitos de esta capa poseen un aspecto espinoso e inician la expresión de queratinas características del proceso de diferenciación de la piel así como de glicolípidos que evitan la permeabilidad y por tanto, la pérdida de agua.

En esta capa, intercaladas entre los queratinocitos, se encuentran las células de Langerhans, que poseen un papel en el sistema inmunitario de la piel y eliminan bacterias, partículas extrañas y células dañadas (West and Bennett 2017). En las capas superiores del estrato se encuentran los cuerpos de Odland o cuerpos gruesos, son unos órganos secretores que contienen proteínas, lípidos y algunas enzimas del estrato córneo y cuya función es liberar ese contenido al espacio intercelular. Los gránulos lamelares, aparecen ya en el estrato espinoso. Son gránulos formados por láminas de lípidos responsables de la impermeabilidad del estrato córneo, así como del almacenamiento de colesterol.

El proceso de división celular que tiene lugar en la capa basal, se ve reflejado en capas superiores; los queratinocitos que ocupan el estrato espinoso son empujados hacia el estrato granuloso.

- El estrato granuloso, se compone de varias capas de queratinocitos más aplanados que los del estrato espinoso y con una superficie más dura. En la parte superior de ese estrato, los queratinocitos sufren la pérdida del núcleo y sus orgánulos y su contenido es mayoritariamente queratina. La queratohialina, es un gránulo basófilo que se encuentra exclusivamente en el citoplasma de los queratinocitos de este estrato, les confiere aspecto granuloso y da lugar a la filagrina: una proteína estructural, que favorece la agregación de filamentos de queratina, esencial para la formación de la cubierta insoluble de los queratinocitos de la capa córnea (Eckhart, Lippens et al. 2013). Además de la filagrina, otras proteínas como la involucrina y la lorícina, también forman parte de la envuelta cornificada insoluble de los queratinocitos. Los gránulos lamelares formados en el estrato

espinoso, se fusionan con la membrana externa y vierten su contenido al espacio intercelular entre el estrato granuloso y córneo, formando una barrera hidrofóbica (envuelta) que impide la pérdida de agua y sustancias.

- El estrato córneo es el estrato más externo, que protege frente a la desecación, los patógenos y los daños físico-químicos. Está compuesto por queratinocitos modificados, denominados corneocitos, conectados entre sí por desmosomas. La queratina y la filagrina constituyen el 90% del contenido de los corneocitos. Poseen además una envuelta proteica (proteínas entrelazadas) y una envuelta lipídica, de lípidos depositados por los gránulos lamelares. Los corneocitos están embebidos en una matriz extracelular rica en lípidos organizados en capas.

1.1.3 Diferenciación epidérmica

El proceso de renovación de la piel depende de las células madre epidérmicas, que se encuentran en la capa basal de la epidermis y poseen una capacidad ilimitada de proliferación; generalmente permanecen en estado de reposo (Niemann and Watt 2002); al dividirse pueden dar lugar a una progenie con un destino celular asimétrico (Figura 3; Jensen and Watt 2006) dos células madre, una célula madre y una célula comprometida a diferenciar o dos células comprometidas a diferenciar (Fuchs and Chen 2013).

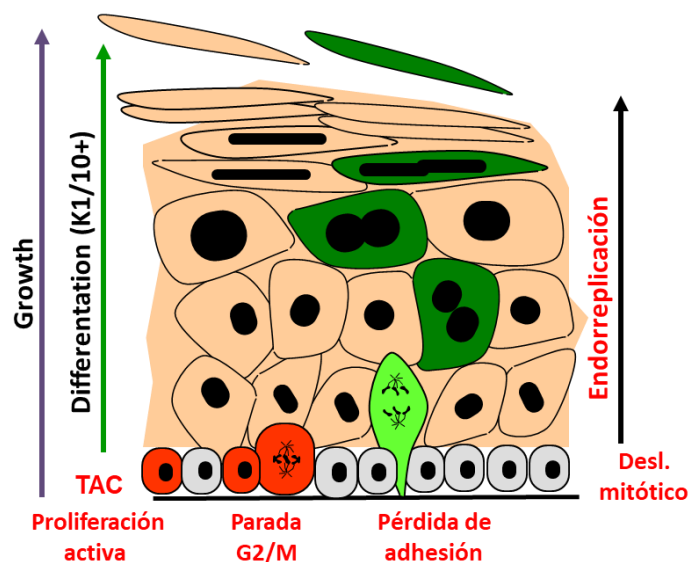


Figura 3. Células de la epidermis. En la capa basal se encuentran las células madre; por división asimétrica dan lugar a otras células madre, con una capacidad ilimitada de división o a células de amplificación transitoria (TAC), comprometidas a diferenciar. Esquema modificado de Gandarillas et al; 2012.

Las células comprometidas a diferenciar se denominan TAC (del inglés, “Transient Amplified Cells”). Estas células tienen una capacidad de proliferación limitada y tras cinco o seis rondas de división celular, abandonan la capa basal y comienza el proceso de diferenciación (Niemann and Watt 2002). Son las encargadas de amplificar el número de células que ocupan las capas suprabasales de la epidermis. El proceso de diferenciación comienza con la parada prolongada de la célula en la transición G2/M y la pérdida de adhesión mediante la pérdida de la expresión de integrinas (Watt 2002).

Las integrinas son una familia de glucoproteínas, cuya expresión es importante para la regulación de la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular. En los queratinocitos de la capa basal, la expresión de $\beta 1$ -integrinas, posee un papel relevante en el proceso de diferenciación epidérmica (Adams and Watt 1989, Kubler and Watt 1993) y es mayor en las células madre epidérmicas respecto de las TAC (Jones and Watt 1993). La pérdida de adhesión de los queratinocitos a la capa basal, causada por la pérdida de función de las integrinas, desencadena el proceso de diferenciación terminal en la epidermis. Los queratinocitos pierden la capacidad de dividirse, abandonan la membrana basal y avanzan a través de los distintos estratos suprabasales de la epidermis. A medida que los queratinocitos migran por las capas superiores y diferencian, se producen cambios morfológicos y de algunas de sus características bioquímicas (Sun and Green 1976); las células aumentan de tamaño y cambia el patrón de expresión de algunas proteínas.

El proceso de diferenciación está caracterizado por un cambio en la expresión de las queratinas, proteínas con estructura fibrosa que constituye el componente principal de las capas más externas de la epidermis. Los queratinocitos de la capa basal expresan queratina 5 (K5) y queratina 14 (K14), mientras que, en capas suprabasales expresan queratina 1 (K1) y queratina 10 (K10). Los filamentos formados por la K1 y K10 son más densos que los formados por la K5 y K14 y forman estructuras más compactas (Moll, Divo et al. 2008). La filagrina favorece la agregación de los filamentos de queratina en diferenciación (corneocitos) y favorece su resistencia mecánica (Eckhart, Lippens et al. 2013).

La síntesis de queratinas es previa a la síntesis de involucrina, que se produce una vez los queratinocitos se despegan de la capa basal (Watt and Green 1981). Esta proteína es un precursor de la envuelta cornificada y se produce al mismo tiempo que la síntesis de la loricrina, un componente mayoritario de la envuelta (Eckhart, Lippens et al. 2013). Durante

el proceso de diferenciación, las células adquieren formas poligonales y pierden el núcleo así como la mayor parte de sus orgánulos celulares.

1.2 CÁNCER DE PIEL

El cáncer de piel es la neoplasia más frecuente (Simoes, Sousa et al. 2015, Apalla, Lallas et al. 2017). Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés “World Health Organization”), cada año aparecen unos 3 millones de nuevos casos de cáncer de piel. Según la Academia española de Dermatología y Venereología, se estima la aparición de unos 150.000 nuevos casos al año en España y una tendencia al alza, con un crecimiento del 38% en los últimos 4 años. En U.S, 1 de cada 5 personas desarrolla cáncer de piel (“Skin Cancer Foundation”).

La continua exposición a los rayos solares es la principal causa de desarrollo de la enfermedad. Algunos factores como el tono de la piel (piel clara), antecedentes familiares y la edad del individuo, están relacionados con la enfermedad. Los individuos de piel clara poseen una menor cantidad de melanocitos, células de la epidermis responsables de la síntesis de melanina, un pigmento que protege de la radiación UV. Otros factores como el tabaco y el alcohol influyen de manera negativa en el desarrollo de esta enfermedad. Las mutaciones producidas por la UV, generalmente son eliminadas por los sistemas de reparación de la célula. Las especies reactivas de oxígenos generadas en la metabolización del alcohol parecen interceder en la reparación del daño en el ADN.

Hay dos tipos de cáncer de piel: melanocítico (MSC, del inglés, “Melanoma Skin Cancer”) y no melanocítico (NMSC, del inglés, “Non-Melanoma Skin Cancer”). El cáncer de piel no melanocítico (NMSC) es el tipo de cáncer de piel más común: el 99% de los casos son cáncer de piel de este tipo, considerados de forma general como cánceres curables (Fahradyan, Howell et al. 2017). La incidencia de este tipo de cáncer crece un 10% aproximadamente cada año y según la Sociedad Americana del cáncer, hay unos 4-5 millones de nuevos casos cada año. Hay dos tipos de NMSC, el carcinoma basocelular (BCC, del inglés “Basal Cell Carcinoma”), con una tasa metastática de 0.1% y el carcinoma escamoso (SCC, del inglés “Squamous Cell Carcinoma”), con una tasa mayor que los BCC,

del 2 al 5%. El BCC representa el 80% de los casos de NMSC, mientras que el SCC representa el 20% restante. La célula precursora del cáncer no melanocítico es el queratinocito.

El cáncer de piel melanocítico o melanoma (MSC), es el tipo de cáncer cutáneo más agresivo. A pesar de ser poco frecuente (4% aproximadamente del total de casos de cáncer cutáneo), resulta de la mutación del melanocito y es la principal causa de muerte por esta enfermedad (McCourt, Dolan et al. 2014).

1.2.1 Carcinoma basocelular (BCC)

Es el tipo de cáncer no melanocítico más común. El BCC está asociado a radiaciones ultravioleta intermitentes y muy intensas y con personas de tez clara. Aparecen *de novo*, no de una lesión precursora anterior. A nivel celular, los BCCs están formados por células de aspecto indiferenciado (Miller 1991, Crowson 2006), que forman agregados celulares rodeados de tejido conjuntivo, conectados a la epidermis. A pesar de su aspecto indiferenciado poseen un crecimiento lento (Heenen, Achten et al. 1973, Miller 1991, Samarasinghe, Madan et al. 2011). El índice de metástasis en estos BCCs se sitúa entre el 0,0028 y el 0,1% (Samarasinghe, Madan et al. 2011).

1.2.2 Carcinoma escamoso (SCC)

La causa principal de los SCCs, es la exposición continuada a la UV. A diferencia de los BCCs, este tipo de lesiones no se generan *de novo*, derivan de un SCC no invasivo y que ocupa las capas más superficiales de la epidermis hacia un SCC invasivo, que llega hasta la membrana basal de la epidermis y penetra incluso en la dermis. El tratamiento de los SCCs no invasivos evita su desarrollo; pueden ser potencialmente destructivos, con una capacidad metastásica mayor que los BCC. A nivel celular, los SCCs poseen un aspecto diferenciado ya que retienen parcialmente la respuesta a diferenciación escamosa (Rheinwald and Beckett 1980, Alonso-Lecue, de Pedro et al. 2017).

Los SCCs se clasifican en relación con el grado de diferenciación: los SCCs mal o pobremente diferenciados, se caracterizan por ser células atípicas, con pérdida de puentes intercelulares y pérdida de expresión de marcadores de diferenciación como queratinas; los SCCs moderadamente o bien diferenciados, poseen células uniformes con numerosos

puentes intercelulares entre ellos y expresan marcadores de diferenciación (Nguyen, Mikita et al. 2016).

1.2.3 Alteraciones carcinomas de piel

La carcinogénesis es un proceso caracterizado por una serie de cambios que tienen lugar en la célula y que pueden ser heredados y/o adquiridos. Los cambios heredados están presentes en las células germinativas (óvulo y espermatozoide) y se transmiten a todas las células hijas; los cambios adquiridos se deben a distintos agentes mutagénicos (físicos, químicos) y/o al fallo en alguno de los sistemas de control de la célula.

1.2.3.1 Genes implicados en los carcinomas de piel

El desarrollo de un proceso tumoral está caracterizado por la mutación de un conjunto de genes. Son genes supresores tumorales que inhiben la proliferación celular y la acción oncogénica. Existen un número de enfermedades congénitas asociadas a la mutación de estos genes. La desregulación de cada gen está relacionada con el desarrollo de un tipo de carcinoma epidermoide.

El supresor de tumores p53, es el gen mutado más común en cáncer (Freije, Molinuevo et al. 2014, Alonso-Lecue, de Pedro et al. 2017). Esta mutación se encuentra en el 90% de los SCCs y el 50% de los BCCs. Aproximadamente el 71% de estas mutaciones tienen como causa común la radiación ultravioleta (Bolshakov, Walker et al. 2003). En respuesta a la UV, se produce un aumento de la síntesis de p53. Las mutaciones en esta proteína inducen su estabilización y aumento de su vida media, así como una pérdida de la proteína nativa. En algunos casos, la proteína mutada puede actuar como un dominante negativo de la proteína nativa (Muller and Vousden 2014). Estos efectos poseen relación con el desarrollo de un proceso tumorogénico (Ziegler, Jonason et al. 1994, Benjamin and Ananthaswamy 2007).

La alteración más característica en los BCCs es la desregulación en la vía de Sonic Hedgehog (Shh), generado por mutaciones en el supresor tumoral PTCH (Ptch1, es un receptor transmembrana que participa en la transducción de las señales y en el proceso de segmentación celular). La ruta de Sonic Hedgehog tiene un papel importante durante el desarrollo embrionario y la regulación de la organogénesis. La mutación en PTCH, está

relacionado con el Síndrome de Gorlin Goltz y un aumento en la probabilidad de desarrollar un BCC. Tras la etapa de formación embrionaria, la ruta de Sonic Hedgehog se inactiva. La activación inadecuada de esta ruta durante la vida del adulto, puede desencadenar un proceso oncogénico.

La vía NOTCH está implicada en el desarrollo de la epidermis. La alteración de esta vía puede inducir el desarrollo de un SCC. Participa durante el desarrollo embrionario y durante la vida del adulto. Se expresa en la epidermis donde interviene en la migración de las células a través de las diferentes capas y en el mantenimiento del compartimento de células madre (Dotto 2008, Panelos and Massi 2009). Actúa como supresor tumoral en los SCCs (Missero and Antonini 2014) induciendo la diferenciación escamosa (Rangarajan, Talora et al. 2001, Lefort, Mandinova et al. 2007); una menor expresión de NOTCH resulta en un menor compromiso a la diferenciación y las células son más susceptibles a una conversión oncogénica mediada por Ras (Kolev, Mandinova et al. 2008).

1.3 RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y DAÑO EN EL ADN

La radiación ultravioleta (UV) es el factor de riesgo más importante para el cáncer de piel y otros trastornos asociados a la piel; sin embargo, deben tenerse en cuenta también los efectos beneficiosos que proporciona al organismo, como la síntesis de Vitamina D, la destrucción de agentes patógenos y la modulación de reacciones enzimáticas. La exposición continuada y excesiva a la UV, conlleva riesgos para la salud; el más grave de ellos, el cáncer de piel. La UV puede clasificarse en 3 tipos distintos en función de su longitud de onda: radiación ultravioleta A, B y C.

1.3.1 Tipos de radiaciones ultravioleta

La radiación ultravioleta A (UVA), es la radiación con mayor longitud de onda (320-400nm) pero menor energía. Esta radiación UVA es capaz de penetrar en la dermis, alcanzando el tejido conectivo e induciendo la desnaturalización de la elastina, afectando al envejecimiento de la piel.

La radiación de tipo B (UVB), con una longitud de onda media (290-320nm), raramente penetra en las capas profundas de la piel y afecta sólo a la epidermis. Esta longitud de

onda es la responsable de daños puntuales en la piel, como quemaduras y eritemas. La UVB es la principal responsable del daño en el ADN, aunque una exposición muy alta a la UVA, puede generar lesiones en el ADN y mutaciones en la piel

La radiación de tipo C (UVC), posee una longitud de onda menor que los dos tipos anteriores (240-290nm). Estos rayos no consiguen atravesar la capa de ozono y llegar a la tierra.

Además de las radiaciones UV y otros factores ambientales, existen algunos factores genéticos relacionados con el desarrollo de enfermedades de la piel. La UV está relacionada con los tres tipos más comunes de cáncer de piel: cáncer de piel melanocítico, basocelular y escamoso.

1.3.2 Vías de activación en respuesta al DDR

La UV es el agente carcinogénico externo más importante. Induce alteraciones genómicas que pueden derivar en el desarrollo de un proceso tumoral. La radiación UV genera además, daño en proteínas y enzimas implicadas en el ciclo celular. En respuesta al daño en el ADN, la célula posee mecanismos de respuesta (DDR, del inglés “DNA Damage Response”) que inducen una parada en el ciclo para reparar el ADN dañado (Weber and Ryan 2015).

La respuesta al DDR es un proceso complejo. Las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK), poseen un papel importante en la respuesta genotóxica; se ha descrito esta vía como uno de los mecanismos necesarios para el bloqueo del ciclo y la activación de los mecanismos de reparación del ADN (Yang, Xu et al. 2004, Kopper, Bierwirth et al. 2013). Sin embargo, las MAPK no son las proteínas desencadenantes de la respuesta al daño.

La familia de PI3-K, una familia de quinasas serina-treonina, formada por una serie de proteínas quinasa dependientes de ADN como ATM, ATR y DNA-PK. Estas proteínas están implicadas en la respuesta al daño, se activan en las primeras etapas de la respuesta y actúan como sensores o transductores de la señal, activando la reparación del ADN.

ATR y ATM activan respectivamente Chk1 y Chk2 promueven la fosforilación de Cdc25, que una vez fosforilada, se inactiva y es incapaz de unirse a los complejos Ciclina-Cdk. Tanto

ATM como ATR son capaces, a través de Chk1 y Chk2, de activar otras dianas como Wee1, que participa en la respuesta al daño y está implicada en la regulación negativa de la progresión del ciclo a nivel de la transición G2/M del ciclo celular. Otras dianas como p53, que es el principal regulador de la respuesta al daño, son capaces de activar numerosas dianas transcripcionales importantes en esta respuesta. Una de las dianas principales de p53 es p21 (punto 1.4.6).

1.3.3 Respuesta celular al daño generado en el ADN.

El DDR tiene como objetivo la reparación del ADN dañado para permitir la división celular en ausencia de errores. Cuando el daño no puede ser reparado, la célula es eliminada, para evitar la división celular y la difusión de los errores, evitando el progreso de un proceso tumoral. Frente al daño no reparado, la célula activa mecanismos que eliminan estas células dañadas.

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada. Es un proceso altamente regulado, esencial para la eliminación de células dañadas y el mantenimiento de la homeostasis en tejidos en desarrollo (Singh and Anand 1994). El regulador más importante de este proceso es p53, activado a través de ATM, ATR y DNA-PK.

Alternativamente a la apoptosis, la senescencia es otro proceso que participa en la respuesta al daño inducido por UV. Esta respuesta produce un arresto permanente del ciclo celular y forma parte del programa de desarrollo normal y envejecimiento de una célula. En queratinocitos, p53 es activado por el factor de crecimiento insulínico (IGF-1R) que responde frente al estrés oxidativo y a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés "Reactive Oxygen Species"). IGF-1R protege de la apoptosis, evita la replicación de las células dañadas y mantiene la función de barrera protectora de la epidermis (Lewis, Yi et al. 2008). Bajo las mismas condiciones y en ausencia de este factor, se desencadena un proceso de apoptosis.

La diferenciación terminal es otro destino celular además de la apoptosis y la senescencia, que tiene lugar en algunas células en respuesta al daño en el ADN. El aumento de algunos marcadores de diferenciación de la piel como filagrina o involucrina, en respuesta a la UV, evidencian un papel de la diferenciación en esta respuesta (Lee, An et al. 2002). Además de la piel, se ha visto en otros tipos celulares como mioblastos (Sherman, Bassing et al.

2011) o melanocitos (Inomata, Aoto et al. 2009). En nuestro grupo se ha descrito un nuevo mecanismo por el cual los queratinocitos de la piel sufren un proceso de diferenciación terminal en respuesta al daño en el ADN para el mantenimiento de la homeostasis del tejido (Freije, Ceballos et al. 2012). Hemos descrito más recientemente, la participación de este mismo mecanismo en respuesta al daño en el ADN inducido por la UV (de Pedro, Alonso-Lecue et al. 2018).

1.4 CICLO CELULAR

1.4.1 Fases del ciclo celular

El ciclo celular es una secuencia de eventos que finaliza con la división celular (Schafer 1998). Es un proceso complejo mediante el cual las células duplican la cantidad de información genética contenida (ADN) y posteriormente segregan esa información a dos células hijas completamente iguales (Figura 4).

El ciclo celular se lleva a cabo de manera ordenada y controlada y posee una duración aproximada de 24 horas; se define en 4 fases distintas: Fases G (del inglés, “gap”, pausa), son las fases G1 y G2, que proporcionan tiempo a la célula para asegurar el buen funcionamiento y las condiciones adecuadas para que continúe el ciclo; la duración de la fase G1 varía en función de esas condiciones. Durante la fase de síntesis de ADN (fase S), tiene lugar la duplicación del material hereditario. Esta fase ocupa aproximadamente la mitad del tiempo total del ciclo celular (12 horas). El conjunto de estas tres fases (G1, G2 y S) se denomina interfase. En la fase de división celular (fase M), la célula reparte la información genética recogida en los cromosomas. Durante este proceso tiene lugar la división del núcleo (cariocinesis) y la división del citoplasma (citoquinesis) y comprende aproximadamente 1 hora de la duración total del ciclo; está dividida a su vez en varias fases.

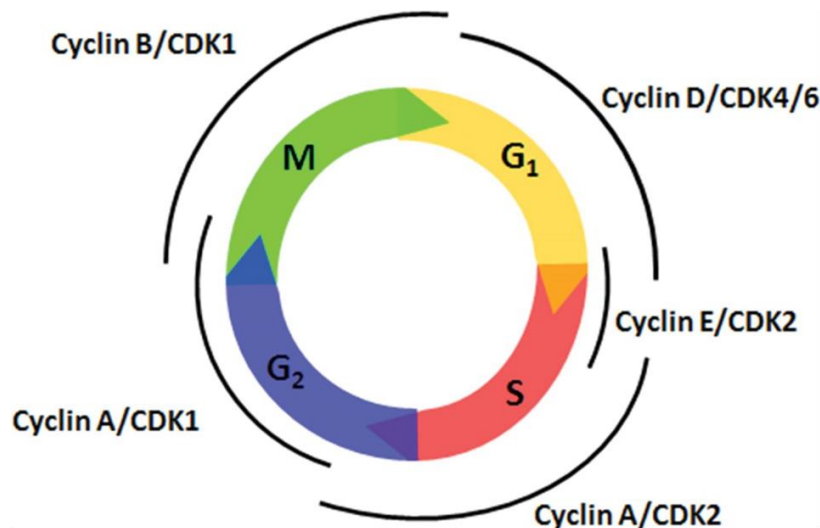


Figura 4. Etapas del ciclo celular El ciclo celular consiste en 4 etapas coordinadas: Las fases Gap (G₁ y G₂) son fases de crecimiento celular; la fase S, tiene lugar la duplicación del ADN y finalmente una fase de mitosis o división celular (fase M), da lugar a dos células hijas idénticas. Los complejos Ciclina-Cdk controlan la progresión del ciclo celular. Suryadinata R., et al. 2010.

La primera de las fases de la división celular, es la profase. Hasta ese momento, los cromosomas permanecen en forma de cromatina; en esta fase tiene lugar la condensación de los cromosomas. Cada cromosoma está formado por dos cromátidas que contienen la misma información (cromátidas hermanas) y permanecen unidas mediante cohesinas, un complejo de proteínas involucradas en la separación de las cromátidas. Además, durante la profase, los dos centriolos (que forman el centrosoma), se separan y migran hacia los polos de la célula.

Durante la pro-metafase, tiene lugar la desorganización de la membrana nuclear permitiendo que, de cada centriolo brote una red de microtúbulos que forman el huso mitótico y se unen a los cinetocoros, situados en el centrómero de los cromosomas, favoreciendo su movilidad.

La siguiente etapa es la metafase, donde los cromosomas se alinean en el centro de la célula, denominada placa ecuatorial. El proceso de la mitosis continúa con la anafase, donde los cromosomas se separan por el huso mitótico del centrosoma y cada una de las cromátidas hermanas se dirige hacia un polo de la célula. Esta división da lugar a dos conjuntos de cromosomas, cada uno de los cuales formará parte de una célula hija. La última fase de la mitosis es la telofase, donde los cromosomas llegan a los dos polos de la célula, se descondensan, formando de nuevo la cromatina. Además, se forman las membranas nucleares de cada una de las células hijas.

Finalizada la división del núcleo, la célula inicia la división del citoplasma (citocinesis), creando un anillo contráctil de fibras de actina y miosina, que estrangula la célula y da lugar a dos células hijas.

1.4.2 Control del ciclo celular

Existen mecanismos de control que intervienen en los procesos esenciales que dirigen el ciclo celular. Estos sistemas de control son puntos de restricción, que desencadenan cada proceso de forma completa e irreversible. Son mecanismos altamente eficaces que cuentan con otros elementos auxiliares, los cuales participan en el control en respuesta al fallo de alguno de los principales sistemas de control.

1.4.2.1 Componentes del sistema de control

Las quinasas dependientes de ciclina (Cdks) y sus actividades catalíticas están moduladas por interacciones con Ciclinas e inhibidores de Cdks (CKIs, del inglés, “Cdk inhibitor proteins”). La actividad cooperativa entre estos elementos, permite la progresión ordenada del ciclo celular (Lim and Kaldis 2013).

Las Cdks son serina/treonina quinasas cuyos niveles permanecen constantes a lo largo de las distintas etapas del ciclo celular pero su actividad catalítica fluctúa ya que está modulada por la acción de otras proteínas reguladoras como Ciclinas e inhibidores de Cdks (CKIs). Las Ciclinas son las proteínas reguladoras más importantes de las Cdks y forman la subunidad catalítica de los complejos Ciclina-Cdk. El funcionamiento de estos complejos se debe a la especificidad en la unión de las Ciclinas con el sustrato y de acuerdo con esto, se establece el modelo de regulación del Ciclo celular (Satyanarayana and Kaldis 2009).

Los niveles de las Ciclinas fluctúan a lo largo del ciclo (Morgan 1995). Estos cambios en la expresión de las proteínas inducen cambios en la activación de los complejos Ciclina-Cdk y en la progresión del ciclo. Además de su activación, la posterior degradación de las Ciclinas induce la inactivación de sus quinasas (Cdks) correspondientes y es esencial para la progresión del ciclo celular (Hochegger, Takeda et al. 2008).

Las familias de Ciclinas y Cdks contienen cada una más de 20 miembros, pero sólo algunos de ellos forman los complejos Ciclina-Cdk y participan de forma activa en el ciclo celular (Hydbring, Malumbres et al. 2016). Sólo 4 de los más de 20 tipos de Cdks identificados, participan en la regulación del ciclo; Cdk4, Cdk6 y Cdk2, que participan durante la interfase y Cdk1, que participa durante la división celular (Malumbres and Barbacid 2009). Del mismo modo, sólo 10 de los 29 tipos de Ciclinas identificadas forman parte activa de la regulación del ciclo celular. Estas 10 Ciclinas están agrupadas en 4 sub-familias y se denominan Ciclina D, Ciclina E, Ciclina A y Ciclina B.

1.4.2.2 Complejos Ciclina-Cdk en el ciclo celular

En respuesta a señales extracelulares de proliferación, como factores de crecimiento o citosinas, se activa la expresión de la Ciclina D (D1, D2 y D3) al inicio de la fase G1 del ciclo celular. A diferencia del resto de Ciclinas implicadas en el ciclo celular, la Ciclina D es la única que no se expresa de forma periódica; su síntesis depende de las señales extracelulares emitidas por los factores de crecimiento (Assoian and Zhu 1997).

Estas Ciclinas de tipo D se unen a las quinasas Cdk4 y Cdk6, formando un complejo, esencial para la entrada de la célula en G1 (Sherr 1994, Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003). Este complejo Ciclina D-Cdk4/6 inicia la fosforilación de proteínas de la familia de retinoblastoma como el supresor de tumores Rb, p107 o p130 (Sherr and Roberts 1999, Sherr and Roberts 2004). Esta fosforilación, induce la inactivación parcial de las proteínas de la familia Rb y provoca la liberación de los factores de transcripción de la familia E2f, responsables de la transcripción de los genes que inducen la progresión del ciclo celular, como Ciclina E y Ciclina A (Hatakeyama and Weinberg 1995) y otros genes implicados en la síntesis de nucleótidos y ADN (Nevins 1998). Al final de la fase G1, la Ciclina E (E1 y E2) ya activa, induce la activación de Cdk2. Además, el complejo Ciclina E-Cdk2 fosforila proteínas de la familia Rb (parcialmente fosforiladas por Ciclina D-Cdk4/6) e induce la completa activación de E2f (Sherr and Roberts 1999). La liberación y activación de E2f junto con la activación de los complejos Ciclina-Cdk, permite el paso de la célula a través de la transición G1/S del ciclo celular. A partir de este punto, la continuación del ciclo celular parece independiente de las señales extracelulares que reciben las células (Blagosklonny and Pardee 2002).

Durante la transición G1/S, los niveles del complejo Ciclina E-Cdk2 son máximos para favorecer el paso hacia la fase S. Este complejo participa además en la fosforilación de algunos componentes del complejo de pre-replicación que tiene lugar durante la fase S y que regula el inicio de la replicación del ADN (Woo and Poon 2003). Cdk2 también participa de manera activa en la progresión de la fase S mediante su unión con la Ciclina A (A1 y A2). Su actividad es importante para la fosforilación de algunos de los componentes de la maquinaria de replicación del ADN (Yam, Fung et al. 2002). Durante el final de la fase S, este complejo Ciclina A-Cdk2 inactiva E2f e impide su unión al ADN. La inactivación de E2f es crítica para la entrada de la célula en la fase G2 del ciclo celular (Krek, Xu et al. 1995).

La Ciclina A se une de forma covalente a Cdk1 para la transición entre la fase G2 y la fase M (Gong and Ferrell 2010). La activación del complejo Ciclina A- Cdk1 es necesario para el inicio de la profase y sus niveles son detectados hasta el inicio de la pro-metafase (Gadea and Ruderman 2005). Su implicación en mitosis parece estar relacionada con la activación del complejo Ciclina B- Cdk1 (Pagano, Pepperkok et al. 1992).

Finalmente, Cdk1 junto con la Ciclina B (B1) regula el proceso de división celular. La síntesis de Ciclina B se mantiene activa hasta la metafase y su degradación es necesaria para la salida de mitosis (Donald C Chang; 2003). El complejo formado por Ciclina B-Cdk1 es degradado por el complejo promotor de anafase (APC, del inglés, "Anaphase Promoting Complex"), (Harper, Burton et al. 2002).

A lo largo de la progresión del ciclo celular, los complejos Ciclina A/B-Cdks mantienen Rb en su forma hiperfosforilada (inactiva, pRb), hasta la salida de mitosis, donde pRb vuelve a su estado defosforilado (activo, Rb) para la siguiente fase G1 (Ludlow, Glendening et al. 1993).

1.4.2.3 Otros mecanismos de control del Ciclo Celular

Las Ciclinas que participan en la progresión del ciclo celular, son los principales reguladores de la acción de las Cdks. Existen otros mecanismos que regulan con precisión la actividad de estas quinasas. Las proteínas inhibidoras de Cdks (CKIs) se unen a los complejos Ciclina-Cdk y regulan de forma negativa la progresión del ciclo celular (Canepa, Scassa et al. 2007).

En mamíferos hay dos familias de CKIs; la familia INK y la familia CIP/KIP. La familia INK inhibe específicamente el complejo Ciclina D-Cdk4/6 y está formada por 4 miembros: p16^{INK4a} (p16), p15^{INK4b} (p15), p18^{INK4c} (p18) y p19^{INK4d} (p19). Se unen específicamente a las quinasas Cdk4 y Cdk6, impiden su unión con la Ciclina D, e inducen una parada en G1 (Sherr and Roberts 1999).

La miembros de la familia CIP/KIP inhiben los complejos Ciclina E-Cdk2, Ciclina A-Cdk2/1 y Ciclina B-Cdk1. Sin embargo, algunos autores proponen que mediante su unión al complejo Ciclina D-Cdk4/6 regulan de forma positiva el inicio de la fase G1: El complejo Ciclina D-Cdk4/6 es responsable de una fosforilación inicial de Rb (pRb) y otras proteínas asociadas. Tras la fosforilación inicial, el complejo Ciclina E-Cdk2 fosforila pRb (Sherr and Roberts 1999, Canepa, Scassa et al. 2007).

La familia CIP/KIP está formada por tres miembros: p21^{Cip1/Waf1/Sdi1} (p21), p27^{Kip1} (p27) y p57^{Kip2} (p57), cada uno de los cuales posee distintas funciones biológicas, aunque se ha descrito que todas ellas tienen un papel en proliferación, diferenciación y en respuesta al estrés celular (Sherr and Roberts 1999).

La expresión de p27 es alta en aquellas células que carecen de mitógenos o que permanecen generalmente quiescentes y disminuye rápidamente con la entrada de las células en ciclo (Besson, Dowdy et al. 2008); se asocia al complejo Ciclina E-Cdk2 dando lugar a una parada en G1 en respuesta a señales antimitogénicas (Hengst and Reed 1998, Abukhdeir and Park 2008). p57 tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular durante el desarrollo embrionario. A diferencia de p27 y p21 que son ubicuas, la localización de esta proteína es muy restringida durante el desarrollo embrionario y también en el adulto (Besson, Dowdy et al. 2008). Además de su papel como supresor tumoral en el desarrollo del ciclo celular a través de su extremo N-terminal, p57 está implicada en otros procesos celulares como transcripción, apoptosis, diferenciación y desarrollo a través de su extremo C-terminal. Como consecuencia de su multifunción, participa en numerosos procesos tumorigénicos, que conllevan pérdida de heterocigosidad, desacetilación de histonas y regulación de microARNs (Guo, Tian et al. 2010).

p21CIP (p21) es una proteína muy importante en la regulación del ciclo celular. Es diana transcripcional de p53, denominada guardián del genoma, es una proteína supresora de tumores, mutada en el 50% de los casos de cáncer (Freije, Molinuevo et al. 2014) y que posee un papel importante en la parada del ciclo celular en las transiciones G1/s y G2/M, en respuesta al daño en el ADN (ver punto 1.4.6)

1.4.2.4 Puntos de control del ciclo celular

El ciclo celular posee varios puntos de control que intervienen en el orden, la integridad y el buen funcionamiento del ciclo celular de una célula (Figura 5).

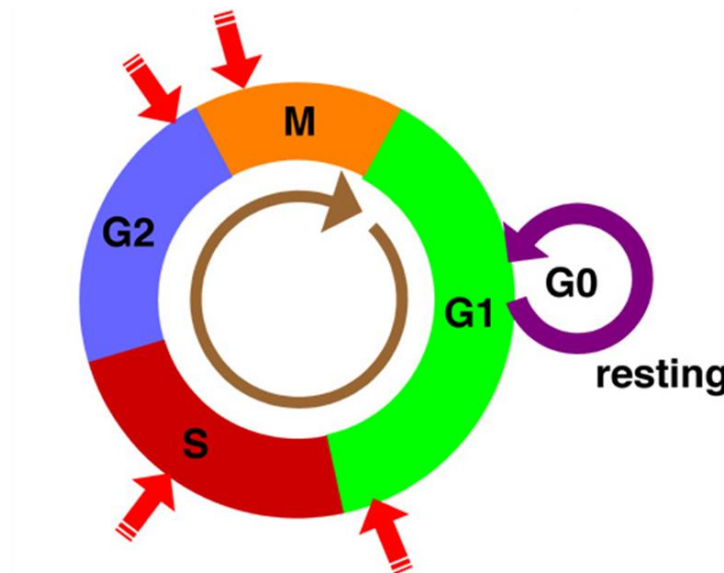


Figura 5. Puntos de control del ciclo celular Mecanismos moleculares que aseguran el funcionamiento y la viabilidad celular. A lo largo del ciclo celular existen distintos puntos de control (punto de control de G1/S, punto de control de G2/M, punto de control de la fase S y el punto de control de la mitosis) que verifican si los procesos en cada fase se han completado correctamente. <http://eishinoguchi.com/checkpoint.htm>

El primer punto de control se encuentra a nivel de la transición G1/S, denominado control de Inicio. En este punto se comprueba el estado de la célula para la entrada en la fase de síntesis del ADN (fase S). El segundo, se encuentra a nivel de la transición G2/M, se analizan los procesos que desencadenan el alineamiento de los cromosomas y el proceso de mitosis. El tercer punto, situado en la transición de metafase-anafase, el sistema permite la separación de los cromosomas situados en la placa ecuatorial y la finalización

de la mitosis. Dentro de la fase S, existe otro punto de control que previene la inestabilidad genómica regulando el origen de replicación, la progresión de la horquilla y la transcripción de los genes G1/S en respuesta al daño en el ADN (Iyer and Rhind 2017).

Durante el periodo de interfase, la célula posee dos puntos de control a nivel de la transición G1/S y a nivel de la transición G2/M del ciclo celular. La vía de señalización principal que activa los mecanismos de reparación en estos puntos, es la de ATM/ATR (ATM del inglés, "Ataxia Talangiectasia Mutated" y ATR, "Ataxia Talangiectasia and Rad3-related protein). Estas quinasas pertenecen a la familia de protein-quinasas fosfoinositol 3-quinasa (PI3-K) y junto a DNA-PK, otra proteína de la misma familia (Houtgraaf, Versmissen et al. 2006), son las proteínas activadoras de las cascadas de señalización para la reparación del ADN.

ATM y DNA-PK reconocen las roturas de doble hebra e inducen la fosforilación de H2AX (γ H2AX), que es uno de los primeros eventos que tiene lugar tras la detección del daño en el ADN. Esta fosforilación activa una cascada de señalización, de proteínas implicadas en la reparación del ADN y en la activación de los puntos de control que detienen el ciclo celular. En los focos donde se inducen las roturas del ADN, co-localizan junto a ATM, DNA-PK y γ H2AX, otros componentes de la respuesta al daño como 53BP, MDC1 y el complejo MRN.

MDC1 amplifica la señal del daño y recluta el complejo MRN, que activa ATM de forma completa, generando una retroalimentación positiva de la cascada, favoreciendo la difusión de la fosforilación de H2AX a través de los dominios de cromatina y formando focos que señalizan los sitios del daño generado en el ADN (Turinetti and Giachino 2015).

ATM activado completamente, fosforila en primer lugar Chk1 que participa en la regulación de proteínas implicadas en la regulación de los complejos Ciclina-Cdk. ATM y ATR pueden activarse de manera directa interaccionando con el ADN dañado o de manera indirecta a través de la interacción con proteínas implicadas en la reparación del ADN. Se piensa, aunque también hay solapamiento, que ATM actúa en respuesta al daño en el ADN de doble hebra, mientras que ATR se activa en respuesta a roturas tanto de doble hebra como de hebra sencilla (Zhou and Elledge 2000). Hay evidencias que sugieren la unión preferente de ATM a los extremos del ADN y de ATR al ADN dañado (Yang, Xu et al. 2004). ATM y ATR activan Chk2 y Chk1 respectivamente, existe cierta co-localización y complementación entre ellas y con otras proteínas que participan en la reparación y la regulación del ciclo celular.

1.4.2.4.1 Punto de control G1/S

En la fase G1 del ciclo celular, se induce la fosforilación del factor de transcripción p53. La activación de p53 se produce de forma directa por ATM y ATR o de manera indirecta a través de la activación de Chk1 y Chk2 (Kastan and Bartek 2004). Todo esto conlleva a la estabilización y acumulación de p53 y su diana transcripcional p21 que inhiben la activación de los complejos Ciclina-Cdk y la progresión del ciclo celular

1.4.2.4.2 Punto de control de la fase S

Durante la fase S, la inestabilidad en las horquillas de replicación puede dar lugar a fallos en el ADN y generar estrés de replicación. Esta inestabilidad puede venir dada por diferentes agentes (intrínsecos y extrínsecos), capaces de interferir y bloquear la actividad de las horquillas y dar lugar a zonas del genoma no replicadas. Este punto de control detecta los fallos en las horquillas y el daño generado en el ADN, desencadenando una cascada de señalización que ralentiza el proceso de replicación, estabilizando los replisomas en las horquillas detenidas (Nyberg, Michelson et al. 2002).

La vía de reparación activada en respuesta al daño, es de nuevo, la cascada de señalización activada por ATM y ATR (Blackford and Jackson 2017). La función de ATR parece clave en este caso para el inicio de la replicación ya que, en ausencia de señal de daño posee un papel importante en los orígenes de replicación.

En ausencia de estrés de replicación, ATR se activa al inicio de la replicación en respuesta a la señal persistente de ADN monocatenario (ADNss) unido a una proteína de replicación A (RPA, del inglés, "Replication Protein A). Esta proteína RPA, se une al ADNss y mantiene la estructura desenrollada, evitando la formación de estructuras secundarias y favoreciendo la acción de la polimerasa durante la replicación. La acción de ATR en ausencia de daño, permite por tanto, controlar el inicio de la replicación (Shechter, Costanzo et al. 2004, Iyer and Rhind 2017).

Este punto de control activa orígenes de replicación inactivos que se replican de forma pasiva en ausencia de señales de daño, eliminando parcialmente el efecto de las horquillas de replicación que se han detenido. (Yekezare, Gomez-Gonzalez et al. 2013). En respuesta al estrés de replicación y el daño inducido en el ADN, ATR actúa inhibiendo el origen de

replicación mediante la activación de su diana Chk1. Esta quinasa, fosforila e inactiva Cdc25A, necesaria para la activación del complejo Ciclina E-Cdk2, que actúa durante la fase S. Además, la inhibición de Cdk2, bloquea la unión de Cdc45 a la cromatina, una proteína necesaria para la unión de la ADN polimerasa al complejo pre-replicativo; por tanto, la inhibición de Cdk2 inhibe la formación de nuevos orígenes de replicación (Kastan and Bartek 2004).

1.4.2.4.3 Punto de control G2/M

El punto de control de la fase G2 previene la entrada prematura de la célula en mitosis; es el punto de control más firme del ciclo celular. La célula se asegura que la replicación se ha completado correctamente y la célula está preparada para la entrada en mitosis.

En este punto se induce la activación de la vía de ATM/ATR en respuesta al daño que genera una cascada de señalización e inhibe la acción del complejo Ciclina B-Cdk1, responsable de la transición G2/M. La parada se produce a través de la fosforilación y degradación de la familia de fosfatasa Cdc25 (Cdc25C) que promueven la activación del complejo Ciclina B-Cdk1. Además de la vía de ATM/ATR, existen otros mecanismos inhibidores de la actividad de Cdc25C como la quinasa p38 y las quinasas polo (Plk1 y Plk3) que actúan de forma conjunta junto a la vía de señalización activada por ATM/ATR (Kastan and Bartek 2004). La fosforilación de Cdc25C crea a su vez un sitio de unión para 14-3-3, otra proteína inhibidora (Gardino and Yaffe 2011).

Así mismo, al igual que en la transición G1/S, en el punto de control de G2/M, se induce la síntesis de p21 a través de la activación de p53. La actividad del complejo Ciclina B-Cdk1 es regulada de forma simultánea por la unión de dos dianas transcripcionales además de p21, Gadd45 y 14-3-3, una proteína represora que mantiene el complejo Ciclina-Cdk retenido en el citoplasma. La familia de proteínas inducibles por daño en el ADN y parada de crecimiento 45 (Gadd45, del inglés "The Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45"), que se inducen en respuesta a diferentes tipos de estrés y que participan en la regulación del ciclo celular.

Chk1 y Chk2, inducen además, de forma independiente a la activación de p53, la activación de Wee1, una quinasa nuclear que pertenece a la familia serina-treonina de proteínas-quinasa que promueve la parada del ciclo mediante la inhibición del complejo Ciclina B-Cdk1.

1.4.2.4.4 Punto de control de la mitosis

El último punto de control tiene lugar durante la división celular y se denomina punto de control del huso mitótico (SAC, del inglés, “Spindle assembly checkpoint”). En este punto, la célula comprueba la unión del huso mitótico a los cinetocoros de los cromosomas. La célula detiene el proceso y evita la división celular hasta que todos los cromosomas están adheridos a los microtúbulos del huso mitótico y colocados en posición ecuatorial. La función del SAC, por tanto, es evitar la separación prematura de las cromátidas. De esta forma, evita la formación de células hijas con un genoma alterado y las posibles consecuencias que esto puede tener (Musacchio 2015).

El complejo promotor de la anafase (APC, del inglés, “Anaphase-Promotin Complex”), es un complejo ubiquitina-ligasa que marca proteínas para su degradación y controla la entrada, progresión y salida de la anafase, para permitir la reentrada en la fase G1 (Castro, Bernis et al. 2005). La degradación de la securina a través del complejo APC, permite la liberación y activación de la separasa, otra proteína, que en su forma activa degrada la cohesina de los cinetocoros y permite la separación de las cromátidas hermanas.

El control de la mitosis previene la activación del complejo APC cuando los cromosomas no están correctamente unidos a los microtúbulos del huso mitótico o cuando la tensión necesaria para la división de las cromátidas no es la adecuada (Chang, Zhang et al. 2014).

1.4.3 Endorreplicación

De forma general, la endorreplicación es un bloqueo de la división celular en presencia de un ciclo celular activo: la célula se somete a múltiples fases S en ausencia de mitosis. El resultado es una célula gigante con un único núcleo poliploide (Zielke, Edgar et al. 2013, Gandarillas, Molinuevo et al. 2018).

Participa en el proceso de desarrollo y crecimiento normal de algunos organismos. El aumento de la cantidad de ADN, permite un aumento de la actividad metabólica de la célula. Por otro lado, el aumento del material genético, conlleva también un aumento del tamaño celular; esto puede ejercer una importante función estructural en algunos organismos, cubriendo un área mayor en un corto periodo de tiempo. En otros organismos, este proceso está relacionado con el proceso de diferenciación y especialización celular. Tanto en organismos vegetales como animales, la endorreplicación es un proceso recurrente; las células lo utilizan como parte de un proceso de

diferenciación para realizar una función específica. Por otro lado, este proceso participa en el mantenimiento del equilibrio y la homeostasis celular, frente a situaciones de estrés; puede proporcionar una respuesta al crecimiento en situaciones adversas, en ausencia de división celular. En hepatocitos, por ejemplo, permite la regeneración del órgano pese la pérdida de la integridad del genoma.

La endorreplicación es un programa habitual en casos de catástrofe mitótica tanto en células sanas como en células cancerígenas. (Zielke, Edgar et al. 2013).

Nuestro grupo ha mostrado que los queratinocitos que abandonan la capa basal de la epidermis, sufren una desregulación del ciclo celular, abandonan el ciclo proliferativo e inician uno endorreplicativo (Gandarillas and Freije 2014),(Figura 6).

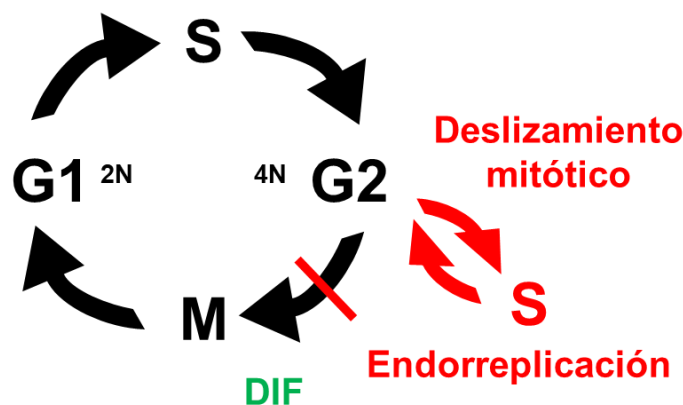


Figura 6. Endorreplicación Las células son capaces de superar el punto de restricción G2/M por un proceso de deslizamiento mitótico o “mitotic slippage”. Consecuencia de ese deslizamiento mitótico las células continúan replicando su ADN en ausencia de división celular. Este proceso se denomina endorreplicación. Gandarillas 2012

La endorreplicación puede tener lugar como consecuencia de un proceso denominado deslizamiento mitótico (MS, del inglés, “mitotic slippage”) (Andreassen and Margolis 1994). La célula, tras un bloqueo extenso en G2/M consigue finalizar el proceso, tras una inactivación prematura de Cdk1 y en presencia de un SAC activo, que impide la división celular y causa MS y endorreplicación (Brito and Rieder 2006, McCloy, Rogers et al. 2014). Este bloqueo defectuoso de la mitosis sugeriría que el control clave de la proliferación en

células que endorreplan se encuentra en la transición G2/M del ciclo celular (Gandarillas 2012).

El proceso de MS responde a una serie de eventos que se suceden en la célula. En respuesta a la desregulación del ciclo celular, se inducen daños en el ADN por estrés replicativo y se activan los puntos de control.

Aunque los mecanismos moleculares que dirigen la endorreplicación no están muy claros, parece haber un cambio en la expresión de algunos reguladores del ciclo celular. Se produce una inactivación de la fosfatasa Cdc25C, de la quinasa Cdk1 así como de las Ciclinas A, B. En queratinocitos, la expresión de la Ciclina E tiene lugar en todas las capas de la epidermis, aunque su expresión es menor en la capa basal y aumenta en las capas suprabasales. Por el contrario, la expresión de la Ciclina A y B se produce en la capa basal y se pierde en capas superiores. Esta pérdida en la expresión de Ciclina A y B, coincide con un aumento en la expresión de queratinas típicas de diferenciación terminal como la K1 y K10 en las capas suprabasales de la epidermis (Zanet, Freije et al. 2010). La endorreplicación indica un punto de unión entre la proliferación y el proceso de diferenciación terminal a través de la mitosis, que puede actuar como mecanismo antioncogénico o de defensa.

Nuestro grupo ha descrito la endorreplicación en la epidermis como un mecanismo de coordinación entre la proliferación y la diferenciación celular (Gandarillas, Molinuevo et al. 2018). En este modelo, los queratinocitos que abandonan la capa basal, continúan replicando su ADN a medida que migran por las capas superiores de la epidermis, en ausencia de división celular (Gandarillas and Freije 2014, Gandarillas, Molinuevo et al. 2018). La replicación en ausencia de división celular, induce un aumento de la dotación cromosómica, dando lugar a células poliploides con un mayor contenido en ADN ($>4N$). Dentro de las capas diferenciadas de la epidermis, se ha encontrado una gran proporción de estas células poliploides (Zanet, Freije et al. 2010).

Este proceso puede ser importante en la formación de estructuras epidérmicas más robustas y compactas. La formación de células de mayor tamaño les permite ocupar una misma superficie con un menor número de divisiones, disminuyendo así el número de espacios intercelulares. Así mismo, la replicación del ADN, permite una mayor producción de ARN y proteínas necesario para el mantenimiento de esas células diferenciadas (Freije, Ceballos et al. 2012). La ausencia de división celular evita la transmisión de posibles mutaciones a otras células hijas así como su eliminación a través de las capas superiores de

la epidermis mediante un proceso de diferenciación terminal (Freije, Molinuevo et al. 2014). La endorreplicación se ha descrito en más tipos celulares además de los queratinocitos, como hepatocitos (Hoffmann, Piasecki et al. 1989), células del endometrio (Kirk and Clingan 1980) así como en células de *Drosophila* (Edgar and Orr-Weaver 2001).

1.4.4 Control Mitosis-Diferenciación.

En la epidermis existe un fuerte equilibrio entre la proliferación celular y la diferenciación terminal para el mantenimiento de la homeostasis del tejido. En nuestro laboratorio se ha descrito un mecanismo que controla este equilibrio; se ha denominado Control Mitosis-Diferenciación (Gandarillas and Freije 2014)(CMD). La piel normal lo utilizaría como un mecanismo de eliminación de células precancerosas que poseen daños irreparables (Gandarillas, Molinuevo et al. 2015).

En respuesta a una parada prolongada de las células en la transición G2/M del ciclo celular, se activa este CMD y se desencadena el proceso de diferenciación terminal de los queratinocitos. Este punto de control responde tanto a la desregulación de la fase S, que produce daño en el ADN debido a errores de replicación, como a causas exógenas que inducen daño en el ADN (Gandarillas 2012, Freije, Molinuevo et al. 2014) (de Pedro et al, no publicado).

La desregulación de la fase S, puede deberse a alteraciones oncogénicas como la sobreexpresión de Myc o de Ciclina E (Zanet, Freije et al. 2010, Freije, Ceballos et al. 2012). Myc es un factor de transcripción, que se encuentra sobreexpresado en numerosos tipos de cáncer; en condiciones normales promueve el inicio y la progresión del ciclo celular, activando la expresión de proteínas esenciales del punto de control G1/S, como E2f, Cdk2, Cdk4, Cdk6, Ciclina D y Ciclina E (Bouchard, Staller et al. 1998, Eilers and Eisenman 2008). Además, actúa como represor de algunos inhibidores de Cdks como p21 o p27 (Claassen and Hann 2000, Shen, Klein et al. 2000). La Ciclina E tiene un papel en la replicación del ADN durante la transición G1/S del ciclo celular (Lim and Kaldis 2013). La sobreexpresión de Myc o Ciclina E, ambos con un papel en proliferación celular, inducen una activación del CDM y desencadenan el proceso de diferenciación terminal (Gandarillas and Watt 1997, Zanet, Freije et al. 2010, Freije, Ceballos et al. 2012). Esto es debido a una desregulación del ciclo y un acumulo de daño en el ADN generado como consecuencia del estrés de replicación. En respuesta a ese daño, se induce la activación del punto de control de G2/M.

La parada prolongada en ese punto, induce la activación del CMD y desencadena el proceso de diferenciación terminal de queratinocitos, en presencia de un SAC activo.

Así mismo, el bloqueo de la división celular, a través de la inhibición de Cdk1 (Ciclina B-Cdk1), de alguno de los componentes del punto de control de la división celular (Polo-like quinasa 1 (Plk1) o Aurora B), o el daño genotóxico generado en el ADN por el uso de drogas (doxorubicina, bleomicina;(Zanet, Freije et al. 2010, Freije, Ceballos et al. 2012, Sanz-Gomez, Freije et al. 2018) activan este CDM y desencadenan el proceso de diferenciación terminal, provocando un aumento del tamaño celular y diferenciación epidermoide.

Este proceso sugiere la existencia de una respuesta a diferenciación inducida por oncogenes (OID; del inglés, “Oncogene-Induced Differentiation response”), análoga a la respuesta a apoptosis o senescencia en otros sistemas y que protege la epidermis de alteraciones oncogénicas (Gandarillas 2012, Gandarillas, Molinuevo et al. 2015). Este OID evita la proliferación y división de células potencialmente peligrosas, que posean algún tipo de mutación o alteración oncogénica y que puedan desencadenar un proceso tumoral, mediante la activación de un proceso de diferenciación terminal e irreversible (Gandarillas 2012, Gandarillas, Molinuevo et al. 2015).

Este CMD no sólo mantendría la homeostasis celular en respuesta a alteraciones oncogénicas, también intervendría en condiciones hiperproliferativas como la psoriasis (Gandarillas and Freije 2014) y explicaría el compromiso hacia la diferenciación de las células TAC, tras las rondas (5-6) de proliferación activa. Estas TAC acumularían errores por estrés de replicación, provocando una activación del CMD y activando el programa de diferenciación terminal.

Para iniciar un proceso tumoral, serían necesarias alteraciones adicionales implicadas en el control del ciclo celular y la interrupción del CMD. Además, se ha visto que una respuesta ineficaz al estrés de replicación induce un aumento de la inestabilidad genómica y una progresión del carcinoma escamoso epidermoide (Alonso-Lecue, de Pedro et al. 2017).

1.4.5 Regulación de Cdk1

Cdk1 es una proteína, serina/treonina quinasa, codificada por el gen CDK1, de pequeño tamaño y compuesta principalmente por dos estructuras lobuladas. El lóbulo N-terminal posee hélices tipo beta, mientras que el lóbulo C-terminal posee una única hélice alfa, la hélice C, que en Cdk1 posee la secuencia PSTAIRE. Entre las estructuras lobuladas, encontramos el sitio activo de la enzima (Malumbres 2014).

La unión de la Ciclina al sitio activo de la quinasa, induce un cambio conformacional por el que la secuencia PSTAIRE es reorientada. Este cambio abre el dominio quinasa activo de la enzima. Para la activación completa se necesita además la inactivación del bucle T (T-loop). Este bucle T inactiva el sitio catalítico de Cdk hasta que es fosforilado por una quinasa activadora (CAK, del inglés, “Cdk Activating Kinase”). CAK es una proteína trimérica que fosforila el bucle T, generando un movimiento que favorece el contacto entre el sitio activo de Cdk1 y las Ciclinas e induce un aumento de la afinidad de esta quinasa por las Ciclinas (Enserink and Kolodner 2010). A lo largo del ciclo celular, Cdk1 se une a la Ciclina A durante la transición G2/M y a la Ciclina B durante el proceso de división celular.

Cdk1 es la única quinasa capaz de unirse a Ciclina B y permanece inactiva a través de la fosforilación de Wee1 en la Tirosina 15 y en la Treonina 14 por Myt1. Ambas proteínas son fosforiladas e inactivadas a su vez por Cdk1, en un sistema de retroalimentación negativa (Brown, Korolchuk et al. 2015). El complejo Ciclina A-Cdk1 promueve la inactivación de Wee1 para debilitar el circuito de retroalimentación negativa y preparar la entrada en mitosis a través de la Ciclina B. Además, estimula la acción de Ciclina B participando en la rotura de la envuelta nuclear (Deibler and Kirschner 2010). La quinasa polo (Plk1) también induce la activación del complejo Ciclina B-Cdk1 a través de la defosforilación (activación) de Cdc25C, una fosfatasa que activa Cdk1 eliminando fosforilaciones inhibitorias e inhibiendo la acción de Wee1. Previo a la mitosis, Cdc25C permanece secuestrada en el citoplasma por la acción de 14-3-3 (Lee, Kumagai et al. 2001). 14-3-3 es una familia de proteínas, que se unen a otras proteínas de señalización y regulan numerosas vías. Destaca 14-3-3 σ , denominado *estratifina*, por su presencia en epitelios estratificados y que está directamente implicada en cáncer

Una vez activado el complejo Ciclina B-Cdk1, se produce la translocación al núcleo. Durante la interfase, la Ciclina B puede situarse de forma indistinta en el núcleo o el citoplasma; durante la mitosis, es necesaria la fosforilación en su secuencia de retención citoplasmática (CRS, del inglés, “Cytoplasmic Retention Sequence”) así como una

inactivación de la señal de exportación del núcleo (NES, del inglés, “Nuclear Export Sequence”). La autofosforilación de Ciclina B-Cdk1 en el centrosoma induce su translocación al núcleo; esto genera una mayor activación del complejo a través de un sistema de retroalimentación positiva (Gavet and Pines 2010). Este mecanismo asegura una entrada en mitosis una vez el complejo esté activo.

Cdk1 se acumula a lo largo de toda la fase de síntesis y se activa al final de la fase S (Brown, Korolchuk et al. 2015). La síntesis de Ciclina B se produce al final de la fase S y comienzo de G2 (Pines and Hunter 1989). El complejo Ciclina B-Cdk1 se detecta en los centrosomas indicando el inicio de la mitosis, pero es necesaria además la señal del complejo Ciclina A-Cdk2 para que se produzca el inicio del proceso (Deibler and Kirschner 2010). La actividad del complejo Ciclina B-Cdk1 finaliza al comienzo del proceso de anafase como consecuencia de la ubiquitinación de la Ciclina A y B y la posterior degradación a través de la ubiquitina ligasa E3 del complejo APC (Clute and Pines 1999).

Algunos autores destacan el papel de Cdk1 como la única quinasa esencial, capaz de sustituir y compensar la ausencia del resto de quinasas que actúan a lo largo de los distintos puntos de control del ciclo celular (Santamaria, Barriere et al. 2007, Brown, Korolchuk et al. 2015). En ausencia de Cdk2, Cdk1 es capaz de ralentizar el ritmo del ciclo durante la transición G1/S (Satyanarayana and Kaldis 2009).

1.4.6 Papel de Wee1 en el ciclo celular

Wee1 es una tirosina quinasa que participa en la transición G2/M del ciclo celular, induciendo una parada del ciclo en respuesta al daño generado en el ADN (Matheson, Backos et al. 2016). La unión de esta proteína a la quinasa Cdk1 del complejo Ciclina B-Cdk1 induce el bloqueo del ciclo celular en ese punto. Wee1 se une a Cdk1 en la Treonina 161 (Thr161; unión activante) y en la Treonina 14 y la Tirosina 15 (Thr14 y la Tyr15; uniones inactivantes). Además, participa en la regulación de la síntesis de ADN durante la fase S del ciclo celular, mediante la fosforilación en la Tyr15 de Cdk2.

Wee1, está regulada por la asociación con otras proteínas como 14-3-3 (Lee, Kumagai et al. 2001). Durante la interfase, Wee1 es fosforilada, favoreciendo la unión de 14-3-3, que aumenta su actividad catalítica. Durante la mitosis, disminuye la interacción entre estas dos proteínas, reduciendo así la actividad catalítica de Wee1 (Hermeking 2003).

Durante la transición G2/M, participa en la reparación del daño generado en el ADN y la continuación del ciclo celular. ATM y ATR inducen la activación de Chk1 a través de su fosforilación; Chk1 a su vez, induce la fosforilación de Wee1 y Cdc25C que promueve la activación de Wee1 y la inactivación de Cdc25C. Wee1 ya activada, se une a la Tyr15 de Cdk1, inactivando el complejo Ciclina B-Cdk1 y dando lugar a un arresto del ciclo que permita la reparación del ADN. Además, hay evidencias de la participación de Wee1 en la regulación de Cdk2 durante el proceso de replicación del ADN y en el mantenimiento de las horquillas de replicación. Wee1 fosforila e inactiva el complejo Ciclina E-Cdk2, que participa en la replicación del ADN durante la fase S. En ausencia de Wee1, Cdk2 permanece activo, induciendo una pérdida de control en los orígenes de replicación del ADN y la formación de estructuras aberrantes de ADN.

Wee1 está sobreexpresado en algunos tipos de cáncer y esto se relaciona con un peor pronóstico (Do, Doroshov et al. 2013). El punto de control de la fase G1 de las células tumorales suele ser defectuoso y las células son capaces de superarlo a pesar del daño no reparado; la ausencia de Wee1, permite a estas células tumorales superar un segundo bloqueo que permite la progresión del ciclo a través de la transición G2/M, a pesar del daño no reparado. Este proceso generalmente finaliza en un proceso de muerte celular.

Wee1 participa en el proceso de apoptosis en algunos tipos de cáncer, como el carcinoma hepatocelular; se observa un aumento del número de células apoptóticas en respuesta a la sobreexpresión de TGF β . La ausencia de Wee1 ligado al aumento de la actividad de Cdk1, induce un aumento del número de células apoptóticas por TGF β . Se desconocen los mecanismos por los que se rige este proceso.

La actividad de Wee1 se relaciona también con la diferenciación celular, en algunos tipos celulares; participa en esta respuesta durante la transición G2/M. Los niveles de la proteína aumentan tras la inducción de la diferenciación y participan en el bloqueo previo a la entrada en mitosis, favoreciendo el proceso de diferenciación (Van Oudenhove, Grandy et al. 2016).

1.4.7 Papel de p21

p21 actúa como supresor tumoral y su mutación no es muy común en cáncer (Romanov and Rudolph 2016); Sus funciones están asociadas al control del ciclo celular, la diferenciación o el proceso de renovación de células madre (El-Deiry 2016).

A través de su extremo N-terminal, p21 inhibe los complejos Ciclina-Cdk; de forma particular, es capaz de inhibir esos complejos a través de su unión indirecta a las Cdk mediante un dominio Cy1 bien conservado de unión a Ciclinas (Dotto 2000). Posee un dominio Cy2 menos conservado en su extremo C-terminal con la misma función que Cy1. A través de estos dominios, p21 es capaz de inhibir la unión a las Cdk de distintos sustratos como p107, p130, proteínas de la familia de retinoblastoma y Cdc25C.

El extremo C-terminal está menos conservado; p21 a través de su extremo C-terminal, es capaz de inhibir la replicación del ADN mediante su unión a PCNA (del inglés, "Proliferating Cell Nuclear Antigen"), una subunidad de la ADN polimerasa (Sherr and Roberts 1999, Abbas and Dutta 2009). Además del control de los complejos Ciclina-Cdk y PCNA, p21 participa en la regulación de la interacción de otras proteínas (Dotto 2000).

1.4.7.1 Actividad p21 en el ciclo celular

p21 ejerce una regulación importante del ciclo celular a través de la inhibición de los complejos Ciclina-Cdk a través de su unión a Cdk2 y Cdk1 durante las distintas fases del ciclo (Figura 7). Durante la fase G1 del ciclo celular, inhibe el paso de la transición G1/S; por otro lado promueve la activación de los orígenes de replicación de algunas proteínas implicadas en la fase S (Abbas and Dutta 2009).

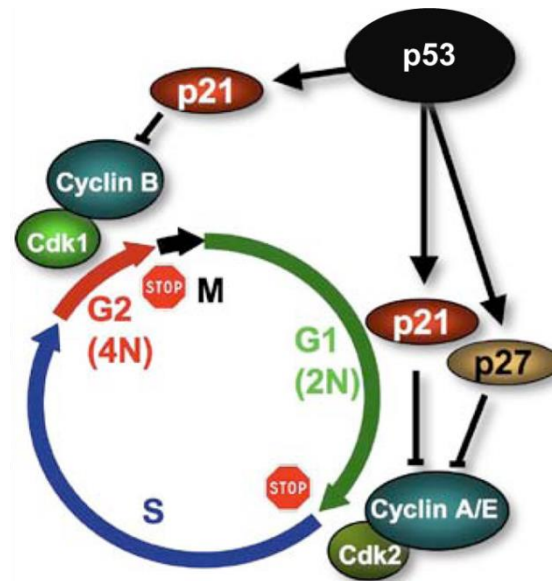


Figura 7. Regulación de p21 Inhibidor del ciclo celular que actúa a nivel de la transición G1/S y G2/M a través de su unión a los complejos Ciclina-Cdk. Es la principal diana transcripcional de p53, que se activa en respuesta al daño en el ADN. Adaptado de Taieb F., et al; 2011

pRb en su forma activa (hipofosforilada) bloquea la entrada en la fase S a través de la inhibición del factor E2f e inhibe la proliferación y el crecimiento celular (Weinberg 1995). Los complejos Ciclina D-Cdk4/6 y Ciclina E-Cdk2 que participan durante esta fase, inducen la inactivación de pRb y permiten la liberación del factor E2f, implicado en la transcripción de numerosos genes que participan durante la fase S del ciclo celular (Brugarolas, Bronson et al. 1998). Así mismo, pRb actúa como supresor tumoral e induce la activación de p21 en respuesta al daño en el ADN.

Existe una correlación positiva entre los niveles de p21 y pRb. La activación de p21 es esencial para el mantenimiento del arresto en la fase G1 del ciclo y mantiene pRb activado por un proceso de retroalimentación positiva (Decesse, Medjkane et al. 2001). Hay evidencias que sugieren un papel de pRb y p21 en la salida de mitosis (Lossaint, Besnard et al. 2011).

Algunos autores sugieren una inhibición más eficaz de los complejos Ciclina-Cdk implicados en las fases G1 y S respecto del resto de fases del ciclo celular; esto se debe a una mayor afinidad de p21 por Cdk2 respecto de Cdk1, quinasa implicada en la transición G2/M (Harper, Elledge et al. 1995). Los niveles de p21 requeridos para inhibir los complejos Ciclina B-Cdk1 son mucho más altos que los necesarios para inhibir los complejos Ciclina-Cdk2 (Harper, Burton et al. 2002). Como consecuencia de esta menor afinidad, muchas

células son capaces de mantener activados los complejos Ciclina B-Cdk1, provocando un fallo en el bloqueo del punto de control G2/M (Bunz, Dutriaux et al. 1998, Maeda, Chong et al. 2002). La incapacidad de mantener el bloqueo, provoca la entrada prematura en mitosis. En estos casos, la mitosis es defectuosa y la proporción de células con una dotación cromosómica $>4N$ es mayor a lo esperado, si la mitosis hubiese llegado a término (Taylor and Stark 2001).

1.4.7.2 Regulación de p21

p21 se ha descrito tradicionalmente como un factor de transcripción diana de p53, una vía que se activa en respuesta al estrés de replicación y al daño en el ADN. Sin embargo se han descrito además otras rutas de actuación de p21, donde su regulación es independiente de p53 (Das, Pintucci et al. 2000).

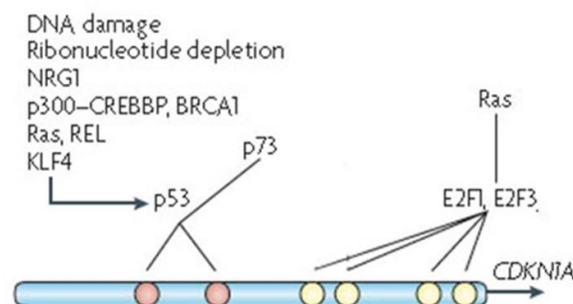


Figura 8. Vías independientes de p53. Ras activa la transcripción de Cdk1 a través de mecanismos dependientes e independientes de p53. <http://slideplayer.com/slide/10633395/>

La transactivación de p21, independiente de la activación de p53, puede inducirse en respuesta a distintos receptores nucleares como los de retinoides, los de vitamina D o los de andrógenos. La activación a través de la inducción de calcio, es otro de los mecanismos de regulación de la proteína, de forma independiente de p53 (Schmidt, Goebeler et al. 2000).

Existe una regulación importante de p21 a través de la vía de HRAS-Raf-MAPK (Abbas and Dutta 2009)(Figura 8). La vía de las MAPK (proteínas quinasa activadas por mitógenos, del inglés, "Mitogen-Activated Protein Kinases) es una ruta de transducción de señales a

través de los receptores tirosina quinasa. Esta ruta juega un papel fundamental en la proliferación celular y su desregulación influye en el desarrollo de algunos tipos de cáncer epitelial. La activación de esta ruta tiene un papel relevante como supresor tumoral. La inducción de p21 a través de esta ruta, induce una parada del ciclo celular y participa del proceso de diferenciación celular (Das, Pintucci et al. 2000).

1.4.7.3 Funciones p21

El control del ciclo celular, depende de muchos factores, entre ellos p21. Además del papel en la regulación de la progresión del ciclo celular, esta proteína tiene otras funciones celulares.

1.4.7.3.1 Papel de p21 en apoptosis

p21 puede proteger de la apoptosis en respuesta a distintos estímulos como la inhibición de los factores de crecimiento o la sobreexpresión de p53. Este proceso es independiente de la progresión del ciclo celular y depende de la interacción directa con otras proteínas, inhibiendo la acción de algunas proteínas pro-apoptóticas como las caspasas (Abbas and Dutta 2009).

p21 participa en la activación de algunos genes como E2F, NFK β o MYC, implicados en la regulación de la apoptosis. Se ha descrito el papel de Myc como inhibidor de p21; existen evidencias que determinan la inducción de la apoptosis a través de la acción inhibitoria de Myc sobre p21 (Karimian, Ahmadi et al. 2016). En muchos tipos celulares Myc, está directamente implicado en el proceso de apoptosis; sin embargo, en nuestro laboratorio se ha visto que este factor de transcripción tiene un papel importante en diferenciación de queratinocitos (Gandarillas and Watt 1997, Gandarillas 2000, Zanet, Pibre et al. 2005, Freije, Ceballos et al. 2012). Otros autores también han descrito un papel de Myc en diferenciación de queratinocitos (Arnold and Watt 2001, Waikel, Kawachi et al. 2001, Dakic, DiVito et al. 2016).

1.4.7.3.2 Papel de p21 en senescencia

La senescencia celular es un mecanismo antioncogénico en el que las células detienen su crecimiento de forma permanente, incluso en respuesta a señales mitogénicas (Velarde and Demaria 2016). Este proceso antitumoral se induce en respuesta a oncogenes, al acortamiento de los telómeros y el daño inducido en el ADN (Georgakilas, Martin et al. 2017). Hay datos que evidencian la participación de p53 en este proceso y por tanto, de algunas de sus principales dianas como p21 (Serrano, Lin et al. 1997). Las células senescentes se caracterizan por la expresión elevada de algunos inhibidores del ciclo celular, como p21 (Velarde and Demaria 2016).

El bloqueo del crecimiento en las células senescentes comienza con la inducción de p53. En respuesta a la senescencia replicativa, se estabiliza la proteína a través de la degradación de Mdm2. p53 activa p21, que inhibe los complejos Ciclina-Cdk e induce la parada del ciclo celular. Por otro lado, p21 regula la senescencia también a través de un mecanismo basado en ROS (especies reactivas de oxígeno (ROS), del inglés, “Reactive Oxigene Species”), independiente de la expresión de p53 y de la función de p21 en su unión a PCNA y a los complejos Ciclina-Cdk (Georgakilas, Martin et al. 2017).

1.4.7.3.3 Papel de p21 en diferenciación

La diferenciación celular es un proceso de especialización, mediante el cual las células adquieren determinadas características que les permiten realizar funciones específicas. Como he comentado previamente, p21 posee un papel importante en la diferenciación epidérmica; además de queratinocitos, esta proteína participa en el proceso de diferenciación de otros tipos celulares como adipocitos, monocitos y megacariocitos (Baccini, Roy et al. 2001, Roninson 2002, Inoue, Yahagi et al. 2008). Los megacariocitos sufren un proceso de mitosis abortiva (endomitosis) durante la diferenciación; esto implica un aumento del número de células poliploides. Los niveles de p21 son altos durante este proceso de diferenciación megacariocítica, sugiriendo una participación directa de la proteína en el proceso.

Otros resultados muestran que la sobreexpresión de p21 induce la poliploidización de los núcleos en megacariocitos (Baccini, Roy et al. 2001). La sobreexpresión de esta proteína en otros tipos celulares también conduce a la poliploidización, favoreciendo la endorreplicación (Niculescu, Chen et al. 1998).

1.4.7.3.4 Papel en transcripción

Además del control del ciclo celular a través de la regulación de los complejos Ciclina-Cdk, p21 posee un papel modulador de la transcripción (Dotto 2000). Una de las vías más importantes por la cual p21 regula el crecimiento celular, es la vía pRb-E2f (Sherr and Roberts 1995), que permite mantener pRb en su forma hipofosforilada (activa) y evita la liberación del factor E2f. Resultados más recientes, sugieren un control de p21 en la actividad de E2f, a través de la unión directa entre esta proteína y el factor de transcripción. p21 actúa como modulador de la transcripción de forma independiente de los complejos Ciclina-Cdk (Dotto 2000) durante las fases S y G2 del ciclo celular, ya que pRb está presente durante la progresión de la fase G1 y además, existen numerosas evidencias que determinan un papel importante de p21 en la progresión de la transición G2/M del ciclo celular (Delavaine and La Thangue 1999).

1.4.7.4 p21 en cáncer

A pesar de su papel como inhibidor de la proliferación celular y su capacidad para inducir diferenciación, senescencia y apoptosis, hay estudios que sugieren que p21 puede tener un papel en oncogénesis (Abbas and Dutta 2009).

p53, el principal regulador de p21, se encuentra mutado en más del 50% de los casos de cáncer. p21 raramente se encuentra mutado aunque en presencia de p53 mutado, su expresión se reduce notablemente (Elbendary, Cirisano et al. 1996). Cuando se encuentra en el núcleo, la proteína puede actuar como un supresor tumoral limitando la proliferación celular, inhibiendo la progresión del ciclo celular a través de los complejos Ciclina-Cdk y activando las vías de reparación del ADN.

Existen evidencias de este papel como supresor tumoral, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. En ausencia de p53, las células pueden adquirir propiedades oncogénicas: inhibiendo la apoptosis, facilitando la migración celular y promoviendo la movilidad y la proliferación celular (Abbas and Dutta 2009, Georgakilas, Martin et al. 2017). A pesar de no responder frente a todas las actividades supresoras de p53, p21 es el principal protector antitumoral mediado por la vía de p53 (Abbas and Dutta 2009).

La actividad oncogénica de p21 está relacionada con su localización citoplasmática. La presencia de la proteína en el citoplasma es un rasgo común en tumores malignos y está ligado a tumores con peor pronóstico (Abbas and Dutta 2009). Tanto la sobreexpresión de

p21 como su presencia citoplasmática, está asociado a un mal pronóstico en tumores malignos de piel y otros órganos como el páncreas, la mama, la próstata, el ovario y el cuello uterino y el cerebro (Romanov, Pospelov et al. 2012). La acumulación de p21 en el citoplasma inhibe proteínas relacionadas con la apoptosis y promueve la supervivencia celular. En el cáncer de mama, la vía de PKB, a través de AKT, fosforila la Thr141 del sitio de unión a PCNA e induce el acúmulo de p21 en el citoplasma (Abbas and Dutta 2009, Romanov, Pospelov et al. 2012). La fosforilación y acúmulo en el citoplasma de AKT y p21, están relacionado con una menor supervivencia de los pacientes con cáncer de mama y puede ser utilizado como un valor pronóstico.

1.4.7.5 Papel de p21 en queratinocitos

Se ha propuesto que p21 tiene un papel pivote en el proceso de crecimiento y diferenciación de queratinocitos (Missero, Calautti et al. 1995, Missero, Di Cunto et al. 1996, Topley, Okuyama et al. 1999). Distintos autores y también nuestro Grupo, han mostrado, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, que la expresión de p21 es importante para la diferenciación epidérmica (Missero, Di Cunto et al. 1996, Deyan, Nguyen et al. 2006, Abbas and Dutta 2009). Queratinocitos procedentes de ratones knock-out (KO) para p21, muestran un aumento de la capacidad proliferativa (Missero, Di Cunto et al. 1996). Al igual que en otros tejidos, la expresión de p21 en la epidermis se induce al inicio del proceso de diferenciación (Missero, Calautti et al. 1995, Topley, Okuyama et al. 1999) contribuyendo a la parada del ciclo celular; sin embargo, algunos trabajos sugieren que la acción de esta proteína no es esencial durante el desarrollo del proceso (Missero, Di Cunto et al. 1996) pero parece clave en el mantenimiento del equilibrio entre las células madre y las TAC, que son las células comprometidas a diferenciar, limitando así el número de células con alta capacidad proliferativa y restringiendo el número de queratinocitos (Okuyama, LeFort et al. 2004). El equilibrio entre las células madre y TAC está controlado por la vía de Notch; la expresión endógena de la proteína es necesaria para la inducción de p21 en queratinocitos primarios en diferenciación, así como de algunos marcadores del inicio de la diferenciación. Notch activa p21 a través de la proteína RBP-Jκ, que se une directamente al promotor de p21 (Rangarajan, Talora et al. 2001, Okuyama, LeFort et al. 2004). Experimentos realizados en ratones recién nacidos muestran, en ausencia de la expresión de Notch, una epidermis más fina, así como un aumento de la expresión de Ki67, un marcador de proliferación. Resultados en nuestro laboratorio sugieren que la inducción

transitoria de p21 se produce en las TAC, las células comprometidas a diferenciar, respecto de las células madre (Dazard, Piette et al. 2000, Freije, Ceballos et al. 2012).

Al final de la diferenciación, se observa una bajada drástica de la expresión de la proteína (Topley, Okuyama et al. 1999). Sin embargo y paradójicamente, la sobreexpresión de p21, también provoca la inhibición de la diferenciación epidérmica (Missero, Di Cunto et al. 1996, Di Cunto, Topley et al. 1998, Topley, Okuyama et al. 1999).

Debido a todos los resultados descritos, existe consenso en que p21 es clave para la toma de decisión del queratinocito hacia la diferenciación epidermoide. Sin embargo, los mecanismos de esta función, aparentemente paradójica, es aún desconocida.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos propuestos al inicio de esta tesis doctoral era conocer el papel de los reguladores de la quinasa mitótica Cdk1 y su implicación en la regulación del punto de control descrito previamente y denominado “Control Mitosis-Diferenciación”. Este mecanismo de control induce un proceso de diferenciación terminal, que mantiene la homeostasis celular y evita la formación de un proceso tumoral en respuesta al daño inducido en el ADN.

Objetivo 2.1

Analizar las alteraciones del Control Mitosis-Diferenciación (CMD) en el carcinoma epidermoide de piel. ANEXO I

Objetivo 2.2

Analizar el Control Mitosis-Diferenciación (CMD) en respuesta a dosis moderadas (subletales) de radiación ultravioleta (UV).

Objetivo 2.3

Analizar el papel de los reguladores de Cdk1 en el Control Mitosis-Diferenciación (CMD).

2.3.1 Papel de p21 en el CMD

2.3.1.1 Papel de p21 en el CMD en respuesta al estrés de replicación en ausencia de p53.

2.3.1.2 Análisis del ciclo celular de queratinocitos en ausencia de p21 y p53.

2.3.1.3 Respuesta al daño en el ADN causado por estrés de replicación tras la pérdida de p53 y p21.

2.3.2 Papel de Wee1 en el CMD

2.3.2.1 Papel de Wee1 en ausencia de p21 en el CMD

Objetivo 2.4

Analizar el papel de los reguladores de Cdk1 en respuesta a la radiación ultravioleta (UV).

MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 CULTIVOS CELULARES

Las biopsias procesadas, fueron utilizadas previo consentimiento escrito y tras la obtención de los permisos éticos, aprobados y consentidos por el comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria. Las muestras se trataron siempre de forma anónima.

Los queratinocitos se obtuvieron a partir de biopsias de prepucio de pacientes pediátricos y fueron aislados según un protocolo descrito previamente (Rheinwald 1989; Gandarillas & Watt 1997). Se cultivaron en condiciones de alto calcio ($1,2\text{mM Ca}^{2+}$) sobre una capa de fibroblastos de ratón (J2-3T3, inactivados previamente con mitomicina C, $6\mu\text{g/ml}$. (Sigma-Aldrich; ref. M0503) denominados *feeders* y se mantuvieron en medio FAD (DMEN/Ham's F12 (3:1 v/v); DMEN: Dulbecco's Modified Eagle Medium. Lonza; ref. BE12-604F. Ham's F12 Medium. Lonza; ref. BE12-615F). Este medio FAD está completado con: 10% suero bovino fetal (SBF. Lonza; ref. DE14-801F), $0,5\text{ng/ml}$ hidrocortisona (Sigma-Aldrich; ref. H0888), $0,01\text{ng/ml}$ factor de crecimiento epidérmico (FCE. Sigma-Aldrich; ref. E9644), $0,08\text{ng/ml}$ cólera toxina (Sigma Aldrich; ref.C8052), $1,8 \times 10^{-4}$ adenina (Sigma-Aldrich; ref. A2786), $5\mu\text{g/ml}$ insulina (Sigma Aldrich; ref. I5500), 2mM L-glutamina (Lonza; ref. BE17-605E), $0,75\text{mM}$ sodio piruvato (Lonza; ref. BE13-115E), 100U/ml penicilina-estreptomicina (P/S. Lonza; ref. BE17-602E) a una temperatura de 37°C y un 5% de CO_2 . Este medio se renueva 3 veces por semana hasta que los queratinocitos llegan a confluencia.

Para el análisis, recogemos las células en cultivo añadiendo PBS-EDTA ($250\mu\text{M}$. EDTA: Sigma-Aldrich; ref. E7889; PBS:Lonza; ref. BE17-517Q) y mantenemos unos 3 minutos a 37°C ; resuspendemos y eliminamos todos los feeders de la placa. A continuación, añadimos PBS-EDTA y tripsina ($0,25\%$ Tripsina-EDTA. Tripsina: Thermo Fisher Scientific; ref. 25200-056), en proporción 2:1 y mantenemos 15 minutos a 37°C . Resuspendemos con medio FAD para eliminar los agregados celulares y bloquear el efecto de la tripsina, recogemos y contamos en una cámara de Neubauer. Lavamos añadiendo PBS 1x, centrifugamos a 1.000rpm durante 5 minutos y descartamos el sobrenadante. Resuspendemos el pellet de células obtenido en medio FAD y plaqueamos a una densidad de 1×10^6 de células por mililitro.

La mayoría de experimentos de esta tesis se han realizado en condiciones de bajo calcio ($<0,1\text{mM Ca}^{2+}$). Para el cultivo de las células se utilizan dos medios de cultivo distintos: Keratinocyte Growth Medium 2 (Promocell; ref. C-20111), utilizado para el plaqueo de los queratinocitos y Defined Keratinocyte-SFM (DSFM, Gibco; ref. 10744019) para el mantenimiento de las células en cultivo durante el experimento. En estas condiciones, no hay capa de *feeders* y los queratinocitos se pegan directamente a las placas de cultivo. Los queratinocitos se mantienen a una temperatura de 37°C y con un 5% de CO₂.

Durante esta tesis se utilizaron queratinocitos pertenecientes a 5 pacientes distintos (KSH, KSP, KSR, KXS and KSV) y en pases tempranos (de 1 a 4).

3.2 LÍNEAS CELULARES

Durante el desarrollo de la tesis, se han utilizado varias líneas celulares.

- SCC12F, línea celular de carcinoma escamoso. Proviene de un carcinoma escamoso facial de un varón, trasplantado de riñón y en tratamiento con fármacos inmunosupresores 7 días previos a la cirugía de extracción (Rheinwald & Beckett 1981).
- J2-3T3, línea celular de fibroblastos de ratón. Se immortalizan previamente (*feeders*) a ser utilizados como soporte estructural para el cultivo de los queratinocitos primarios y la línea de carcinoma escamoso (SCC) en condiciones de alto calcio.
- HEK-293T, línea celular de células epiteliales humanas de riñón. Se utilizan como células productoras de partículas lentivirales.
- AM12'S, línea de células de leucemia de ratón anfotrópico. Se utilizan como células productoras de partículas retrovirales

El medio de crecimiento y mantenimiento de estas líneas celulares es DMEN con un suplemento del 10% de suero bovino (DONOR. Gibco: ref. 16030074), penicilina-estreptomycin (P/S) y L-glutamina

3.3 CONSTRUCCIONES LENTIVIRALES

Mediante la tecnología de los shRNA (shRNA, del inglés, “short hairpin RNA”), se ha estudiado el efecto de la inhibición de genes implicados en el desarrollo del ciclo celular (tabla), en queratinocitos primarios y la línea de cancer escamoso.

GEN	PROTEÍNA	VECTOR VACÍO	CÉLULAS	TIPO INFECCIÓN
CDKN1A	p21	pLKO1	Queratinocitos	Lentiviral
TP53	p53	pLVHTM-GFP	Queratinocitos	Lentiviral
WEE1	Wee1	pLKO1	Queratinocitos	Lentiviral
CICLINA E	Ciclina E	pLKO1	SCC	Lentiviral

Las HEK-293T son células productoras de partículas lentivirales. Se plaquean el día previo a la transfección (5x10⁵ células por placa de 100mm) y se transfectan al día siguiente al 70% de confluencia aproximadamente, con 3 plásmidos distintos: El plásmido de empaquetamiento (psPAX2, 7,5µg. Addgene; ref. 12260), el plásmido de la envuelta (pCI-VSVG, 3µg. Addgene; ref. 11653) y el plásmido de interés (10µg). El volumen final de la solución con estos 3 plásmidos son 750µl por placa de 100mm. Para la transfección se utiliza JetPAI (VWR, ref. 101-01) un reactivo de transfección disuelto en NaCl 150mM (90µl JetPAI en 660µl de NaCl 150mM, un volumen total de 750µl por placa de 100mm). La solución JetPAI se mezcla con la solución de plásmidos; el volumen final de la solución (1,5ml por placa de 100mm) se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente y se añade a las placas de HEK-293T gota a gota.

Para los experimentos en condiciones de alto calcio, se reemplaza el medio con DMEN 10% DONOR 8 horas después de la transfección y se mantiene toda la noche. Al día siguiente, se reemplaza de nuevo el medio y se añade medio FAD 8 horas antes de la infección. Los queratinocitos se plaquean (4x10⁵ células por placa de 100mm) 6 horas antes de la infección.

En condiciones de bajo calcio, las HEK-293T se incuban durante toda la noche con la solución de transfección y se reemplaza al día siguiente por DMEN 10% DONOR. Tras 8 horas, el medio es sustituido de nuevo con Keratinocyte Growth Medium 2 y se incuba durante toda la noche.

Los queratinocitos en este caso, se plaquean 24 horas antes de la infección (2×10^6 por placa de 100mm).

En ambas condiciones de cultivo, los queratinocitos se infectan con el sobrenadante producido en las HEK-293T (6ml por placa de 100mm). En infecciones dobles, el volumen final de sobrenadante es el mismo que en las infecciones sencillas. En este caso, el sobrenadante de cada construcción se añade en proporción 1:1. Previo a la infección, el sobrenadante se filtra a través de unos filtros de $22\mu\text{m}$ (Millipore; ref. SLGP33RB) y se añade Polibreno ($8\mu\text{g/ml}$; 1/1000; Sigma-Aldrich, ref. H9268), que aumenta la eficiencia de la infección. En condiciones de alto calcio, la infección se produce durante toda la noche (16 horas aproximadamente); en condiciones de bajo calcio, los queratinocitos se infectan durante unas 5 horas. Tras el periodo de infección, se reemplaza el sobrenadante con medio FAD (alto calcio) y DSFM (bajo calcio).

3.4 CONSTRUCCIONES RETROVIRALES

Las células derivadas del carcinoma escamoso (SCC) denominada SCC12F, fueron infectadas por retrovirus que contenían el plásmido control (pBabe puro) y con el plásmido que contenía la información para la sobreexpresión de la Ciclina E (pBabe-GFP-Ciclina E), construido para expresar la proteína fusión GFP-Ciclina E en queratinocitos normales a partir de pBabe-li-GFP y pBabe-Ciclina E, descrito previamente (Freije et al, 2012).

Las AM12'S se infectan con los vectores retrovirales y se mantienen hasta confluencia. Se tratan con Mitomicina C durante 2 horas y se siembran las SCC12F en co-cultivo. Dos días después, se retiran las AM12'S y se sustituyen con feeders, previamente inmortalizados; se añade puromicina ($1\mu\text{g/ml}$. Sigma-Aldrich; ref. P8833) para seleccionar las células infectadas ya que el vector retroviral contiene resistencia a la puromicina.

3.5 RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

Para determinar el efecto de la radiación ultravioleta en los queratinocitos, se utiliza un aparato que mide y controla la radiación ultravioleta (UPV CL-1,000 Series UV crosslinker). La luz UVB es emitida por tubos fluorescentes de radiación UV de onda corta (312nm).

Los queratinocitos se plaquean en condiciones de bajo calcio (7×10^5 células por placa de 60mm), se cultivan en DSFM y se someten a dosis bajas (10mJ/cm^2) de UVB cuando están en condiciones de subconfluencia (80-90%). El medio es reemplazado 14 horas previamente a la

irradiación. Antes de irradiar, se hace un lavado y se añade 1,5ml de PBS atemperado por placa de 60mm. Las placas se introducen destapadas y la tapa se coloca también dentro del irradiador. Una vez irradiadas, se elimina el PBS, se añade 4ml de medio DSFM y las placas se introducen de nuevo en el incubador (37°C, 5% CO₂).

El procedimiento de los queratinocitos control es el mismo excepto la irradiación.

3.6 CITOMETRÍA DE FLUJO

Los ensayos realizados durante la tesis doctoral se han analizado en el citómetro Becton Dickinson BD FACS Canto™ cytometer y en el citómetro CytoFLEX (Bectam Coulter). Los resultados se han analizado mediante el software FACSDiva V5.03, ModFit V3.0 y el software CytExpert™ respectivamente. Las muestras se filtran a través de un filtro de 70µm para evitar los agregados celulares. En cada experimento se adquieren 10.000 eventos.

3.7 CICLO CELULAR

3.7.1 Contenido en ADN

De forma general, tras recoger las células en cultivo, se hacen 2 lavados con PBS frío y se centrifuga a 1.000rpm. Para el análisis del contenido en ADN, se fija con etanol 70% (ETOH, Fluka; ref. 02860), para lo cual es necesario agitar vigorosamente las células (al menos 1 minuto) y mantener a 4°C durante al menos 30 minutos.

Para el análisis, se hacen dos lavados de PBS 0,5% FCS y se centrifuga a 2.000rpm durante 5 minutos. El pellet de células obtenido se resuspende en 500µl de una mezcla de PBS (485µl), Ioduro de Propidio (12,5µl; 25µg/ml, Life-technologies; ref. P3566) y RNasa (1,25µl; (100µg/ml, life-technologies; ref. 12091-021).

3.7.2 Replicación del ADN

Las células se tratan con Bromodesoxyuridina (BrdU, 10Mm, Sigma-Aldrich; ref. B5002). Las células tratadas con BrdU se recogen 5 horas después, se lavan con PBS frío y se centrifugan a 1.000rpm. La fijación se realiza en etanol 70%, siguiendo el protocolo utilizado para el estudio del ciclo celular.

Para el análisis, las células fijadas se lavan con un tampón de lavado (PBS, 5% FBS, 0,5% Tween 20, Sigma-Aldrich; ref. P1379) y se centrifugan a 2.000rpm durante 5 minutos a 4°C. El procedimiento de fijación y análisis es el mismo para las células no tratadas con BrdU (control). Tras la centrifugación, se elimina el sobrenadante, se añade 2ml de HCl 2M (Merck; ref. 100319) y se mantiene 20 minutos a temperatura ambiente. Se hacen dos lavados con Tetraborato de Sodio 0,1M (NaB_4O_7 , Sigma-Aldrich; ref. 221732), se centrifuga de nuevo a 2.000rpm durante 5 minutos y se añade el anticuerpo anti-BrdU (4µl por muestra, 1 hora a temperatura ambiente). Se hacen dos lavados con el tampón de lavado y se añade el anticuerpo secundario (Alexa Fluor^R 488 anti-mouse IgG) durante 1 hora en oscuridad. De nuevo se hacen dos lavados con el tampón de lavado y se añade el Ioduro de Propidio, tal y como se ha descrito previamente (Freije et al, 2012; modificado para bajo calcio ($<0,1\text{mM Ca}^{2+}$)).

3.8 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Para el análisis de la expresión de distintos marcadores del ciclo celular (Tabla I), las células se recogen y se fijan en etanol 70%, siguiendo el mismo protocolo descrito previamente.

Para el análisis de estos marcadores, se hacen dos lavados con un tampón de lavado (PBS, 5% FCS, 0,5% Tween 20) y se centrifuga a 2.000rpm. Se añade el anticuerpo primario (anti-K1 y anti- γH2AX) 1 hora a temperatura ambiente. Para los controles, se añade la misma concentración de suero de conejo o IgGs de ratón en función de la especie y de la concentración del anticuerpo primario. Se hacen dos lavados con tampón de lavado, se añade el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488 anti-IgG de ratón, Alexa Fluor 488 anti-IgG de conejo) y se incuba durante 1 hora en oscuridad. Se hacen dos lavados de nuevo y se resuspende en PBS.

3.9 INMUNOFLUORESCENCIA

Las células se cultivan sobre cubreobjetos redondos (tamaño). Para la fijación, se elimina el sobrenadante y se hacen dos lavados con PBS frío. Los cristales se fijan en Metanol (OID) a -20°C o en Formaldehído al 3,7% (FHO, ref) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se hace un lavado de nuevo y se mantienen con PBS frío a 4°C.

Para el análisis, se hacen de nuevo dos lavados con PBS frío y un tercer lavado con PBS 0,05% Tween 20 (PBS-Tween). Los cristales fijados en FHO deben permeabilizarse previamente con MEOH durante 5 minutos antes del lavado con PBS-Tween. Se añade 10µl de anticuerpo primario y se incuba en una cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente (Tabla I). Se hacen dos lavados de nuevo con PBS frío y un tercer lavado con PBS-Tween. Se incuban con 10µl de un anticuerpo secundario (Tabla II) durante 1 hora en condiciones de oscuridad. De nuevo se hacen 3 lavados, el último con PBS-Tween. Para la tinción de los núcleos, se añaden 10µl de DAPI (0,2µg/ml. Sigma-Aldrich; ref. D9542) durante 10 minutos en oscuridad. En el caso de dobles marcajes, los anticuerpos primarios se incuban conjuntamente y se revelan con una mezcla de anticuerpos secundarios específicos para cada uno de los anticuerpos primarios. Los cubreobjetos se montan con el medio de montaje prolong Gold antifade (Life-technologies; ref. P36934) sobre un portaobjetos y a continuación se analizan con el microscopio de fluorescencia Zeiss imager D2 con cámara Axio Cam MRn y fuente de fluorescencia HPX 120C Kübler codix.

3.10 ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

Para el análisis de proteínas, se recogen las células, se lavan con PBS y se centrifugan a 12.000rpm durante 30 segundos. Se retira el sobrenadante y el pellet de células se guarda a -20°C.

Para la extracción de proteína se añade un tampón de lisis (150mM NaCl 4M, 50mM Tris 1M pH 8, 20mM NaF 1M, 1% Np40, 1 mM EDTA 0,5M pH 8, 0,2% SDS 10%, 1X de inhibidor de fosfatasas (Thermo; ref. 88667) e inhibidor de proteasas (1:100, Calbiochem; ref. 539131)), se pipetea sobre el pellet de células y se mantiene en hielo durante 10 minutos. El proceso se repite 3 veces y finalmente se centrifuga a 12.000rpm durante 10 minutos. El sobrenadante con las proteínas solubles se mantiene a -80°C; el pellet con las proteínas insolubles se mantiene a -20°C. La cuantificación de la cantidad de proteína se realiza utilizando el sistema de fluorimetría Qubit 4.0 (Life Technologies).

Cada muestra (40-80µg de proteína) se mezcla con el tampón de carga (Tampón Laemli 4x: 100mM Tris-HCl 1M pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 8% β-mercaptoetanol y 0,1% azul bromofenol) y se hierve a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se cargan en un gel de poliacrilamida-SDS (10-14% de poliacrilamida, en función del tamaño de las proteínas) y se someten a un proceso de electroforesis vertical en un Mini-Protean II (Bio-Rad) con un tampón de electroforesis 1x (2,5mM Tris; 19,2mM glicina y 0,1% SDS en agua destilada, pH 8.3 (Bio-Rad; ref.161-0771). Las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa PROTAN® (GE healthcare; ref.10600002) durante 2 horas y 15 minutos a 260mA/cm² o durante 30 minutos a 400mA/cm² para γH2AX u otras proteínas de pequeño tamaño en un tampón de transferencia (2,5mM Tris; 19,2mM glicina, 10% MeOH y 0,01% SDS en agua destilada a pH 8.3).

La membrana con las proteínas ya transferidas, se tiñe con rojo ponceau (0,1% rojo ponceau S (Sigma-Aldrich; ref. P3504), 5% ácido acético glacial (Panreac; ref.141008) en agua destilada)), para detectar las bandas de proteínas. Una vez detectadas, el rojo ponceau se elimina decolorando con NaOH 0,1M (Sigma-Aldrich; ref. S8045) y finalmente se hace un lavado con agua destilada. La membrana se incuba durante una hora con una solución de bloqueo de TTBS-5% leche (TTBS: 120mM NaCl, 20mM Tris 1M pH 7.5, 0,1% Tween en agua destilada). Se prepara el anticuerpo primario en TTBS-5% leche (Tabla I) y se incuba a 4°C durante 12-14 horas ó a temperatura ambiente durante 3 horas. Para γH2AX, el anticuerpo se prepara en una solución 1% BSA en TTBS. Las membranas se lavan 3 veces con TTBS y se incuban con el anticuerpo secundario (Tabla II) preparado igual que el primario (TTBS-5% leche ó 1% BSA) y se mantiene una hora a temperatura ambiente (las muestras reveladas con el sistema Odyssey se incuban además en condiciones de oscuridad). El revelado se realiza mediante el sistema Odyssey Infrared Imaging System (Li-cor) y también mediante el aparato de quimioluminiscencia Fusion solo S (Vilmer Lourmat). En todos los análisis de proteína se utiliza una proteína control; en estos experimentos se utilizan GAPDH o γ-tubulina dependiendo del peso molecular de la proteína de interés.

3.10.1 Análisis de proteínas insolubles

El pellet de proteínas insolubles obtenido tras el proceso de lisis del pellet de células, se somete a un segundo proceso de lisis con un tampón distinto (Achtstaetter y cols 1986), que contiene: 10mM Tris 0.5M pH 8, 5% SDS, 5% β-mercaptoetanol y 4M Urea. Se añade el tampón y se lisa de forma mecánica el pellet con ayuda de una pipeta. Se calienta la mezcla a

95º durante 5 minutos y posteriormente se pasa a través de una jeringa de 10 a 15 veces para completar el lisado del pellet. La cuantificación se realiza mediante el sistema de fluorometría Qubit 4.0 (Life-Technologies). El resto del proceso de análisis es el mismo descrito para proteínas solubles.

3.11 RT-qPCR

3.11.1 Obtención del ARN mensajero (ARNm)

Se recogen las células, se lavan dos veces con PBS frío y se centrifugan a 12.000rpm durante 30 segundos. Se elimina el sobrenadante y el pellet celular se guarda a -20ºC (mismo procedimiento utilizado para el análisis de proteína). Se utiliza el kit de extracción de ARN NucleoSpinR kit (Macherey-nagel). El protocolo aplicado se ajusta fielmente a las especificaciones del fabricante. La cuantificación de las muestras de ARN se realiza mediante la lectura de su absorbancia a 260nm en un espectofotómetro Gen 5TM con el accesorio para ARN Take 3 micro-volume (Biotek). Para evaluar la integridad del ARN se realiza un gel de electroforesis de agarosa 1% en tampón 0,05% tris-borato-EDTA (TBE. Fisher; ref. T/P050/15) en agua destilada. Se añade 1µg de cada muestra en tampón de carga (1:2 v/v) y se realiza en una cubeta específica para muestras de ARN (Labnet Gel XL ultra) a 100V durante 15 minutos. Las muestras de ARNm se guardan a -80ºC.

3.11.2 Obtención del ADN complementario (ADNc)

A partir del ARNm se obtiene el ADN complementario por retrotranscripción con el kit de síntesis de ADN iScriptTM cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Se utiliza 1µg de cada muestra de ARNm junto a desoxinucleótidos y transcriptasa inversa RNase H+, utilizando hexámeros de oligonucleótidos (random hexamers) como cebadores en un termociclador (Mj mini Bio-Rad). Se introducen las muestras en el termociclador y se realiza la incubación con un protocolo ya establecido (primer paso 5 minutos a 25ºC, segundo paso 30 minutos a 42ºC, tercer paso 5 minutos a 85ºC y una incubación final de 10 minutos a 25ºC). El ADN complementario obtenido se guarda a -20ºC.

3.12 ENSAYOS COMETA

Los ensayos cometa alcalinos se utilizan para el análisis del daño. Permite analizar las roturas de hebra sencilla y de hebra doble del ADN.

Previamente se tratan los portaobjetos con éter-etanol (2:1) durante 1 hora y posteriormente con etanol 70% durante 30 minutos. Se añade agarosa normal sobre los portaobjetos (agarosa 0,5% en PBS; Pronadisa; ref: 8016) y se incuba durante 5 minutos a 65°C.

Por otro lado, se recogen las células en condiciones de oscuridad. Se separan 5.000 células y se resuspenden en 20µl de PBS y 75µl de agarosa de bajo punto de fusión (agarosa 0,5% en PBS; Invitrogen; ref. 15517-014) mantenida a 37°C. Se añade 90µl de la mezcla sobre el portaobjetos preparado con la agarosa normal, se cubre con un cubreobjetos y se incuba durante 10 minutos a 4°C. Se retira el cubreobjetos, se añaden 75µl de agarosa de bajo punto de fusión, se cubre de nuevo y se incuba durante 10 minutos a 4°C.

Se introduce el portaobjetos en una solución de lisis fría que contiene 10% DMSO, 1% Triton X-100 y 89% de tampón de lisis con pH 10 (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, NaOH 200mM) durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, los portaobjetos se incuban en una cubeta de electroforesis con un tampón de electroforesis frío (83% EDTA 0,1M, 17% NaOH 300mM) durante 20 minutos en condiciones de oscuridad y pasado ese tiempo se realiza la electroforesis a 25V durante 20 minutos.

Se lava dos veces con un tampón de neutralización (Tris 400mM; pH 7.5) y se fijan en etanol puro. Se tiñen con Red Safe 1:500 (InTron; ref. 21144).

3.13 ENSAYOS DE CLONOGENICIDAD

Para los ensayos de clonogenicidad se recogen las células, se hacen dos lavados con PBS y se plaquean de nuevo. Para los análisis en condiciones de alto calcio, se plaquean las células en baja densidad (2.500 células) sobre una capa de feeders y en medio FAD; para los análisis en condiciones de bajo calcio, se plaquean las células en una densidad normal ($0,7 \times 10^6$ pocillo T6) en Promocell y se cultivan en DSFM. Se mantienen durante 12-14 días, se fijan con formaldehído 3,7%, se hace un lavado en agua destilada y se tiñe con Rodamina-Nile Blue (1% Rodamine B. Sigma-Aldrich; ref. R6626, 1% NileBlue. Sigma-Aldrich; ref. N5632) (Watt and Jones 1993)

TABLA I. ANTICUERPOS PRIMARIOS

ANTICUERPO	ESPECIE	CASA COMERCIAL	REF			
				WB	FACS	IF
* IgG	Ratón	Sigma-Aldrich	I-5381			
* IgG	Conejo	Sigma-Aldrich	R9133			
53BP1	Conejo	Bethyl	A300-272A	-	-	
BrdU	Mouse	Benton- Dickinson	347580	-	4µl	-
Ciclina A (H432)	Mouse	Santa Cruz	sc-751		-	
Ciclina B (GNS1)	Mouse	Santa Cruz	sc-245		-	
Ciclina E (HE12)	Rabbit	Santa Cruz	sc-247		-	
GAPDH (0411)	Rabbit				-	-
γH2AX	Mouse	Millipore	05-636			
γ-tubulin (GTU-88)	Mouse	Sigma	T6557			
Queratina 1 (K1; AF87)	Rabbit	Palex	PRB-149P	-		-
Queratina 5 (K5; C-terminal)	Rabbit	Sigma-Aldrich	ESAB4501651		-	

Queratina 8 (M20)	Mouse	Sigma-Aldrich	C5301		-	
Queratina 16 (K16)	Mouse	Santa Cruz	sc-53255	-		-
p21	Mouse	Sigma	P1484		-	-
p53 (FL393)	Mouse	Santa Cruz	sc-6243		-	

TABLA II. ANTICUERPOS SECUNDARIOS

ANTICUERPO	ESPECIE	CASA COMERCIAL	REF			
				WB	FACS	IF
Alexa Fluor 488 anti-IgG	Ratón	Jackson ImmunoResearch	115-547003	-	1:100	1:100
Alexa Fluor 488 anti-IgG	Conejo	Jackson ImmunoResearch	111-547003	-	1:100	1:100
DylightTM 594conjugated	Conejo	Jackson ImmunoResearch	111-515047	-	-	1:100
DylightTM 594conjugated	Ratón	Jackson ImmunoResearch	115-517003	-	-	1:100
DylightTM 800conjugated	Conejo	Thermo-Fisher	35571	1:10000	-	-
DylightTM 800conjugated	Ratón	Thermo-Fisher	35521	1:10000	-	-
H+L horseradish peroxidase conjugated	Ratón	Biorad	1706516	1:10000	-	-
H+L horseradish peroxidase conjugated	Conejo	Biorad	1706515	1:10000	-	-

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Alteraciones del Control Mitosis-Diferenciación (CMD) en el carcinoma epidermoide de piel.

Este apartado de la tesis forma parte de un artículo ya publicado (Alonso-Lecue, de Pedro et al. 2017) y del cual soy co-primer autora. Los resultados están recogidos en el ANEXO I.

ANEXO I “Inefficient differentiation response to cell cycle stress leads to genomic instability and malignant progression of squamous carcinoma cells”. Pilar Alonso-Lecue, Isabel de Pedro, Vincent Coulon, Rut Molinuevo, Corina Lorz, Carmen Segrelles, Laura Ceballos, Daniel López-Aventín, Ana García-Valtuille, José M Bernal, Francisco Mazorra, Ramón M Pujol, Jesús Paramio, J Ramón Sanz, Ana Freije, Agustí Toll and Alberto Gandarillas. Cell Death and Disease (CDDis), 2017.

Seguidamente resumo los resultados recogidos en esta publicación.

Nuestra hipótesis inicial era que la activación del Control Mitosis-Diferenciación (CMD) se induce como un mecanismo anti-oncogénico. Por ello pensamos que las alteraciones en el CMD podrían contribuir a la agresividad del carcinoma escamoso (SCC). El objetivo de este trabajo era investigar estas posibles alteraciones en dos líneas derivadas de carcinoma no melanocítico (NMSC). Como he descrito en la introducción, el SCC, es el más agresivo, a pesar de su aspecto diferenciado mientras que el carcinoma basocelular (BCC), es menos agresivo, a pesar de su aspecto proliferativo.

Como se ha descrito en la introducción, la sobreexpresión de la Ciclina E en queratinocitos induce la desregulación del ciclo celular y desencadena la diferenciación escamosa en queratinocitos de piel (Freije, Ceballos et al. 2012). Por ello Pilar Alonso-Lecue analizó el efecto de la sobreexpresión de la Ciclina E en ambas líneas carcinomatosas a través de vectores retrovirales.

Referente a mi trabajo en este apartado, analicé de nuevo la sobreexpresión de la Ciclina E, en la línea de carcinoma escamoso facial humano bien diferenciado (SCC12F). Verifiqué los

resultados obtenidos anteriormente y analicé la capacidad clonogénica de estas células mediante ensayos de clonogenicidad; observé que aquellos cultivos infectados con el vector retroviral para la Ciclina E (CEGFP) mostraban una pérdida de la capacidad clonogénica respecto de los cultivos infectados con el vector vacío (GFP).

Los resultados obtenidos por el laboratorio en respuesta a la sobreexpresión de la Ciclina E, mostraban además un aumento de la señal de γ H2AX en CEGFP respecto del control (GFP). Resultados en colaboración con el Servicio de Dermatología del Hospital del Mar en Barcelona, mostraron también un mayor número de alteraciones cromosómicas en biopsias de pacientes con carcinomas escamosos de tipo metastásico (MSCCs) respecto de pacientes con carcinomas escamosos no metastásicos (NMSCCs) y éstos respecto de pacientes con carcinomas basocelulares (BCCs).

El conjunto de estos resultados sugería que el eje entre Ciclina E y diferenciación escamosa, a través del estrés de replicación y los defectos mitóticos, puede contribuir a la inestabilidad genómica en los SCC.

Pilar analizó la inestabilidad genómica de los BCC y SCC, sometiendo las células a dos bloqueos consecutivos con Nocodazol (Nz); esta droga impide la polimerización de los microtúbulos (Samson, Donoso et al. 1979). Tras dos bloqueos consecutivos con Nz, los SCC12F (SCC12R1Nz) sufrían un proceso de diferenciación sin embargo, conservaban parte de su capacidad proliferativa. Las células capaces de superar ese bloqueo (SCC12R2), mostraban una mayor capacidad clonogénica así como una pérdida del fenotipo escamoso y una expresión citoplasmática de la Ciclina E. Los datos de la Ciclina E citoplasmática eran consistentes con los datos obtenidos en las biopsias de carcinomas metastásicos (MSCC), frente a los menos agresivos. Además, mediante un experimento *in vivo* comprobamos que las SCC12R2 inducían tumores en ratones desnudos a diferencia de las células parentales (SCC12F), que inducían tumores benignos de menor tamaño y crecimiento mucho más lento, sólo en la mitad de los individuos del ensayo. Por tanto, determinamos que las células capaces de superar el doble bloqueo con Nz (SCC12R2) eran más inestables genómicamente.

En referencia a esta parte del trabajo, realicé el primero tratamiento de los SCC con Nz (SCC12Nz); tras este bloqueo, los análisis por microscopía de fase mostraron unas células con un fenotipo diferenciado, un aumento del porcentaje de células en G2/M así como de la población poliploide en los análisis realizados por citometría de flujo. Por otro lado, las células capaces de superar el bloqueo (SCC12R1) mostraban una mayor capacidad clonogénica respecto de las células parentales (SCC12F). Además, los análisis realizados por western

blotting (WB) e inmunofluorescencia (IF) determinaron un aumento importante de la expresión de γ H2AX así como la expresión de p21 y p53.

Para comprobar si la pérdida de la Ciclina E contribuye a la pérdida del fenotipo escamoso, inhibí la expresión de la Ciclina E en SCC12F mediante el uso de vectores lentivirales. Los análisis por microscopía de fase sugerían una pérdida del fenotipo escamoso en respuesta a la inhibición de la Ciclina E (shCE) respecto del control (Ctr). Los análisis por IF y WB mostraban, además de una inhibición eficiente de la expresión de Ciclina E, una pérdida del fenotipo escamoso. En los cultivos shCE, había un aumento de la expresión de queratina 8 (K8) y Vimentina, marcadores característicos de una transición epitelial-mesénquimal respecto de los cultivos Ctr así como una menor expresión de queratina 5 (K5), característica de la capa basal de la epidermis. Los resultados obtenidos mediante ensayos de clonogenicidad, mostraron un aumento de la capacidad clonogénica en ausencia de Ciclina E (shCE) respecto del Ctr, así como un aumento del número de colonias.

4.2 Análisis del Checkpoint de Mitosis-Diferenciación en respuesta a dosis no letales de radiación ultravioleta (UV).

Los resultados de este apartado pertenecen a un artículo ya publicado del cual soy primera autora (de Pedro, Alonso-Lecue et al. 2018). Los resultados están recogidos en el Anexo II.

ANEXO II “Sublethal UV irradiation induces squamous differentiation via a p53-independent, DNA damage-mitosis checkpoint”. Isabel de Pedro, Pilar Alonso-Lecue, Natalia Sanz-Gómez, Ana Freije and Alberto Gandarillas. Cell Death and Disease (CDDis); 2018.

Seguidamente resumo los resultados de este trabajo.

El Control Mitosis-Diferenciación (CMD) se postula como un importante mecanismo anti-oncogénico en respuesta al daño genético. En trabajos anteriores, como he descrito en la introducción, el laboratorio ha mostrado que el CMD responde al daño causado por estrés de replicación. La pregunta entonces fue si respondería también al daño causado por la radiación Ultravioleta (UV), el principal agente mutagénico en la piel.

En este trabajo en el laboratorio, Pilar Alonso-Lecue analizó previamente, la respuesta de los queratinocitos a dosis altas (letales) y moderadas (no letales) de UV. Los resultados mostraban un aumento de la población Sub-G1 a dosis letales pero no a dosis no letales (moderadas; sbUV). A dosis bajas de UV, las células mostraban un aumento de los marcadores de diferenciación así como del tamaño celular y del porcentaje de células >4N (endorreplicación). Estos resultados evidenciaban que los queratinocitos sufrían un proceso de diferenciación terminal en respuesta a dosis no letales de UV.

Está descrito en la literatura que p53 posee un papel en la radiación ultravioleta; media la respuesta a la apoptosis en las células de la piel en respuesta a dosis altas de UV (Hall, McKee et al. 1993, Ziegler, Jonason et al. 1994). Pilar Alonso-Lecue analizó el papel de p53 en la diferenciación de queratinocitos en respuesta a dosis moderadas de UV (sbUV). Los resultados obtenidos mostraban que la respuesta de diferenciación era independiente de la expresión de p53.

Este punto de control de mitosis (CMD) es extensible a otros epitelios además de la piel que comparten la respuesta a diferenciación como consecuencia de la desregulación del ciclo celular y el daño en el ADN (Sanz-Gomez, Freije et al. 2018). De forma consistente, los resultados obtenidos en colaboración con Natalia Sanz, mostraron un aumento de los marcadores de diferenciación así como una pérdida de la capacidad clonogénica en queratinocitos procedentes de boca y laringe, en respuesta a dosis no letales de UV. Por tanto la respuesta en queratinocitos de piel y de boca y garganta (cabeza y cuello) fue similar.

Seguidamente investigué si el control de mitosis controlaba la diferenciación escamosa en respuesta a la UV a través de la sobreexpresión de FOXM1 (FOX), un factor de transcripción de genes implicados en la división celular (Costa 2005). Resultados previos en el laboratorio han mostrado que FOX, al ser un regulador global de la mitosis, fuerza la división celular de los queratinocitos a pesar de contener daño en el ADN no reparado (Molinuevo, Freije et al. 2017). En mis experimentos observé cierta recuperación de la morfología típica de las células proliferativas en las células con FOX sobreexpresado (KFOX) respecto de las células control (KCT). Así mismo, observé un aumento de la capacidad clonogénica (% total de colonias) de las células irradiadas, a través de ensayos de clonogenicidad, y una atenuación importante del fenotipo escamoso diferenciado en los cultivos de células KFOX respecto de los cultivos KCT. Es decir, FOX fue capaz de atenuar la respuesta diferenciación a dosis no letales de UV (sbUV), a pesar de contener un mayor daño en el ADN. Esto confirmaba que esta respuesta es controlada a través de la mitosis.

En relación a los resultados con FOX y con el fin de confirmar la implicación de los puntos de control de mitosis en la respuesta de diferenciación, estudié la participación de Wee1 a través de la inhibición de su expresión por vectores lentivirales (shwee1). Observé un aumento de la proliferación celular en los cultivos de queratinocitos portadores de shwee1, que mostraron una disminución importante de la proteína. No detecté signos de apoptosis en los cultivos proliferativos (no población Sub-G1). Sin embargo, en respuesta a dosis no letales de UV, los análisis por citometría de flujo mostraron una disminución de la expresión de K1 en los cultivos shwee1 respecto del control (CT) así como un aumento del porcentaje de células apoptóticas. Resultados obtenidos mediante análisis de ARN también mostraron una disminución de la expresión de marcadores de diferenciación y un aumento de la expresión de marcadores pro-apoptóticos.

Los resultados descritos demostraron que el CMD es un mecanismo que responde al daño generado en el ADN, bien como consecuencia del estrés de replicación o como consecuencia de dosis moderadas (no letales) de radiación ultravioleta. Como expliqué en la introducción, p21 está descrito como un inhibidor del ciclo celular, importante en la respuesta al daño en el ADN. Y aunque se cree que es clave en la diferenciación de queratinocitos, se desconocen los mecanismos por los que actúa, a veces paradójicos. En el laboratorio hemos obtenido resultados relevantes que sugerían que esta proteína podría tener un papel importante en el CMD. La expresión creciente de p21 en carcinomas se correlaciona con la expresión de la Ciclina E (Alonso-Lecue, de Pedro et al. 2017). Así mismo, se observa una pérdida de p21 y Ciclina E en las células capaces de superar el bloqueo en G2/M, células inestables genómicamente. También puede expresarse independientemente de p53 y su desregulación en SCC12F podría reflejar alteraciones en el ciclo celular (Alonso-Lecue, de Pedro et al. 2017). p21 también se indujo en respuesta a dosis moderadas de radiación ultravioleta (de Pedro, Alonso-Lecue et al. 2018). Además, está descrito el papel de p21 en la endorreplicación (Gandarillas, Molinuevo et al. 2018). Finalmente, en queratinocitos, resultados del laboratorio habían mostrado una expresión de p21 independiente de p53 (Freije, Molinuevo et al. 2014). Por todo ello, nuestro siguiente objetivo fue determinar el papel de p21 en el CMD y por ende, en la diferenciación de queratinocitos.

4.3 Papel de los inhibidores de Cdk1 en el CMD

Esta parte de mi trabajo doctoral, junto con el punto 4 (papel de Wee1), está actualmente en preparación para publicación.

4.3.1 Papel de p21 en el CMD

Para conocer el papel de la proteína p21 en el ciclo celular de queratinocitos, inhibí la expresión de la proteína a través de la tecnología de los shRNA (shp21), mediante un vector lentiviral. Se utilizó el plásmido vacío como control del experimento (pLK01; a partir de ahora CT) y el mismo plásmido con la información específica para la proteína (pLK01-shp21; a partir de ahora shp21). Estos experimentos se realizaron en condiciones de bajo calcio ($<0,1\text{mM Ca}^{2+}$). Comprobé la eficiencia de la inhibición a través de la expresión de la proteína mediante western blotting (WB) y también a través del análisis del ARN mensajero por RT-qPCR (Figura 9). Los resultados obtenidos con ambas técnicas, mostraron la bajada de la expresión de forma significativa en los cultivos infectados con el vector shp21 respecto de los cultivos infectados con el plásmido vacío utilizado como control; incluso tras el tratamiento con Doxorubicina (DOXO), que induce daño en el ADN y activa la vía de p53 y p21, la inhibición de la expresión era significativa. La Doxorubicina es uno de los quimioterapéuticos más utilizados contra el cáncer; inhibe el crecimiento de las células cancerosas a través de la inhibición de la topoisomerasa II, una enzima necesaria para el crecimiento celular. Sin embargo, está descrito como un inductor del daño en el ADN, generando estrés oxidativo a través de la formación de radicales libres.

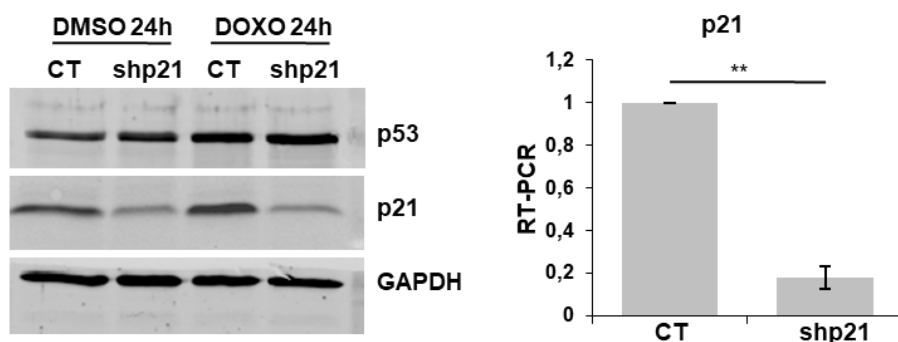


Figura 9. Expresión de p21 Análisis de la expresión de p21 y p53 por técnicas de western blotting (izquierda) y de p21 por RT-qPCR (derecha) tras la inhibición de p21 mediante un vector lentiviral para la proteína (shp21) respecto del control infectado con el vector vacío (CT). GAPDH: control de carga. ** $p < 0,01$

De forma preliminar, por técnicas de microscopía óptica, analicé de forma cualitativa las características de estos cultivos (Figura 10a). Respecto del tamaño celular, relacionamos el tamaño de los queratinocitos con su capacidad proliferativa; los queratinocitos de la capa basal, diferencian y aumentan de tamaño a medida que migran por las capas suprabasales de la epidermis (Watt and Green 1982). En ausencia de p21 (shp21), las células mostraban un tamaño menor en esos cultivos respecto de los cultivos control infectados con el plásmido vacío (CT); por otro lado, el tamaño de las colonias era mayor con shp21.

De forma cuantitativa analicé la capacidad proliferativa a través del conteo del número de células en cultivo (Figura 10b). El número de células era mucho mayor en los cultivos con shp21 respecto de los cultivos control. Estos datos se recogieron a distintos tiempos (3, 4, 5 y 6 días post-infección) y en todos los casos había un aumento significativo del número de células respecto del control. Los datos obtenidos sugerían que la ausencia de p21, inducía un aumento de la proliferación celular.

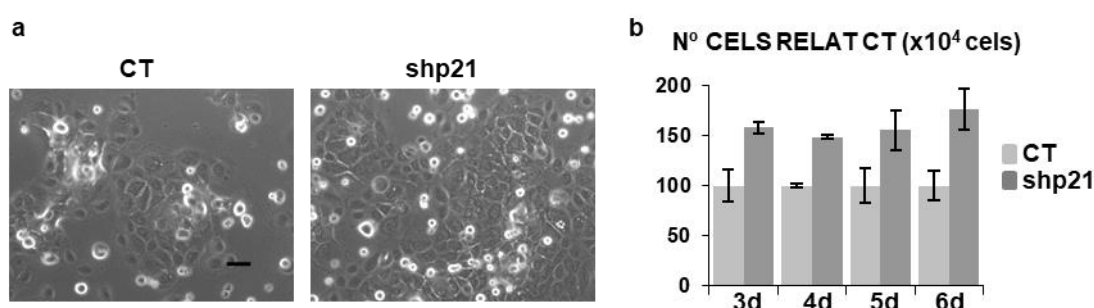


Figura 10. La ausencia de p21 induce un aumento de la proliferación a. Fotos obtenidas por microscopía de fase de los cultivos CT e infectados con shp21. **b.** Cuantificación del número de células en cultivo relativizadas al control, tras la inhibición de p21 (shp21) respecto del CT, a distintos días después de la infección (3, 4, 5 y 6 días post-infección). Escala 50µm

Analicé por citometría de flujo, el papel de p21 en la diferenciación de queratinocitos (Figura 11). Estos análisis se realizaron cinco días después de la infección. Se analizó el tamaño y la complejidad de estas células a través de la dispersión de la luz que incide sobre las células (High Scatter, HS: forward y side scatter). El grado de dispersión de la luz es proporcional al tamaño y la complejidad celular. Las células con el vector shp21 poseían un menor tamaño y una menor complejidad respecto de las CT.

Las células se marcaron con un anticuerpo anti-queratina 1 (K1), marcador post-mitótico de diferenciación terminal de queratinocitos. El análisis de este marcaje determinó una menor expresión de K1 en las células infectadas con el vector shp21 respecto de las células control (CT).

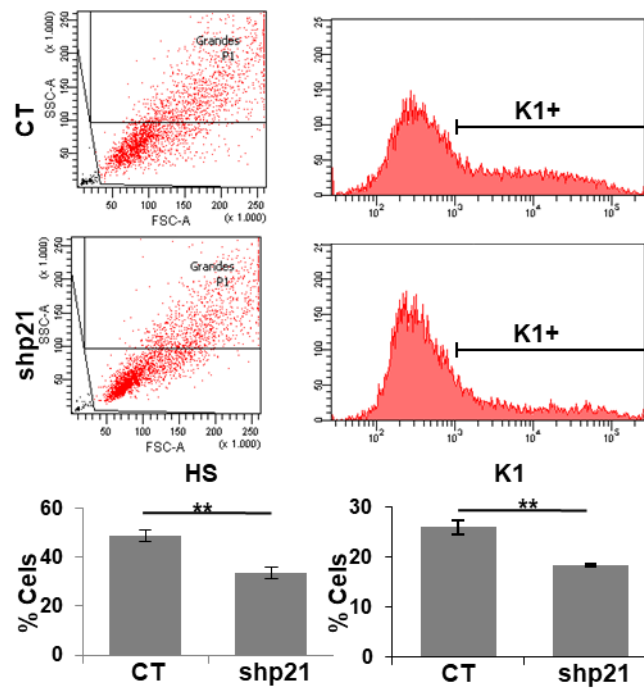


Figura11. La ausencia de p21 reduce la diferenciación a. Histogramas representativos del tamaño y complejidad celular (HS, high light scatter) y la expresión de K1 (K1+) en queratinocitos en ausencia de p21 (shp21) respecto del control (CT), 5 días después de la infección. **b.** Cuantificación del porcentaje de células grandes (HS) y positivas para K1 en los cultivos shp21 respecto del CT. ** $p < 0,01$

Los resultados obtenidos sugerían que p21 posee un papel en la diferenciación de queratinocitos; la inhibición de la expresión inducía un aumento de la proliferación celular y una disminución de la expresión de marcadores de diferenciación, como la K1.

Los queratinocitos al diferenciarse, se denominan *corneocitos* o envueltas cornificadas. Adquieren características especiales y abandonan la capa córnea de la epidermis. En condiciones *in vitro* se despegan y quedan flotando en el sobrenadante. En relación con la bajada de la diferenciación, analicé el número de envueltas cornificadas de estos cultivos celulares (Figura 12).

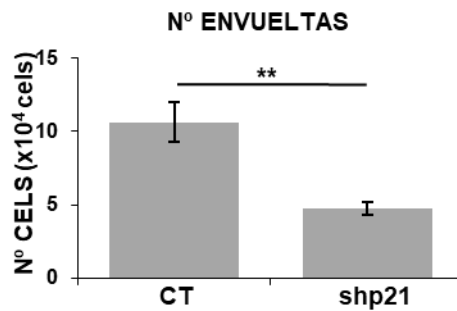


Figura 12. La inhibición de p21 reduce la diferenciación Las envueltas cornificadas son queratinocitos diferenciados que se despegan y abandonan la capa córnea. Cuantificación del número de envueltas en los cultivos infectados con shp21 respecto de los cultivos control. **p<0,01

El análisis por citometría de flujo permite estudiar los cambios que tienen lugar en el ciclo celular. Analicé el estado del ciclo celular en los queratinocitos shp21 respecto del control a través de la citometría de flujo mediante el marcaje con ioduro de propidio (IP). También mediante las técnicas de inmunofluorescencia (IF) y western blotting (WB) a través del marcaje con distintos marcadores de ciclo celular (Figura 13), permitieron el estudio del ciclo celular.

El marcaje con IP determinó que hay un aumento del porcentaje de células que se encuentra en la transición G2/M y del porcentaje de células poliploides (>4N; Figura 13a) en los cultivos shp21 respecto del CT. Los resultados obtenidos por IF y WB (Figura 13b) mostraron un aumento de la expresión de proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular, como la Ciclina A, B, p-Rb y p-H3. La formación de los complejos Ciclina E-Cdk2, Ciclina A-Cdk2/1 y Ciclina B-Cdk1 participan durante la fase S y la transición G2/M y son necesarias para la progresión del ciclo celular. En queratinocitos, el aumento de la expresión de la Ciclina E es característico de la endorreplicación, en respuesta a la activación del CMD (Freije, Ceballos et al. 2012). La proteína de Retinoblastoma en su forma hipofosforilada (Rb, activa) actúa como un inhibidor del ciclo celular, impidiendo la entrada de las células en la fase G1 del ciclo celular; por otro lado, es inactiva en su forma hiperfosforilada (p-Rb). La fosforilación de la histona 3 (p-H3) se utiliza como un marcador de la condensación de los cromosomas en la mitosis.

En ausencia de p21 (shp21), había una inducción de la expresión de la Ciclina A y B, de la forma inactiva de la proteína de Retinoblastoma (p-Rb) y p-H3 respecto del control. Al contrario de la Ciclina A y B, se observaba una bajada de la expresión de la Ciclina E

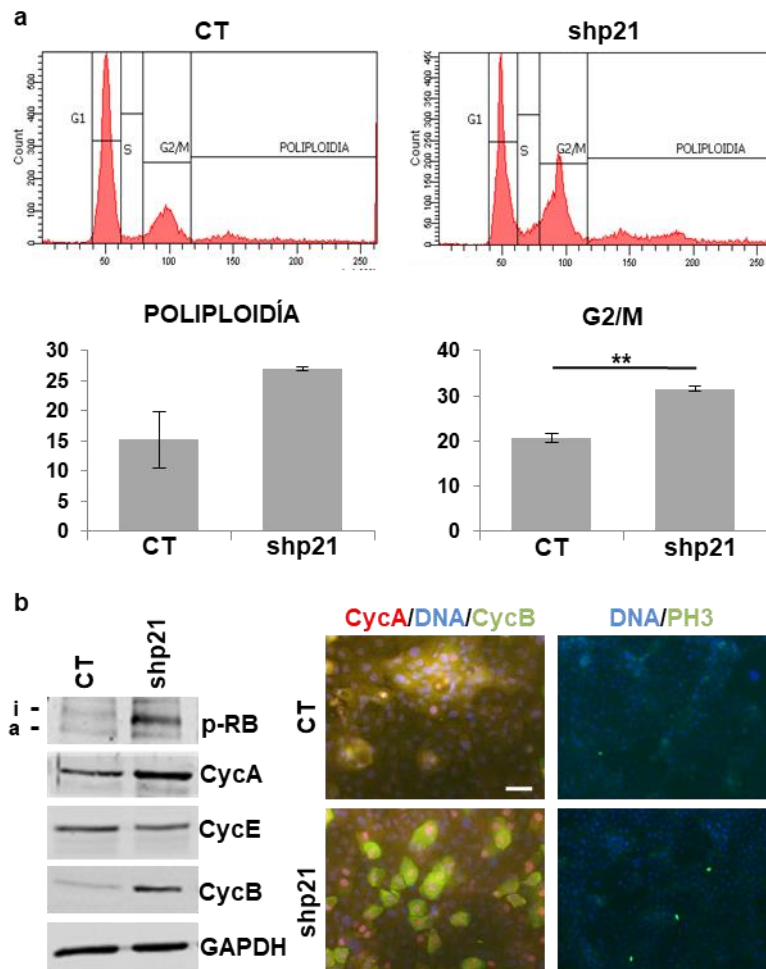


Figura 13. La inhibición de p21 induce la activación del ciclo celular **a.** Análisis por citometría de flujo mediante marcaje con IP del porcentaje de células en G2/M y con una dotación cromosómica <4N (población poliploide) en los cultivos infectados con shp21 respecto del CT. **b.** Análisis por western blotting (izquierda) e inmunofluorescencia (derecha) de Ciclina A (CycA, rojo), Ciclina B (CycB, verde), proteína de Retinoblastoma (p-RB), la Histona 3 fosforilada (PH3) y Ciclina E (CycE), distintos marcadores del ciclo celular en los cultivos shp21 respecto del CT. ** $p < 0,01$. Escala 50 μ m.

Para verificar los resultados obtenidos y caracterizar el efecto de la inhibición de p21 en queratinocitos de piel, utilicé otras tres construcciones lentivirales (shp21) para la inhibición de la proteína y realicé los mismos experimentos. Nombré las 4 construcciones como shp21 I, shp21 II, shp21 III y shp21 IV, siendo shp21 I la utilizada anteriormente.

En primer lugar, comprobé la eficiencia de la infección, analizando la expresión de la proteína con las 4 construcciones lentivirales, mediante técnicas de WB y RT-qPCR (Figura 14). El nivel de la proteína disminuía de forma significativa con tres de las cuatro construcciones utilizadas

(shp21 I, III y IV), mientras que el nivel de expresión con la construcción II (shp21 II) era igual o mayor que el control.

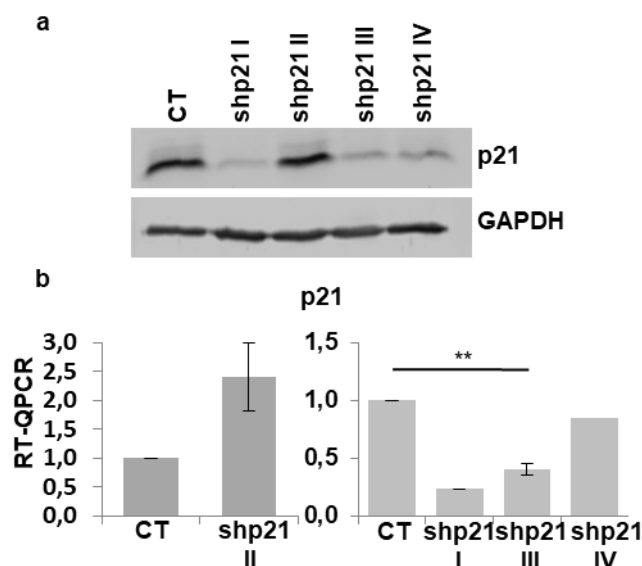


Figura 14. Expresión de p21 a. Análisis por western blotting de la expresión de p21 tras la infección con 4 shRNA distintos y específicos para p21 (shp21 I, II, III, IV) respecto de la infección con el plásmido vacío (CT). **b.** Análisis de la expresión de p21 por RT-qPCR tras la inhibición con shp21 I, II, III y IV respecto del CT. GAPH: control de carga ** $p < 0,01$.

Analicé de forma cualitativa por microscopía de fase el efecto de la inhibición de la proteína con cada construcción lentiviral. Los resultados de las distintas infecciones sugerían una correlación inversa entre el nivel de expresión de la proteína y el crecimiento celular con cada una de las construcciones (Figura 15a). De forma cuantitativa, estudié la capacidad proliferativa de cada cultivo celular infectado con un shp21 distinto y así determiné que existía un aumento de la proliferación con cada una de las construcciones lentivirales (shp21 I-IV) respecto del control. Entre las distintas construcciones utilizadas había diferencias significativas respecto al número de células obtenidas (Figura 15b).

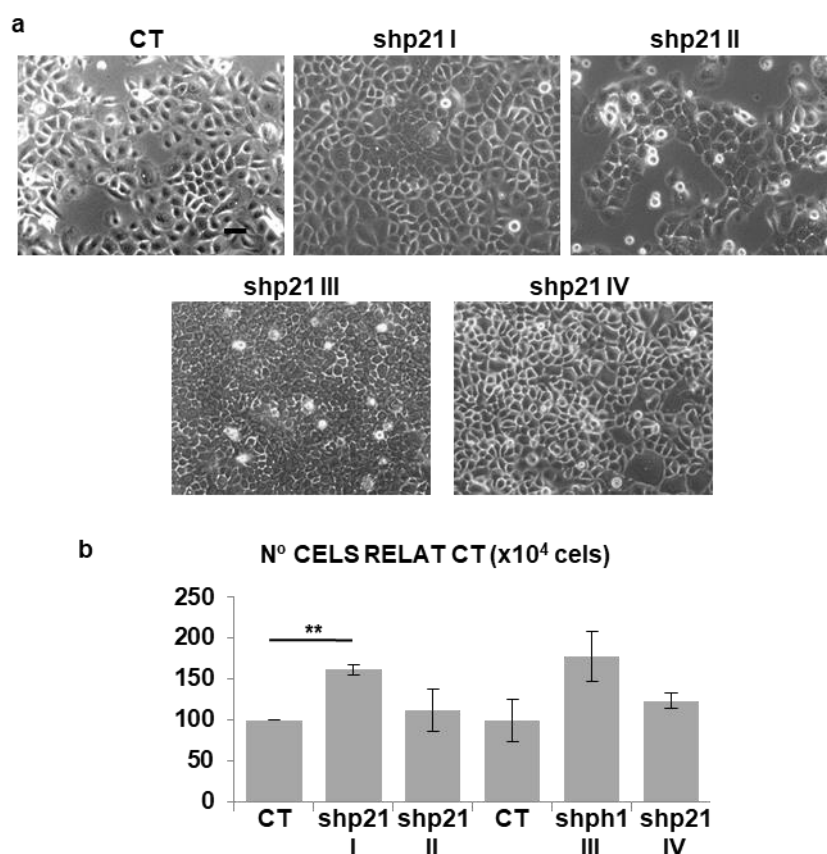


Figura 15. La ausencia de p21 induce un aumento de la proliferación a. Fotografías representativas de microscopía de fase del cultivo infectado con el plásmido control (CT) y con cada una de las construcciones para p21 (shp21 I-IV). **b.** Análisis cuantitativo del número de células en cultivo con cada una de las construcciones lentivirales (shp21 I-IV); los datos están relativizados al control. **p<0,01. Escala 50µm.

Los datos cuantitativos mostraron una correlación entre el nivel de expresión de la proteína y la capacidad proliferativa de las células. Los cultivos celulares donde los niveles de p21 eran más bajos (shp21 I y shp21 III), mostraron una mayor capacidad proliferativa y el número de células obtenido era mayor respecto del CT. En los cultivos donde la inhibición de p21 no era tan eficiente (shp21 II shp21 IV), la expresión de la proteína era más alta y los niveles de proliferación similares a los del CT.

Para verificar los resultados obtenidos previamente, analicé el efecto en diferenciación con shp21 III, que mostraba niveles similares de proliferación a shp21 I, la construcción utilizada inicialmente.

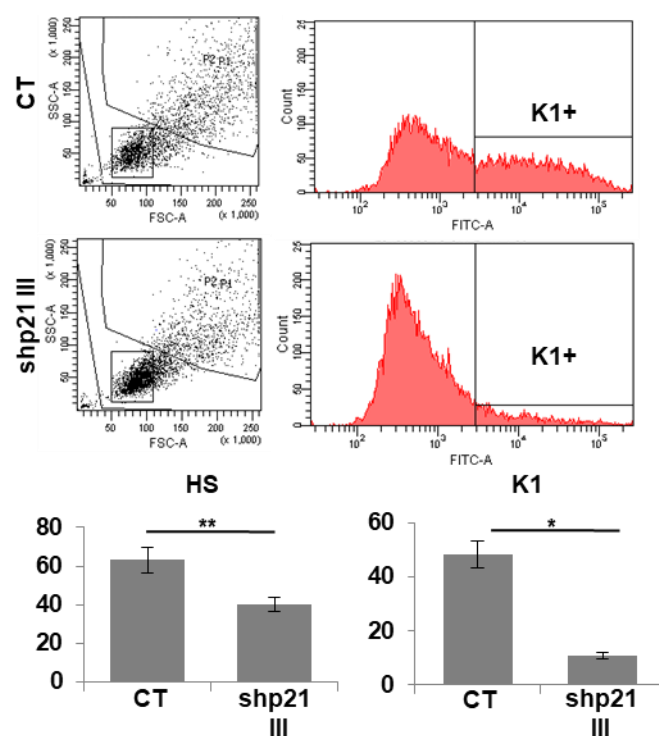


Figura 16. La inhibición de p21 reduce la diferenciación Análisis representativos por citometría de flujo del porcentaje de células grandes (HS) y positivas para K1 en los cultivos infectados con el vector lentiviral para p21 (shp21 III) respecto del control (CT). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Los resultados obtenidos con shp21 III respecto de la diferenciación celular (Figura 16) confirmaron los resultados obtenidos anteriormente con shp21 I (Figura 11). Con esta construcción, los cultivos shp21 mostraban un menor porcentaje de células con alta refracción de la luz (grandes y complejas; HS), así como un menor porcentaje de la expresión de K1 respecto de los cultivos CT.

A pesar de su eficiencia, los vectores lentivirales utilizados son incapaces de inhibir de forma completa la expresión de p21. Esto es así incluso para las construcciones shp21 I y shp21 III que inducen un mayor grado de inhibición de p21 (Figura 14a).

Con objeto de intentar alcanzar un mayor grado de inhibición de p21 nos propusimos la utilización de estos vectores de forma combinada. La metodología utilizada era la misma que en experimentos anteriores. La particularidad de este experimento era la infección con el sobrenadante de dos construcciones lentivirales (en proporción 1:1; shp21 I+III). Comprobé por WB la eficiencia de la infección; como control del experimento, infecté las células con el plásmido vacío (CT) como en experimentos anteriores y con cada una de las construcciones por separado (shp21 I y shp21 III) para comprobar la eficiencia de cada construcción para p21 por separado. Los resultados obtenidos (Figura 17) mostraron una mayor eficiencia en la

inhibición de p21 en los cultivos tratados con ambas construcciones (shp21 I+III); el nivel de p21 era menor respecto de shp21 I y shp21 III y mucho menor respecto del CT.

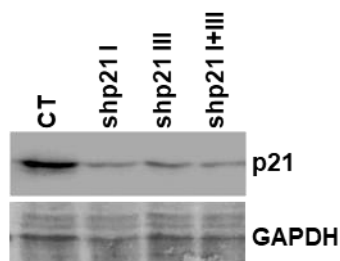


Figura 17. Expresión de p21 con shp21 I+III. Análisis por western blotting de la expresión de p21 tras la inhibición conjunta con dos construcciones diferentes para p21 (shp21 I y shp21 III). GAPDH: control de carga.

Analicé el resultado de la infección (shp21 I+III) de forma cualitativa por microscopía de fase (Figura 18a). El tamaño de las colonias parecía mayor en los cultivos infectados con shp21 I y shp21 III por separado respecto del control con el plásmido vacío (CT), validando los resultados obtenidos en experimentos anteriores. El cultivo infectado con ambas construcciones (shp21 I+III) mostraba un aspecto diferenciado, colonias más pequeñas así como un tamaño celular mayor respecto de las células del control. De forma cuantitativa, mediante el conteo con cámara de Neubauer del número de células en cultivo (Figura 18b), determiné la capacidad proliferativa de las células. El número de células en cultivo era mayor en los cultivos infectados con shp21 I y shp21 III respecto del control (CT); por el contrario, el número de células del cultivo infectado con shp21 I+III era significativamente menor respecto del CT y respecto de los cultivos shp21 I y shp21 III.

Como he explicado previamente, en condiciones *in vitro*, los queratinocitos diferenciados se despegan del cultivo y quedan flotando en el sobrenadante. Analicé de forma cuantitativa el sobrenadante de estos cultivos mediante conteo del número de células con cámara de Neubauer (Figura 18b). El porcentaje de células en el sobrenadante era mayor en el caso del cultivo infectado con shp21 I+III.

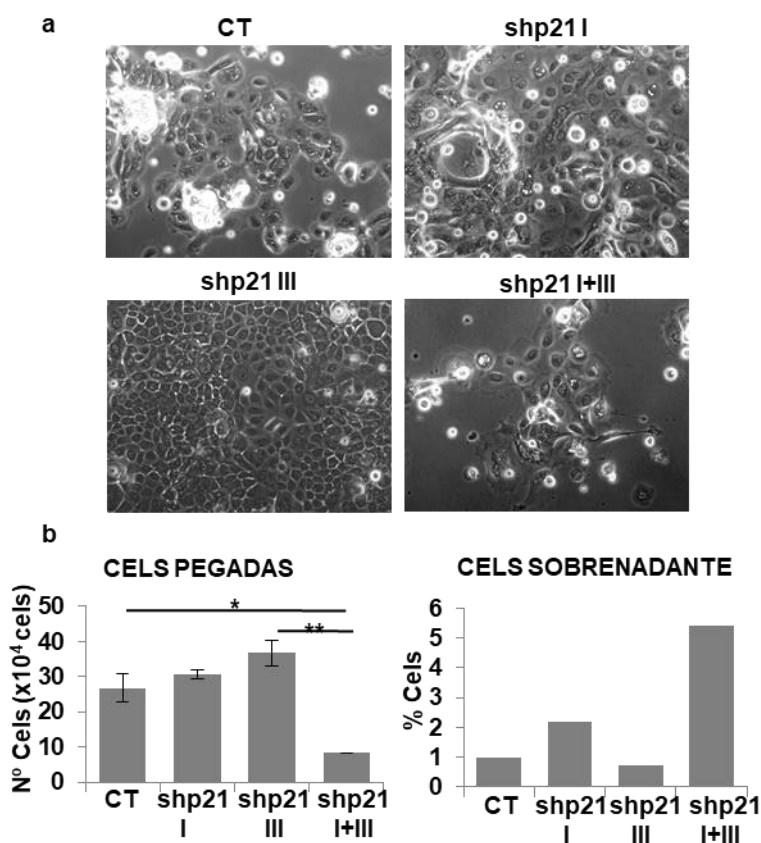


Figura 18. La inhibición de p21 (shp21 I+III) disminuye la proliferación a. Fotos obtenidas por microscopía de fase de los cultivos infectados con las construcciones para p21 (shp21 I, III y I+III) respecto del control. **b.** Cuantificación del número de células en cultivo (izquierda) y del porcentaje de células en el sobrenadante (derecha) tras la inhibición de p21 (shp21 I, III, I+III) respecto del CT. Escala 50 μ m. *p<0,05 **p<0,01

Por otro lado, analicé los niveles de diferenciación de esos cultivos por citometría de flujo mediante un marcaje con K1, un marcador de diferenciación. (Figura 19). Los cultivos infectados con ambos vectores lentivirales (shp21 I+III) mostraban una disminución de la expresión de K1 así como del porcentaje de células grandes (HS) respecto del control (CT). Estos resultados parecían contradictorios con los resultados vistos mediante microscopía de fase (Figura 18a), donde el cultivo infectado con ambas construcciones (shp21 I+III) mostraba un aspecto diferenciado. La mayoría de células de este cultivo estaban diferenciadas y se encontraban en el sobrenadante del cultivo (Figura 18b), mientras que adheridas a la placa permanecían solamente aquellas menos diferenciadas y menos positivas para K1. En el CT, el número de células del sobrenadante era menor y el mayor porcentaje de células diferenciadas y positivas para K1, se encontraban adheridas a la placa.

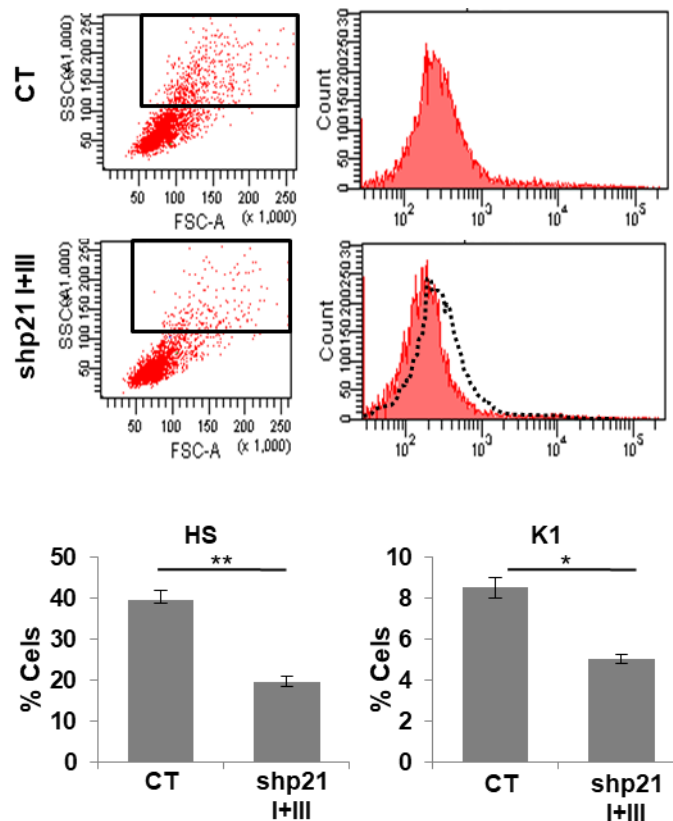


Figura 19. La ausencia de p21 (shp21 I+III) disminuye la diferenciación. Análisis por citometría de flujo, 48 horas después de la infección, del porcentaje de células grandes (HS, high scatter) y de células positivas para K1 en los cultivos en ausencia de p21 (shp21 I+III) respecto del control (CT). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

4.3.2 Papel de p21 en el CMD en respuesta al estrés de replicación en ausencia de p53.

p21 es la principal diana transcripcional de p53. Trabajos previos en el laboratorio han mostrado un papel de p53 en el CMD; en ausencia de p53, los queratinocitos se bloquean en la transición G2/M del ciclo celular, desencadenando un proceso de diferenciación terminal. En Freije et al, (Freije, Molinuevo et al. 2014) se observa, en ausencia de p53, una expresión significativa de p21. Este resultado sugiere que existe una expresión de p21 independiente de p53. En este punto, determino el papel de p21 que es independiente de p53, en el CMD.

Inhibí a través de la tecnología de los shRNA la expresión de p21 y p53. En este caso, utilicé dos vectores lentivirales diferentes. Por un lado el vector vacío pLK01 y con la información para p21 (pLK01-shp21; shp21), por otro lado el vector pLVHTM-GFP vacío y con la información para p53 (pLVHTM-shp53-GFP; shp53). El vector lentiviral utilizado para la inhibición de p53 lleva asociado una proteína fluorescente verde (GFP, del inglés "Green Fluorescent Protein"), que permite comprobar la eficiencia de la infección.

En los experimentos realizados con dos construcciones shRNA para p21 (shp21 I+III) el plásmido control (pLK01) era el mismo. En este caso, infecté el cultivo utilizado como control con el sobrenadante de ambos plásmidos vacíos (pLK01 y pLVHTM-GFP), el cultivo utilizado como control de la inhibición de p21, con el plásmido shp21 en combinación con el plásmido vacío para p53 (pLVHTM-GFP) y el control de la inhibición de p53, con el plásmido shRNA para p53 (shp53) junto con el plásmido control para p21 (pLK01). Para analizar el efecto de la inhibición de ambas proteínas, infecté el cultivo con el plásmido shp21 y el plásmido shp53. Añadí el mismo volumen de sobrenadante de cada construcción lentiviral al cultivo celular, en cada caso.

Comprobé la eficiencia de la infección por WB (Figura 20). La inhibición era eficiente con ambos vectores shRNA por separado (shp53 y shp21). En ambos casos, se observaba una menor expresión de la proteína respecto del control (CT). En el caso de la doble infección (shp53/21), la inhibición de p21 era aún más eficiente y su expresión era menor respecto del CT y respecto de shp21, como consecuencia de la inhibición de la proteína y de su principal diana transcripcional y activador, p53.

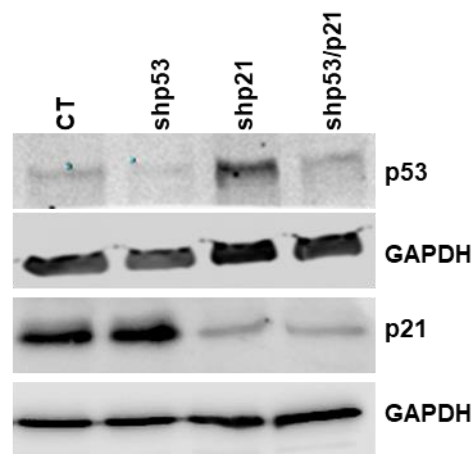


Figura 20. Expresión de p21 y p53 Análisis por western blotting (WB) tras la inhibición de la expresión de p21 (shp21), de p53 (shp53) y de ambas proteínas (shp53/21) con un shRNA específico para cada una. GAPDH: control de carga

Analiqué la capacidad proliferativa de los queratinocitos en ausencia de p21 y de p53 (Figura 21). El análisis cualitativo por microscopía de fase (Figura 21a), mostraba un aumento de la proliferación de los cultivos celulares tras la pérdida de la expresión de p21 (shp21), mientras que los cultivos con pérdida de la expresión de p53 (shp53), mostraban una menor capacidad proliferativa respecto del CT. Los resultados obtenidos con shp53, validaban una vez más, los resultados obtenidos previamente en el laboratorio y ya publicados (Freije, Molinuevo et al.

2014). En ausencia de p21, el tamaño de las colonias era mayor y las células mostraban un menor tamaño respecto del CT y por tanto un aspecto más proliferativo; en respuesta a la pérdida de p53, los queratinocitos mostraban un aspecto más diferenciado. Tras la inhibición de la expresión de p21 y p53 (shp53/21), los cultivos eran muy proliferativos y mostraban una mayor confluencia respecto de los cultivos CT y de los cultivos infectados con shp21 y shp53.

De forma cuantitativa analicé el número de células en cultivo mediante el conteo con cámara de Neubauer (Figura 21b). Cinco días después de la infección, los cultivos shp21 mostraban un ligero aumento del número de células respecto del CT; así mismo, los cultivos shp53/p21, también mostraban un aumento del número de células respecto del CT. El número de células en los cultivos shp53 era menor respecto del CT. Los resultados obtenidos con la cuantificación del sobrenadante sugerían que la diferenciación en todos los casos era menor respecto del CT.

En ausencia del bloqueo inducido en respuesta al estrés de replicación, aumentaba el índice de proliferación de los cultivos; existía por tanto una correlación entre los niveles de expresión de la proteína y el número de células del cultivo.

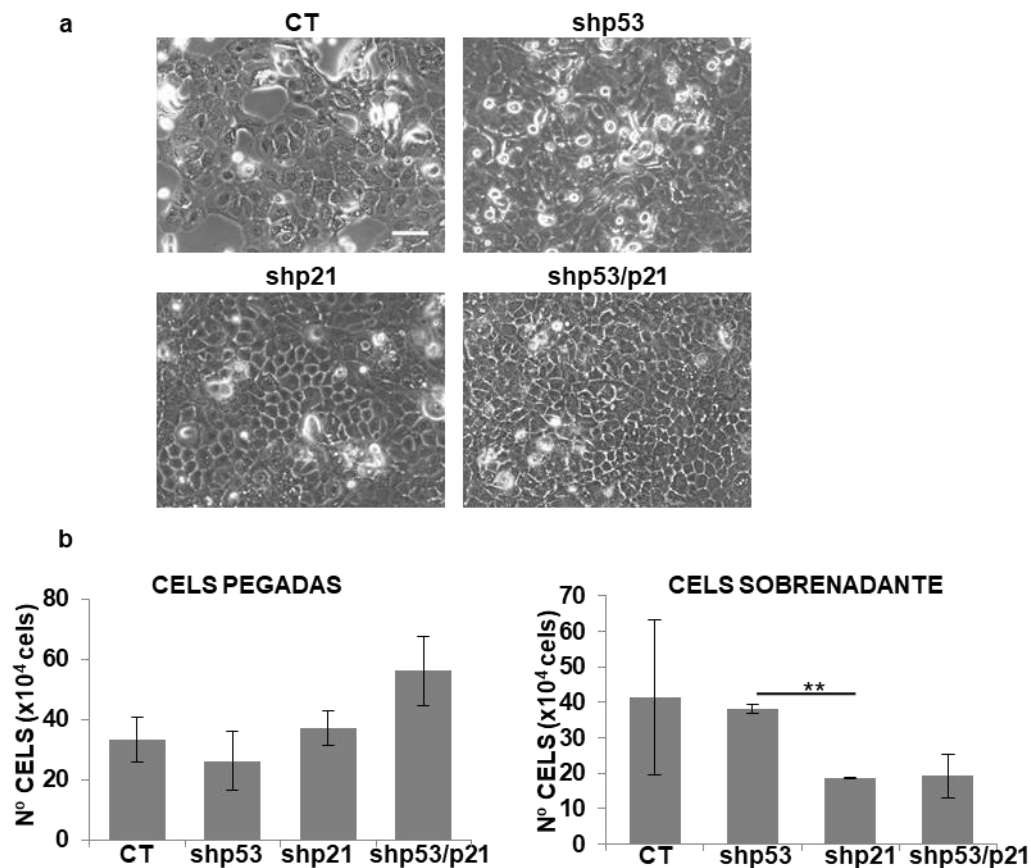


Figura 21. La inhibición de p21 traduce la pérdida de p53 en proliferación a. Fotografías obtenidas por microscopía de fase de los cultivos infectados con el plásmido control (CT), p21 (shp21), p53 (shp53) y con ambos (shp53/21). **b.** Cuantificación del número de células en cultivo (izquierda) 5 días después de la infección y el número de células obtenidas del sobrenadante (derecha) de esos mismos cultivos. **p<0,01

En base al resultado de la cuantificación del número de células del sobrenadante, analicé la respuesta a diferenciación de los cultivos celulares a través de citometría de flujo con un marcaje de K1 (Figura 22). Además, al mismo tiempo, analicé el tamaño y la complejidad celular (HS, high scatter) de esas células. Los cultivos infectados con shp21 mostraban un menor porcentaje de células grandes (HS) respecto del CT; al contrario de los cultivos infectados con shp53, que mostraban un porcentaje significativamente mayor de células grandes respecto del control. Estos resultados validaban resultados previos de experimentos anteriores y de trabajos previos de nuestro laboratorio ya publicados (Freije, Molinuevo et al. 2014). Los cultivos infectados con ambas construcciones (shp53/21) mostraban un porcentaje de células grandes (HS) superior al CT. Respecto del marcador de diferenciación K1, tanto los cultivos infectados con shp21 como los infectados con shp53, mostraban un porcentaje menor de células positivas para K1 respecto del CT, mientras que los cultivos infectados con shp53/21, el porcentaje de células positivas para K1 era mayor respecto del control. El

porcentaje de células positivas para p53 era menor respecto del control debido a las condiciones del cultivo. La confluencia es crítica para la expresión de algunas queratinas como K1 y K10 (Poumay and Pittelkow 1995); tras la inhibición de p53 (shp53), los queratinocitos diferenciaban antes de llegar a confluencia, por eso la expresión de K1 era menor respecto del control.

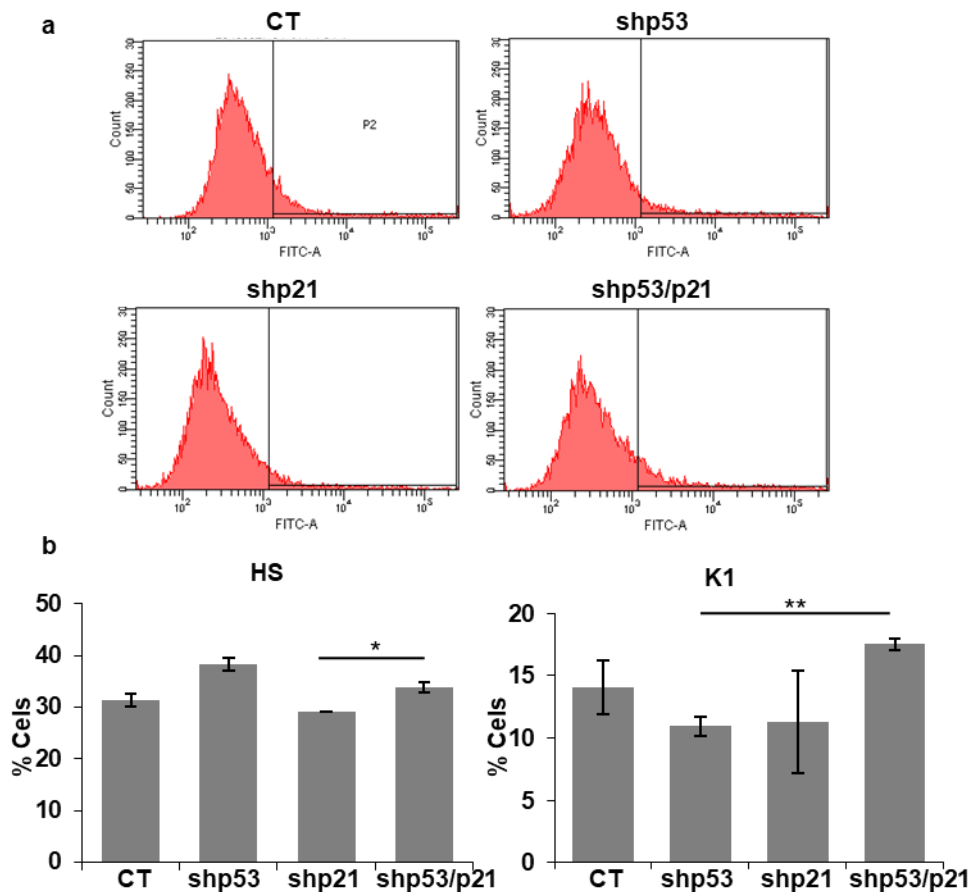


Figura 22. La inhibición de p21 en ausencia de p53 favorece la diferenciación. **a.** Histogramas representativos tras la inhibición de p21 (shp21), p53 (shp53) y ambas proteínas (shp53/21) respecto del CT, para K1 (K1+). **b.** Cuantificación del porcentaje de células grandes (HS) y positivas para K1, 5 días post-infección en shp21, shp53 y shp53/21 respecto del CT. *p<0,05 **p<0,01

Los resultados obtenidos previamente tras la inhibición de p21, mostraban un aumento de la proliferación celular, así como una disminución de la diferenciación (Figura 10 y 11). Los cultivos infectados con shp53/21 mostraban un aumento masivo de la proliferación celular pero, en este caso, observábamos un aumento de la diferenciación celular como consecuencia de la confluencia celular, favoreciendo en este caso la expresión de K1.

Validé los resultados obtenidos con la inhibición de p21 y p53 con otras construcciones lentivirales para estos mismos genes. Utilicé el mismo vector shRNA utilizado anteriormente para p53 (shp53) en combinación con otro de los vectores lentivirales para p21 ya utilizados (shp21 III).

Los resultados previos mostraban un aumento de la capacidad proliferativa en respuesta a la inhibición de p21 (shp21 I) y de p21 y p53 (shp53/21 I). Tras la sola inhibición de p53 (shp53), el número de células era menor respecto del CT.

El resultado de la cuantificación determinó un aumento del número de células respecto del control (CT), tras la inhibición de p21 (shp21 III), y de p21 y p53 (shp53/21 III; Figura 23a). Analicé por citometría de flujo la respuesta a diferenciación (Figura 23b). En ausencia de p21, tanto el tamaño de las células como el porcentaje de K1 era menor que en el CT. Los cultivos infectados con shp53/21 III mostraban también un menor tamaño celular así como una menor expresión de K1. En ausencia de p53, el tamaño celular era mayor respecto del CT como en los anteriores experimentos, pero en este caso, el porcentaje de células positivas para K1 era más bajo que en el CT.

Las diferencias en la expresión de K1 en este experimento puede explicarse por el tiempo post-infección; en los experimentos anteriores, las células permanecieron cinco días en cultivo tras la infección; en este caso, el tiempo post-infección fue de dos días. En Freije et al, 2014 está descrito que, en respuesta a la inhibición de p53, los queratinocitos muestran una mayor capacidad proliferativa previa a la diferenciación, que se detecta en torno a cinco días.

Los análisis mostrados sugieren un papel necesario de p21 en el CMD en ausencia de su principal activador p53.

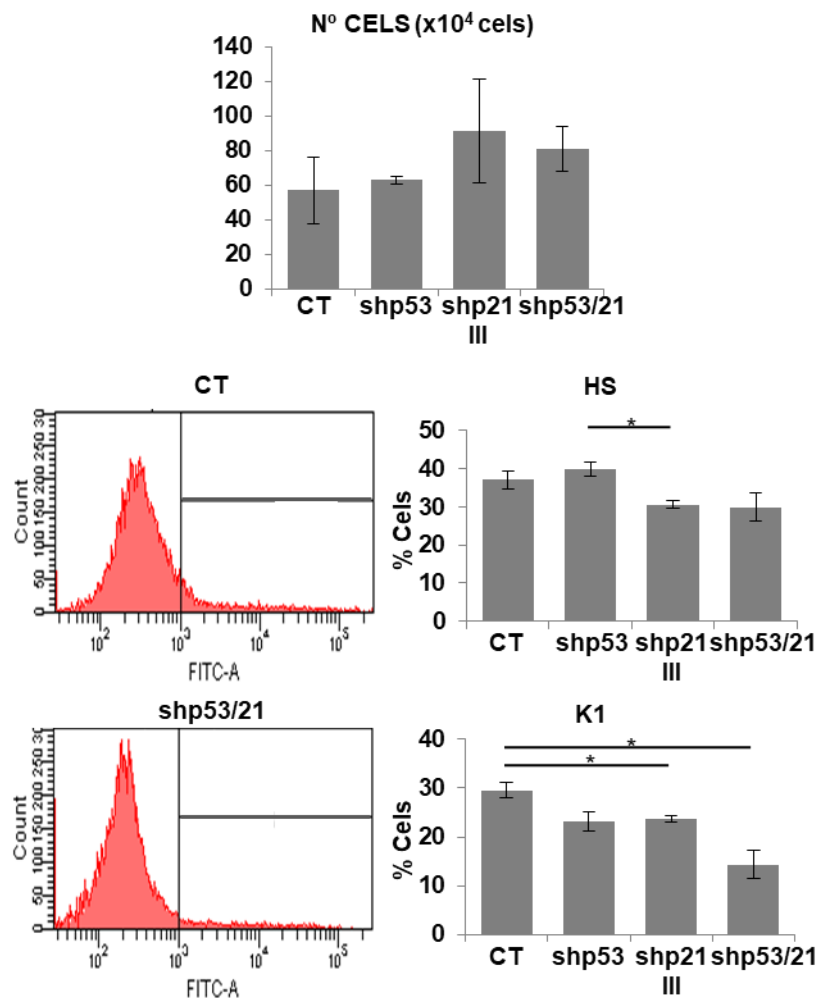


Figura 15. La inhibición de p21 traduce la falta de p53 en un aumento de la proliferación celular. a. Cuantificación del número de células en cultivo 2 días post-infección **b.** Análisis representativo por citometría de flujo del marcador de diferenciación K1 . Muestran un menor tamaño celular salvo los cultivos infectados con shp53 y un menor de porcentaje de células positivas para K1. *p<0,05.

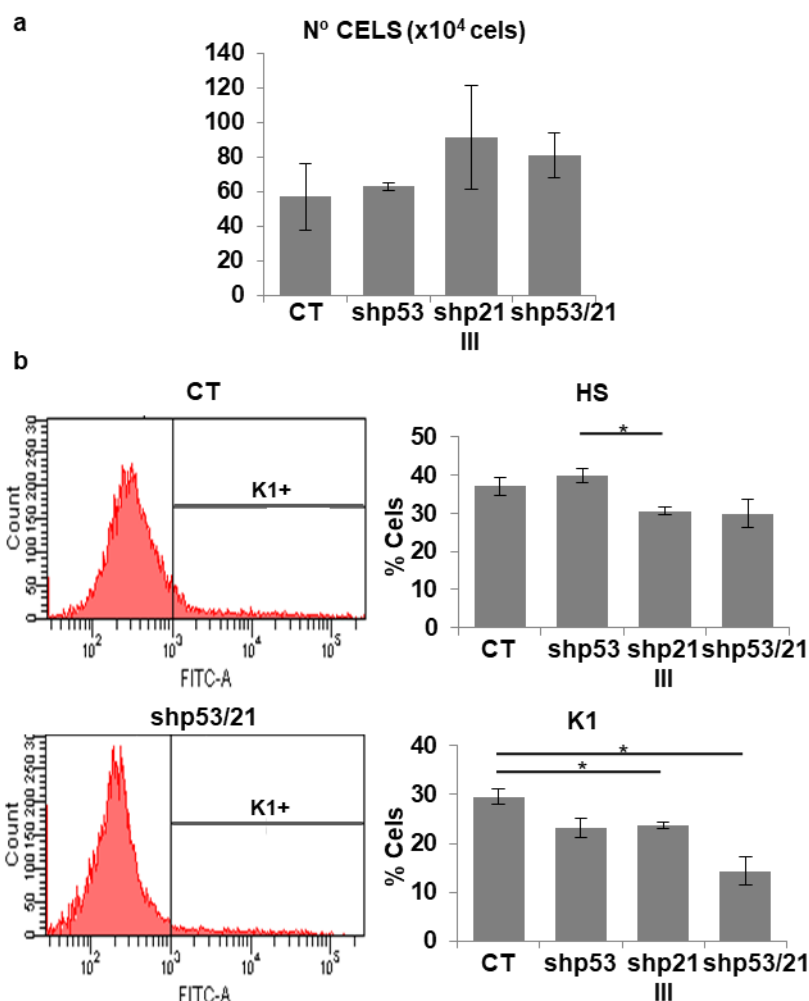


Figura 23. La inhibición de p21 y p53 (shp53/21) induce un aumento de la proliferación celular. a. Cuantificación del número de células en cultivo 2 días post-infección tras la inhibición de p53 (shp53), p21 (shp21) y ambos (shp53/21) respecto del control (CT). **b.** Análisis representativo por citometría de flujo (2 días post-infección) del porcentaje de células grandes (HS) y el porcentaje de células positivas para K1(K1+) en los cultivos shp53, shp21 y shp53/21 respecto del control *p<0,05.

4.3.3 Análisis del ciclo celular de queratinocitos en respuesta a la inhibición de p53 y p21

Analicé el ciclo celular por citometría de flujo a través de un doble marcaje con ioduro de propidio (IP) y BrdU. Respecto del análisis del ciclo celular (Figura 24a), en respuesta a la inhibición de p53 (shp53), hay un aumento del porcentaje de células en G2/M y la población poliploide (>4N) respecto del CT. Tras la inhibición de p21 (shp21 I), aumentaba el porcentaje de células en G2/M así como la población poliploide de forma significativa respecto del control (CT). En el caso del cultivo infectado con shp53/21 I, aumentaba el porcentaje de células en G2/M respecto del CT y de los cultivos infectados con shp21 y shp53. En este caso, la población poliploide aumentaba mayor respecto del control pero era menor respecto del cultivo infectado con shp21.

Para el estudio del ciclo celular, además del marcaje con ioduro de propidio, analicé la expresión de las quinasas dependientes de ciclina (Cdks; Figura 24b), que forman parte de los sistemas que controlan la progresión del ciclo celular. En respuesta a la inhibición de p21 y p53, se producía un aumento de la expresión de las Cdks; estos resultados determinaban que la pérdida de la expresión de p21 afectaba a la actividad y funcionabilidad de estas quinasas.

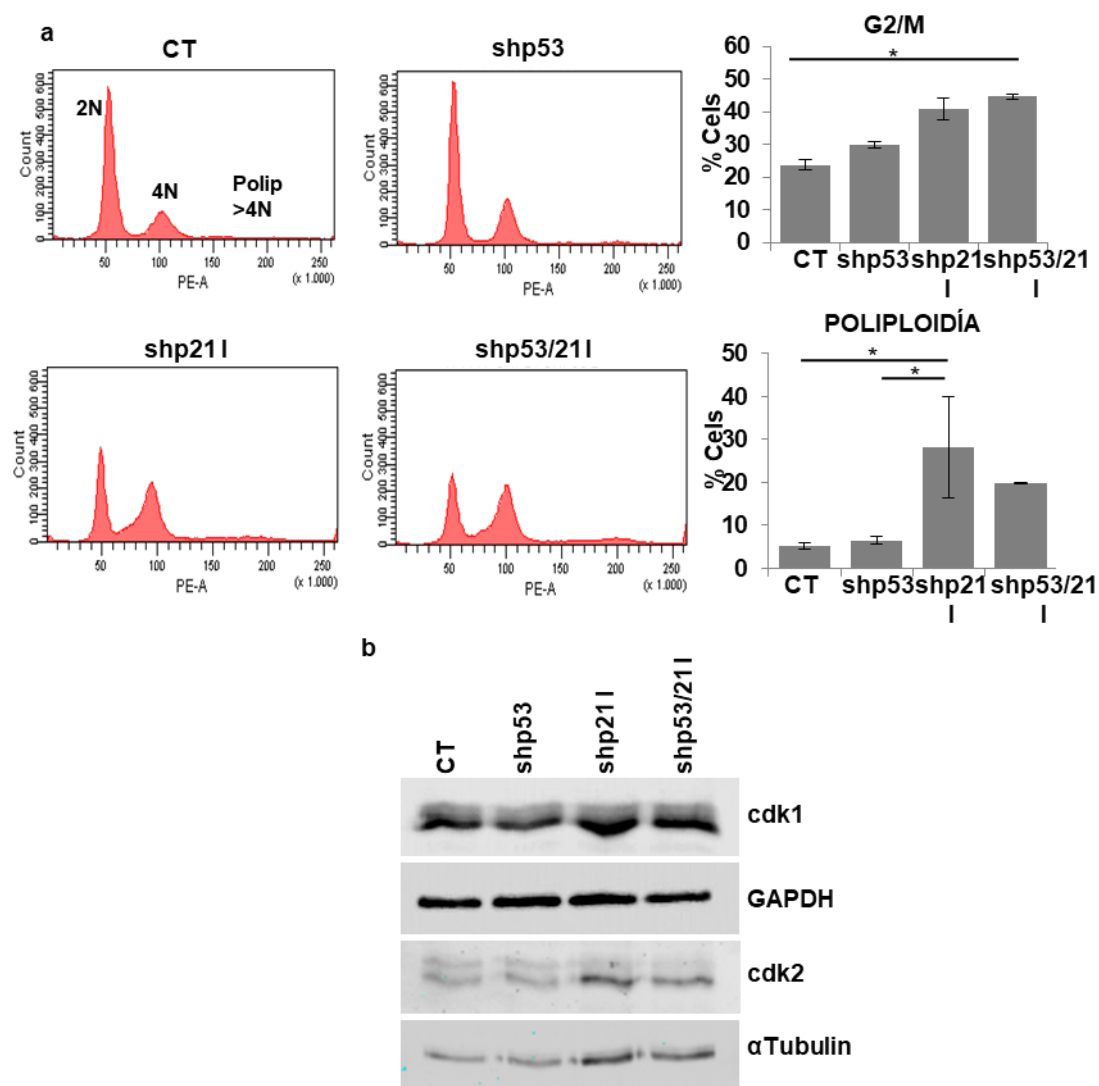


Figura 24. La inhibición de p53 y p21 promueve un acúmulo de células en G2/M **a.** Histogramas representativo (izquierda) del ciclo celular en ausencia de p21 y p53. Porcentaje de células (derecha) en G2/M y con una ploidía <4N en los cultivos shp53, shp21 y shp53/21 respecto del CT. **b.** Análisis por WB de la expresión de Cdks en los cultivos en ausencia de p53 (shp53), p21 (shp21) y ambos (shp53/21) respecto del CT. GAPDH y α Tubulina (α Tubulin) como control de carga. *p<0,05 **p<0,01

El análisis de la incorporación de BrdU determina el número de células que están sintetizando ADN. La Bromodesoxiuridina (BrdU) es un análogo de la timina que se incorpora a la cadena de ADN durante la fase de síntesis. La Figura 25 contiene el análisis representativo de las células que incorporan BrdU (puntos verdes) junto al resto de células (puntos rojos). En todas las condiciones, los cultivos mostraban un porcentaje mayor de células positivas para BrdU (BrdU+) respecto del control. De forma creciente, cinco días después de la infección los cultivos infectados con shp53, shp21 I y shp53/21 I, mostraban un aumento del porcentaje de células positivas. Los cultivos shp53/21, presentaban el mayor número de células en la fase S del ciclo celular.

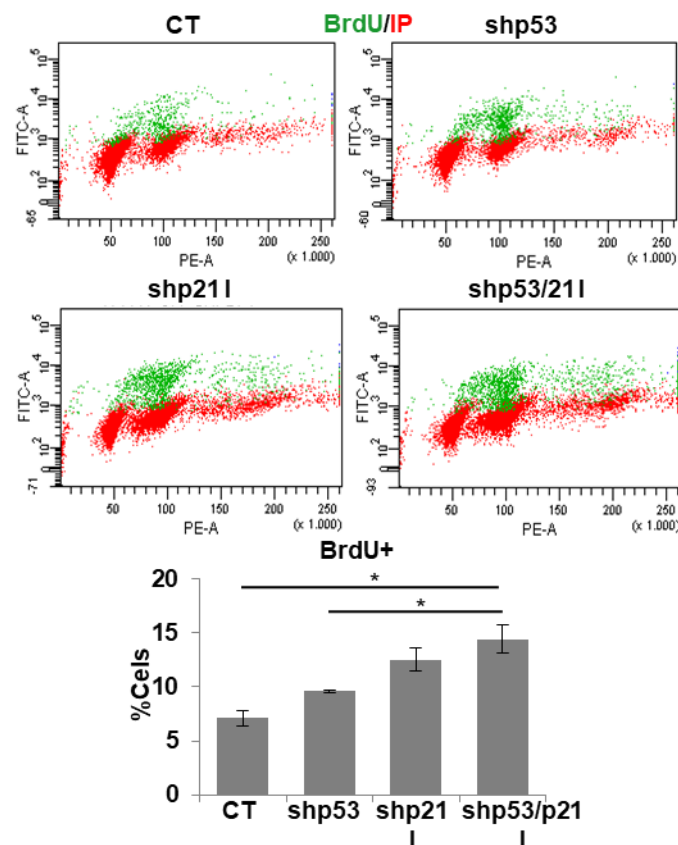


Figura 25. La ausencia de p53 y p21 (shp53/21) induce un aumento de la incorporación de BrdU. Análisis representativos por citometría de flujo de la incorporación de BrdU (verde) en doble marcaje con ioduro de propidio (rojo, representación Figura 23), 5 días después de la infección para la inhibición de p53 (shp53), p21 (shp21) y p53 y p21 (shp53/21) respecto del control CT. * $p < 0,05$.

4.3.4 Respuesta al daño en el ADN causado por estrés de replicación tras la pérdida de p53 y p21.

En queratinocitos, el estrés de replicación causa daño en el ADN y activa el proceso de diferenciación epidérmica (Gandarillas 2012)(Gandarillas, 2012). Los resultados mostrados hasta ahora han revelado un aumento de la proliferación celular en ausencia de p53 y p21. El análisis de la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX), proteína que forma parte del nucleosoma que mantiene la estructura de la cromatina, permite determinar el grado del daño inducido en el ADN de las células.

Analicé por IF el daño en el ADN, a través de la cuantificación del número de células positivas para γ H2AX, cinco días después de la infección (Figura 26a). En ausencia de p53 (shp53) observé un aumento del número de células positivas para γ H2AX respecto del control (CT). Además, en ausencia de p21 (shp21 I), el número de células positivas era mayor respecto del cultivo infectado con shp53 y del CT. El cultivo infectado con ambos vectores lentivirales (shp53/21 I), mostraba un número mayor de células positivas respecto del CT pero menor respecto de los cultivos shp53 y shp21 I.

La fosforilación de γ H2AX es uno de los primeros eventos que tiene lugar en la respuesta al daño en el ADN (DDR) y es clave para la activación de una cascada de señalización que está implicada en reparar el ADN dañado. Como consecuencia de la inhibición de p53 y p21, hay una deficiencia en el arresto en G2/M, que impide la correcta actuación de los sistemas de reparación y por lo tanto se induciría una menor señal de γ H2AX. Por otro lado, algunos autores relacionan la pérdida de γ H2AX con un daño celular masivo (Bouquet, Muller et al. 2006); hay una pérdida de correlación entre el daño generado en el ADN y la señal de γ H2AX.

Para verificar los resultados obtenidos a través del conteo del número de células positivas para γ H2AX, analicé la expresión de este mismo marcador por western blotting (Figura 26b). La expresión proteica de γ H2AX era mayor en shp53 respecto del control. En el caso de las células infectadas con shp21, la expresión era mayor respecto de shp53 y del CT. De forma consistente a los resultados obtenidos por inmunofluorescencia, la expresión proteica de γ H2AX en shp53/21 I, era mayor respecto del CT pero menor respecto de las infecciones individuales (shp53 y shp21 I).

Otro de los marcadores utilizados para el análisis del daño en el ADN, es la expresión de 53BP (del inglés “53 binding protein”; Figura 26c). Es una proteína de unión a p53, se localiza en los lugares donde hay una rotura de doble hebra en el ADN (DSB, del inglés “Double Strand Breaks”) y se ubica en los sitios de unión de p53 al ADN en respuesta al daño (Ward, Minn et

al. 2003). En los cultivos en ausencia de la expresión de p53 (shp53), p21 (shp21I) y de ambos (shp53/21 I), había un aumento de la expresión de 53BP respecto del control (CT). En este caso, a diferencia de los resultados obtenidos con γ H2AX, el cultivo infectado con ambas construcciones, mostraba una mayor expresión de 53BP respecto de las infecciones individuales con shp53 y shp21 I. Los focos de puntos gordos aislados, correspondían con focos de daño no reparado, que se mantienen silenciados para evitar su transcripción (Mata-Garrido, Casafont et al. 2016, Fernandez-Vidal, Vignard et al. 2017); en shp21 se observaba un patrón de puntos múltiples, son puntos de reparación que se observaban también en los cultivos shp53/21. En relación con los resultados obtenidos para γ H2AX, puede que, en ausencia de p53 y p21 y en respuesta al daño celular masivo, se activen 53BP y otros elementos que participan en la reparación del ADN dañado.

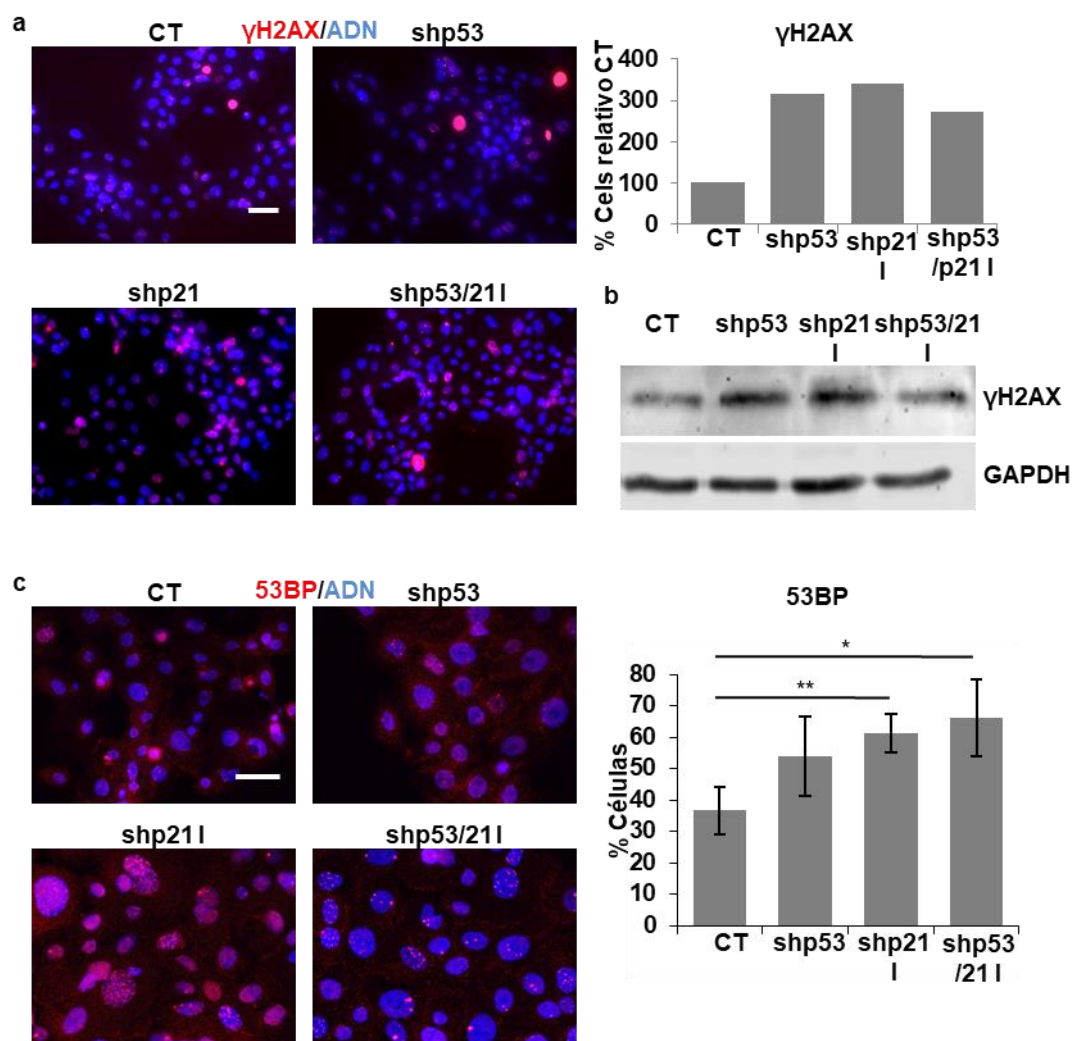


Figura 26. La inhibición de p21 en ausencia de p53 induce daño en el ADN. Análisis del daño generado en el ADN, 5 días después de la infección lentiviral. **a.** Microfotografías de IF para el marcador de daño γ H2AX (rojo) en células control (CT) infectadas con un vector lentiviral para p53 (shp53), p21 (shp21 I) y ambos (shp53/21 I). **b.** Western blotting de la expresión de γ H2AX en ausencia de la expresión de p53 y p21. GAPDH como control de carga **c.** Microfotografías de IF para el marcador 53BP (rojo) en células control (CT), shp53, shp21 I y shp53/21 I. ADN en azul. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Escala 50 μ m.

Para determinar el daño real del ADN en estos experimentos, realicé un ensayo cometa alcalino. Estos ensayos permiten analizar el daño a través de la cuantificación de las colas de ADN, formadas como consecuencia de la rotura de las hebras de ADN a través de un proceso enzimático y posteriormente un proceso de electroforesis. A través de la tinción con Red Safe y mediante el microscopio de fluorescencia, determiné el tamaño de las colas (Figura 27).

En los cultivos infectados con el vector para p53 (shp53), el tamaño de las colas era mayor respecto del control (CT); así mismo, en los cultivos infectados con el vector lentiviral para p21 (shp21 I), el tamaño de las colas era mayor respecto del CT y también de los cultivos infectados con shp53. Los cultivos infectados con ambos vectores lentivirales para p53 y p21 (shp53/21 I),

mostraban un tamaño de las colas mayor que el CT así como de los cultivos infectados con shp53, pero menor que el tamaño de los cultivos shp21 I, de forma consistente a los resultados observados por IF y el marcador de daño γ H2AX. Estos resultados apoyan los obtenidos respecto del marcaje con 53BP y la existencia de un sistema de reparación más eficiente que permita una mayor reparación.

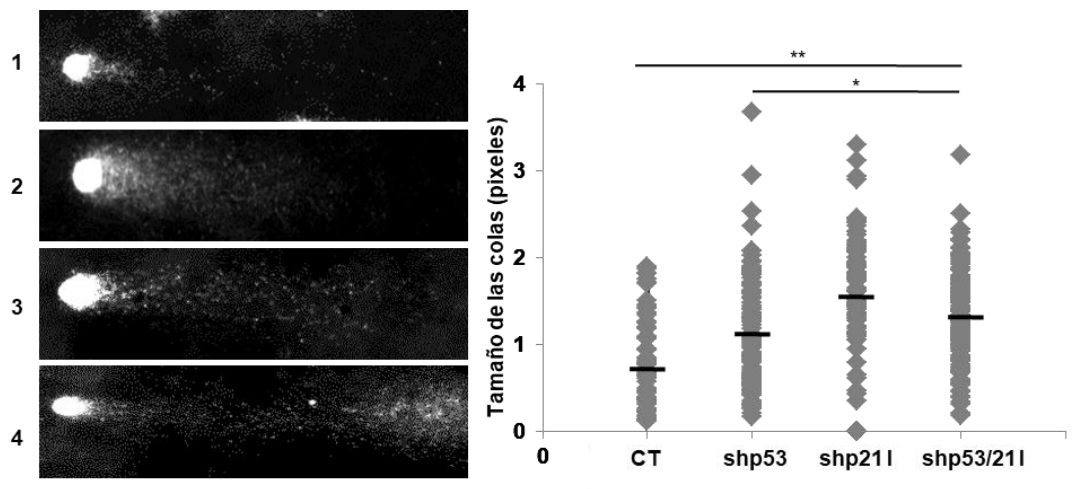


Figura 27. La inhibición de p21 en ausencia de p53 induce daño en el ADN Microfotografías representativas (izquierda) por microscopía electrónica, del tamaño de las colas de ADN, 5 días después de la infección con el vector vacío (CT), shp53, shp21 y shp53/21. Clasificación de 1-4 en función de la longitud de la cola. Representación gráfica (derecha) del tamaño de las colas de ADN tras la inhibición de p53 y p21 *p<0,05 **p<0,01

4.4 Papel de Wee1 en el Control Mitosis-Diferenciación (CMD)

4.4.1. Caracterización del papel de Wee1 en respuesta al estrés de replicación.

Wee1 es un inhibidor del ciclo celular que participa, al igual que p21, en la regulación del ciclo celular durante la transición G2/M del ciclo celular, mediante su unión al complejo Ciclina B-Cdk1 (Harvey, Enciso et al. 2011). En experimentos anteriores, observé un aumento de la expresión de Wee1 en ausencia de p21, sugiriendo una complementariedad en la expresión de estos inhibidores (Figura 28a).

Analicé el papel de Wee1 en el CMD, a través de la inhibición de la expresión de la proteína mediante la tecnología de los shRNA. El vector lentiviral para estos experimentos es Plk01, el mismo utilizado para los experimentos realizados con p21. En este caso, utilicé también el plásmido vacío como control del experimento (CT) y con la secuencia insertada para inhibir la expresión de Wee1 (shwee1). En primer lugar, comprobé el nivel de expresión de RNA en los cultivos infectados con el vector lentiviral para Wee1 (shwee1) a través de técnicas de RT-qPCR. Los resultados mostraban la inhibición parcial de la molécula endógena (Figura 28b).

Posteriormente, en colaboración con Ana Freije y Natalia Sanz, analizamos la eficiencia de la infección mediante técnicas de WB y RT-qPCR; con ambas técnicas observamos una bajada significativa de la expresión de la proteína (ANEXO II).

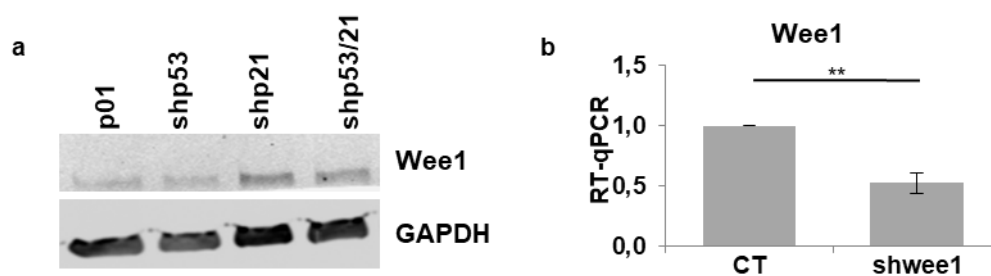


Figura 28. Expresión de Wee1. **a.** Expresión de Wee1 en ausencia de la expresión de p21 y p53 (shp53, shp21 y shp53/21) respecto del control (CT). **b.** Expresión de Wee1 por RT-qPCR, 48 horas post-infección con el vector lentiviral para Wee1 (shwee1) respecto del vector vacío (CT). GAPDH: control de carga **p<0,01

Tras comprobar la eficiencia de la infección, analicé el efecto de la inhibición de Wee1 de forma cualitativa, en los cultivos control (CT) y en los infectados con el vector lentiviral para Wee1 (shwee1) a través del microscopio de fase (Figura 29a); también de forma cuantitativa (Figura 29b), a través del conteo del número de células en cultivo mediante cámara de Neubauer. Tres días después de la infección, el número de células en shwee1 era ligeramente mayor respecto del CT. No había significancia estadística en el número de células en cultivo según el test de Student (valor > 0,05)

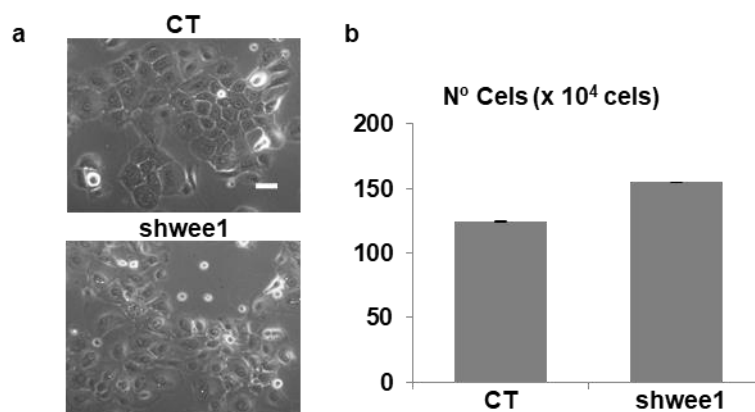


Figura 29. La inhibición de Wee1 induce un aumento de la proliferación. **a.** Microfotografías representativas de cultivos control (CT) e infectados con el vector lentiviral para Wee1 (shwee1). **b.** Contaje del número de células, obtenido 5 días después de la infección en cultivos CT y shwee1.

Además del estudio del número de células en cultivo, que proporciona información sobre la capacidad proliferativa de los queratinocitos en respuesta a la inhibición de Wee1, analicé por citometría de flujo el papel de Wee1 en la diferenciación escamosa (Figura 30). En ausencia de Wee1, se observaba un aumento del porcentaje de células positivas para queratina 1 (K1) en los cultivos infectados con el vector lentiviral para Wee1 (shwee1) respecto del control (CT; Figura 30b). En puntos anteriores, relacionamos la capacidad de diferenciación con un aumento del tamaño celular; en este caso, no había grandes diferencias de tamaño entre los cultivos shwee1 y el CT. Al igual que en casos anteriores, el aumento de la expresión de K1 en shwee1, se debía a un aumento de la confluencia celular en esos cultivos. Por otro lado, en colaboración con Ana Freije y Natalia Sanz, analizamos la diferenciación escamosa por técnicas de RT-qPCR; los resultados mostraban una menor diferenciación celular de los cultivos infectados con shwee1 respecto de los cultivos CT (ANEXO II).

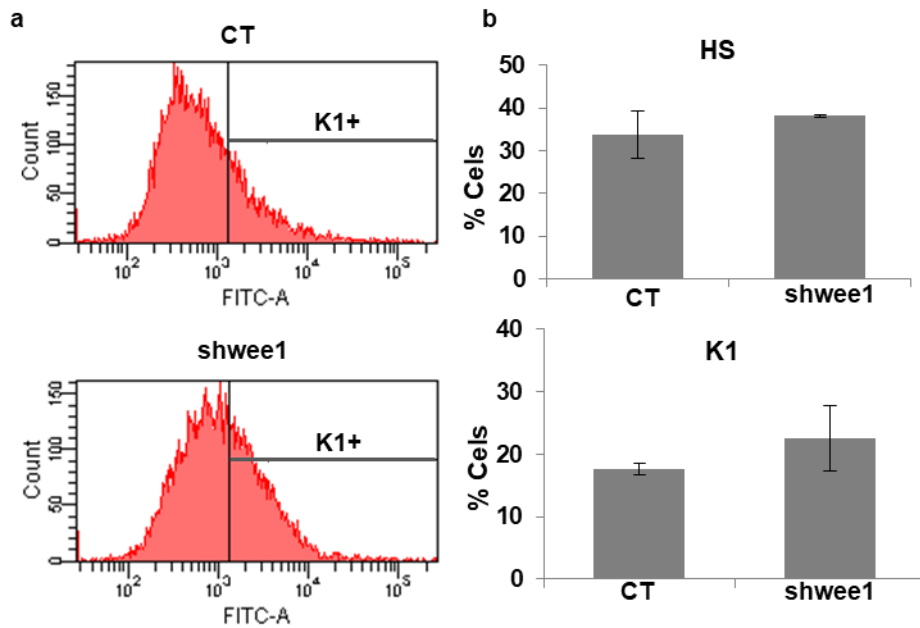


Figura 30. La inhibición de Wee1 induce un aumento de la diferenciación. **a.** Histogramas representativos (izquierda) de cultivos control y shwee1 para el marcador de diferenciación K1. **b.** Representación gráfica del porcentaje de células grandes (HS) y positivo para K1 en los cultivos, 4 días post-infección con el vector vacío (CT) y para Wee1 (shwee1).

Analicé por citometría de flujo, el ciclo celular de los queratinocitos de piel en ausencia de Wee1 (shwee1) respecto de los cultivos control (CT) (Figura 31) por tinción con IP. En ausencia de Wee1, las células mostraban un menor porcentaje de células en G2/M así como un mayor porcentaje de células poliploides, células con una ploidía >4N.

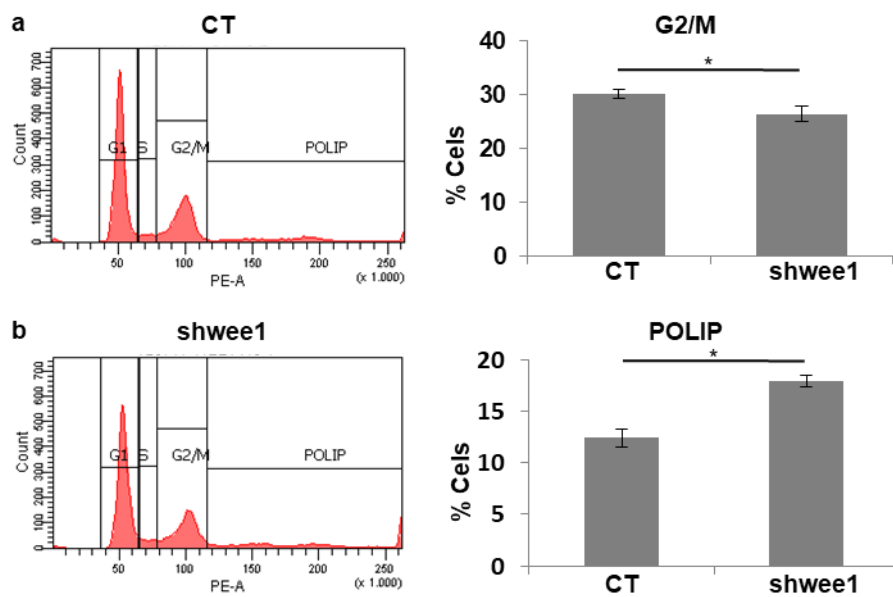


Figura 31. La inhibición de Wee1 induce cambios en el ciclo celular a. Análisis del ciclo celular mediante la tinción con IP, 5 días después de la infección en los cultivos infectados con el vector vacío (CT) y con el vector lentiviral para Wee1 (shwee1). **b.** Representación gráfica del porcentaje de células en G2/M y de la población poliploide (>4N) en shwee1 respecto del CT. * $<0,01$

4.4.2 Papel de Wee1 en ausencia de p21 en el CMD

p21, de forma independiente de p53, parece tener un papel clave en el control de mitosis (CMD); así mismo, Wee1, al igual que p21, es un inhibidor del ciclo celular que actúa durante la transición G2/M del ciclo celular mediante su unión a Cdk1 y que se activa en respuesta al daño en el ADN de forma independiente de la vía de p53

Tras el análisis de ambos inhibidores del ciclo celular por separado para entender su implicación en el control de mitosis y la respuesta a diferenciación, estudio el estado del CDM en ausencia de ambos. La metodología utilizada era la misma de puntos anteriores; en este caso, inhibí la expresión proteica de p21 y Wee1 de forma individual y también conjunta. El vector vacío utilizado es el mismo (Plk01), por lo tanto, el plásmido CT es el mismo en las infecciones dobles. La construcción utilizada para el análisis de Wee1 en ausencia de p21, es la construcción shp21 I.

En primer lugar, analicé el efecto de la inhibición de ambas proteínas (Figura 32). La capacidad proliferativa de los cultivos, analizada de forma cualitativa por microscopía de fase (izquierda) y posteriormente de forma cuantitativa mediante el conteo con cámara de Neubauer del número de células en cultivo (derecha). Por un lado, estos resultados confirmaban los

obtenidos previamente tras la inhibición de p21 y Wee1 de forma individual y además mostraban el resultado de la inhibición de ambas proteínas de forma conjunta. En ausencia de p21 y Wee1 (shwee1/p21), hay un aumento significativo de la proliferación celular respecto del CT.

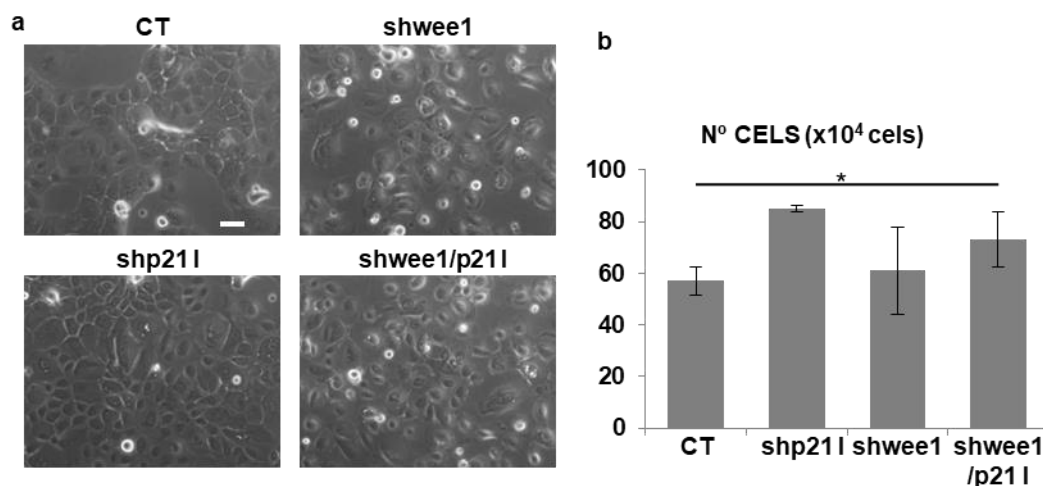


Figura 32. La inhibición de p21 y Wee1 induce un aumento de la proliferación. a. Microfotografías representativas realizadas mediante microscopía de fase, del cultivo con el vector vacío (CT), el vector para p21 (shp21 I), para Wee1 (shwee1) y ambos vectores (shwee1/p21 I). b. Cuantificación del número de células, 4 días después de la infección con el CT, shp21, shwee1 y shwee1/21. *p<0,05

4.5. Papel de los inhibidores de Cdk1 en respuesta a la radiación ultravioleta (UV)

Tanto p21 como Wee1, son inhibidores del ciclo celular que participan en la respuesta a diferenciación mediante su unión a Cdk1, durante la transición G2/M del ciclo celular. Los resultados obtenidos previamente, sugieren su participación en la activación del punto de control de mitosis y la ruta escamosa.

Previamente se ha estudiado la respuesta al estrés de replicación y el daño generado en el ADN como consecuencia de la ausencia de p21 y Wee1. El siguiente punto era analizar su papel en respuesta a dosis moderadas de radiación ultravioleta; analizar si p21 y Wee1 tenían un papel en la activación del CMD en respuesta al daño generado por la radiación ultravioleta al igual que en respuesta al estrés de replicación.

Inhibí de forma conjunta la expresión de ambas proteínas, a través de vectores lentivirales. Para el análisis de la respuesta a la UV, sometí a las células a dosis no letales de UV ($10\text{mJ}/\text{cm}^2$). En primer lugar, analicé de forma preliminar el efecto de la UV a través de los datos obtenidos por el microscopio de fase. 24 horas después, los efectos de la radiación ultravioleta ya eran visibles en los cultivos celulares, mostrando ciertas diferencias entre los cultivos infectados con el vector vacío (CT) y los infectados con los vectores lentivirales para p21 y Wee1, por separado y con ambos a la vez (shp21, shwee1 y shwee1/p21).

48 horas después de la irradiación, las diferencias eran aún más evidentes entre el CT y el resto de los cultivos celulares (Figura 33a): En los cultivos CT, las células sometidas a dosis moderadas de UV ($10\text{mJ}/\text{cm}^2$) mostraban un aspecto diferenciado; en el resto de cultivos celulares, las células mostraban un aspecto más apoptótico y la mayoría se encontraban en el sobrenadante. Respecto del número de células, cuantifiqué el número de células en cultivo y por otro lado el número de células del sobrenadante. Como control de la irradiación, queratinocitos sometidos al mismo protocolo: La infección con las mismas construcciones para p21 y Wee1, y recogida de las células al mismo tiempo post-infección y post-irradiación (48 horas). En este caso sin irradiar, las células se introducen en el irradiador sin irradiar.

48 horas después de la irradiación, disminuía de manera significativa el número de células pegadas en cada una de las condiciones en cultivo (shp21, shwee1, shwee1/p21) respecto de los cultivos CT y aumentaba de manera significativa el número de células del sobrenadante en esos mismos cultivos respecto del CT (Figura 33b).

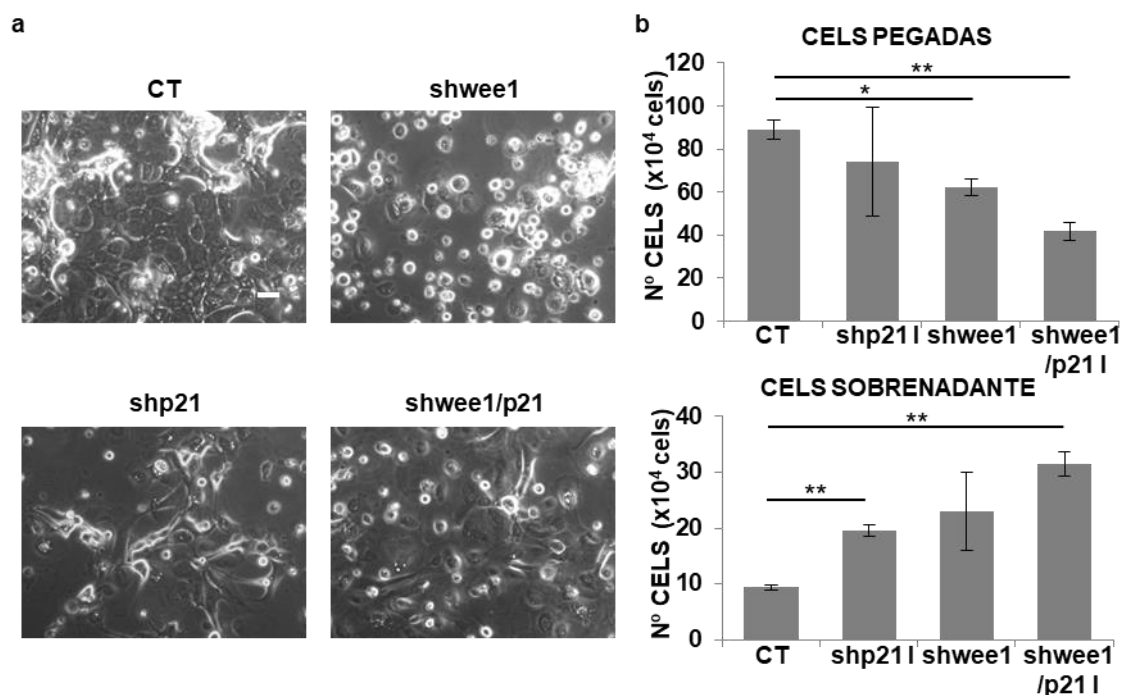


Figura 33. Efecto de la inhibición de p21 y Wee1 tras dosis moderadas de UV a. Microfotografías obtenidas por microscopía de fase 48 horas después de someter las células a dosis moderadas (10mJ/cm²) de UV. **b.** Cuantificación del número de células en cultivo (arriba, células pegadas; abajo, células del sobrenadante), 7 días post-infección, 48 horas después de la irradiación, en los cultivos infectados con los vectores lentivirales para p21 (shp21 I), Wee1 (shwee1) y ambos (shwee1/p21 I) respecto del CT. Escala 50µm. *p<0,05 **p<0,01

Los análisis previos de los cultivos celulares realizados por microscopía de fase, mostraban un aumento significativo del número de células del sobrenadante; analicé el papel de p21 y Wee1 en la diferenciación escamosa en respuesta a dosis moderadas de UV en esas células del sobrenadante (Figura 34a). El análisis del sobrenadante por citometría de flujo mediante el marcaje con el marcador K1, determinó una disminución significativa del porcentaje de células positivas para K1 respecto del control. El menor porcentaje de células positivas correspondía con los cultivos infectados con ambos vectores lentivirales (shwee1/p21). En los cultivos infectados con cada vector por separado (shp21 y shwee1), el porcentaje de células positivas para K1 era menor respecto del CT pero mayor respecto del cultivo shwee1/p21. Estos resultados sugerían que los queratinocitos en ausencia de p21 y Wee1 y en respuesta a dosis moderadas de UV, tenían un destino celular distinto a la diferenciación. A través de la citometría de flujo mediante la tinción con IP, analicé el estado del ciclo celular de estas células para determinar la presencia de una población apoptótica, representada por el porcentaje de células que forman parte de la población Sub-G1 del ciclo celular.

Al igual que en el experimento anterior, analicé el ciclo celular de las células del sobrenadante de los cultivos infectados con el vector lentiviral para p21 (shp21), con el vector para Wee1 (shwee1) y con ambos vectores (shwee1/p21) y lo comparé con los resultados obtenidos de los

cultivos infectados con el vector vacío (CT; Figura 34b). Las células fueron sometidas a dosis moderadas de radiación ultravioleta ($10\text{mJ}/\text{cm}^2$), cuatro días después de la infección. El análisis, 24 horas después de la infección, mostraba un aumento de la muerte celular en todos los cultivos respecto del CT: En ausencia de Wee1 (shwee1) aumentaba de manera significativa el porcentaje de células en Sub-G1 respecto del CT; así mismo, en ausencia de p21 y Wee1, el porcentaje de células apoptóticas era significativamente mayor respecto del CT y respecto de los cultivos shp21 y shwee1.

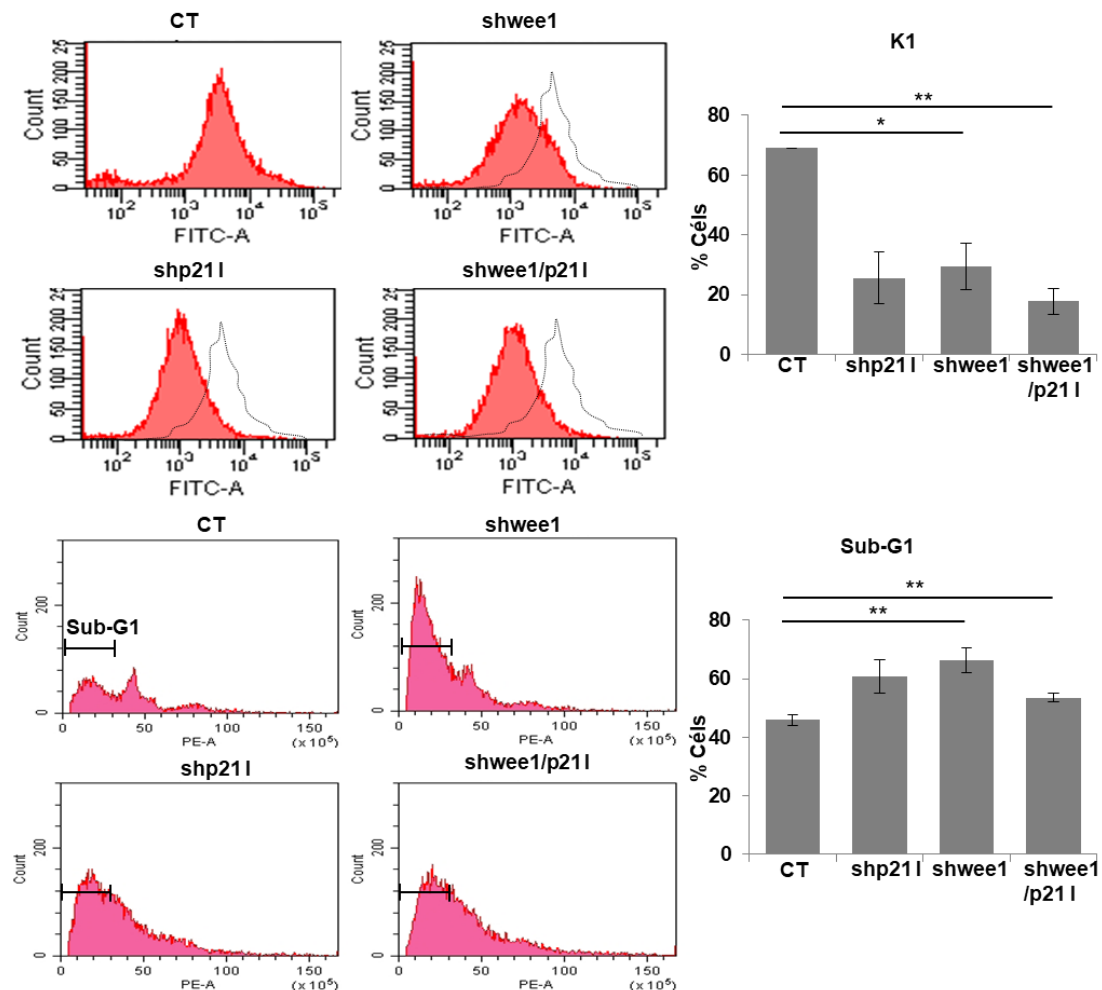


Figura 34. Efecto de la inhibición de p21 y Wee1 tras dosis moderadas de radiación UV. a. Análisis representativo por citometría de flujo del marcador de diferenciación K1, 5 días post-infección, 48 horas después de dosis moderadas ($10\text{mJ}/\text{cm}^2$) de radiación ultravioleta en los cultivos celulares en ausencia de p21 (shp21 I), de Wee1 (shwee1) y en ausencia de ambos (shwee1/p21 I) respecto del control (CT). b. Análisis representativo por citometría de flujo por tinción con iodo de propidio (IP) de la población Sub-G1, 4 días post-infección, 24 horas después de la radiación a dosis moderadas ($10\text{mJ}/\text{cm}^2$) con shp21 I, shwee1 y shwee1/p21 I respecto del CT.) de radiación UV. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Apoyando los resultados de un aumento de la actividad apoptótica, los análisis realizados por RT-qPCR en colaboración con Ana Freije y Natalia Sanz, mostraron un aumento de APAF-1 (del inglés “Apoptotic Protease Activating Factor 1”) y de BAX (del inglés “Bcl-2 associated X protein”). Ambas son moléculas implicadas en la activación de las caspasas que actúan durante

el proceso de apoptosis (Pawlowski and Kraft 2000, Shakeri, Kheirollahi et al. 2017); en ausencia de Wee1 (shwee1), se inducía un aumento de estas proteínas pro-apoptóticas respecto de los cultivos control; (ANEXO II).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El proceso de diferenciación epidermoide o escamosa es importante tanto para el mantenimiento de la homeostasis epidérmica como para la eliminación de las células dañadas, evitando su proliferación y el desarrollo de un proceso tumoral en la piel (Gandarillas 2012). La diferenciación inducida por el daño genético actuaría como un importante proceso antioncogénico aunque se desconocen los mecanismos que desencadenan esta respuesta. Las células madre epidérmicas de la capa basal dan lugar a otras células madre o a células TAC. Los datos recogidos hasta el momento sugieren que las TAC pueden ser las responsables de la activación del CMD en respuesta al estrés de replicación: son células de amplificación transitoria, cuya replicación puede generar errores en el ADN.

Los datos publicados hasta ahora en nuestro grupo sugieren que el punto clave para entender los mecanismos que controlan el Control Mitosis-Diferenciación (CMD) y la respuesta a diferenciación se encuentra en la mitosis. La participación, tanto p21 como Wee1, es clave en la regulación de este punto mediante su unión a los complejos Ciclina-Cdk, a través de su unión a Cdk1.

Nuestra hipótesis es que la hiperactivación y deregulación del ciclo celular induce estrés de replicación, generando un daño en el ADN y la activación del CMD; en respuesta a un bloqueo prolongado en la transición G2/M del ciclo celular, los queratinocitos diferencian como parte de un mecanismo antioncogénico.

Hay diversos trabajos que proponen un papel pivote de p21 en la diferenciación escamosa; la expresión de la proteína es importante para el inicio del proceso así como su contribución a la diferenciación como consecuencia de la parada del ciclo celular (Topley, Okuyama et al. 1999, Dazard, Piette et al. 2000, Freije, Molinuevo et al. 2014), sin embargo, se desconocen los mecanismos por los que actúa. En nuestro grupo hipotetizamos que el papel de p21 en la diferenciación escamosa recae sobre el proceso de mitosis. Esta proteína se caracterizó como un importante inhibidor del crecimiento celular, a través de su unión a los complejos Ciclina-Cdk y la principal diana transcripcional de p53, que activa una cascada de señalización en respuesta al daño (Devgan, Nguyen et al. 2006). Posteriormente, está recogido en la literatura y en algunos trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, un papel importante de p21 en ausencia de p53. Los resultados de ese trabajo muestran un aumento de los marcadores de

diferenciación así como una expresión importante de p21 en queratinocitos, en respuesta a la inhibición de la expresión de p53 (Freije, Molinuevo et al. 2014). Se analiza el papel de p21 en la diferenciación de queratinocitos en ausencia de la expresión de p53.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, muestran un papel importante de p21 en la diferenciación epidérmica. En respuesta a la inhibición de p21 en queratinocitos de piel, se induce un aumento de la proliferación celular respecto de las células control; así mismo, las células que contienen niveles bajos de la proteína, muestran un aspecto menos diferenciado y una menor capacidad de diferenciar respecto de las células control. A diferencia de los resultados previos observados tras la inhibición de p53 (Freije, Molinuevo et al. 2014), en ausencia de su principal diana transcripcional, los queratinocitos muestran un aspecto más indiferenciado, típico de células proliferativas.

Los resultados obtenidos tras la inhibición conjunta de p53 y p21, su principal diana transcripcional, muestran un aumento masivo de la proliferación celular; las diferencias son muy significativas respecto del número de células del control. El ciclo celular se acelera en ausencia de ambos inhibidores; como consecuencia del menor tiempo requerido por las células para dividirse, se genera estrés de replicación en las células en ausencia de p21 y en ausencia de ambos inhibidores (p53 y p21).

Así mismo, observamos un aumento de la expresión de Ciclina A, cuya unión a Cdk1 favorece la entrada en la fase de mitosis, y también de Ciclina B, que forma el complejo Cdk1-Ciclina B y regula el proceso de mitosis. Por el contrario, en shp21 se observa una disminución de la expresión de Ciclina E, importante para la progresión del ciclo durante la fase de síntesis mediante su unión a Cdk2. El aumento de la expresión de Ciclina E se relaciona con la endorreplicación que tiene lugar como consecuencia de la activación del CMD en queratinocitos (Freije, Ceballos et al. 2012, Gandarillas 2012).

En respuesta a la inhibición de p21, se observa un aumento de la expresión de las formas fosforiladas (activas) de Cdk2 y Cdk1. Para algunos autores, la expresión de Cdk2 es dispensable para la progresión del ciclo celular mientras que Cdk1 es la única quinasa esencial para el ciclo celular (Santamaria, Barriere et al. 2007, Satyanarayana and Kaldis 2009). En queratinocitos, p21 posee una mayor afinidad por Cdk2 respecto de Cdk1 (Harper, Elledge et al. 1995, Zhang, Liu et al. 2015); en ausencia de p21 y también en ausencia de p53 y p21, aumenta la expresión de Cdk1 y esto podría permitir la entrada de las células en mitosis (Santamaria, Barriere et al. 2007, Malumbres 2014, Brown, Korolchuk et al. 2015). La inhibición de p21 a través de la utilización de vectores lentivirales, permite inhibir parte de la expresión

de la proteína. La cantidad de p21 que queda, es capaz de unirse a Cdk2, permitiendo la inhibición de la expresión del complejo Cdk2-Ciclina E. Como consecuencia de la menor expresión de p21 (shp21) y su menor afinidad por la quinasa, la inhibición de Cdk1 no es tan eficiente, permitiendo la funcionabilidad del complejo Ciclina B-Cdk1 y permitiendo la entrada en mitosis. El aumento de la expresión de Ciclina B tras la inhibición de p21 (shp21) confirmaría estos resultados. p21 mantiene la Ciclina B en el núcleo. En ausencia de p21, la Ciclina B se encuentra en el citoplasma (Charrier-Savournin, Chateau et al. 2004).

Por tanto, en ausencia de la expresión de p21, los queratinocitos sufren un proceso de bloqueo en la transición G2/M del ciclo celular.

Los resultados obtenidos a través de la incorporación de BrdU, que se incorpora a las cadenas de ADN recién sintetizadas, muestra un aumento de BrdU en ausencia de p21 y de forma aún más evidente en ausencia de p53 y p21. Esto confirma que mediante el shRNA contra p21 conseguimos inhibir su función, es decir, la inactivación de las Cdk. En concreto cdk2 participa en la replicación del ADN.

p21 parece tener un papel en el CMD y la respuesta a diferenciación de forma independiente de p53. En ausencia de la expresión de p21, se produce un fallo en la activación del CMD y los queratinocitos son capaces de continuar proliferando, a pesar de un aumento de la señal del daño en el ADN. De forma general, en respuesta al daño, p21 induce el bloqueo del ciclo celular y la activación del control de mitosis. Como consecuencia de ese control y a través de la inactivación de Cdk1, las células se bloquean en G2/M y endorreplican debido a la activación del CMD, por el cual son capaces de continuar replicando ya en ausencia de división celular.

La fosforilación de γ H2AX es uno de los primeros eventos que tiene lugar en la respuesta al daño en el ADN (DDR, del inglés “DNA-damage response”) y es clave para la activación de otros elementos que participan en la respuesta así como en la parada del ciclo para la reparación del daño (vías de ATM y ATR). Algunos autores relacionan la pérdida de γ H2AX con un daño celular masivo (Bouquet, Muller et al. 2006); en estos casos hay una pérdida de la correlación entre la señal de γ H2AX y la capacidad de reparación de las células.

La activación de ATM, genera la activación de los focos de γ H2AX y la amplificación de esa señal del daño en la cromatina. Esto favorece la participación de otras moléculas de reparación en la respuesta: 53BP1 (del inglés “53 binding protein-1”), participa en la señalización de las

roturas de ADN (Tsvetkova, Ozerov et al. 2017) y además mantiene inactiva la cromatina señalizada por γ H2AX, dando lugar a los núcleos celulares de 53BP.

Los queratinocitos en respuesta a la inhibición conjunta de p53 y p21 (shp53/21) muestran una menor señal de γ H2AX respecto de los queratinocitos shp21; sin embargo la expresión de 53BP es mayor en los queratinocitos en ausencia de ambas proteínas (shp53/21).

La fosforilación de γ H2AX puede producirse en las horquillas de replicación bloqueadas, incluso en ausencia de la rotura específica del ADN, por eso analizamos también la presencia de focos nucleares de 53BP, que marcan específicamente los sitios de rotura cromosómicos (Marques-Torrejon, Porlan et al. 2013). 53BP es un componente esencial de la respuesta al daño de doble cadena. Además de la formación de los nucleares que permiten la señalización del daño, promueve la reparación terminal no homóloga e inhibe la reparación homóloga (Panier and Boulton 2014, Zimmermann and de Lange 2014).

El aumento de la proliferación celular en ausencia de p21 tiene lugar a pesar del aumento del daño generado en las células como consecuencia del estrés de replicación. Los niveles de γ H2AX y los análisis del daño real realizados mediante ensayos cometa alcalino, muestran un aumento de la señal del daño respecto del control. En respuesta a la inhibición conjunta de p53 y p21 los queratinocitos muestran un tamaño menor de las colas formadas como consecuencia de la fragmentación del ADN - respecto de los queratinocitos en ausencia de p21.

El proceso de diferenciación terminal que se produce como consecuencia de la activación del CMD y la endorreplicación, permitiría el mantenimiento de la homeostasis celular. Las células dañadas no continúan dividiéndose y son eliminadas por un proceso de diferenciación y descamación, permitiendo y favoreciendo de esta forma la generación de nuevas células. Creemos que el punto limitante en la generación del estrés de replicación en condiciones normales de la epidermis, se encuentra en las TAC; células de amplificación transitoria que están comprometidas a diferenciar tras 5 ó 6 rondas de proliferación activa.

En caso de desregulación del ciclo celular, p21 posee un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular, ejerciendo una acción protectora frente a la pérdida de p53, conocido como guardián del genoma y regulador principal de la respuesta al daño en el ADN (Williams and Schumacher 2016). La activación del Checkpoint de Mitosis-Diferenciación

(CMD) parece dependiente del papel de p21, bloqueando la entrada en mitosis de las células, que superan ese bloqueo por un proceso de deslizamiento mitótico (del inglés “mitotic slippage”), endorreplan y finalmente diferencian.

Durante el desarrollo de esta tesis, también analicé el papel de Wee1 en la activación del CMD y la diferenciación. El aumento de la proliferación celular así como la disminución de la diferenciación, sugiere un papel de Wee1 en esta respuesta. El aumento de su expresión proteica en ausencia de p21, sugiere un papel complementario de Wee1 y p21 en la diferenciación de queratinocitos. Ambas proteínas participarían en la formación de una barrera protectora que elimina las células dañadas. La presencia de Wee1 y p21 sería clave en la activación del CMD y la formación de las células diferenciadas, evitando así la proliferación descontrolada de esas células dañadas, que pueden derivar en un proceso tumoral.

La diferenciación escamosa es, un importante mecanismo antioncogénico frente al estrés de replicación (Gandarillas 2012). Los resultados de esta tesis muestran que, tanto p21 como Wee1 tienen un papel en los mecanismos de activación de esa respuesta.

Más recientemente, hemos estudiado la diferenciación escamosa y los mecanismos de activación de la respuesta, frente a distintas dosis de ultravioleta (UV; (de Pedro, Alonso-Lecue et al. 2018)). La radiación UV, al igual que el estrés de replicación, genera daño en el ADN. Está descrito en que la diferenciación, además de otros procesos como la apoptosis o la senescencia, participa en la respuesta al daño por UV en algunos tipos celulares (Sherman, Bassing et al. 2011).

El CMD en queratinocitos responde frente a dosis moderadas de UV (de Pedro, Alonso-Lecue et al. 2018). Analizamos la respuesta de los queratinocitos frente a dosis no letales de UV; se induce la activación del CMD, desencadenando un proceso de diferenciación escamosa.

Conociendo el papel de p21 y Wee1 CMD en respuesta al daño generado por el estrés de replicación, analizamos el papel de ambas proteínas en la respuesta al daño generado por la radiación ultravioleta (UV).

La radiación ultravioleta a dosis no letales induce una disminución de los marcadores de diferenciación así como un aumento de la población apoptótica en ausencia de la expresión de p21 o Wee1. Análisis posteriores realizados en nuestro laboratorio, apoyan esta hipótesis: en

ausencia de la expresión de Wee1 aumenta la expresión de algunos marcadores apoptóticos (de Pedro, Alonso-Lecue et al. 2018). Está ya descrito en algunos artículos la participación de p21 en la protección de las células frente a la apoptosis; la sobreexpresión de p21 rescata las células de una muerte celular programada dependiente de la vía de p53 (Gorospe, Cirielli et al. 1997). La sobreexpresión de p21 en este caso mejora la supervivencia celular. Toda la información contenida en la bibliografía ya publicada sostiene la importancia de la vía de p53 en el proceso de apoptosis. En respuesta a altas dosis de UV, la apoptosis es dependiente de la vía de p53 (Ziegler, Jonason et al. 1994). Nuestro grupo previamente mostró que los queratinocitos diferencian en respuesta al daño en el ADN, de forma independiente a la vía de p53 (Freije, Molinuevo et al. 2014). Los resultados de este trabajo muestran que la diferenciación en respuesta a dosis moderadas de UV también es independiente de p53 (de Pedro, Alonso-Lecue et al. 2018).

En respuesta a la radiación ultravioleta, p21 y Wee1 activan la cascada de señalización necesaria para la reparación del daño; los queratinocitos endorreplican como consecuencia del bloqueo de la división evitando la proliferación celular. En nuestro caso, los queratinocitos tienen otro destino celular; la pérdida de la expresión de p21 y Wee1 reduce el umbral de los niveles de UV soportados por los queratinocitos, generando un proceso de apoptosis. El CMD parece, por tanto, implicado en determinar el destino celular de los queratinocitos hacia la diferenciación escamosa o bien hacia la apoptosis. Tanto p21 como Wee1 son importantes para el mantenimiento de la diferenciación escamosa en queratinocitos en respuesta a la UV.

El mantenimiento de la diferenciación escamosa frente a la UV tiene bastante importancia a nivel clínico. La activación del CMD puede contribuir a los efectos beneficiosos de las dosis moderadas de UV en una persona sana, así como en el tratamiento de algunos trastornos de la piel como la psoriasis (hiperproliferación, (Parisi, Symmons et al. 2013)).

El CMD es un mecanismo necesario para el mantenimiento de la homeostasis y la integridad genómica de las células; las alteraciones en este punto de control pueden inducir un proceso de proliferación descontrolada generando inestabilidad genómica que finalice en un proceso tumoral. En nuestro estudio, analizamos dos tipos de carcinomas; el carcinoma escamoso de

piel (SCC), que es el tipo de carcinoma no melanocítico más peligroso a pesar de su aspecto diferenciado, y responde al menos de forma parcial al bloqueo de mitosis. Este CMD parece tener un papel dual en la diferenciación epidérmica: forma una barrera antiproliferativa que induce una respuesta a diferenciación frente al daño cuando es irreversible; sin embargo, genera inestabilidad genómica en aquellos casos en los que es irreversible. Los SCC capaces de superar dos bloqueos con Nz, que induce un proceso de diferenciación terminal en queratinocitos (Zanet, Freije et al. 2010). Las células que superan estos bloqueos, expresan marcadores típicos de una transición epitelio-mesénquimal, pierden características de células diferenciadas y se vuelven muy agresivos in vivo.

Como se ha comentado previamente, la Ciclina E constituye un marcador de endorreplicación en ausencia de Ciclinas mitóticas (Freije, Ceballos et al. 2012, Gandarillas 2012). En ausencia de p21, los queratinocitos muestran niveles decrecientes de Ciclina E coincidiendo con niveles crecientes de la señal del daño γ H2AX respecto del control; en los queratinocitos en los que inhibimos la expresión de p21 y p53, y que muestran los máximos valores de proliferación, se observa una disminución de la expresión de γ H2AX en comparación con la sola inhibición de p21. Paralelamente a estos resultados, los carcinomas escamosos no metastásicos acumulan altos niveles de γ H2AX al igual que los queratinocitos normales al inicio del proceso de diferenciación (Freije, Molinuevo et al. 2014) y también de Ciclina E; sin embargo los carcinomas metastásicos muestran una pérdida de la señal de γ H2AX que coincide con una pérdida de la Ciclina E en el núcleo (Alonso-Lecue, de Pedro et al. 2017). Los SCC que son capaces de dividirse a pesar del daño, son genéticamente inestables; la probabilidad de la aparición de clones más agresivos es mayor, así como la formación de un proceso tumoral. El eje entre la expresión de Ciclina E y la diferenciación escamosa parece ejercer una barrera antiproliferativa frente al daño (Gandarillas 2012); las células SCC más agresivas pierden el fenotipo escamoso para evitar la diferenciación. Es interesante que coincidiendo con nuestras observaciones de que los carcinomas más agresivos pierden señal γ H2AX, se ha relacionado también la pérdida de esta señal con la pérdida del fenotipo epitelial. En nuestros experimentos, la inhibición de la Ciclina E, indujo también una pérdida del fenotipo escamoso y las células expresaron marcadores de la transición epitelio-mesénquima (Alonso-Lecue, de Pedro et al. 2017).

La sobreexpresión de la Ciclina E parece, por tanto, formar parte de la barrera antiproliferativa en los SCC, hasta que estos son capaces de superar el bloqueo de mitosis impuesto por la diferenciación terminal.

Los resultados mostrados en esta tesis muestran un papel clave de los inhibidores de Cdk1 en la diferenciación escamosa. Estos resultados ayudan a comprender los mecanismos que dirigen el CMD y que permiten a la piel tener un mecanismo protector tan importante. Gracias a este mecanismo de “autocontrol”, la piel de forma general mantiene el equilibrio y la homeostasis celular. Como consecuencia de la acción de estos inhibidores frente al estrés de replicación y el daño generado por la radiación ultravioleta (UV), el desarrollo de los procesos tumorales en la piel poseen una incidencia más baja de la que cabría esperar por ser un órgano tan expuesto.

A partir de este modelo y el conocimiento de su mecanismo de acción, pueden desarrollarse en clínica sistemas de detección temprana, que permitan, a través de la obtención de biopsias y la utilización de técnicas estandarizadas de laboratorio como la inmunohistoquímica o la inmunofluorescencia, los análisis de estos y otros marcadores de malignización de un tumor. De esta forma podría realizarse un estudio más individualizado de la naturaleza del tumor, así como un tratamiento más efectivo.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- La diferenciación epidermoide causa un bloqueo de mitosis reversible en el carcinoma epidermoide escamoso (SCC), induciendo inestabilidad genómica
- Los SCCs agresivos pierden la barrera antiproliferativa en respuesta al estrés de replicación (Ciclina E y γ H2AX).
- La pérdida de Ciclina E en los SCCs provoca una pérdida del fenotipo escamoso.
- p21 participa en el control mitosis-diferenciación (CMD) en respuesta al estrés de replicación.
- La función de p21 en el CMD es independiente de la vía de p53.
- En ausencia de p21 y p53, las células son capaces de seguir dividiéndose, causando inestabilidad genómica.
- Wee1 participa en el control mitosis-diferenciación (CMD) en respuesta al estrés de replicación
- p21 y Wee1 poseen un papel protector de la apoptosis frente al daño generado en el ADN por la radiación UV.
- La participación de p21 y Wee1 es clave para la activación de la ruta escamosa en respuesta al daño generado por UV

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, T. and A. Dutta (2009). "p21 in cancer: intricate networks and multiple activities." Nat Rev Cancer **9**(6): 400-414.
- Abukhdeir, A. M. and B. H. Park (2008). "P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance." Expert Rev Mol Med **10**: e19.
- Adams, J. C. and F. M. Watt (1989). "Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes." Nature **340**(6231): 307-309.
- Alonso-Lecue, P., I. de Pedro, V. Coulon, R. Molinuevo, C. Lorz, C. Segrelles, L. Ceballos, D. Lopez-Aventin, A. Garcia-Valtuille, J. M. Bernal, F. Mazorra, R. M. Pujol, J. Paramio, J. Ramon Sanz, A. Freije, A. Toll and A. Gandarillas (2017). "Inefficient differentiation response to cell cycle stress leads to genomic instability and malignant progression of squamous carcinoma cells." Cell Death Dis **8**(6): e2901.
- Andreassen, P. R. and R. L. Margolis (1994). "Microtubule dependency of p34cdc2 inactivation and mitotic exit in mammalian cells." J Cell Biol **127**(3): 789-802.
- Apalla, Z., A. Lallas, E. Sotiriou, E. Lazaridou and D. Ioannides (2017). "Epidemiological trends in skin cancer." Dermatol Pract Concept **7**(2): 1-6.
- Arnold, I. and F. M. Watt (2001). "c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny." Curr Biol **11**(8): 558-568.
- Assoian, R. K. and X. Zhu (1997). "Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression." Curr Opin Cell Biol **9**(1): 93-98.
- Baccini, V., L. Roy, N. Vitrat, H. Chagraoui, S. Sabri, J. P. Le Couedic, N. Debili, F. Wendling and W. Vainchenker (2001). "Role of p21(Cip1/Waf1) in cell-cycle exit of endomitotic megakaryocytes." Blood **98**(12): 3274-3282.
- Benjamin, C. L. and H. N. Ananthaswamy (2007). "p53 and the pathogenesis of skin cancer." Toxicol Appl Pharmacol **224**(3): 241-248.
- Besson, A., S. F. Dowdy and J. M. Roberts (2008). "CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond." Dev Cell **14**(2): 159-169.
- Blackford, A. N. and S. P. Jackson (2017). "ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response." Mol Cell **66**(6): 801-817.
- Blagosklonny, M. V. and A. B. Pardee (2002). "The restriction point of the cell cycle." Cell Cycle **1**(2): 103-110.
- Blanpain, C. and E. Fuchs (2009). "Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(3): 207-217.
- Bolshakov, S., C. M. Walker, S. S. Strom, M. S. Selvan, G. L. Clayman, A. El-Naggar, S. M. Lippman, M. L. Kripke and H. N. Ananthaswamy (2003). "p53 mutations in human aggressive and nonaggressive basal and squamous cell carcinomas." Clin Cancer Res **9**(1): 228-234.
- Bouchard, C., P. Staller and M. Eilers (1998). "Control of cell proliferation by Myc." Trends Cell Biol **8**(5): 202-206.
- Bouquet, F., C. Muller and B. Salles (2006). "The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage." Cell Cycle **5**(10): 1116-1122.
- Breitbart, D., N. Mirancea and R. Nischt (2009). "Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions?" Histochem Cell Biol **132**(1): 1-10.
- Brito, D. A. and C. L. Rieder (2006). "Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint." Curr Biol **16**(12): 1194-1200.

Brown, N. R., S. Korolchuk, M. P. Martin, W. A. Stanley, R. Moukhametzianov, M. E. Noble and J. A. Endicott (2015). "CDK1 structures reveal conserved and unique features of the essential cell cycle CDK." *Nat Commun* **6**: 6769.

Brugarolas, J., R. T. Bronson and T. Jacks (1998). "p21 is a critical CDK2 regulator essential for proliferation control in Rb-deficient cells." *J Cell Biol* **141**(2): 503-514.

Bunz, F., A. Dutriaux, C. Lengauer, T. Waldman, S. Zhou, J. P. Brown, J. M. Sedivy, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1998). "Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage." *Science* **282**(5393): 1497-1501.

Canepa, E. T., M. E. Scassa, J. M. Ceruti, M. C. Marazita, A. L. Carcagno, P. F. Sirkin and M. F. Ogara (2007). "INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions." *IUBMB Life* **59**(7): 419-426.

Castro, A., C. Bernis, S. Vigneron, J. C. Labbe and T. Lorca (2005). "The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle." *Oncogene* **24**(3): 314-325.

Chang, L. F., Z. Zhang, J. Yang, S. H. McLaughlin and D. Barford (2014). "Molecular architecture and mechanism of the anaphase-promoting complex." *Nature* **513**(7518): 388-393.

Charrier-Savournin, F. B., M. T. Chateau, V. Gire, J. Sedivy, J. Piette and V. Dulic (2004). "p21-Mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress." *Mol Biol Cell* **15**(9): 3965-3976.

Claassen, G. F. and S. R. Hann (2000). "A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(17): 9498-9503.

Clute, P. and J. Pines (1999). "Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase." *Nat Cell Biol* **1**(2): 82-87.

Costa, R. H. (2005). "FoxM1 dances with mitosis." *Nat Cell Biol* **7**(2): 108-110.

Crowson, A. N. (2006). "Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications." *Mod Pathol* **19 Suppl 2**: S127-147.

Dakic, A., K. DiVito, S. Fang, F. Supryniewicz, A. Gaur, X. Li, N. Palechor-Ceron, V. Simic, S. Choudhury, S. Yu, C. M. Simbulan-Rosenthal, D. Rosenthal, R. Schlegel and X. Liu (2016). "ROCK inhibitor reduces Myc-induced apoptosis and mediates immortalization of human keratinocytes." *Oncotarget* **7**(41): 66740-66753.

Das, D., G. Pintucci and A. Stern (2000). "MAPK-dependent expression of p21(WAF) and p27(kip1) in PMA-induced differentiation of HL60 cells." *FEBS Lett* **472**(1): 50-52.

Dazard, J. E., J. Piette, N. Basset-Seguin, J. M. Blanchard and A. Gandarillas (2000). "Switch from p53 to MDM2 as differentiating human keratinocytes lose their proliferative potential and increase in cellular size." *Oncogene* **19**(33): 3693-3705.

de Pedro, I., P. Alonso-Lecue, N. Sanz-Gomez, A. Freije and A. Gandarillas (2018). "Sublethal UV irradiation induces squamous differentiation via a p53-independent, DNA damage-mitosis checkpoint." *Cell Death Dis* **9**(11): 1094.

Decesse, J. T., S. Medjkane, M. B. Datto and C. E. Cremisi (2001). "RB regulates transcription of the p21/WAF1/CIP1 gene." *Oncogene* **20**(8): 962-971.

Deibler, R. W. and M. W. Kirschner (2010). "Quantitative reconstitution of mitotic CDK1 activation in somatic cell extracts." *Mol Cell* **37**(6): 753-767.

Delavaine, L. and N. B. La Thangue (1999). "Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1." *Oncogene* **18**(39): 5381-5392.

Devgan, V., B. C. Nguyen, H. Oh and G. P. Dotto (2006). "p21WAF1/Cip1 suppresses keratinocyte differentiation independently of the cell cycle through transcriptional up-regulation of the IGF-I gene." *J Biol Chem* **281**(41): 30463-30470.

Di Cunto, F., G. Topley, E. Calautti, J. Hsiao, L. Ong, P. K. Seth and G. P. Dotto (1998). "Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control." *Science* **280**(5366): 1069-1072.

Do, K., J. H. Doroshov and S. Kummar (2013). "Wee1 kinase as a target for cancer therapy." *Cell Cycle* **12**(19): 3159-3164.

Dotto, G. P. (2000). "p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle?" Biochim Biophys Acta **1471**(1): M43-56.

Dotto, G. P. (2008). "Notch tumor suppressor function." Oncogene **27**(38): 5115-5123.

Eckhart, L., S. Lippens, E. Tschachler and W. Declercq (2013). "Cell death by cornification." Biochim Biophys Acta **1833**(12): 3471-3480.

Edgar, B. A. and T. L. Orr-Weaver (2001). "Endoreplication cell cycles: more for less." Cell **105**(3): 297-306.

Eilers, M. and R. N. Eisenman (2008). "Myc's broad reach." Genes Dev **22**(20): 2755-2766.

El-Deiry, W. S. (2016). "p21(WAF1) Mediates Cell-Cycle Inhibition, Relevant to Cancer Suppression and Therapy." Cancer Res **76**(18): 5189-5191.

Elbendary, A. A., F. D. Cirisano, A. C. Evans, Jr., P. L. Davis, J. D. Iglehart, J. R. Marks and A. Berchuck (1996). "Relationship between p21 expression and mutation of the p53 tumor suppressor gene in normal and malignant ovarian epithelial cells." Clin Cancer Res **2**(9): 1571-1575.

Enserink, J. M. and R. D. Kolodner (2010). "An overview of Cdk1-controlled targets and processes." Cell Div **5**: 11.

Fahradyan, A., A. C. Howell, E. M. Wolfswinkel, M. Tsuha, P. Sheth and A. K. Wong (2017). "Updates on the Management of Non-Melanoma Skin Cancer (NMSC)." Healthcare (Basel) **5**(4).

Fernandez-Vidal, A., J. Vignard and G. Mirey (2017). "Around and beyond 53BP1 Nuclear Bodies." Int J Mol Sci **18**(12).

Freije, A., L. Ceballos, M. Coisy, L. Barnes, M. Rosa, E. De Diego, J. M. Blanchard and A. Gandarillas (2012). "Cyclin E drives human keratinocyte growth into differentiation." Oncogene **31**(50): 5180-5192.

Freije, A., R. Molinuevo, L. Ceballos, M. Cagigas, P. Alonso-Lecue, R. Rodriguez, P. Menendez, D. Aberdam, E. De Diego and A. Gandarillas (2014). "Inactivation of p53 in Human Keratinocytes Leads to Squamous Differentiation and Shedding via Replication Stress and Mitotic Slippage." Cell Rep **9**(4): 1349-1360.

Fuchs, E. and T. Chen (2013). "A matter of life and death: self-renewal in stem cells." EMBO Rep **14**(1): 39-48.

Gadea, B. B. and J. V. Ruderman (2005). "Aurora kinase inhibitor ZM447439 blocks chromosome-induced spindle assembly, the completion of chromosome condensation, and the establishment of the spindle integrity checkpoint in Xenopus egg extracts." Mol Biol Cell **16**(3): 1305-1318.

Gandarillas, A. (2000). "Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways?" Exp Gerontol **35**(1): 53-62.

Gandarillas, A. (2012). "The mysterious human epidermal cell cycle, or an oncogene-induced differentiation checkpoint." Cell Cycle **11**(24): 4507-4516.

Gandarillas, A. and A. Freije (2014). "Cycling up the epidermis: reconciling 100 years of debate." Exp Dermatol **23**(2): 87-91.

Gandarillas, A., R. Molinuevo, A. Freije and P. Alonso-Lecue (2015). "The mitosis-differentiation checkpoint, another guardian of the epidermal genome." Mol Cell Oncol **2**(3): e997127.

Gandarillas, A., R. Molinuevo and N. Sanz-Gomez (2018). "Mammalian endoreplication emerges to reveal a potential developmental timer." Cell Death Differ **25**(3): 471-476.

Gandarillas, A. and F. M. Watt (1997). "c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells." Genes Dev **11**(21): 2869-2882.

Gardino, A. K. and M. B. Yaffe (2011). "14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis." Semin Cell Dev Biol **22**(7): 688-695.

Gavet, O. and J. Pines (2010). "Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis." J Cell Biol **189**(2): 247-259.

Georgakilas, A. G., O. A. Martin and W. M. Bonner (2017). "p21: A Two-Faced Genome Guardian." Trends Mol Med **23**(4): 310-319.

Gong, D. and J. E. Ferrell, Jr. (2010). "The roles of cyclin A2, B1, and B2 in early and late mitotic events." *Mol Biol Cell* **21**(18): 3149-3161.

Gorospe, M., C. Cirielli, X. Wang, P. Seth, M. C. Capogrossi and N. J. Holbrook (1997). "p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells." *Oncogene* **14**(8): 929-935.

Guo, H., T. Tian, K. Nan and W. Wang (2010). "p57: A multifunctional protein in cancer (Review)." *Int J Oncol* **36**(6): 1321-1329.

Hall, P. A., P. H. McKee, H. D. Menage, R. Dover and D. P. Lane (1993). "High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin." *Oncogene* **8**(1): 203-207.

Harper, J. W., J. L. Burton and M. J. Solomon (2002). "The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more." *Genes Dev* **16**(17): 2179-2206.

Harper, J. W., S. J. Elledge, K. Keyomarsi, B. Dynlacht, L. H. Tsai, P. Zhang, S. Dobrowolski, C. Bai, L. Connell-Crowley, E. Swindell and et al. (1995). "Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21." *Mol Biol Cell* **6**(4): 387-400.

Harvey, S. L., G. Enciso, N. Dephoure, S. P. Gygi, J. Gunawardena and D. R. Kellogg (2011). "A phosphatase threshold sets the level of Cdk1 activity in early mitosis in budding yeast." *Mol Biol Cell* **22**(19): 3595-3608.

Hatakeyama, M. and R. A. Weinberg (1995). "The role of RB in cell cycle control." *Prog Cell Cycle Res* **1**: 9-19.

Heenen, M., G. Achten and P. Galand (1973). "Autoradiographic analysis of cell kinetics in human normal epidermis and basal cell carcinoma." *Cancer Res* **33**(1): 123-127.

Hengst, L. and S. I. Reed (1998). "Inhibitors of the Cip/Kip family." *Curr Top Microbiol Immunol* **227**: 25-41.

Hermeking, H. (2003). "The 14-3-3 cancer connection." *Nat Rev Cancer* **3**(12): 931-943.

Hochegger, H., S. Takeda and T. Hunt (2008). "Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?" *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(11): 910-916.

Hoffmann, B., A. Piasecki and D. Paul (1989). "Proliferation of fetal rat hepatocytes in response to growth factors and hormones in primary culture." *J Cell Physiol* **139**(3): 654-662.

Houtgraaf, J. H., J. Versmissen and W. J. van der Giessen (2006). "A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells." *Cardiovasc Revasc Med* **7**(3): 165-172.

Hydbring, P., M. Malumbres and P. Sicinski (2016). "Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**(5): 280-292.

Inomata, K., T. Aoto, N. T. Binh, N. Okamoto, S. Tanimura, T. Wakayama, S. Iseki, E. Hara, T. Masunaga, H. Shimizu and E. K. Nishimura (2009). "Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation." *Cell* **137**(6): 1088-1099.

Inoue, N., N. Yahagi, T. Yamamoto, M. Ishikawa, K. Watanabe, T. Matsuzaka, Y. Nakagawa, Y. Takeuchi, K. Kobayashi, A. Takahashi, H. Suzuki, A. H. Hasty, H. Toyoshima, N. Yamada and H. Shimano (2008). "Cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, is involved in adipocyte differentiation and hypertrophy, linking to obesity, and insulin resistance." *J Biol Chem* **283**(30): 21220-21229.

Iyer, D. R. and N. Rhind (2017). "The Intra-S Checkpoint Responses to DNA Damage." *Genes (Basel)* **8**(2).

Jensen, K. B. and F. M. Watt (2006). "Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: Lrig1 is a regulator of stem cell quiescence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(32): 11958-11963.

Jones, P. H. and F. M. Watt (1993). "Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression." *Cell* **73**(4): 713-724.

Karimian, A., Y. Ahmadi and B. Yousefi (2016). "Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage." *DNA Repair (Amst)* **42**: 63-71.

Kastan, M. B. and J. Bartek (2004). "Cell-cycle checkpoints and cancer." *Nature* **432**(7015): 316-323.

Kirk, D. and D. A. Clingan (1980). "Normal human endometrium in cell culture. III. Mechanism(s) of epithelial polyploidization." Cell Biol Int Rep **4**(1): 83-92.

Kolev, V., A. Mandinova, J. Guinea-Viniegra, B. Hu, K. Lefort, C. Lambertini, V. Neel, R. Dummer, E. F. Wagner and G. P. Dotto (2008). "EGFR signalling as a negative regulator of Notch1 gene transcription and function in proliferating keratinocytes and cancer." Nat Cell Biol **10**(8): 902-911.

Kopper, F., C. Bierwirth, M. Schon, M. Kunze, I. Elvers, D. Kranz, P. Saini, M. B. Menon, D. Walter, C. S. Sorensen, M. Gaestel, T. Helleday, M. P. Schon and M. Dobbstein (2013). "Damage-induced DNA replication stalling relies on MAPK-activated protein kinase 2 activity." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(42): 16856-16861.

Krek, W., G. Xu and D. M. Livingston (1995). "Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint." Cell **83**(7): 1149-1158.

Kubler, M. D. and F. M. Watt (1993). "Changes in the distribution of actin-associated proteins during epidermal wound healing." J Invest Dermatol **100**(6): 785-789.

Lee, J., A. Kumagai and W. G. Dunphy (2001). "Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins." Mol Biol Cell **12**(3): 551-563.

Lee, J. H., H. T. An, J. H. Chung, K. H. Kim, H. C. Eun and K. H. Cho (2002). "Acute effects of UVB radiation on the proliferation and differentiation of keratinocytes." Photodermatol Photoimmunol Photomed **18**(5): 253-261.

Lefort, K., A. Mandinova, P. Ostano, V. Kolev, V. Calpini, I. Kolfschoten, V. Devgan, J. Lieb, W. Raffoul, D. Hohl, V. Neel, J. Garlick, G. Chiorino and G. P. Dotto (2007). "Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCKalpha kinases." Genes Dev **21**(5): 562-577.

Lewis, D. A., Q. Yi, J. B. Travers and D. F. Spandau (2008). "UVB-induced senescence in human keratinocytes requires a functional insulin-like growth factor-1 receptor and p53." Mol Biol Cell **19**(4): 1346-1353.

Lim, S. and P. Kaldis (2013). "Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation." Development **140**(15): 3079-3093.

Lossaint, G., E. Besnard, D. Fisher, J. Piette and V. Dulic (2011). "Chk1 is dispensable for G2 arrest in response to sustained DNA damage when the ATM/p53/p21 pathway is functional." Oncogene **30**(41): 4261-4274.

Ludlow, J. W., C. L. Glendening, D. M. Livingston and J. A. DeCarprio (1993). "Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein." Mol Cell Biol **13**(1): 367-372.

Maeda, T., M. T. Chong, R. A. Espino, P. P. Chua, J. Q. Cao, E. G. Chomey, L. Luong and V. A. Tron (2002). "Role of p21(Waf-1) in regulating the G1 and G2/M checkpoints in ultraviolet-irradiated keratinocytes." J Invest Dermatol **119**(2): 513-521.

Malumbres, M. (2014). "Cyclin-dependent kinases." Genome Biol **15**(6): 122.

Malumbres, M. and M. Barbacid (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." Nat Rev Cancer **9**(3): 153-166.

Marques-Torres, M. A., E. Porlan, A. Banito, E. Gomez-Ibarlucea, A. J. Lopez-Contreras, O. Fernandez-Capetillo, A. Vidal, J. Gil, J. Torres and I. Farinas (2013). "Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression." Cell Stem Cell **12**(1): 88-100.

Mata-Garrido, J., I. Casafont, O. Tapia, M. T. Berciano and M. Lafarga (2016). "Neuronal accumulation of unrepaired DNA in a novel specific chromatin domain: structural, molecular and transcriptional characterization." Acta Neuropathol Commun **4**: 41.

Matheson, C. J., D. S. Backos and P. Reigan (2016). "Targeting WEE1 Kinase in Cancer." Trends Pharmacol Sci **37**(10): 872-881.

McCloy, R. A., S. Rogers, C. E. Caldon, T. Lorca, A. Castro and A. Burgess (2014). "Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events." Cell Cycle **13**(9): 1400-1412.

McCourt, C., O. Dolan and G. Gormley (2014). "Malignant melanoma: a pictorial review." Ulster Med J **83**(2): 103-110.

McMillan, J. R., M. Akiyama and H. Shimizu (2003). "Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions." J Dermatol Sci **31**(3): 169-177.

Miller, S. J. (1991). "Biology of basal cell carcinoma (Part I)." J Am Acad Dermatol **24**(1): 1-13.

Missero, C. and D. Antonini (2014). "Crosstalk among p53 family members in cutaneous carcinoma." Exp Dermatol **23**(3): 143-146.

Missero, C., E. Calautti, R. Eckner, J. Chin, L. H. Tsai, D. M. Livingston and G. P. Dotto (1995). "Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5451-5455.

Missero, C., F. Di Cunto, H. Kiyokawa, A. Koff and G. P. Dotto (1996). "The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression." Genes Dev **10**(23): 3065-3075.

Molinuevo, R., A. Freije, I. de Pedro, S. W. Stoll, J. T. Elder and A. Gandarillas (2017). "FOXO1 allows human keratinocytes to bypass the oncogene-induced differentiation checkpoint in response to gain of MYC or loss of p53." Oncogene **36**(7): 956-965.

Moll, R., M. Divo and L. Langbein (2008). "The human keratins: biology and pathology." Histochem Cell Biol **129**(6): 705-733.

Morgan, D. O. (1995). "Principles of CDK regulation." Nature **374**(6518): 131-134.

Muller, P. A. and K. H. Vousden (2014). "Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities." Cancer Cell **25**(3): 304-317.

Musacchio, A. (2015). "The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics." Curr Biol **25**(20): R1002-1018.

Nevins, J. R. (1998). "Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families." Cell Growth Differ **9**(8): 585-593.

Nguyen, M., G. Mikita and R. S. Hoda (2016). "Inter-cellular bridges" in a case of well differentiated squamous carcinoma." Diagn Cytopathol **44**(2): 121-123.

Niculescu, A. B., 3rd, X. Chen, M. Smeets, L. Hengst, C. Prives and S. I. Reed (1998). "Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication." Mol Cell Biol **18**(1): 629-643.

Niemann, C. and F. M. Watt (2002). "Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis." Trends Cell Biol **12**(4): 185-192.

Nyberg, K. A., R. J. Michelson, C. W. Putnam and T. A. Weinert (2002). "Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints." Annu Rev Genet **36**: 617-656.

Ogawa, R. and C. K. Hsu (2013). "Mechanobiological dysregulation of the epidermis and dermis in skin disorders and in degeneration." J Cell Mol Med **17**(7): 817-822.

Okuyama, R., K. LeFort and G. P. Dotto (2004). "A dynamic model of keratinocyte stem cell renewal and differentiation: role of the p21WAF1/Cip1 and Notch1 signaling pathways." J Invest Dermatol Symp Proc **9**(3): 248-252.

Pagano, M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge and G. Draetta (1992). "Cyclin A is required at two points in the human cell cycle." EMBO J **11**(3): 961-971.

Panelos, J. and D. Massi (2009). "Emerging role of Notch signaling in epidermal differentiation and skin cancer." Cancer Biol Ther **8**(21): 1986-1993.

Panier, S. and S. J. Boulton (2014). "Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(1): 7-18.

Parisi, R., D. P. Symmons, C. E. Griffiths, D. M. Ashcroft, Identification, P. Management of and t. Associated Comorbidity project (2013). "Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence." J Invest Dermatol **133**(2): 377-385.

Pawlowski, J. and A. S. Kraft (2000). "Bax-induced apoptotic cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 529-531.

Pines, J. and T. Hunter (1989). "Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2." Cell **58**(5): 833-846.

Poumay, Y. and M. R. Pittelkow (1995). "Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins." J Invest Dermatol **104**(2): 271-276.

Rangarajan, A., C. Talora, R. Okuyama, M. Nicolas, C. Mammucari, H. Oh, J. C. Aster, S. Krishna, D. Metzger, P. Chambon, L. Miele, M. Aguet, F. Radtke and G. P. Dotto (2001). "Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation." EMBO J **20**(13): 3427-3436.

Rheinwald, J. G. and M. A. Beckett (1980). "Defective terminal differentiation in culture as a consistent and selectable character of malignant human keratinocytes." Cell **22**(2 Pt 2): 629-632.

Romanov, V. S., V. A. Pospelov and T. V. Pospelova (2012). "Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis." Biochemistry (Mosc) **77**(6): 575-584.

Romanov, V. S. and K. L. Rudolph (2016). "p21 shapes cancer evolution." Nat Cell Biol **18**(7): 722-724.

Roninson, I. B. (2002). "Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts." Cancer Lett **179**(1): 1-14.

Samarasinghe, V., V. Madan and J. T. Lear (2011). "Focus on Basal cell carcinoma." J Skin Cancer **2011**: 328615.

Samson, F., J. A. Donoso, I. Heller-Bettinger, D. Watson and R. H. Himes (1979). "Nocodazole action on tubulin assembly, axonal ultrastructure and fast axoplasmic transport." J Pharmacol Exp Ther **208**(3): 411-417.

Santamaria, D., C. Barriere, A. Cerqueira, S. Hunt, C. Tardy, K. Newton, J. F. Caceres, P. Dubus, M. Malumbres and M. Barbacid (2007). "Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle." Nature **448**(7155): 811-815.

Sanz-Gomez, N., A. Freije, L. Ceballos, S. Obeso, J. R. Sanz, F. Garcia-Reija, C. Morales-Angulo and A. Gandarillas (2018). "Response of head and neck epithelial cells to a DNA damage-differentiation checkpoint involving polyploidization." Head Neck.

Satyanarayana, A. and P. Kaldis (2009). "Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms." Oncogene **28**(33): 2925-2939.

Schafer, K. A. (1998). "The cell cycle: a review." Vet Pathol **35**(6): 461-478.

Schmidt, M., M. Goebeler, G. Posern, S. M. Feller, C. S. Seitz, E. B. Brocker, U. R. Rapp and S. Ludwig (2000). "Ras-independent activation of the Raf/MEK/ERK pathway upon calcium-induced differentiation of keratinocytes." J Biol Chem **275**(52): 41011-41017.

Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach and S. W. Lowe (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." Cell **88**(5): 593-602.

Shakeri, R., A. Kheirollahi and J. Davoodi (2017). "Apaf-1: Regulation and function in cell death." Biochimie **135**: 111-125.

Shechter, D., V. Costanzo and J. Gautier (2004). "Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 901-908.

Shen, J. C., R. D. Klein, Q. Wei, Y. Guan, J. H. Contois, T. T. Wang, S. Chang and S. D. Hursting (2000). "Low-dose genistein induces cyclin-dependent kinase inhibitors and G(1) cell-cycle arrest in human prostate cancer cells." Mol Carcinog **29**(2): 92-102.

Sherman, M. H., C. H. Bassing and M. A. Teitell (2011). "Regulation of cell differentiation by the DNA damage response." Trends Cell Biol **21**(5): 312-319.

Sherr, C. J. (1994). "Growth factor-regulated G1 cyclins." Stem Cells **12 Suppl 1**: 47-55; discussion 55-47.

Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1995). "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases." Genes Dev **9**(10): 1149-1163.

Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev **13**(12): 1501-1512.

Sherr, C. J. and J. M. Roberts (2004). "Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases." Genes Dev **18**(22): 2699-2711.

Simoes, M. C. F., J. J. S. Sousa and A. Pais (2015). "Skin cancer and new treatment perspectives: a review." Cancer Lett **357**(1): 8-42.

Singh, N. and S. Anand (1994). "Cell death by apoptosis." Indian J Exp Biol **32**(12): 843-847.

Sun, T. T. and H. Green (1976). "Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of the cornified envelope." Cell **9**(4 Pt 1): 511-521.

Taylor, W. R. and G. R. Stark (2001). "Regulation of the G2/M transition by p53." Oncogene **20**(15): 1803-1815.

Topley, G. I., R. Okuyama, J. G. Gonzales, C. Conti and G. P. Dotto (1999). "p21(WAF1/Cip1) functions as a suppressor of malignant skin tumor formation and a determinant of keratinocyte stem-cell potential." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9089-9094.

Tsvetkova, A., I. V. Ozerov, M. Pustovalova, A. Grekhova, P. Eremin, N. Vorobyeva, I. Eremin, A. Pulin, V. Zorin, P. Kopnin, S. Leonov, A. Zhavoronkov, D. Klovov and A. N. Osipov (2017). "gammaH2AX, 53BP1 and Rad51 protein foci changes in mesenchymal stem cells during prolonged X-ray irradiation." Oncotarget **8**(38): 64317-64329.

Turinetto, V. and C. Giachino (2015). "Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions." Nucleic Acids Res **43**(5): 2489-2498.

Van Oudenhove, J. J., R. A. Grandy, P. N. Ghule, R. Del Rio, J. B. Lian, J. L. Stein, S. K. Zaidi and G. S. Stein (2016). "Lineage-Specific Early Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Requires a G2 Cell Cycle Pause." Stem Cells **34**(7): 1765-1775.

Velarde, M. C. and M. Demaria (2016). "Targeting Senescent Cells: Possible Implications for Delaying Skin Aging: A Mini-Review." Gerontology **62**(5): 513-518.

Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele and Z. N. Berneman (2003). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer." Cell Prolif **36**(3): 131-149.

Waikel, R. L., Y. Kawachi, P. A. Waikel, X. J. Wang and D. R. Roop (2001). "Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells." Nat Genet **28**(2): 165-168.

Ward, I. M., K. Minn, K. G. Jorda and J. Chen (2003). "Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX." J Biol Chem **278**(22): 19579-19582.

Watt, F. M. (1989). "Terminal differentiation of epidermal keratinocytes." Curr Opin Cell Biol **1**(6): 1107-1115.

Watt, F. M. (2002). "Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation." EMBO J **21**(15): 3919-3926.

Watt, F. M. and H. Green (1981). "Involucrin synthesis is correlated with cell size in human epidermal cultures." J Cell Biol **90**(3): 738-742.

Watt, F. M. and H. Green (1982). "Stratification and terminal differentiation of cultured epidermal cells." Nature **295**(5848): 434-436.

Weber, A. M. and A. J. Ryan (2015). "ATM and ATR as therapeutic targets in cancer." Pharmacol Ther **149**: 124-138.

Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." Cell **81**(3): 323-330.

West, H. C. and C. L. Bennett (2017). "Redefining the Role of Langerhans Cells As Immune Regulators within the Skin." Front Immunol **8**: 1941.

Williams, A. B. and B. Schumacher (2016). "p53 in the DNA-Damage-Repair Process." Cold Spring Harb Perspect Med **6**(5).

Woo, R. A. and R. Y. Poon (2003). "Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells." Cell Cycle **2**(4): 316-324.

Yam, C. H., T. K. Fung and R. Y. Poon (2002). "Cyclin A in cell cycle control and cancer." Cell Mol Life Sci **59**(8): 1317-1326.

Yang, J., Z. P. Xu, Y. Huang, H. E. Hamrick, P. J. Duerksen-Hughes and Y. N. Yu (2004). "ATM and ATR: sensing DNA damage." World J Gastroenterol **10**(2): 155-160.

Yekezare, M., B. Gomez-Gonzalez and J. F. Diffley (2013). "Controlling DNA replication origins in response to DNA damage - inhibit globally, activate locally." J Cell Sci **126**(Pt 6): 1297-1306.

Zanet, J., A. Freije, M. Ruiz, V. Coulon, J. R. Sanz, J. Chiesa and A. Gandarillas (2010). "A mitosis block links active cell cycle with human epidermal differentiation and results in endoreplication." PLoS One **5**(12): e15701.

Zanet, J., S. Pibre, C. Jacquet, A. Ramirez, I. M. de Alboran and A. Gandarillas (2005). "Endogenous Myc controls mammalian epidermal cell size, hyperproliferation, endoreplication and stem cell amplification." J Cell Sci **118**(Pt 8): 1693-1704.

Zhang, W., Y. Liu, N. Zhao, H. Chen, L. Qiao, W. Zhao and J. J. Chen (2015). "Role of Cdk1 in the p53-independent abrogation of the postmitotic checkpoint by human papillomavirus E6." J Virol **89**(5): 2553-2562.

Zhou, B. B. and S. J. Elledge (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." Nature **408**(6811): 433-439.

Ziegler, A., A. S. Jonason, D. J. Leffell, J. A. Simon, H. W. Sharma, J. Kimmelman, L. Remington, T. Jacks and D. E. Brash (1994). "Sunburn and p53 in the onset of skin cancer." Nature **372**(6508): 773-776.

Zielke, N., B. A. Edgar and M. L. DePamphilis (2013). "Endoreplication." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(1): a012948.

Zimmermann, M. and T. de Lange (2014). "53BP1: pro choice in DNA repair." Trends Cell Biol **24**(2): 108-117.

ANEXO I

Inefficient differentiation response to cell cycle stress leads to genomic instability and malignant progression of squamous carcinoma cells

Pilar Alonso-Lecue^{1,11}, Isabel de Pedro^{1,11}, Vincent Coulon², Rut Molinuevo¹, Corina Lorz³, Carmen Segrelles³, Laura Ceballos¹, Daniel López-Aventín⁴, Ana García-Valtuille⁵, José M Bernal^{1,6}, Francisco Mazorra^{5,7}, Ramón M Pujol^{4,8}, Jesús Paramio³, J Ramón Sanz^{1,5,9}, Ana Freije¹, Agustí Toll^{4,8} and Alberto Gandarillas^{*,1,10}

Squamous cell carcinoma (SCC) or epidermoid cancer is a frequent and aggressive malignancy. However in apparent paradox it retains the squamous differentiation phenotype except for very dysplastic lesions. We have shown that cell cycle stress in normal epidermal keratinocytes triggers a squamous differentiation response involving irreversible mitosis block and polyploidisation. Here we show that cutaneous SCC cells conserve a partial squamous DNA damage-induced differentiation response that allows them to overcome the cell division block. The capacity to divide in spite of drug-induced mitotic stress and DNA damage made well-differentiated SCC cells more genomically instable and more malignant *in vivo*. Consistently, in a series of human biopsies, non-metastatic SCCs displayed a higher degree of chromosomal alterations and higher expression of the S phase regulator Cyclin E and the DNA damage signal γ H2AX than the less aggressive, non-squamous, basal cell carcinomas. However, metastatic SCCs lost the γ H2AX signal and Cyclin E, or accumulated cytoplasmic Cyclin E. Conversely, inhibition of endogenous Cyclin E in well-differentiated SCC cells interfered with the squamous phenotype. The results suggest a dual role of cell cycle stress-induced differentiation in squamous cancer: the resulting mitotic blocks would impose, when irreversible, a proliferative barrier, when reversible, a source of genomic instability, thus contributing to malignancy.

Cell Death and Disease (2017) 8, e2901; doi:10.1038/cddis.2017.259; published online 29 June 2017

Squamous cell carcinoma (SCC) or epidermoid carcinoma arises in stratified epithelia including skin, head and neck, oesophagus, or cervix but also in simple epithelia (25–30% of lung cancer; <http://www.cancer.org> <http://www.cancer.gov>). SCCs are often aggressive and have poor prognosis causing significant death numbers. Although clinics and treatment of SCCs vary, they are mostly caused by external mutagenic agents (UV light, smoking, alcohol). Cutaneous SCC is not frequently fatal (4% metastasize)¹ but is a paradigmatic and accessible model for the study of squamous cancer. The two types of cutaneous carcinoma: basal cell carcinoma (BCC; 80%) and SCC (20%) are the most common forms of cancer.^{1–4} The comparison of BCC and SCC provides divergent lesions displaying different molecular alterations and paradoxical contrasting prognosis.⁵ While SCCs retain a squamous differentiated phenotype except for very dysplastic lesions,⁶ BCCs typically contain undifferentiated small cells reminiscent of proliferative basal keratinocytes although they display slow growth⁷ and a very low metastatic rate (0.1%).⁸ Why SCCs are more aggressive than skin BCCs,

is a relevant clinical and biological question that remains unresolved.

We have previously revealed a novel epidermal response that triggers squamous differentiation upon cell cycle deregulation and DNA damage.^{9–12} This DNA damage response (DDR) suppresses cell division but allows extra rounds of DNA replication resulting in polyploidy. This involves mitotic bypass (without intervening mitosis), mitotic slippage (defined as failure to arrest in G2/M)¹³ or acytokinetic mitosis.¹² Due to this process, cell cycle stress induced in human keratinocytes by proto-oncogene MYC, the DNA replication regulator Cyclin E, or by inactivation of tumour suppressor p53, does not result in cellular transformation, but in a G2/M block that in turn induces squamous differentiation and polyploidy.^{9,10,14} We have proposed that this response constitutes an anti-oncogenic mechanism by which pre-cancerous cells are eliminated from the skin via squamous differentiation.^{10,11} Consistently, in a large body of works on mouse skin differentiation prevailed upon overexpression of cell cycle or oncogenic molecules (for example, refs 15–17 reviewed in ref. 11).

¹Cell Cycle, Stem Cell Fate and Cancer Laboratory, Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain; ²Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, CNRS/UM2, Montpellier, France; ³Molecular Oncology Unit, Department of Basic Research, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), CIBERONC, Madrid, Spain; ⁴Department of Dermatology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ⁵Clínica Mompía, Mompía, Spain; ⁶Department of Cardiovascular Surgery, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain; ⁷Department of Pathology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain; ⁸Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, Barcelona, Spain; ⁹Department of Plastic Surgery, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain and ¹⁰INSERM, Languedoc-Roussillon, Montpellier, France

*Corresponding author: Dr A Gandarillas, Cell Cycle, Stem Cell Fate and Cancer Lab, Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Cardenal Herrera Oria s/n, Santander, Cantabria 39011, Spain; Tel: +34 942315515 074111; Fax: +34 942315517; E-mail: agandarillas@idival.org

¹¹These authors contributed equally to this work.

Received 16.9.16; revised 12.4.17; accepted 04.5.17; Edited by R Aqeilan

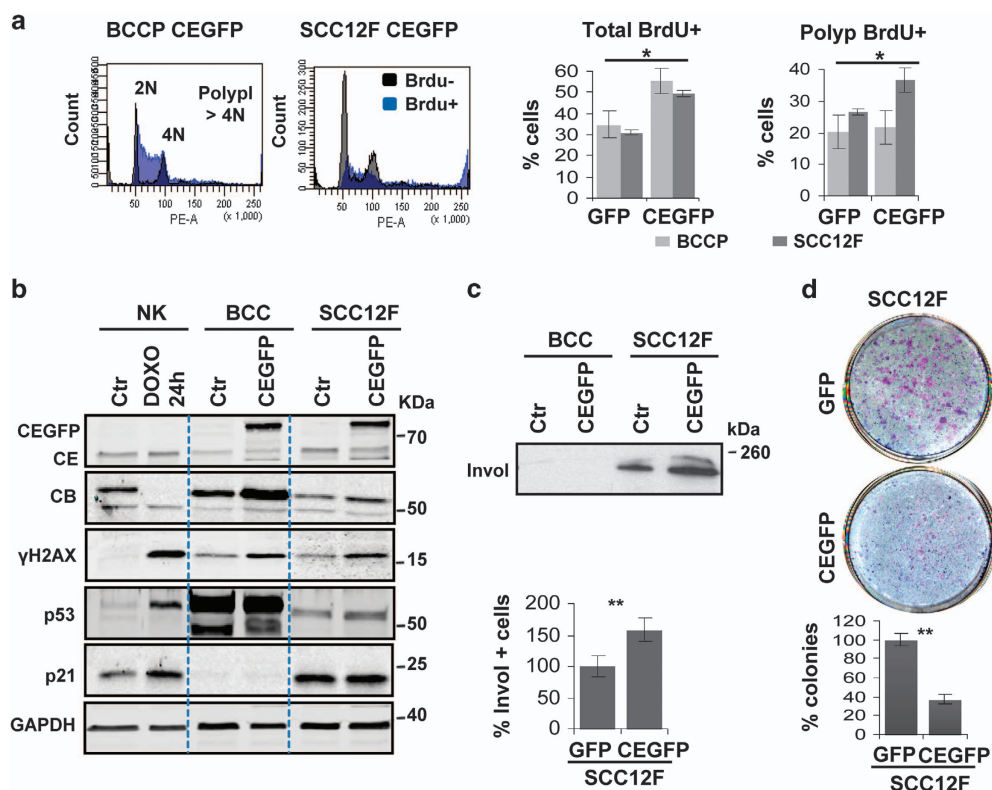


Figure 1 Cyclin E induces a partial squamous differentiation response in SCC12F cells and proliferation in BCCP cells. (a) Plots: representative cell cycle profiles (propidium iodide) of BCCP or SCC12F overexpressing Cyclin E-GFP (CEGFP) after a 1.5 h pulse of BrdU. BrdU negative (–) cells in black and BrdU positive cells (BrdU+) in blue. Bars: quantitation of total BrdU positive (+) cells or polyploid (> 4N) BrdU+ cells in BCCP (light grey) or SCC12F (dark grey) overexpressing GFP or CEGFP. See also Supplementary Figure 1b. (b) Detection by western blot of CEGFP, Cyclin E (CE), Cyclin B (CB), γH2AX, p53, or p21 in normal keratinocytes (NK) untreated (Ctr) or treated 24 h with doxorubicin (DOXO); or in BCC and SCC12F cells Ctr or overexpressing CEGFP. GAPDH is loading control. (c) Top: detection by western blot of involucrin in insoluble protein extracts (Invol); same number of cells per lane. Uncropped blots are shown in Supplementary Figure 12. Bottom: percent of SCC12F-CEGFP positive cells for Invol relative to SCC12F-GFP (as determined by immunofluorescence; Supplementary Figure 1d). (d) Top: clonogenic capacity of SCC12F-GFP and SCC12F-CEGFP, first passage after infection (1000 cells per well, wells are representative of triplicate samples; blue is the fibroblast feeder layer, pink the carcinoma cells); bottom: percent of proliferative colonies of SCC12F-CEGFP relative to SCC12F-GFP. Error bars are s.e.m. of duplicate or triplicate samples of at least two independent representative experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$

Replication stress by causing DNA damage alerts cell cycle checkpoints of G2 and mitosis.^{18,19} In keratinocytes, a mere impairment of the G2/M transitions induces massive terminal squamous differentiation and polyploidy and loss of proliferative potential within 48 h.^{9,14,20} This includes the inhibition of mitotic kinases (Aurora Kinase B, Polo-like Kinase, cdk1) or microtubuli (Nocodazole, Taxol) and also S phase defects (Doxorubicin or Bleomycine). We hypothesised that the capacity of SCC cells to divide upon replication stress in spite of polyploidy might contribute to malignancy. This would require alterations in mitosis control.¹⁰ Supporting this notion, overexpression of the global mitotic regulator FOXM1 drives the keratinocyte response to ectopic MYC or loss of p53 from increased differentiation to increased proliferation.²¹

We have now investigated the alterations of SCC and BCC cells in their response to cell cycle stress. We find that SCC but not BCC cells retain a partial squamous differentiation response to replication stress induced by Cyclin E. Analyses of a panel of human biopsies of BCC, non-metastatic SCC and metastatic SCC reveal significant differences in the expression of Cyclin E and in levels of DNA damage. In addition, we report that mitotic stress induced by consecutive mitosis

blocks drive SCC cells to accumulate DNA damage, to progressively lose the squamous phenotype, to gain mesenchymal features and to become more malignant *in vivo*. We propose a model by which alterations in the squamous differentiation DDR at mitosis contributes to genomic instability and malignant progression of squamous cancer. This might contribute explaining why SCC tends to be aggressive in opposition to the less differentiated BCC.

Results

Cyclin E accumulates during squamous differentiation and when overexpressed in proliferative keratinocytes it promotes replication stress, DNA damage, mitotic defects and polyploidy.^{9,20,22,23} To study this response in carcinoma cells we overexpressed a GFP form of Cyclin E in cells originated from a human facial BCC (BCCP;²⁴ Supplementary Figure 1a) or from a human facial well-differentiated SCC (SCC12F;²⁵ Supplementary Figure 1a). Cyclin E induced DNA replication both in BCCP and SCC12F as monitored by BrdU incorporation (Figure 1a; Supplementary Figure 1b). However, whereas in BCCP this resulted in a boost of S phase, in SCC12F it

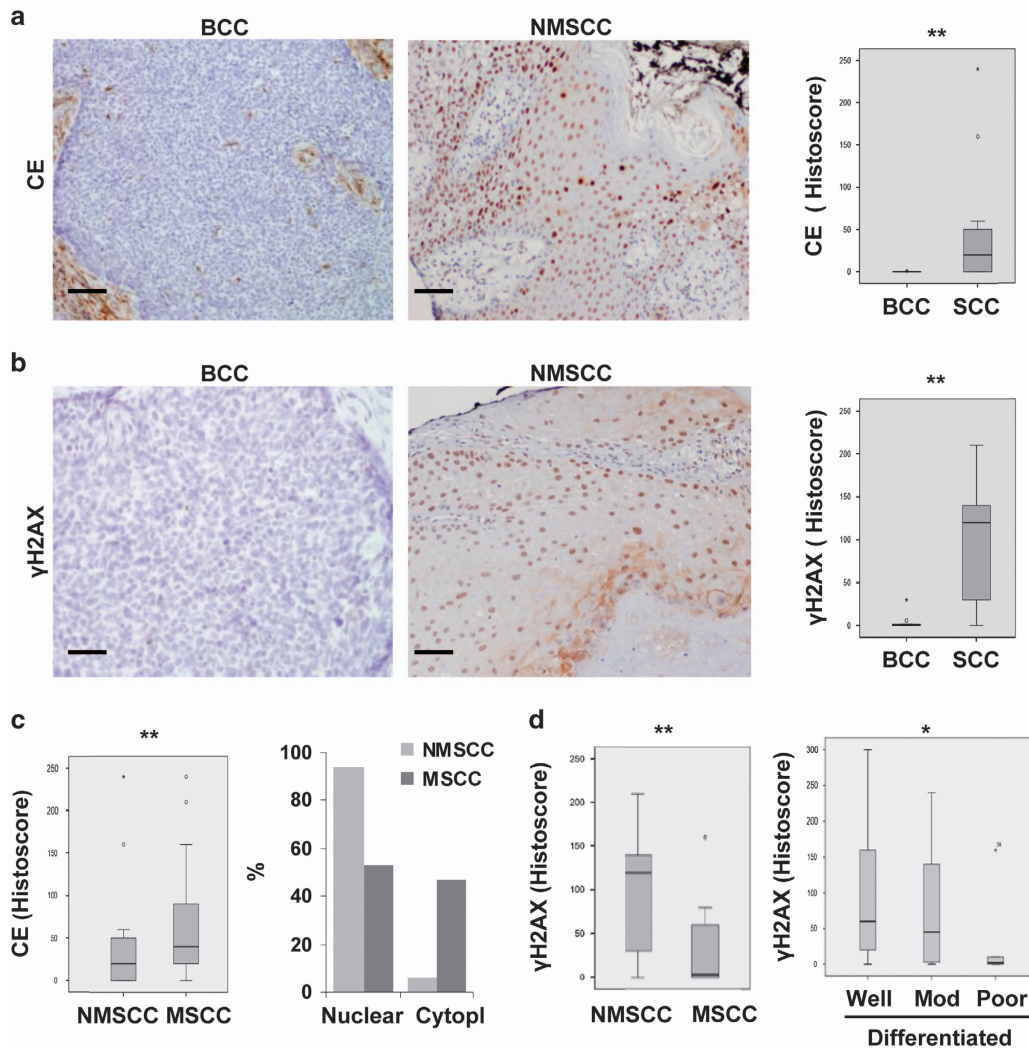


Figure 2 The axis Cyclin E/γH2AX is high in human NMSSCs, low in BCCs and MSSCs. (a,b) Microphotographs show representative images of immunohistochemical (IHC) staining of BCC or non-metastatic SCC (NMSSC) biopsies for (a) Cyclin E (CE) or (b) γH2AX. See also Supplementary Figures 2a,b. Histograms show histoscore values for CE (a) or γH2AX (b) in the series of BCCs ($n=15$) and SCCs ($n=35$). Scale bars, 200 μm. (c) Left histogram: histoscore values for CE in NMSSC ($n=17$) and metastatic SCC (MSSC; $n=18$). Right: bar histogram shows percent of cases displaying nuclear or cytoplasmic localisation of CE (nuclear or cytoplasmic) within NMSSCs (light grey) or MSSCs (dark grey). See also Supplementary Figure 2b. (d) Histoscore values of γH2AX in NMSSC and MSSC (left) or in SCC well differentiated (Diff; $n=10$), moderately differentiated (Mod; $n=20$) and poorly differentiated (Poor; $n=5$) (right; see also Supplementary Figure 2a). Data plotted by tests Kruskal-Wallis/Mann-Whitney U. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$

promoted polyploidy. Cyclin E induced mitotic Cyclin B in BCCP, but not in SCC12F due to mitotic slippage or bypass (Figure 1b).⁹ As expected, Cyclin E also caused increase of the DNA damage marker γH2AX both in BCCP and SCC12F (Figure 1b) due to replication stress.^{9,22} BCCP display the mutated p53 antigen Pab240 (p53mut), whereas SCC12F are reported not to bear p53 mutations and did not express p53mut (Supplementary Figure 1c).²⁶ In line with inactivating mutations which render the protein resistant to degradation,²⁷ p53 was overexpressed in BCCP cells (Figure 1b; Supplementary Figure 1c). p53 transcriptional target p21CIP (p21) was barely detectable in proliferating BCCP *in vitro* (Figure 1b). p21 inhibits cdk2 and cell cycle entry or cdk1 and mitosis progression,²⁸ for instance in response to DNA damage. In keratinocytes, p21 is transiently induced and binds cdk1 in the onset of squamous differentiation.^{9,29,30}

Overexpression of Cyclin E in SCC12F cells caused a slight induction of p53 typical of DNA damage (Figure 1b).⁹ However, p21 was high both in parental SCC12F cells and upon ectopic Cyclin E, as compared with normal keratinocytes (Figure 1b). p21 can be expressed independently of p53 and its deregulation in SCC12F might reflect cell cycle alterations.

Overexpression of Cyclin E induced at some extent squamous differentiation in SCC12F, but not in BCCP, as measured by the squamous marker involucrin (Figure 1c; Supplementary Figure 1d). As we found no signs of apoptosis (Figure 1a; Supplementary Figure 1b), the induction of terminal differentiation is consistent with the significant loss of clonogenic potential of SCC12F-Cyclin E (Figure 1d). Growing SCC12F cells overexpressing Cyclin E after three passages continued to show higher DNA damage

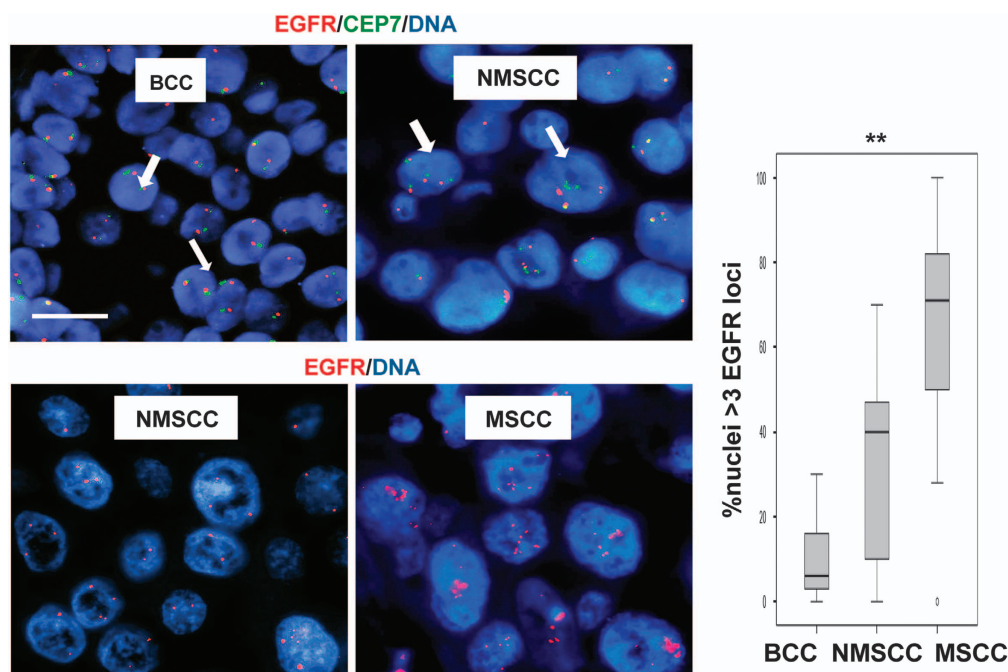


Figure 3 Chromosomal alterations are low in BCCs, moderate in NMSCCs and high in MSCCs. Representative microphotographs of top: *in situ* hybridisation (FISH) for the EGFR locus (red) and centromere of chromosome 7 (CEP7; green) in sections of BCC or non-metastatic SCC (NMSCC); bottom: NMSCC or metastatic SCC (MSCC) hybridised for EGFR (red). DAPI for DNA in blue. Scale bar, 25 μ m. Histogram: percent of nuclei with EGFR amplifications (>3 spots) in BCC, NMSCC and MSCC (*n* as in Figure 2). Data plotted by tests Kruskal-Wallis/Mann-Whitney U. ***P*<0.01

(Supplementary Figure 1e) and reduced clonogenic capacity than parental cells (Supplementary Figure 1f).

The results above suggest that an excess of Cyclin E by inducing DNA damage and differentiation might be a burden to carcinoma cells. We studied the expression of Cyclin E and γ H2AX in a pilot collection of human BCC and SCC biopsies. 15 BCCs, 17 non-metastatic SCCs (NMSCCs) and 18 metastatic SCCs (MSCCs) were compared (Supplementary Table 1). Both Cyclin E and γ H2AX were barely detectable in BCC lesions, whereas they were prominent in SCC lesions (Figures 2a and b). γ H2AX in BCCs was detectable only in the growing front of the tumour (Figure 2b; Supplementary Figure 2a). Nuclear expression of Cyclin E was significantly lost in MSCCs as compared with NMSCC. In 40% of MSCCs Cyclin E was strongly accumulated in the cytoplasm (cCE; *P*<0.01; Figure 2c; Supplementary Figure 2b). Although the number of cases is small, cCE was found only in one case out of 16 NMSCCs and none of 10 well-differentiated SCCs. While the mechanism exporting Cyclin E to the cytoplasm and its consequences are unclear, overexpression of a cytoplasmic shorter form of the protein accelerates mitosis (low molecular weight LMW-Cyclin E).^{23,31} Interestingly, we detected a shorter protein in SCC12F overexpressing Cyclin E (Figure 1b). Reducing Cyclin E in the nucleus by sequestering cdk2 in the cytoplasm might reduce DNA replication-associated damage. To note, the DNA damage marker γ H2AX was strong in NMSCCs and significantly lost in poorly differentiated MSCCs (Figure 2d; Supplementary Figure 2a). Analyses of serial sections showed coincident Cyclin E and γ H2AX in cases where Cyclin E was strongly nuclear and marked loss of γ H2AX in cases where it was strongly

cytoplasmic (Supplementary Figure 3a). Co-accumulation of Cyclin E and p21 reveals cell cycle conflict, occurs in the onset of initiation of keratinocyte differentiation (Supplementary Figures 3b–d)^{9,20,29,30} and was found in well differentiating SCCs displaying nuclear Cyclin E (Supplementary Figures 3c, d). p21 was strong in large nuclei or multinucleate cells (arrows in Supplementary Figure 3d). No general correlation was found between p21 or p53 and aggressiveness (Supplementary Figure 4a). However, deregulated p53 (maximum intensity in 100% of cells), suggestive of inactivating mutations, was found in 44% of cases with cCE *versus* only 13% with no cCE (Supplementary Figure 4b).

The results above suggest that the axis squamous differentiation/Cyclin E via cell cycle stress might contribute to genomic instability in SCC. Consistently, MSCCs in the biopsy collection significantly displayed more chromosomal alterations than NMSCCs and these in turn more than BCCs (Figure 3). BCCs not showing signs of squamous differentiation, nor accumulation of Cyclin E, contained small and homogenous nuclei with two chromosomal copies.

We investigated whether the capacity to escape the differentiation-associated cell division block in spite of genetic damage may cause genomic instability in SCC cells. To this end, we subjected BCCP and SCC12F cells to mitosis blocks by use of the microtubule-inhibitory drug Nocodazole (Nz), which triggers the squamous differentiation programme in human keratinocytes within 48 h^{9,14} (Supplementary Figure 5). This response mimics differentiation induced by MYC, Cyclin E, loss of p53 or other inhibitors of mitosis.^{9,10,20} A 24 h Nz treatment irreversibly suppressed the clonogenic capacity of normal keratinocytes (Figure 4a; Supplementary

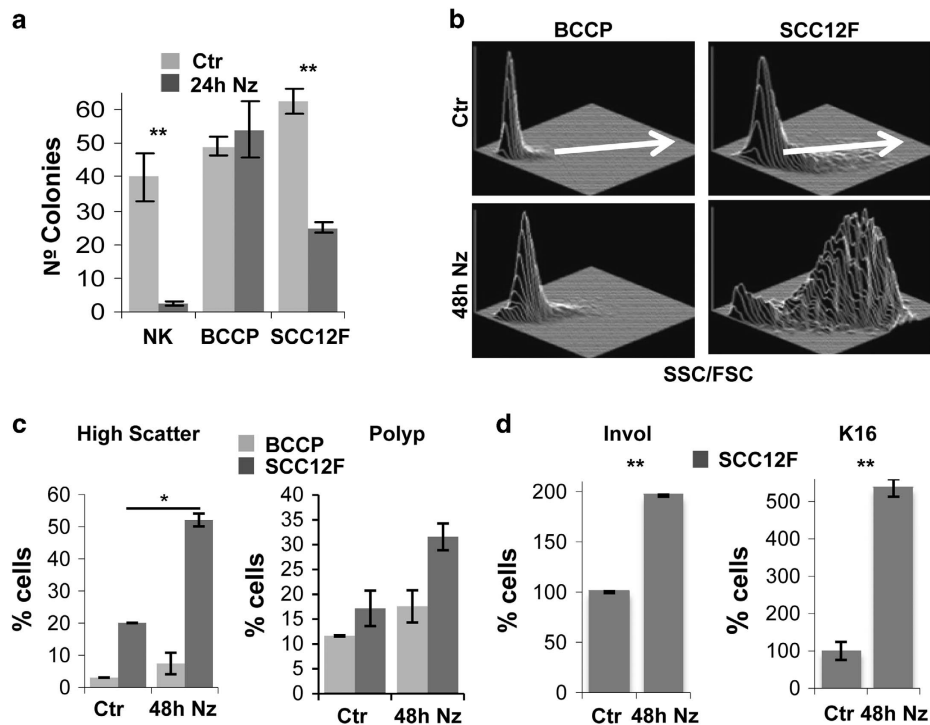


Figure 4 A Nocodazole treatment induces a partial anti-proliferative squamous differentiation response in SCC12F cells but not in BCCP cells. (a) Clonogenic capacity of normal keratinocytes (NK), BCCP and SCC12F untreated (DMSO only, Ctr) or after a 24h Nocodazole (Nz) treatment (Supplementary Figure 5a). (b) Representative 3D histograms of light scattering (SSC: Side Scatter; FSC: Forward Scatter; cell size and complexity; white arrow) in BCCP and SCC12F untreated (Ctr) or treated with Nz for 48 h. (c) Percent of cells with large size and complexity (High Scatter) or polyploidy (Polyp, DNA content > 4N), as measured by flow-cytometry in BCCP (light grey) or SCC12F (dark grey) treated with Nz for 48 h or untreated (Ctr) as indicated. See also Supplementary Figures 5b–d. (d) Percent of SCC12F cells treated with Nz for 48 h that express the differentiation markers involucrin (Invol) or keratin K16, relative to untreated cells, as measured by flow-cytometry. Error bars are s.e.m. of duplicate or triplicate samples of at least two independent representative experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. See also Supplementary Figure 6

Figure 5a). However, SCC12F conserved some of the capacity to proliferate after the mitosis block and the clonogenic capacity of BCCP cells was barely affected (Figure 4a; Supplementary Figure 5a). This suggests that BCCP cells have a more robust G2 arrest and a tighter control of cell growth. Accordingly, while SCC12F cells strikingly increased in cell size upon the mitosis block (high light scattering typical of differentiated keratinocytes),³² the size of BCCP cells changed very moderately (Figures 4b and c; Supplementary Figures 5c and d). In addition, SCC12F slipped into polyploidy at a greater extent than BCCP (Figure 4c; Supplementary Figures 5c and d). The changes in cellular size and ploidy in SCC12F were associated with an increase of squamous suprabasal markers (involucrin and keratin K16; Figure 4d; Supplementary Figures 6a and b), indicating that these cells conserve a partial differentiation response to mitotic stress. Differentiation likely accounts for the loss of clonogenicity observed, as no signs of apoptosis were found in the DNA content profiles (Supplementary Figures 5 b–d). In contrast, squamous markers were undetectable in BCC cells upon Nz treatment (Supplementary Figure 6b, not shown) in line with the absence of clonogenic loss.

Proliferating SCC12F cells just after the Nz drug release were larger and a high proportion polyploid. Therefore these cells were able to proliferate in spite of being polyploid (Supplementary Figures 7a and b). However, after two

passages subculture these cells (SCC12R1) displayed higher levels of p53, p21 and DNA damage marker γ H2AX and were more proliferative than the parental cells (Supplementary Figures 7c–f). p53 was overexpressed in SCC12R1 and the typical mutated conformation was now detected, although the cell morphology was unchanged.

In order to test whether consecutive partial mitotic blocks might induce severe changes in SCC12F cells as it might occur *in vivo*, we subjected SCC12R1 cells to a second 48 h Nz treatment. Again, the mitotic block at first produced a high proportion of polyploid cells and significantly reduced their clonogenic potential (SCC12R1Nz; Figure 5a; Supplementary Figure 8a). However, cells stably growing two passages after the second block (SCC12R2) displayed a markedly different phenotype. They were remarkably homogenous in size, small and diploid and displayed a more fibroblastic morphology (Figure 5a). To study this phenomenon further we performed western blotting, immunofluorescence or RT-PCR for expression of keratin K5, often lost in aggressive carcinomas, keratin K8 and vimentin, often gained in aggressive carcinomas. Interestingly, SCC12R2 lost expression of epidermal keratin K5 and Cyclin E and strongly gained keratin K8 and vimentin with respect to untreated parental cells (Figures 5b and c; Supplementary Figure 8b). Consequently, SCC12R2 cells lost completely the expression of the typical squamous marker involucrin (Figure 5b).

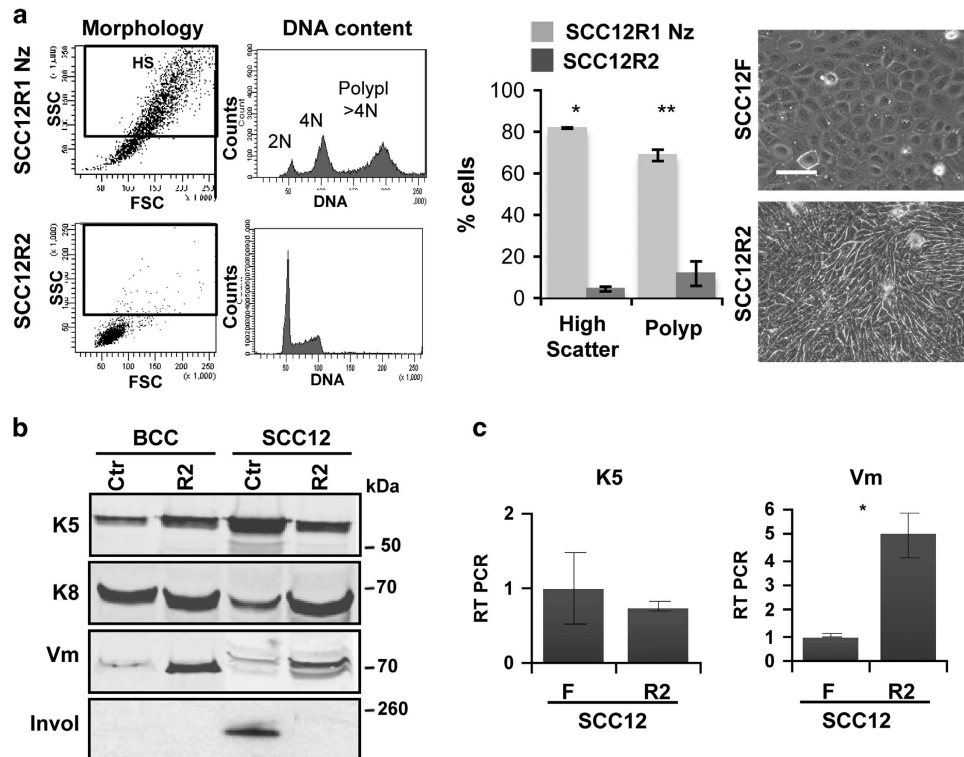


Figure 5 Two consecutive Nocodazole mitotic blocks drive a phenotypic conversion in SCC12F cells. (a) Left plots: representative flow-cytometry analyses of morphology (light scattering) and DNA content (propidium iodide) of SCC12R1 immediately after a second 48 h Nocodazole (Nz) treatment (SCC12R1Nz), or cells growing after treatment release (SCC12R2). Black square in dot plots gates cells with high light scatter (HS). Middle: bar histogram shows percent of SCC12R1Nz cells (light grey) or SCC12R2 cells (dark grey) with high scatter or polyploid (Polyp, DNA content > 4N). Right: phase contrast microphotographs of parental SCC12F and SCC12R2 as indicated. Scale bar, 50 μ m. (b) Western blotting for the expression of keratin K5, keratin K8, vimentin (Vm) or involucrin (Invol) in *insoluble* extracts of untreated BCCP or SCC12F (Ctr), or after a second Nz treatment release (R2). Same number of cells per lane. See also Supplementary Figure 8b. Invol lanes for Ctr are the same as in Figure 1c. Uncropped blots are shown in Supplementary Figure 12. (c) Quantitation of the expression of keratin K5 or vimentin (Vm) in SCC12F and SCC12R2 by real-time (RT)-PCR. See also Supplementary Figure 8b. Error bars are s.e.m. of duplicate samples of at least two independent representative experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Similar phenotypic results were obtained on R2 cells in three independent experiments and the degree of the changes was proportional to the number of consecutive mitotic blocks applied (R1, R2, R3; Supplementary Figure 9). Altogether the results indicate that the phenotypic changes were not sporadic events but a consistent conversion produced by mitotic stress.

The proliferative capacity of SCC12R2 cells was significantly enhanced compared with parental cells (Figure 6a), in spite of a neat accumulation of γ H2AX (Figure 6b). Western blot analyses confirmed the higher levels of γ H2AX in SCC12R2 (Figure 6c). The expression of the DNA repair factor p53-binding protein 1 (53BP) was low in BCCP cells and high in SCC12F cells (Figure 6b; Supplementary Figure 8c). Interestingly, SCC12FR2 cells displayed a strong nuclear spot of 53BP typical of isolated unrepaired DNA damage.³³ In addition, SCC12R2 strongly expressed the mutated p53 antigen Pab240 (p53mut; Supplementary Figure 8b) and strongly accumulated p53 (Figure 6c), indicative of inactivating mutations.²⁷ Proliferating SCC12R2 cells also lost p21, decreased the expression of Cyclin E and increased the expression of mitotic Cyclin B, resembling BCCP cells (Figures 6b and c). Interestingly, SCC12R2 accumulated Cyclin E in the cytoplasm. These changes were consistent with the loss of the squamous phenotype, nuclear Cyclin E and γ H2AX observed in aggressive MSCCs *in situ*.

In order to test whether loss of Cyclin E function might contribute to the loss of the squamous phenotype, we inhibited the endogenous protein in well-differentiated parental SCC12F. To this aim, we made use of lentiviral constructs carrying specific shRNA to Cyclin E (shCE). Interestingly, shCE diminished the levels of γ H2AX, potentiated the expansion of SCC12F colonies, induced expression of keratin K8 and vimentin and produced a more fibroblastic morphology (Figures 6d–f; Supplementary Figure 10).

To determine whether the double mitotic block rendered SCC cells more malignant, we injected SCC12R2 subcutaneously in nude mice. Parental SCC12F are scarcely tumorigenic.^{25,26} As shown in Figure 7a, the parental cells developed very slowly growing benign tumours that were detected only after 10 weeks. In striking contrast, SCC12R2 cells rapidly generated detectable tumours after only 10 days. The size of the SCC12R2 lesions was also larger at term. Half of the mice injected with the parental cells never developed tumours after 16 weeks, whereas all mice injected with SCC12R2 cells had developed tumours after 4 weeks (Figure 7b). The histology showed that the tumours generated by parental cells were well-differentiated, whereas those generated by SCC12R2 cells were characterised as poorly differentiated (H/E; Figure 7c). SCC12R2 tumours were more proliferative (Ki67) and accumulated γ H2AX (Figure 7c).

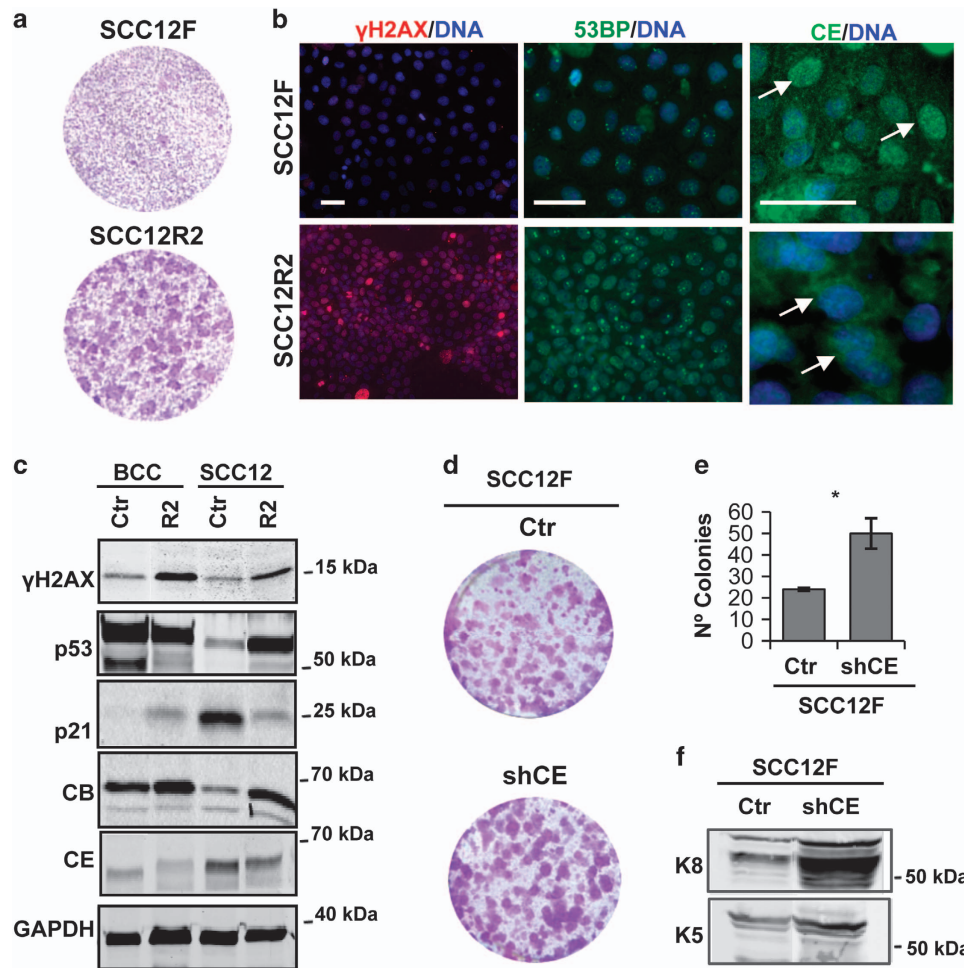


Figure 6 SCC12R2 or SCC12F expressing shRNA to Cyclin E display growth advantage. (a) Clonogenic capacity of parental SCC12F and SCC12R2 (1 000 cells per well). Wells representative of triplicates of three independent experiments. (b) Immunofluorescence for γH2AX (red; left panels), 53 binding protein 1 (53BP, green; middle panels) or Cyclin E (CE, green; right panels) in SCC12F or SCC12R2. DAPI for DNA in blue. Scale bar, 50 μm. Note that reduced Cyclin E, prominent and nuclear in SCC12F, localises in the cytoplasm in SCC12R2 (arrows). (c) Western blot for expression of γH2AX, p53, p21, Cyclin E (CE) or Cyclin B (CB) in untreated BCCP and SCC12F (Ctr), or in growing cells after a second Nz treatment (R2). GAPDH is loading control. Lanes for Ctr are the same as in Figure 1b. (d) Clonogenic capacity of SCC12F infected with the empty vector (Ctr) or with specific shRNA to Cyclin E (shCE; 2 500 cells per well). (e) Bar histogram shows the number of proliferative colonies in (d). Error bars are s.e.m. of triplicate samples. **P* < 0.05. (f) Western blotting for expression of keratin K5, keratin K8 in Ctr and shCE. See also Supplementary Figure 10. Uncropped images of blots in c and f are shown in Supplementary Figure 12. In (a and d) wells are representative of triplicate samples

Consistently, these rapidly growing tumours displayed loss of epidermal keratins K5/K10 and E-cadherin and gain of keratins K13, K8 and vimentin (Figure 7d; Supplementary Figure 11), changes typical of aggressive stages of skin carcinogenesis.^{34,35} The abundance of γH2AX and the absence of lung metastasis (not shown) suggest that they are in an early stage of invasive conversion.

Discussion

We hypothesised that alterations in the link between mitosis control and squamous differentiation might contribute to carcinogenesis.¹⁰ It is paradoxical that BCC of the skin is very rarely invasive in spite of losing the squamous phenotype. In our study SCC, not BCC cells, responded to cell cycle stress by initiating squamous differentiation. Cell cycle deregulation/replication stress induces DNA damage and G2/M arrest.^{18,19} Moreover, mitotic arrest is sufficient to cause DNA damage³⁶

and mitotic slippage/bypass can result in chromosomal defects.¹⁰ Moreover, polyploidy often leads to aneuploidy when cells are able to divide.³⁷ We propose that the reversibility of the cell division block imposed by the initiation of squamous differentiation contributes to genomic instability and malignant progression in SCCs but not in BCCs (Figure 8).

Normal keratinocytes that initiate differentiation accumulate high levels of DNA damage marker γH2AX,¹⁰ as we found in NMSCC cells. In contrast, MSCCs lost nuclear Cyclin E and the γH2AX signal. Accumulation and coexpression of Cyclin E and γH2AX in NMSCCs and their coincident nuclear loss in MSCC suggests that high levels of nuclear Cyclin E via replication stress^{9,22} is a burden to malignant carcinoma cells. While normal keratinocytes differentiate terminally in response to cell cycle stress,^{10,11} damaged SCC cells that are able to divide are genetically unstable. This would increase

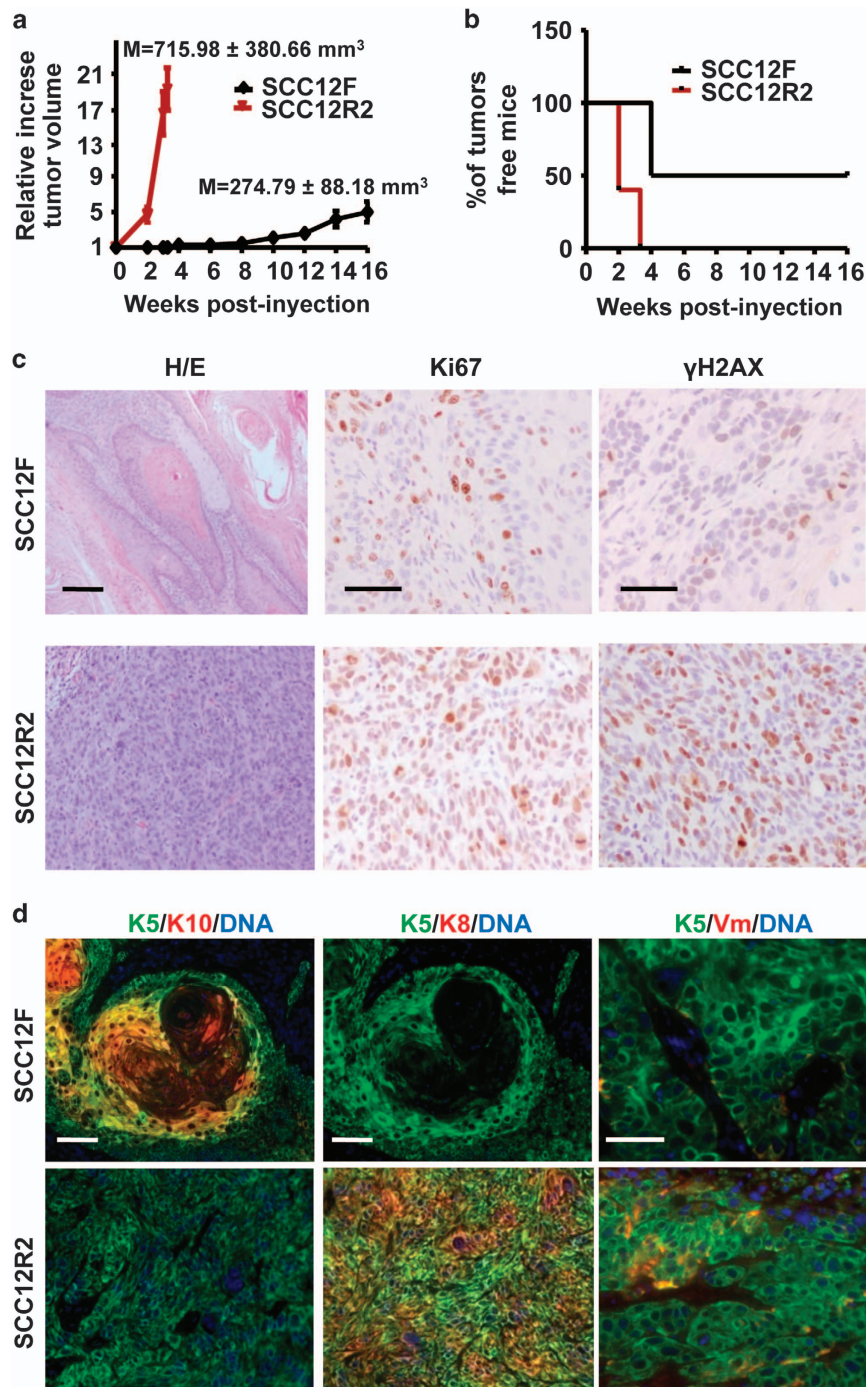


Figure 7 Two consecutive Nocodazole mitotic blocks drive squamous malignant progression. Plots for the tumorigenic capacity of parental SCC12F (black) or SCC12R2 (red) in nude mice. **(a)** Growth rate of tumours with time; means of final volumes are indicated (M). **(b)** Number of mice with no tumours with time. **(c)** Hematoxylin-eosin staining or immunohistochemistry for Ki67 and γH2AX of microsections of tumours generated by SCC12F or SCC12R2, as indicated. **(d)** Immunofluorescence for keratin K5 (green) and keratin K10 (red; left panels), K5 (green) and keratin K8 (red; middle panels) or K5 (green) and vimentin (red, Vm; right panels) of SCC12F or SCC12R2 tumours, as indicated. See also Supplementary Figure 11. DAPI for DNA in blue. Scale bars, 200 μm

the probability of more aggressive clones to appear that would be selected for (Figure 8). Interestingly, genomic instability has been shown to promote evolutionary adaptation.³⁸ In our study simply overexpressing Cyclin E was insufficient to drive malignant transformation. However, forcing cell division by FOXM1 allows damaged normal keratinocytes with

deregulated MYC or p53 to amplify.²¹ FOXM1 is a global mitotic regulator and this suggests that mitosis control is a limiting factor in keratinocyte transformation. Squamous cancer progression might require mitotic alterations.

Remarkably, in our study two consecutive mitotic blocks were sufficient to render well-differentiated SCC cells highly

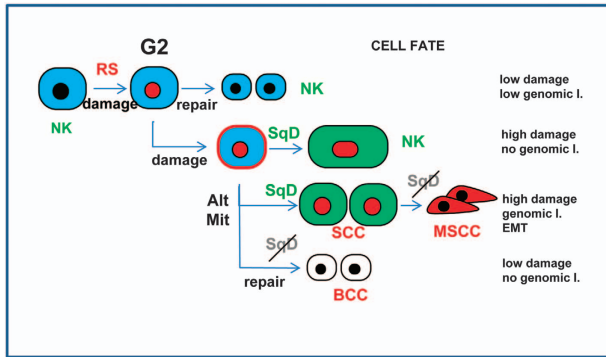


Figure 8 Model for the contribution of the squamous DNA damage-differentiation response to carcinogenesis. Normal keratinocytes (NK) accumulating Cyclin E and DNA damage due to cell cycle or mitotic stress (red nuclei), arrest in G2 for DNA repair. Repaired cells are allowed to divide. Cells with irreparable damage undergo mitotic bypass or mitotic slippage, increase of cellular size and squamous differentiation (SqD; Green), irreversibly unable to divide. Squamous carcinoma cells (SCC) with alterations in mitosis control (AltMit) are able to divide in spite of irreparable damage and polyploidy. Sustained stress and genomic instability (genomic I.) lead to further alterations giving rise to cells that lose the squamous phenotype, are able to divide in spite of numerous genetic alterations and eventually become metastatic (MSCC; dark blue). Basal cell carcinoma cells having alterations in mitosis control (AltMit) due to complete loss of the squamous pathway do not undergo mitotic bypass or slippage after G2 arrest with the possibility to repair and continue to divide normally with low genomic instability (BCC)

tumorigenic. These cells initiated an epithelial–mesenchymal conversion typical of invasive SCCs^{34,35,39} and proportional to the number of consecutive mitotic blocks (SCC12R1, R2, R3). The phenotypic conversion of SCC12R2 cells, far more aggressive than the parental cells, shows that mitotic stress can contribute to squamous malignant progression. Paradoxically, the SCC12FR2 cells shared features with BCCP cells. As in carcinoma biopsies, both lines displayed low levels of γ H2AX. The critical difference might be the degree of genetic alterations caused by genomic instability. Accordingly, MSCCs displayed a higher degree of chromosomal alterations and SCC12R2 cells strongly displayed spots of 53BP, a marker of persistent unrepaired DNA damage.³³ In contrast, no spots 53BP were observed in BCCP cells. The higher stability of the BCC genome might be due to the lack of the squamous pathway and, a more robust G2 arrest and a tighter control of cellular growth. In contrast, SCC12F cells displayed a loose mitotic control. Interestingly, mutations in the Sonic hedgehog (Hh) pathway are frequent in BCC, suppress squamous differentiation in mouse⁴⁰ and cause evasion of G2/M checkpoints.⁴¹ The robustness of the G2/M arrest in BCC cells might allow more efficient DNA repair and maintenance of genomic stability. Consistently, γ H2AX in BCC biopsies was scarce while it was detected in the tumour growing front and in proliferating BCCP *in vitro*.

The epithelial–mesenchymal conversion has recently been associated with loss of γ H2AX.⁴² The axis squamous differentiation/high Cyclin E constitutes a mitotic barrier¹¹ and we argue that the most aggressive SCC cells lose the squamous phenotype in order to avoid it. This is well supported by the loss, or cytoplasmic accumulation of Cyclin E (cCE) that we found in metastatic SCCs in our pilot study and in SCC12R2 *in vitro*. Recent works on large biopsy collections

also have shown association between cytoplasmic shorter forms of Cyclin E and poor breast cancer prognosis,^{23,31,43} suggesting a growth advantage to cancer cells. Although cCE can cause genomic instability, it accelerates mitosis.^{23,31} In our study, the loss of γ H2AX was especially marked in cases displaying cCE. By reducing the levels of Cyclin E in the nucleus, malignant squamous cells might in part avoid severe deregulation of DNA replication-S phase. Functionally supporting this model, in our study inhibition of Cyclin E in well-differentiated SCC12F reduced DNA damage and enhanced proliferation and expression of mesenchymal markers.

Loss of p53, *The Guardian of the Genome*, leads to polyploidy in a variety of cell types.⁴⁴ In keratinocytes this loss induces polyploidy and squamous differentiation.¹⁰ The responses of the carcinoma cells studied here do not seem to be mediated by p53: (i) SCC12F cells seemingly bearing intact p53 become polyploid upon Nocodazole; (ii) BCCP displaying mutated p53 were able to efficiently control G2/M and ploidy; (iii) SCC12R2 cells overexpressing mutated p53 displayed no signs of polyploidy. In addition, the levels of p53 in the human biopsies did not indicate a general association with aggressiveness. However, we detected a potential association between cCE and deregulation of p53. In addition, the cell cycle inhibitor p21, target of p53, stayed high in MSCC. Interestingly, Galanos *et al.* now reports a role of chronic and p53-independent expression of p21 in promoting genomic instability through replication stress in carcinomas of lung of head and neck.⁴⁵ Moreover, the deregulation of DNA replication licensing protein cdc6 contributes to features of epithelial–mesenchymal transition⁴⁶ and deregulated Cyclin E was found to affect licensing.⁴⁷

In summary, our model is that the DNA damage-squamous differentiation pathway constitutes first a barrier to undesired proliferation, second a source of genomic instability, thereby driving malignant progression of genetically damaged cells that are able to divide (Figure 8). The loss of detectable nuclear Cyclin E and γ H2AX in MSCCs in the pilot series of biopsies studied was highly significant. These results, together with the cytoplasmic accumulation of Cyclin E, should encourage further studies on larger cohorts of squamous carcinomas. The findings might have application into squamous cancer in locations other than skin, as a growing body of evidence suggests that they might share common mechanisms. It has been proposed that alterations in ploidy contribute to cancer malignancy.³⁷ Our observations would indicate that squamous cancer cells become malignant not because they are polyploid, but because they are capable to divide in spite of being so.

Materials and Methods

Cell culture, human biological samples and viral infections.

Ethical permission for this study was requested, approved, and obtained from the Ethical Committee for Clinical Research of Cantabria Council, Spain. In all cases of primary cell culture, human tissue material discarded after surgery was obtained with written consent presented by clinicians to the patients and it was treated anonymously.

The Basal carcinoma cell line (BCCP²⁴), isolated from a human facial BCC, was kindly provided by Dr. R. Polakowska (Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille [IRCL], Lille Cedex, France). The SCC12F line was cultured from a human facial SCC.²⁵ SCC12B originated from a more aggressive component of the same carcinoma was also analysed. Primary normal keratinocytes (NK) were isolated from

neonatal human foreskin. All cells were cultured in presence of a mouse fibroblast feeder layer (inactivated by mitomycin C) in Rheinwald FAD medium as described previously (10% serum and 1.2 mM Ca^{2+}).⁴⁸ All cell lines and primary normal keratinocytes used were tested for mycoplasma contamination.

Cells were treated with Nocodazole for 24 h (Nz; 20 μM ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).⁴⁹ Primary normal keratinocytes were treated 24 h with doxorubicin (0.5 μM). Parallel control cultures were always subjected to the DMSO vehicle only. Fresh medium was added 24 h before addition of Nz and again 24 h after.

BCCP or SCC12F were subjected to retroviral infection with pBabe-GFP (GFP) and pBabe-GFP-Cyclin E (CEGFP) constructs. SCC12F also were subjected to lentiviral infection as described (see also Supplementary Materials and Methods)^{9,10} with MISSION Sigma-Aldrich plasmids: control (pLKO.1, Ctr) and pLKO.1 with a shRNA against Cyclin E (TRCN0000045300, shCE). The studies were carried out either by analysing unselected pools 4 days after retroviral infections or by stably selecting cells expressing retroviral or lentiviral constructions by 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin.

Clonogenicity assays were made as described previously (see also Supplementary Materials and Methods).¹⁰

50 non-melanoma skin cancer lesions were included in the study (Supplementary Table 1): (i) 15 basal cell carcinomas; (ii) 18 primary metastatic squamous cell carcinomas (MSCCs) that had evolved to (histologically confirmed) lymph node metastases (2 well differentiated; 11 moderately differentiated; 5 undifferentiated) and (iii) 17 patients with SCC who had not developed any metastasis (non-metastatic, NMSCCs) in a 5-year follow-up period (8 well differentiated; 9 moderately differentiated; 0 undifferentiated). A control group of 10 samples of elastotic non-tumoral skin was also included in the study. For details of sample collection and characterisation see Supplementary Materials and Methods. After histopathological evaluation the invasive edge of the tumour was selected for the construction of tissue microarray (TMAs).⁵⁰ Two tissue cylinders with a diameter of 2 mm were punched from the selected areas from each tissue block and brought into a recipient paraffin block using the tissue micro-array (Arrayer Punch set 2.00 mm, ATA200, Advanced Tissue Arrayer, Chemicon International).

Antibodies. Primary and secondary antibodies utilised in this study are listed in Supplementary Materials and Methods.

Flow-cytometry. Cells were harvested, fixed and stained as previously described for DNA synthesis and content (BrdU incorporation and propidium iodide; see Supplementary Materials and Methods).^{9,14}

Histology and immunostaining. For immunofluorescence, cells were grown on glass coverslips, fixed, and stained as previously described.⁹ H&E, immunofluorescence and immunohistochemical stainings of carcinoma sections of paraffin embedded formalin fixed tissues were performed on 4 μm thick sections. For more details see Supplementary Materials and Methods.

The score of immunohistochemical (IHC) stainings was given between 0 and 100% of positively stained neoplastic cells and the intensity was measured as: 1 (weak), 2 (medium), 3 (strong). The whole punch (2 mm in diameter, 3.14 mm^2) was evaluated using a 10 $\times$ objective lens and 10 $\times$ ocular lens. The histoscore was calculated by multiplying the percent of positive cells by the intensity (from 0 to 3) to give numbers ranging from 0 to 300. p53 was considered deregulated by inactivating mutations when the intensity of the staining was 3 (maximum) in 100% of cells (histoscore 300). Histograms were then plotted using Test of Kruskal–Wallis in combination with Mann–Whitney U test. Immunohistochemical staining was independently evaluated by two observers (A. Toll and D. López).

For analyses of protein expression, cells were washed with PBS, lysed and subjected to SDS-PAGE electrophoresis and western blotting as described.⁹ Insoluble protein fractions were incubated in Urea lysis buffer (10 mM Tris pH 8, 5% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 4 M Urea). The whole original blots are shown in Supplementary Figure 12.

RT-PCR. Total RNA was isolated using NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and reverse transcribed with the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).¹⁰ The cDNAs (1 μl) were amplified by real-time PCR (Bio-Rad iQ SYBR green supermix) and normalised to β -actin mRNA levels.¹⁰ Primers utilised in this study are listed in Supplementary Materials and Methods.

Fluorescence in situ hybridisation. To evaluate genomic instability, fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with a specific probe against EGFR was also performed. Dual-colour hybridisation with fluorescent DNA for the centromeric

region of chromosome 7 (CEP7, green) and for the specific DNA region for EGFR (7p12, red) was performed (Abbott Molecular, Abbot Park, IL, USA). One hundred nuclei per case were scored to determine the percent of epithelial cells with EGFR gains (three or more signals for EGFR). FISH were evaluated by two observers (A. Toll and D. López).

Tumorigenesis. Experiments using animals were performed in compliance with the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Prevention Research's Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia, and authorised by the Consejería de Medioambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid. Further details on mice conditions in Supplementary Materials and Methods.

Keratinocytes were trypsinized and resuspended in a mixture (2:1) of PBS and Matrigel (BD Biosciences, San Jose CA, USA). A volume of 150 μl of this suspension containing 1×10^6 cells was subcutaneously inoculated into the right flank of each mouse. Tumour width (W) and length (L) were measured twice a week using an external caliper. Tumour volume was calculated using the formula $0.5 \times L \times W^2$ (ref. 51).

Statistical analyses. For cell culture experiments standard deviation and variance were calculated and served as estimates of variation within each group of data. For statistical comparison of groups with similar variance, a homoscedastic *t*-test was performed. For statistical comparison of groups with diverging variance, a heteroscedastic *t*-test was applied. Data sets were compared using an unpaired Student's *t*-test. A *P*-value of less than 0.05 was considered statistically significant. For histology and FISH statistical analyses were performed using Windows Statistical Package for Social Sciences version 17 (SPSS, Chicago, IL, USA). The non-parametric Mann–Whitney U test was used to compare the histoscore of different immunohistochemical markers and EGFR gains by FISH. For contingency tables, the Fisher exact test was used to assess the level of significance. In all cases, a 2-tailed *P* < 0.05 was required for statistical significance. Data were plotted and analysed using Test of Kruskal–Wallis in combination with Mann–Whitney U test.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. AG is grateful to Jean-Jeaques Guilhou, Jean-Claude Rossi and the INSERM for professional support and to Renata Polakowska for the generous gift of precious BCCP cell line. We thank Lucia Barbier, Tania Lobato, Evelyn Andrades, Alicia Noriega and Maria Aramburu for technical assistance and Natalia Sanz for critical reading of the MS. To AG: National grants from Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (ISCIII-FIS/FEDER, Spain): PI08/0890, PI11/02070, PI14/00900; Ligue Nationale Contre la Cancer (La Ligue; France). To AT: ISCIII-FIS PI10/00785. To JP: MINECO grant SAF2015-66015-R; AES grant ISCIII-RETIC RD12/0036/0009. VC was funded by a fellowship from La Ligue (France), PA by IDIVAL (Spain), RM and IdP by AG lab and ISCIII-FIS-FEDER PI11/02070 (Spain).

- Karia PS, Han J, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United States, 2012. *J Am Acad Dermatol* 2013; **68**: 957–966.
- Madan V, Lear JT, Szeimies RM. Non-melanoma skin cancer. *Lancet* 2010; **375**: 673–685.
- Freedberg I EA WK, Austen KF, Golspith L, Katz S, Fitzpatrick T. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. McGraw-Hill Health Professional division: New York, 1999.
- Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. *N Eng J Med* 2005; **353**: 2262–2269.
- Boukamp P. Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis* 2005; **26**: 1657–1667.
- Rheinwald JG, Beckett MA. Defective terminal differentiation in culture as a consistent and selectable character of malignant human keratinocytes. *Cell* 1980; **22**: 629–632.
- Heenen M, Achten G, Galand P. Autoradiographic analysis of cell kinetics in human normal epidermis and basal cell carcinoma. *Cancer Res* 1973; **33**: 123–127.
- Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Modern Pathol* 2006; **19**: S127–S147.
- Freije A, Ceballos L, Coisy M, Barnes L, Rosa M, De Diego E *et al*. Cyclin E drives human keratinocyte growth into differentiation. *Oncogene* 2012; **31**: 5180–5192.
- Freije A, Molinuevo R, Ceballos L, Cagigas M, Alonso-Lecue P, Rodriguez R *et al*. Inactivation of p53 in Human Keratinocytes Leads to Squamous Differentiation and Shedding via Replication Stress and Mitotic Slippage. *Cell Rep* 2014; **9**: 1349–1360.
- Gandarillas A. The mysterious human epidermal cell cycle, or an oncogene-induced differentiation checkpoint. *Cell Cycle* 2012; **11**: 4507–4516.

12. Gandarillas A, Freije A. Cycling up the epidermis: reconciling 100 years of debate. *Exp Dermatol* 2014; **23**: 87–91.
13. Andreassen PR, Margolis RL. Microtubule dependency of p34cdc2 inactivation and mitotic exit in mammalian cells. *J Cell Biol* 1994; **127**: 789–802.
14. Gandarillas A, Davies D, Blanchard JM. Normal and c-Myc-promoted human keratinocyte differentiation both occur via a novel cell cycle involving cellular growth and endoreplication. *Oncogene* 2000; **19**: 3278–3289.
15. Waikel RL, Kawachi Y, Waikel PA, Wang XJ, Roop DR. Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nat Genet* 2001; **28**: 165–168.
16. Ruiz S, Santos M, Segrelles C, Leis H, Jorcano JL, Berns A et al. Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis. *Development* 2004; **131**: 2737–2748.
17. Wang X, Sistrunk C, Rodriguez-Puebla ML. Unexpected reduction of skin tumorigenesis on expression of cyclin-dependent kinase 6 in mouse epidermis. *Am J Pathol* 2011; **178**: 345–354.
18. Ichijima Y, Yoshioka K, Yoshioka Y, Shinohe K, Fujimori H, Unno J et al. DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PLoS One* 2010; **5**: e8821.
19. Magdalou I, Lopez BS, Pasero P, Lambert SA. The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Semin Cell Dev Biol* 2014; **30**: 154–164.
20. Zanet J, Freije A, Ruiz M, Coulon V, Sanz JR, Chiesa J et al. A mitosis block links active cell cycle with human epidermal differentiation and results in endoreplication. *PLoS One* 2010; **5**: e15701.
21. Molinuevo R, Freije A, de Pedro I, Stoll SW, Elder JT, Gandarillas A. FOXM1 allows human keratinocytes to bypass the oncogene-induced differentiation checkpoint in response to gain of MYC or loss of p53. *Oncogene* 2017; **36**: 956–965.
22. Bester AC, Roniger M, Oren YS, Im MM, Sami D, Chaoat M et al. Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* 2011; **145**: 435–446.
23. Moore JD. In the wrong place at the wrong time: does cyclin mislocalization drive oncogenic transformation? *Nat Rev Cancer* 2013; **13**: 201–208.
24. Beck B, Lehen'kyi V, Roudbaraki M, Flourakis M, Charveron M, Bordat P et al. TRPC channels determine human keratinocyte differentiation: new insight into basal cell carcinoma. *Cell Calcium* 2008; **43**: 492–505.
25. Rheinwald J, Germain E, Beckett M. Expression of keratins and envelope proteins in normal and malignant human keratinocytes and mesothelial cells. In: Harris CC, Antrup HN. *Human Carcinogenesis*. Academic press: New York, 1983.
26. Burns JE, Baird MC, Clark LJ, Burns PA, Edington K, Chapman C et al. Gene mutations and increased levels of p53 protein in human squamous cell carcinomas and their cell lines. *Br J Cancer* 1993; **67**: 1274–1284.
27. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; **387**: 296–299.
28. Medema RH, Klompmaier R, Smits VA, Rijkse G. p21waf1 can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. *Oncogene* 1998; **16**: 431–441.
29. Missero C, Calautti E, Eckner R, Chin J, Tsai LH, Livingston DM et al. Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 5451–5455.
30. Harvat BL, Wang A, Seth P, Jetten AM. Up-regulation of p27Kip1, p21WAF1/Cip1 and p16Ink4a is associated with, but not sufficient for, induction of squamous differentiation. *J Cell Sci* 1998; **111**: 1185–1196.
31. Karakas C, Biernacka A, Bui T, Sahin AA, Yi M, Akli S et al. Cytoplasmic cyclin E and phospho-cyclin-dependent kinase 2 are biomarkers of aggressive breast cancer. *Am J Pathol* 2016; **186**: 1900–1912.
32. Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 1993; **73**: 713–724.
33. Mata-Garrido J, Casafont I, Tapia O, Berciano MT, Lafarga M. Neuronal accumulation of unrepaired DNA in a novel specific chromatin domain: structural, molecular and transcriptional characterization. *Acta Neuropathol Commun* 2016; **4**: 41.
34. Stoler AB, Stenback F, Balmain A. The conversion of mouse skin squamous cell carcinomas to spindle cell carcinomas is a recessive event. *J Cell Biol* 1993; **122**: 1103–1117.
35. Markey AC, Lane EB, Churchill LJ, MacDonald DM, Leigh IM. Expression of simple epithelial keratins 8 and 18 in epidermal neoplasia. *J Invest Dermatol* 1991; **97**: 763–770.
36. Hayashi MT, Karlseder J. DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure. *Oncogene* 2013; **32**: 4593–4601.
37. Davoli T, de Lange T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; **27**: 585–610.
38. Selmecki AM, Maruvka YE, Richmond PA, Guillet M, Shores N, Sorenson AL et al. Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast. *Nature* 2015; **519**: 349–352.
39. Toll A, Masferrer E, Hernandez-Ruiz ME, Ferrandiz-Pulido C, Yébenes M, Jaka A et al. Epithelial to mesenchymal transition markers are associated with an increased metastatic risk in primary cutaneous squamous cell carcinomas but are attenuated in lymph node metastases. *J Dermatol Sci* 2013; **72**: 93–102.
40. Fan H, Khavari PA. Sonic hedgehog opposes epithelial cell cycle arrest. *J Cell Biol* 1999; **147**: 71–76.
41. Li ZJ, Mack SC, Mak TH, Angers S, Taylor MD, Hui CC. Evasion of p53 and G2/M checkpoints are characteristic of Hh-driven basal cell carcinoma. *Oncogene* 2014; **33**: 2674–2680.
42. Weyemi U, Redon CE, Choudhuri R, Aziz T, Maeda D, Boufraqueh M et al. The histone variant H2A.X is a regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Nat Commun* 2016; **7**: 10711.
43. Hunt KK, Karakas C, Ha MJ, Biernacka A, Yi M, Sahin AA et al. Cytoplasmic cyclin E predicts recurrence in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2016. (doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2217; e-pub ahead of print).
44. Aylon Y, Oren M. p53: guardian of ploidy. *Mol Oncol* 2011; **5**: 315–323.
45. Galanos P, Vougas K, Walter D, Polyzos A, Maya-Mendoza A, Haegensen EJ et al. Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing. *Nat Cell Biol* 2016; **18**: 777–789.
46. Sideridou M, Zakopoulou R, Evangelou K, Lontos M, Kotsinas A, Rampakakis E et al. Cdc6 expression represses E-cadherin transcription and activates adjacent replication origins. *J Cell Biol* 2011; **195**: 1123–1140.
47. Ekholm-Reed S, Mendez J, Tedesco D, Zetterberg A, Stillman B, Reed SI. Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *J Cell Biol* 2004; **165**: 789–800.
48. Rheinwald JG. Methods for clonal growth and serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes and mesothelial cells. In: Baserga R (ed). *Cell Growth and Division*. IRL Press: Oxford, 1989, p 81–94.
49. Samson F, Donoso JA, Heller-Bettinger I, Watson D, Himes RH. Nocodazole action on tubulin assembly, axonal ultrastructure and fast axoplasmic transport. *J Pharmacol Exp Ther* 1979; **208**: 411–417.
50. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; **4**: 844–847.
51. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; **24**: 148–154.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by **Nature Publishing Group**. This work is licensed under a **Creative Commons Attribution 4.0 International License**. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)

ANEXO II

ARTICLE

Open Access

Sublethal UV irradiation induces squamous differentiation via a p53-independent, DNA damage-mitosis checkpoint

Isabel de Pedro¹, Pilar Alonso-Lecue¹, Natalia Sanz-Gómez¹, Ana Freije¹ and Alberto Gandarillas^{1,2}

Abstract

The epidermis is a self-renewal epithelium continuously exposed to the genotoxic effects of ultraviolet (UV) light, the main cause of skin cancer. Therefore, it needs robust self-protective mechanisms facing genomic damage. p53 has been shown to mediate apoptosis in sunburn cells of the epidermis. However, epidermal cells daily receive sublethal mutagenic doses of UV and massive apoptosis would be deleterious. We have recently unravelled an anti-oncogenic keratinocyte DNA damage-differentiation response to cell cycle stress. We now have studied this response to high or moderate single doses of UV irradiation. Whereas, as expected, high levels of UV induced p53-dependent apoptosis, moderate levels triggered squamous differentiation. UV-induced differentiation was not mediated by endogenous p53. Overexpression of the mitosis global regulator FOXM1 alleviated the proliferative loss caused by UV. Conversely, knocking-down the mitotic checkpoint protein Wee1 drove UV-induced differentiation into apoptosis. Therefore, the results indicate that mitosis checkpoints determine the response to UV irradiation. The differentiation response was also found in cells of head and neck epithelia thus uncovering a common regulation in squamous tissues upon chronic exposure to mutagens, with implications into homeostasis and disease.

Introduction

Stratified epithelia of the skin and head and neck are continuously exposed to mutagenic carcinogens. Skin cancer in all forms (melanoma and carcinoma) has strikingly increased in the last decades due to social trends such as tanning or outdoor sports. It is well established that the main causes of epithelial skin cancer are continuous exposure to the genotoxic effect of ultraviolet (UV) and continuous cell renewal^{1–4}. Skin sunburn has been found to trigger apoptosis of severely damaged keratinocytes in the epidermis^{5,6}. However, sublethal chronic UV irradiation impacts the keratinocyte genome even in the absence of burning and this is the main cause

of precancerous mutations. Induction of massive apoptosis in the epidermis upon UV irradiation would compromise the skin function. The fate of moderately non-lethal UV-damaged keratinocytes and the mechanisms by which the epidermis avoids its precancerous potential are unclear.

Tumour suppressor p53 is very frequently mutated in skin carcinomas in a UV-traceable and specific manner^{4,5}. p53 is referred to as the guardian of the genome due to its important role in controlling the cell cycle and inducing apoptosis upon DNA damage⁷. Healthy sun-exposed skin contains patches of cells displaying mutant p53 although a relationship with skin cancer has not been found^{8–10}. The fate of these mutant cells is uncertain.

We have previously revealed a keratinocyte DNA damage-differentiation response (DDDR) to cell cycle deregulation or mitotic inhibition^{11,12}. Interestingly, knock-down of p53 or overexpression of proto-oncogene MYC or the cell cycle promoter Cyclin E in primary cells

Correspondence: Alberto Gandarillas (agandarillas@idival.org)

¹Cell Cycle, Stem Cell Fate and Cancer Laboratory, Marqués de Valdecilla Research Institute (IDIVAL), 39011 Santander, Spain

²INSERM, Languedoc-Roussillon, 34394 Montpellier, France

These authors contributed equally: Isabel de Pedro, Pilar Alonso-Lecue
Edited by A. Peschiaroli.

© The Author(s) 2018



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

via replication stress¹³ triggers the DDDR and results in squamous cell differentiation and shedding. This response is controlled by a differentiation-mitosis checkpoint (DMC)¹⁴.

Since UV irradiation causes DNA damage and G2/M arrest^{15–17}, we have investigated whether sublethal levels trigger the DMC. The results show that, as expected, acute high levels of UV irradiation in human primary keratinocytes cause apoptosis mediated by p53. However, more moderate levels of UV irradiation that were sublethal yet significantly causing DNA damage, induced mitotic arrest and terminal differentiation. Contrary to UV-induced apoptosis, this response was independent of p53. Interestingly, UV-induced differentiation was attenuated by forcing mitosis when overexpressing FOXM1. In addition, we provide evidence for a role of a Wee1-mediated mitotic checkpoint in the differentiation response. The results provide new insight into the mechanisms limiting the clinical impact of cell sublethal UV irradiation in skin. They contribute explaining why UV irradiation is therapeutic on the psoriatic skin or why chronic or persistent irradiation is needed for skin carcinomas to develop. The observation that oral keratinocytes also differentiate terminally in response to UV irradiation to which they are not usually exposed, suggests common mechanisms of squamous epithelia facing genetic damage.

Results

To determine the DNA damage caused by UV light in human keratinocytes, we performed a dose-response study. As shown in Supplementary Figure 1, all doses tested produced a significant increase in the DNA damage marker γ H2AX 5 h after irradiation as measured by flow cytometry and immunofluorescence. Most cells were positive for the marker at any dose. However, 300 mJ/cm² caused a stronger induction of the marker than 25 mJ/cm² (intensity level 2, Supplementary Figure 1). An early fraction of apoptotic cells was detected at the higher doses but not at the lower doses (25 mJ/cm²; sub-G1; Supplementary Figure 1a). As expected, there was an induction of the tumour suppressor p53 upon UV irradiation (green; Supplementary Figure 1b). In response to DNA damage, p53 holds the cycle to allow DNA repair⁷.

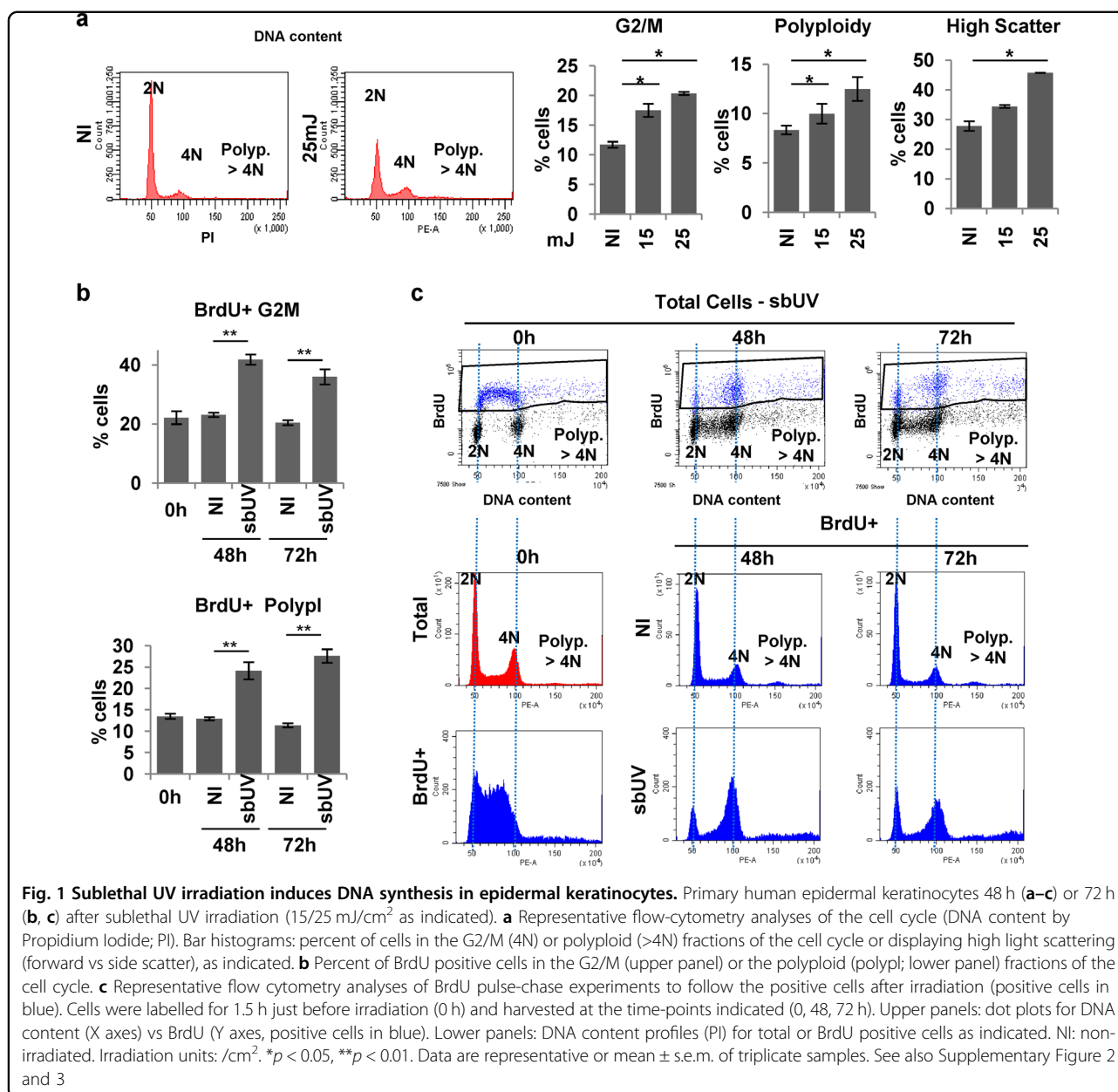
We aimed to determine the keratinocyte fate after doses of UV irradiation that were sublethal (sbUV). In order to investigate this, we chose doses 15–25 mJ/cm². First, we analysed the effect on the cell cycle. As shown in Supplementary Figure 2a (DNA content), only a small proportion of cells was found in sub-G1, indicative of apoptosis, even 72 h after irradiation. At these doses, UV produced a decrease in the G1 phase of the cell cycle and an increase in the G2/M phases (4N) and polyploidy (>4N; Fig. 1a and Supplementary Figure 2a). Similar results were observed upon 15 or 25 mJ/cm² with slight variation in

the timing of the response, the latter causing a moderately faster response. Either dose of irradiation provoked a significant increase in the cellular light scatter parameters of cells, reflecting a switch to higher size and complexity typical of keratinocyte differentiation (Fig. 1a and Supplementary Figure 2a¹⁸). Up-regulation of p53 by the effect of sbUV irradiation was sustained (Supplementary Figure 2b).

UV light is thought to activate the cell cycle^{19,20}. The cell cycle profiles that we observed were consistent with this model. However, the accumulation of cells in S phase and G2/M could be due to cells being stuck due to DNA breaks not to cell cycle activation. Therefore, we performed BrdU incorporation assays upon sbUV irradiation to measure the proportion of cells undergoing DNA replication. DNA synthesis was significantly increased 12 h after irradiation (Supplementary Figure 3a). Consistent with a mitosis arrest, irradiated DNA synthesising cells also accumulated in G2/M. In order to monitor DNA re-replication beyond G2/M after irradiation, we performed pulse-chase experiments. Keratinocytes were labelled for 1.5 h just before irradiation. Interestingly, BrdU positive accumulated mainly in G2/M by 48 h and progressed into polyploidy by 72 h (Fig. 1b, c and Supplementary Figure 3b), demonstrating that cells continued DNA replication in spite of a mitotic block.

Consistent with the cell cycle changes and the increase in light scattering, sbUV irradiation (15/25 mJ/cm²) induced the expression of epidermal suprabasal protein markers keratins K1, K13 and K16 and involucrin (Fig. 2a–c and Supplementary Figure 4a–c). RT-PCR also demonstrated an increase in the expression of markers keratins K1 and K10, filaggrin and involucrin (Fig. 2d). Further evidence that sbUV irradiation induced terminal differentiation, was the differentiated morphology of irradiated cells (Supplementary Figure 4d) and the striking irreversible loss of proliferative potential (Fig. 2e and Supplementary Figure 4e).

We have recently found that stratified epithelia of head and neck share with epidermal keratinocytes a DDDR to cell cycle deregulation²¹. We aimed to test whether head and neck squamous cells respond similarly to UV irradiation even though they are not usually exposed to this carcinogen. Therefore, we isolated primary cells from oral mucosa and larynx and subjected them to sbUV irradiation. As shown in Fig. 3, these cells responded in a similar way as epidermal keratinocytes. Irradiated oral and larynx cells greatly expressed the DNA damage marker γ H2AX and accumulated in S phase, G2/M and polyploidy (Fig. 3a, b and Supplementary Figure 5). A low fraction of sub-G1 cells was observed in the cell cycle profiles at these doses (9% oral and 6% larynx; Fig. 3b and Supplementary Figure 5b). The irradiation induced the expression of the squamous differentiation marker keratin K13



(Fig. 3c). Consistent with the induction of irreversible terminal differentiation, the clonogenic capacity of these cells was lost upon UV irradiation (Fig. 3d).

The loss of clonogenicity in irradiated keratinocytes would not be due to quiescence as cells were more actively on cycle. The induction of all markers of post-mitotic differentiation suggests that cells ceased proliferation due to terminal differentiation. However, we tested whether some of the keratinocyte proliferative potential lost upon sbUV irradiation was due to senescence. We analysed cells for Beta-Galactosidase activity (B-Gal), the main marker of this process²². While mitomycin C-treated fibroblasts proved positive for B-Gal,

none of the keratinocyte colonies were positive, before or even 12 days after sbUV irradiation (Supplementary Figure 6).

It has been shown that tumour suppressor p53 mediates UV-induced apoptosis in epidermal keratinocytes⁵. We tested whether p53 mediates UV-induced differentiation. We irradiated human primary control or p53 knock-down keratinocytes at lethal doses (lthUV, 150–300 mJ/cm²) or sbUV doses of UV. p53 protein and mRNA were suppressed by exogenous expression of well established specific shRNA¹², even upon UV (Fig. 4a, b). p53 transcriptional target, the cell cycle inhibitor p21CIP (p21), was decreased by shp53 although a significant expression

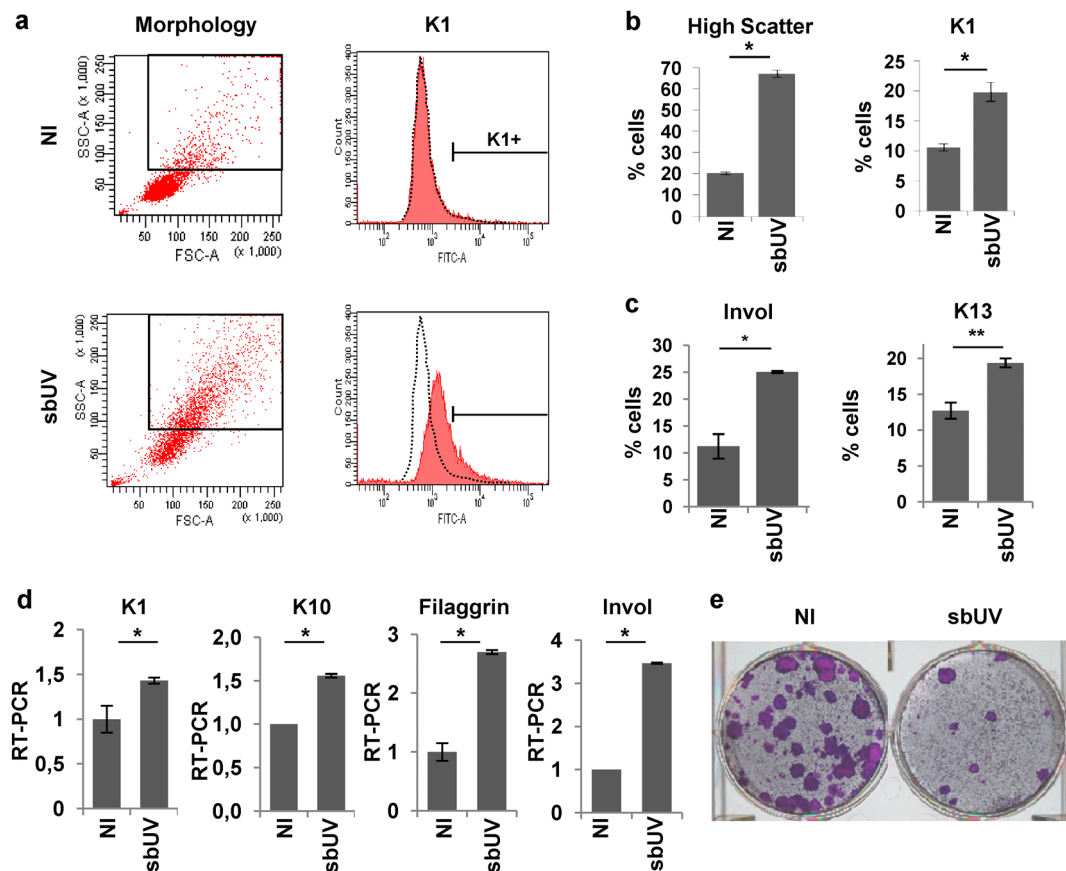


Fig. 2 Sublethal UV irradiation induces squamous differentiation in epidermal keratinocytes. Primary human epidermal keratinocytes 24 h (d) or 48 h (a–c, e) after sublethal UV irradiation (sbUV; 15 mJ/cm²). **a** Representative flow-cytometry analyses for morphology (light scatter) or the expression of keratin K1. Black boxes gate cells with high light scatter typical of differentiation. **b** Percent of high scatter cells or keratin K1 positive cells. **c** Percent of involucrin (Invol) or keratin K13 positive cells. **d** Expression of K1, K10, filaggrin or Invol as measured by RT-qPCR. **e** Clonogenic capacity of cells plated 48 h after UV irradiation as in (a) (3000 cells per well in triplicates). NI: non-irradiated. Irradiation units: /cm². **p* < 0.05, ***p* < 0.01. Data are representative or mean ± s.e.m. of triplicate samples. See also Supplementary Figure 4

was still detected (Fig. 4a). p21 has a known p53-independent expression pathway²³. The absence of p53 provoked a higher impact of UV on keratinocyte DNA damage (γH2AX). As shown in Fig. 4c, d, lthUV irradiation induced acute apoptosis by 24 h resulting in over 40% of cells in the sub-G1 fraction. The proportion of apoptotic cells significantly decreased in the absence of p53, indicating that the tumour suppressor mediates UV-induced apoptosis. In contrast, a scarce effect was observed in the cell cycle of keratinocytes by sbUV irradiation.

We investigated whether p53 mediated the differentiation response to sbUV levels. The inactivation of p53 alone induces squamous differentiation via cell cycle stress¹². Contrary to the apoptosis response induced by lthUV, the loss of endogenous p53 did not compromise the induction of terminal differentiation provoked by sbUV irradiation, as measured by increased light scattering (Fig. 5a) and expression of suprabasal squamous

markers (mRNA or protein) keratins K1, K10, K16 and K13, involucrin and filaggrin (Fig. 5b, c). The results show that endogenous p53 does not mediate UV-induced differentiation.

To test whether UV irradiation might induce differentiation via mitosis control, we overexpressed the mitosis global regulator FOXM1^{24,25}. This gene allows keratinocytes to bypass the mitotic checkpoints and forces cell division^{26,27}. Interestingly, overexpression of FOXM1 recovered the proliferative cell morphology (Fig. 6a) and mitigated the induction of squamous differentiation and thereby the loss of clonogenic capacity (Fig. 6b, c and Supplementary Figure 7a, b) caused by sbUV irradiation. These results suggest that mitotic checkpoints control UV-induced differentiation.

In order to confirm a role of G2/M checkpoints in the keratinocyte differentiation response to UV, we studied the involvement of Wee1 kinase. Wee1 via cdc25 inactivates the main mitotic kinase cdk1 in response to DNA

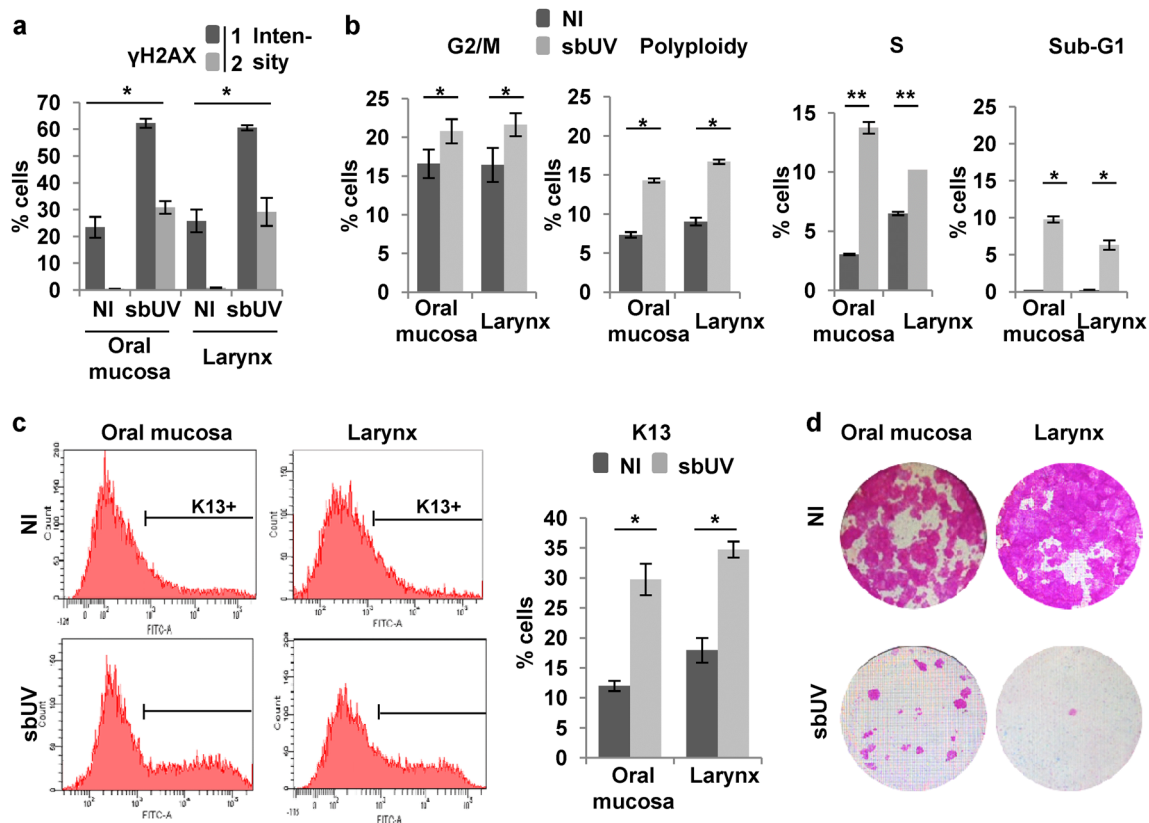


Fig. 3 Sublethal UV irradiation induces squamous differentiation in keratinocytes of head and neck. Primary cells from human oral mucosa or larynx after sublethal UV irradiation (sbUV; 25 mJ/cm²) were analysed 5 h (**a**) or 48 h (**b–d**) after irradiation. **a** Percent of γH2AX (early DNA damage marker) positive cells according to 2 levels of intensity (1–2). **b** Percent of G2/M, polyploid, S or sub-G1 fractions of the cell cycle, measured as in Fig. 1. **c** Representative flow cytometry analyses of the differentiation marker keratin K13. Bar histogram shows the percent of K13 positive cells (K13+) as determined by a negative control antibody (see Materials and methods) **d** Clonogenic capacity of cells plated 48 h after irradiation (2500 cells per well in triplicates). NI: non-irradiated. **p* < 0.05, ***p* < 0.01. Data are representative or mean ± s.e.m. of duplicate samples and two independent experiments. See also Supplementary Figure 5

damage and causes G2 arrest to allow DNA repair independently of p53²⁸. We therefore knocked-down Wee1 in primary keratinocytes and subjected them to UV irradiation. We did this in low-calcium (<0.01 mM) conditions where viral infections are more efficient on primary keratinocytes (see Materials and methods) and where differentiating cells early detach into the medium^{12,29–31}. Partial silencing of Wee1 (Fig. 7a) in non-irradiated cells slightly promoted proliferation without any detectable sub-G1 population in the attached monolayer (Supplementary Figure 7c, d). However, loss of Wee1 significantly resulted in apoptosis upon sbUV irradiation as monitored by increased expression of mRNA for pro-apoptotic factors BAX and APAF-1 (Fig. 7b) and increased proportion of detached apoptotic cells in sub-G1 (Fig. 7c). The inhibition of Wee1 caused sbUV-induced apoptosis at the expense of terminal differentiation according to the decrease of differentiation markers keratin K1, filaggrin, involucrin and loricrin (Fig. 7d, e).

Discussion

The main genomic insult to the skin is UV irradiation. It is instrumental to skin homeostasis that daily, non-lethal levels of UV, trigger a squamous differentiation response. This might constitute a self-protective mechanism of the skin alternative to apoptosis, in order to suppress pre-cancerous cells via shedding (*peeling*).

UV light-induced skin squamous cancer cannot be originated by cells undergoing apoptosis but by cells surviving irradiation. Given that skin cancer is mainly due to repeated or chronic exposure to UV^{1,32,33}, pre-cancerous cells are expected to arise from sublethal levels. Our results provide a mechanism by which the skin can continuously be cleansed of damaged, potentially pre-cancerous cells. Although most studies have addressed keratinocyte apoptosis induced by UV, some results have been previously reported on differentiation effects. Cotton and Spandau suggested that at sublethal UV

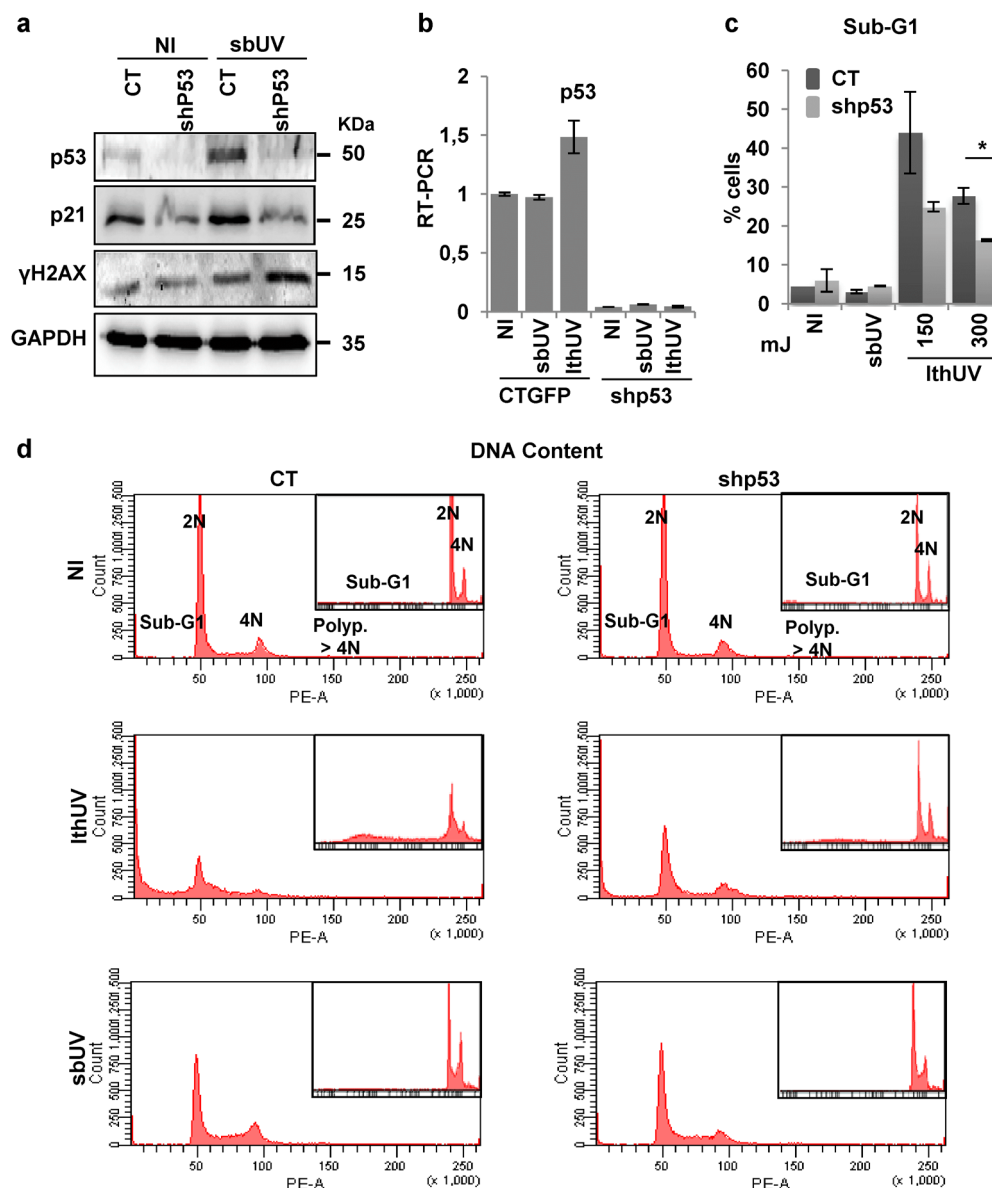
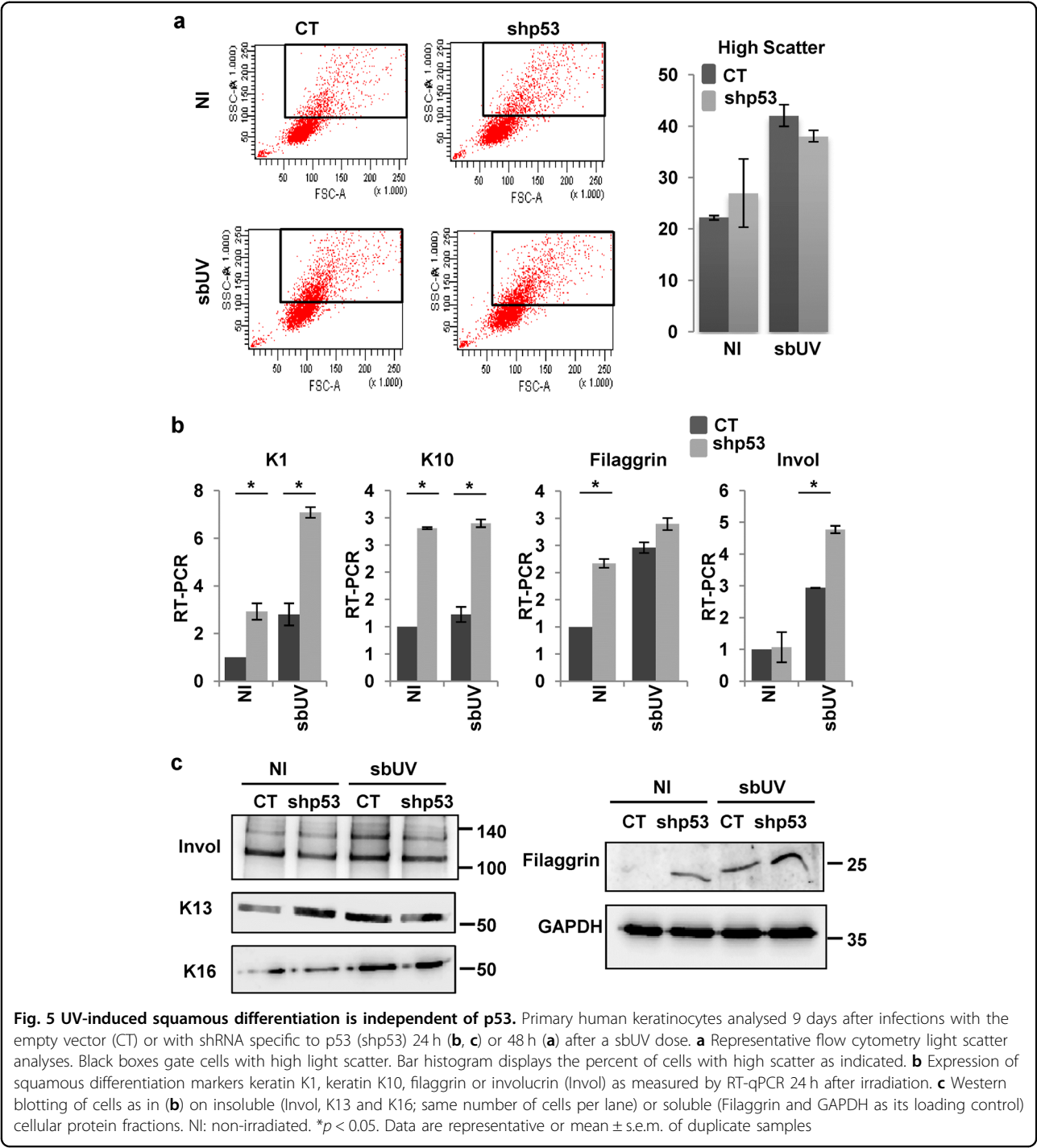


Fig. 4 p53 mediates UV-induced keratinocyte apoptosis. Primary human keratinocytes 6 days after infections with the empty vector (CT) or with shRNA specific to p53 (shp53) and 24 h after lethal UV (150–300 mJ/cm²; lthUV) or sublethal UV doses (sbUV), as indicated. **a** Expression of p53, its target p21 or γH2AX by western blotting 24 h after sbUV. GAPDH as loading control. **b** Expression of p53 mRNA as measured by RT-qPCR. **c** Percent of cells in the sub-G1 (apoptotic) fraction of the cell cycle. **d** Representative flow-cytometry analyses for DNA content as in Fig. 1. Inset histograms show DNA content in logarithmic units. NI: non-irradiated. Irradiation units: /cm². **p* < 0.05. Data are representative or mean ± s.e.m. of triplicate samples

doses differentiation might protect keratinocytes from apoptosis³⁴. Increased production of cornified envelopes or expression of differentiation markers upon UV have been detected in human keratinocytes in gene arrays, ex vivo, or in organ cultures^{29,35–37}. Repeated irradiation cycles triggered an alternative differentiation response in telomerase-immortalised keratinocytes³⁸. Our results strongly support a physiological differentiation response to sublethal UV irradiation. We have investigated the mechanisms triggering this response.

p53 has a well-known capacity to trigger apoptosis when the cellular damage is too acute to be repaired⁷. Although the role of p53 in mediating UV-induced apoptosis is well established^{4,5}, in our study the lack of p53 did not impair the differentiation response to sublethal UV irradiation. This result is consistent with the known function of p53 in holding the cell cycle to allow DNA repair⁷. In addition, we have previously shown that p53 does not mediate keratinocyte differentiation induced in response to oncogenic cell cycle stress^{11,12}.



Our hypothesis is that moderate sublethal UV irradiation induces keratinocyte differentiation via the DNA damage response pathways, through the G2/M checkpoints. This hypothesis is well supported by the proliferative rescue by FOXM1 upon UV. FOXM1 is frequently amplified in epithelial cancer³⁹ and is a global mitotic regulator with the capacity to override G2-mitotic checkpoints^{25,40}. This transcription factor induces a set of

genes driving mitosis. Altogether, the results suggest that the induction of differentiation upon UV irradiation is dependent on mitosis impairment. This is further illustrated by the requirement of Wee1.

Wee1 is a component of the DNA damage mitosis checkpoints²⁸. Its role is to inactivate the central mitosis kinase cdk1 in order to delay entry in mitosis upon DNA damage. It is interesting that keratinocytes undergo

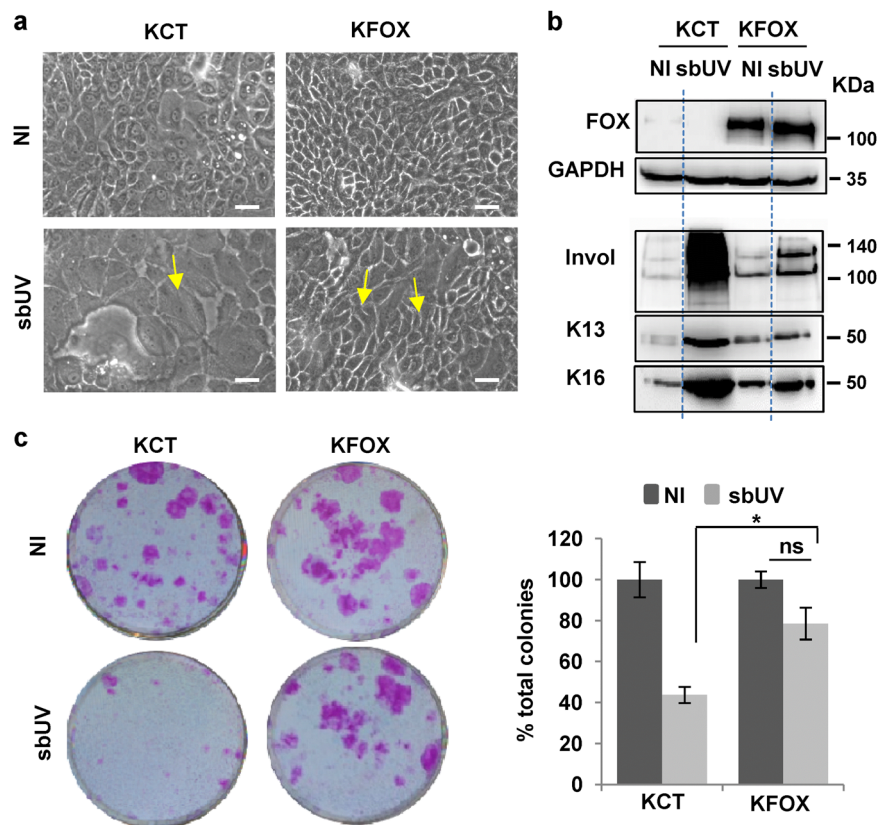


Fig. 6 Mitotic regulator FOXM1 suppresses UV-induced squamous differentiation and rescues the clonogenic potential. Analyses of primary human keratinocytes expressing the empty vector (KCT) or the same vector expressing FOXM1 (KFOX), non-irradiated or 48 h after sbUV irradiation. **a** Representative microphotographs of phase contrast. Note that typical differentiated large cells are induced by UV whereas small proliferative cells are recovered by FOXM1 in spite of UV (yellow arrows). **b** Western blotting of KCT or KFOX on soluble (FOXM1 and GAPDH as its loading control) or insoluble (Invol, keratins K13 and K16) cellular protein fraction. **c** Clonogenic capacity of the cells indicated plated 48 h after sbUV irradiation (2500 cells per well in triplicates). Bar histogram shows the percent of colonies relative to CT 48 h after irradiation. NI: non-irradiated. ns: not statistically significant. * $p < 0.05$. Data are representative or mean $\pm$ s.e.m. of triplicate samples. See also Supplementary Figure 7

mitotic slippage in the onset of differentiation^{14,41}. Mitotic slippage is caused by the incapability of cells to maintain a G2 arrest⁴². It has been shown that mitotic slippage occurs when cdk1 is prematurely inactivated during a G2/M arrest^{43,44}. In addition, in various systems mitotic slippage has been proposed to protect cells from apoptosis (refs in Gandarillas et al.⁴⁵). Although p53 is part of the G2 checkpoint to promote DNA repair, the lack of p53, by not allowing full repair, provokes a G2/M arrest¹². This can be achieved by the mitosis checkpoints but some cell cycle inhibitors such as p21 can be induced independently of p53 at G2 and thus inhibit cdk1 and cause G2/M arrest²³. Certainly, we found a significant expression of p21 in the absence of p53 before and after UV irradiation. Wee1 also promotes cdk1 inhibition in response to DNA damage independent of p53. The fact that inactivation of Wee1 induces apoptosis indicates that this protein is involved (possibly required) in the squamous differentiation pathway.

The loss of Wee1 reduced the threshold of UV levels at which keratinocytes underwent apoptosis. This suggests that mitotic checkpoints determine the keratinocyte fate towards apoptosis or differentiation. Interestingly, moderate UV irradiation has been shown to trigger a postreplication checkpoint in yeast, an alternative to the G1/S and G2/S checkpoints triggered by high doses⁴⁶.

The results have implications into disease. The UV-induced DMC may contribute to the therapeutic effects of moderate exposure to the Sun or UV on hyperproliferation indicated for the common skin disorder, psoriasis (4% of the population⁴⁷). It also contributes to explaining why skin carcinomas arise mainly upon chronic sun exposure. Sustained UV irradiation promotes the expansion of p53 mutant cells^{5,48}. It has been proposed that this occurs because p53 mutant cells are more resistant to UV-induced apoptosis than adjacent wild-type cells⁴⁹. Additional alterations in the DMC caused by sustained UV

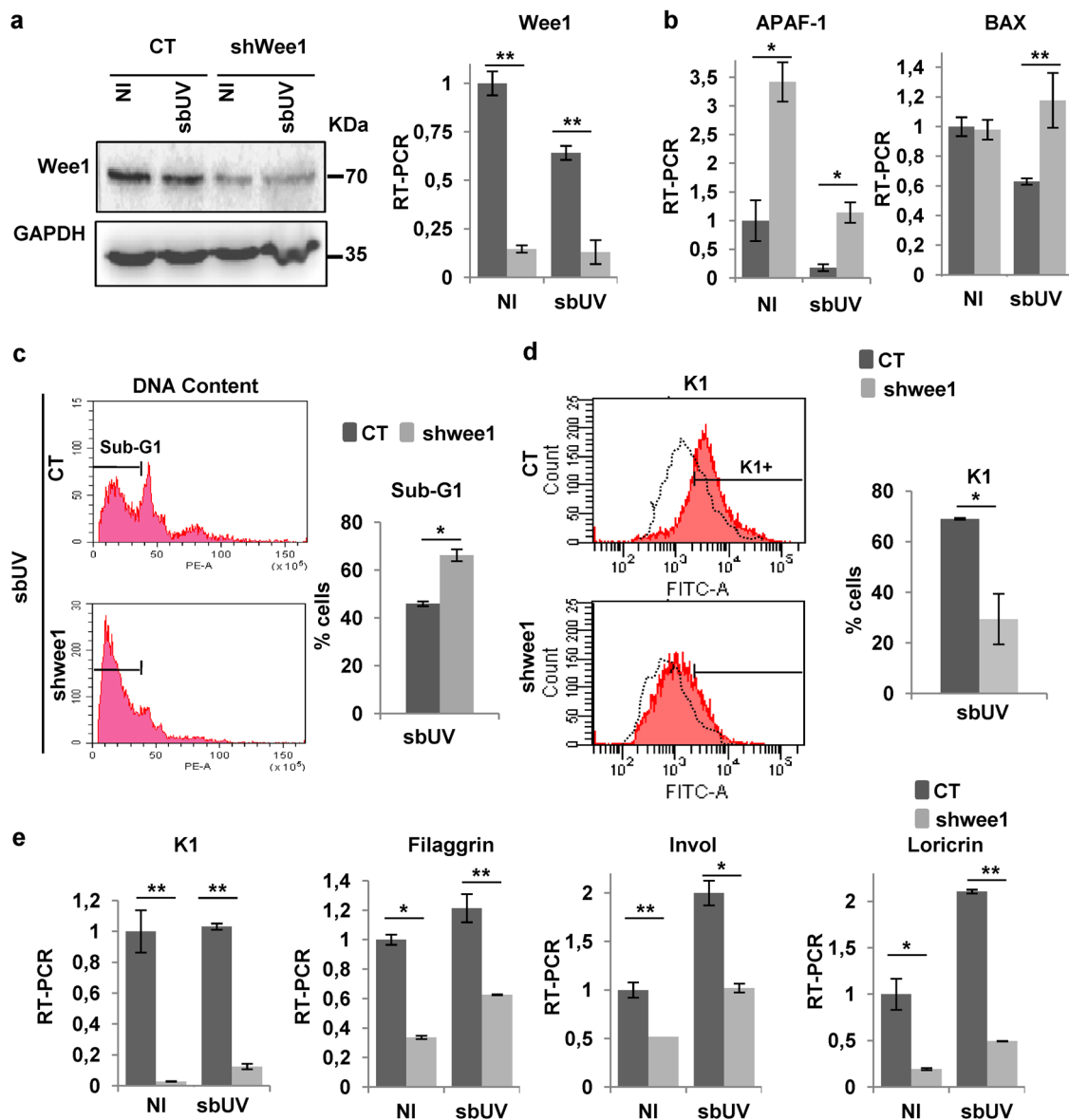


Fig. 7 Mitosis checkpoint protein Wee1 protects keratinocytes from UV-induced apoptosis and allows UV-induced squamous differentiation. Analyses of primary human keratinocytes 3 days after infections with the empty vector (CT) or specific shRNA to Wee1 (shwee1) and 24 h (a), 16 h (b, e), or 72 h (c, d) after sbUV irradiation as indicated. **a** Expression of Wee1 by western blotting or by RT-qPCR. GAPDH as loading control. **b** Expression of pro-apoptotic markers APAF-1 or BAX by RT-qPCR. **c**, **d** Analyses of shedding cells collected from the culture supernatant. **c** Representative flow-cytometry of DNA content. Bar histogram shows the percent of apoptotic cells in the sub-G1 fraction. **d** Representative flow-cytometry for the expression of keratin K1. Bar histogram displays positive cells relative to NI control (black broken line). **e** Expression of differentiation markers K1, filaggrin, involucrin (Invol) or loricrin by RT-qPCR. NI: non-irradiated. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Data are representative or mean $\pm$ s.e.m. of triplicate samples. See also Supplementary Figure 7

irradiation might also allow p53 deficient cells to amplify with tumorigenic consequences and genomic instability.

Lastly, keratinocytes of oral mucosa and larynx appear to share with keratinocytes of the skin the same differentiation response to sublethal UV irradiation. Most epithelia of head and neck are stratified and squamous. They are not mostly exposed to the Sun but to carcinogens of the intake, especially alcohol and tobacco,

yet undergo a similar response as epidermal cells to the sbUV radiation. Interestingly, the tar carcinogen 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA), a more frequent mutagen in the oral cavity, also induces squamous differentiation in oral keratinocytes²¹. Therefore, the regulation that we have found in keratinocytes of the skin might apply to head and neck self-renewal stratified epithelia. Alterations of this pathway might thus be

common to squamous carcinomas of these locations. Self-renewal epithelia need powerful mechanisms to minimise the continuous impact of carcinogens. The DMC might renew and cleanse these tissues through squamous differentiation and cell shedding. This mechanism might protect them from precancerous mutations and thus maintain homeostasis in spite of the constant sources of DNA damage.

Materials and methods

Cell culture, plasmids and viral infections

Ethical permissions for this study were requested, approved, and obtained from the Ethical Committee for Clinical Research of Cantabria Council, Spain. In all cases, human tissue material discarded after surgery was obtained with written consent presented by clinicians to the patients, and it was treated anonymously.

Primary keratinocytes were isolated from neonatal human foreskin of four individuals or from adult head and neck epithelia of two individuals (inner cheek, larynx), and cultured in the presence of 3T3 mouse fibroblast feeder layer (inactivated by mitomycin C), in Rheinwald FAD medium as described (10% foetal bovine serum and 1.2 mM Ca^{+2} ^{50,51}). For cell suspensions, keratinocytes were harvested at subconfluence and feeder cells were carefully removed by treatment with 250 μM EDTA-PBS before trypsin. However, at subconfluence very few feeder cells remain. Low cell passages (1–4) were utilised. The 3T3 mouse fibroblast cell line used as feeder layer was cultured in Dulbecco medium 10% donor calf serum.

For gene delivery in primary keratinocytes, the following lentiviral constructs driven by constitutive promoters were used: control GFP pLVTHM and a construct expressing shRNA against p53: pLVUH-shp53-GFP (shp53; a gift from Patrick Aebischer and Didier Trono⁵²; Addgene plasmid 11653); control pLVX (CT-pLVX) and pLVX-FoxM1 (FOX M1; kindly provided by S. Stoll, University of Michigan, Ann Arbor, USA); control pIKO1 (Sigma-Aldrich, Inc) and a construct expressing shRNA against Wee1 (shwee1).

Lentiviral production was performed by transient transfection of 293T cells as previously described¹². Lentiviral infections were performed as described²⁷. Infections of Control GFP, shp53, CT-pLVX and pLVX-FoxM1 were made in Rheinwald FAD medium. Experiments involving lentiviral construct bearing shRNA to Wee1 were performed in low Ca medium due to the higher infection efficiency. In this case, cells were transferred to low-calcium concentration (<0.1 mM) in two media: Keratinocyte Growth Medium 2 Promocell; ref. C-20111 or Defined Keratinocyte-SFM (serum-free, <0.1 mM Ca^{+2} ; Gibco; ref. 10744019) following the manufacturer's instructions. Low Ca conditions allow early differentiation of human keratinocytes but not stratification. Late

differentiation or apoptotic cells are shed into the medium^{12,29–31}.

For clonogenicity assays, 2500 keratinocytes were grown in high-calcium FAD medium and plated per T6 well triplicates. About 14 days later, the culture was stained with Rhodanile blue as described previously⁵³. This mixture dyes differently keratinocyte colonies (pink) and background feeders (blue).

Antibodies

The following primary antibodies from Santa Cruz Biotechnology were used: anti-FOX M1 (Western Blot: WB), anti-GAPDH (FL-335, WB), anti-keratin K10 (RKSE60, immunofluorescence: IF), anti-p53 (FL-393, IF and WB), anti-keratin K16 (Flow Cytometry: FC and WB) and anti-wee1 (B11, WB). Other antibodies used were: anti-involucrin (SY5, Sigma-Aldrich, IF, FC; SY3⁵⁴, WB), anti-BrdU (BD Biosciences, FC), anti-filaggrin (PRB-417P, COVANCE, WB), anti- γH2AX (Ser139, Millipore, FC and WB), anti-keratin K1 (Poly19052, Biolegend, IF, FC), keratin K13 (KS-1A3, NOVUS, FC) and anti-p21 (P1484, Sigma-Aldrich, WB). Keratins K16 and K13 are typical of hyperplastic skin and oral epithelium, respectively and both are expressed in suprabasal cultured keratinocytes^{12,21}.

The following secondary antibodies from Jackson ImmunoResearch were used: Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG antibodies (FC and IF); Alexa Fluor® 594-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG antibodies (IF). Other secondary antibodies used were: IRdye800-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG antibodies (Li-Cor, WB) and HRP-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG antibodies (Bio-Rad, WB).

Ultraviolet irradiation

Keratinocytes were irradiated with UPV CL-1000 Series UV crosslinker at various doses. The light sources were fluorescent tubes of 312 nm shortwave ultraviolet B (UVB). Keratinocytes were plated in 60 mm dishes and irradiated in subconfluence conditions (70% of the plate). Keratinocyte medium was replaced 14 h before the irradiation. Before the irradiation, the medium was removed and added PBS tempered at 37 °C. 60 mm dishes with keratinocytes were irradiated uncovered. Once keratinocytes were irradiated, PBS was removed and fresh medium was added. Non-irradiated control cells were subjected to the same procedure except for lack of irradiation.

The same cell fate was observed at doses 150–300 mJ/cm² (apoptosis; lethal UV: lthUV) or at 10–25 mJ (differentiation; sublethal UV: sbUV). Within each group, the effects were slightly faster or more intense at the higher doses. The doses were chosen depending on the timing of the assay or if the culture was high calcium or low calcium (where the non-stratified monolayer was more sensitive).

The effect of sbUV doses on squamous differentiation was confirmed on primary cells from the healthy skin of four different individuals and healthy head and neck epithelia of two different individuals, with consistent results.

Flow cytometry

Keratinocytes were harvested, fixed and stained for BrdU, DNA content (Propidium Iodide, PI), γ H2AX, involucrin and keratins K16, K1 as previously described^{11,12}. Keratin K13 was labelled as K1. All antibody stainings were controlled by the use of similar concentration of isotype negative antibody (mouse IgG, Sigma-Aldrich; rabbit serum, or anti-BrdU in non-BrdU containing cells). After staining, cells were firmly resuspended and filtered through a 70 μ M mesh to minimise the presence of aggregates and then analysed on a Becton Dickinson FACS Canto™ and CytoFLEX (Beckman Coulter). 10,000 events were gated and acquired. For DNA synthesis analyses, cells were cultured in the presence of 10 μ M BrdU (Sigma-Aldrich) for 1.5 h and harvested. For BrdU pulse-chase experiment, cells were cultured for 1.5 h in the presence of 10 μ M BrdU just before irradiation (Sigma-Aldrich) and were harvested 48 or 72 h after irradiation. BrdU staining and DNA content analysis with PI (25 μ g/ml, 12 h) were performed as described¹¹.

Immunodetection

For immunofluorescence, keratinocytes were grown on glass coverslips, fixed and stained as previously described¹¹. For western blotting, cells were washed with PBS, lysed and subjected to SDS-PAGE electrophoresis and blotting as previously described¹¹ (soluble protein fraction). An equal amount of protein was loaded onto the gel. For protein detection in the highly insoluble cellular fraction (Keratins K13, K16, involucrin), the remaining pellet after lyses was incubated in urea lysis buffer (10 mM Tris pH 8, 5% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 4 M urea⁵⁵). Since protein cannot be quantitated in this lysis buffer, the same number of cells were loaded onto the gel (8000 cells per lane).

Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated and reverse-transcribed using NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel) and the iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. The cDNAs (2 μ l) were amplified by real-time PCR (Bio-Rad iQ™ SYBR Green supermix) and normalised to β -actin mRNA levels. Primers utilised in this study for human genes were: β -actin (5'-AAAATCTGGCACCACACCTTC-3' and 5'-AGCACAGCCTGGATAGCAA-3'), APAF-1 (5'-CCTGTTGTCTCTCTTCCAGTGT-3' and 5'-CTGAAACCCAATGCACTCCC-3'), BAX (5'-TGGAGCTGCAGAGGATGATTG-3' and 5'-CCAGTTGAAGTTGCCGTCAGA-3'), filaggrin

(5'-GGCACTGAAAGGCCAAAAAGG-3' and 5'-AGCTGCCATGTCTCCAAACTA-3'), involucrin (5'-TGCCTGAGCAAGAATGTGAG-3' and 5'-AGCTGCTGATCCCTTTGTGT-3'), keratin K1 (5'-CCAGCCAGAGTAGGACCAGT-3' and 5'-TGCAGCAAAACAAGGAAATG-3'), keratin K10 (5'-AATGAAAAAGTAACCATGCAGAATCTG-3' and 5'-CACGAGGCTCCCCCTGAT-3'), loricrin (5'-TCATGA TGCTACCCGAGGTTTG-3' and 5'-CAGAACTAGATGCAGCCGGAGA-3'), p53 (5'-GTTCCGAGAGCTGAATGAGG-3' and 5'-TCTGAGTCAGGCCCCTTCTGT-3') and wee1 (5'-GCTTGCCCTCACAGTGGTAT-3' and 5'-GTAAGGCTGACAGAGCGGTT-3').

Senescence

The expression of senescence marker β -Galactosidase²² was analysed by Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions and visualised and photographed by bright field microscopy (ECLIPSE TS100F and LEDCMOS 5MP COLOR Nikon).

Statistical analyses

Data sets were compared using an unpaired Student's *t* test. A *p*-value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgements

This work was funded by Instituto de Salud Carlos III/FEDER (A.G.; Spain), grants PI11/02070, PI14/00900, and PI17/01307. P.A.L. was the recipient of a scholarship from IFIMAV/Gob. de Cantabria (Spain). I.d.P. was in part supported by lab resources, by ISCIII-FEDER PI1400900 and by a scholarship from IFC (Industrial Farmacéutica Cantabria; Spain). N.S.G. is the recipient of a predoctoral scholarship from Universidad de Cantabria/IDIVAL (Spain). We thank Lucía Barbier for technical assistance at a preliminary phase.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary Information accompanies this paper at (<https://doi.org/10.1038/s41419-018-1130-8>).

Received: 24 April 2018 Revised: 3 October 2018 Accepted: 8 October 2018
Published online: 25 October 2018

References

- Karia, P. S., Han, J. & Schmults, C. D. Cutaneous squamous cell carcinoma: estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United States, 2012. *J. Am. Acad. Dermatol.* **68**, 957–966 (2013).
- Ferlay, J. et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann. Oncol.* **18**, 581–592 (2007).
- Boukamp, P. Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis* **26**, 1657–1667 (2005).
- Besaratinia, A. & Pfeifer, G. P. Sunlight ultraviolet irradiation and BRAF V600 mutagenesis in human melanoma. *Hum. Mutat.* **29**, 983–991 (2008).

5. Ziegler, A. et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* **372**, 773–776 (1994).
6. Kulms, D. & Schwarz, T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **16**, 195–201 (2000).
7. Aylon, Y. & Oren, M. p53: guardian of ploidy. *Mol. Oncol.* **5**, 315–323 (2011).
8. Jonason, A. S. et al. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 14025–14029 (1996).
9. Ren, Z., Ponten, F., Nister, M. & Ponten, J. Reconstruction of the two-dimensional distribution of p53 positive staining patches in sun-exposed morphologically normal skin. *Int. J. Oncol.* **11**, 111–115 (1997).
10. le Pelletier, F., Soufir, N., de La Salmoniere, P., Janin, A. & Basset-Seguín, N. p53 Patches are not increased in patients with multiple nonmelanoma skin cancers. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 1324–1325 (2001).
11. Freije, A. et al. Cyclin E drives human keratinocyte growth into differentiation. *Oncogene* **31**, 5180–5192 (2012).
12. Freije, A. et al. Inactivation of p53 in human keratinocytes leads to squamous differentiation and shedding via replication stress and mitotic slippage. *Cell Rep.* **9**, 1349–1360 (2014).
13. Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G. & Bartek, J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* **319**, 1352–1355 (2008).
14. Gandarillas, A., Molinuevo, R., Freije, A. & Alonso-Lecue, P. The mitosis-differentiation checkpoint, another guardian of the epidermal genome. *Mol. Cell. Oncol.* **2**, e997127 (2015).
15. Pavey, S., Russell, T. & Gabrielli, B. G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation. *Oncogene* **20**, 6103–6110 (2001).
16. Blackford, A. N. & Jackson, S. P. ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response. *Mol. Cell* **66**, 801–817 (2017).
17. van Oosten, M. et al. Differential role of transcription-coupled repair in UVB-induced G2 arrest and apoptosis in mouse epidermis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 11268–11273 (2000).
18. Watt, F. M. & Jones, P. H. Changes in cell-surface carbohydrate during terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Biochem. Soc. Trans.* **20**, 285–288 (1992).
19. Berton, T. R., Pavone, A. & Fischer, S. M. Ultraviolet-B irradiation alters the cell cycle machinery in murine epidermis in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 1171–1178 (2001).
20. Olsen, W. M. Early cell kinetic effects of a single dose of monochromatic ultraviolet B irradiation on hairless mouse epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **91**, 585–589 (1988).
21. Sanz-Gómez, N. et al. Response of head and neck epithelial cells to a DNA damage-differentiation checkpoint involving polyploidization. *Head Neck*, <https://doi.org/10.1002/hed.25376> (2018).
22. Itahana, K., Campisi, J. & Dimri, G. P. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol. Biol.* **371**, 21–31 (2007).
23. Parker, S. B. et al. p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* **267**, 1024–1027 (1995).
24. Laoukili, J. et al. FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nat. Cell Biol.* **7**, 126–136 (2005).
25. Costa, R. H. FoxM1 dances with mitosis. *Nat. Cell Biol.* **7**, 108–110 (2005).
26. Gemenetidis, E. et al. Induction of human epithelial stem/progenitor expansion by FOXM1. *Cancer Res.* **70**, 9515–9526 (2010).
27. Molinuevo, R. et al. FOXM1 allows human keratinocytes to bypass the oncogene-induced differentiation checkpoint in response to gain of MYC or loss of p53. *Oncogene* **36**, 956–965 (2017).
28. Heijink, A. M., Krajewska, M. & van Vugt, M. A. The DNA damage response during mitosis. *Mutat. Res.* **750**, 45–55 (2013).
29. Kumar, M. G., Hurwitz, S. A., Cotton, J. & Spandau, D. F. Subphysiological concentrations of extracellular calcium sensitize normal human keratinocytes to UVB-induced apoptosis. *Arch. Dermatol. Res.* **291**, 37–46 (1999).
30. Dazard, J. E., Piette, J., Basset-Seguín, N., Blanchard, J. M. & Gandarillas, A. Switch from p53 to MDM2 as differentiating human keratinocytes lose their proliferative potential and increase in cellular size. *Oncogene* **19**, 3693–3705 (2000).
31. Borowiec, A. S., Delcourt, P., Dewailly, E. & Bidaux, G. Optimal differentiation of in vitro keratinocytes requires multifactorial external control. *PLoS ONE* **8**, e77507 (2013).
32. Madan, V., Lear, J. T. & Szeimies, R. M. Non-melanoma skin cancer. *Lancet* **375**, 673–685 (2010).
33. Rubin, A. I., Chen, E. H. & Ratner, D. Basal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2262–2269 (2005).
34. Cotton, J. & Spandau, D. F. Ultraviolet B-radiation dose influences the induction of apoptosis and p53 in human keratinocytes. *Radiat. Res.* **147**, 148–155 (1997).
35. Matsui, M. S., Wang, N. & DeLeo, V. A. Ultraviolet radiation B induces differentiation and protein kinase C in normal human epidermal keratinocytes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **12**, 103–108 (1996).
36. Del Bino, S. et al. Ultraviolet B induces hyperproliferation and modification of epidermal differentiation in normal human skin grafted on to nude mice. *Br. J. Dermatol.* **150**, 658–667 (2004).
37. Li, D. et al. Rays and arrays: the transcriptional program in the response of human epidermal keratinocytes to UVB illumination. *FASEB J.* **15**, 2533–2535 (2001).
38. Bertrand-Valle, V. et al. Repeated exposures to UVB induce differentiation rather than senescence of human keratinocytes lacking p16^{INK4A}. *Biogerontology* **11**, 167–181 (2010).
39. Laoukili, J., Stahl, M. & Medema, R. H. FoxM1: at the crossroads of ageing and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1775**, 92–102 (2007).
40. Shaltiel, I. A., Krenning, L., Bruinsma, W. & Medema, R. H. The same, only different—DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *J. Cell Sci.* **128**, 607–620 (2015).
41. Gandarillas, A. & Freije, A. Cycling up the epidermis: reconciling 100 years of debate. *Exp. Dermatol.* **23**, 87–91 (2014).
42. Andreassen, P. R. & Margolis, R. L. Microtubule dependency of p34cdc2 inactivation and mitotic exit in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **127**, 789–802 (1994).
43. Brito, D. A. & Rieder, C. L. Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr. Biol.* **16**, 1194–1200 (2006).
44. McCloy, R. A. et al. Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* **13**, 1400–1412 (2014).
45. Gandarillas, A., Molinuevo, R. & Sanz-Gomez, N. Mammalian endoreplication emerges to reveal a potential developmental timer. *Cell Death Differ.* **25**, 471–476 (2018).
46. Callegari, A. J. & Kelly, T. J. Shedding light on the DNA damage checkpoint. *Cell Cycle* **6**, 660–666 (2007).
47. Parisi, R., Symmons, D. P., Griffiths, C. E. & Ashcroft, D. M. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 377–385 (2013).
48. Klein, A. M., Brash, D. E., Jones, P. H. & Simons, B. D. Stochastic fate of p53-mutant epidermal progenitor cells is tilted toward proliferation by UV B during preneoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 270–275 (2010).
49. Chao, D. L., Eck, J. T., Brash, D. E., Maley, C. C. & Luebeck, E. G. Preneoplastic lesion growth driven by the death of adjacent normal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 15034–15039 (2008).
50. Rheinwald, J. G. in *Cell Growth and Division* (ed Baserga, R.) Ch. 5, 81–94 (IRL Press, Oxford 1989).
51. Gandarillas, A. & Watt, F. M. c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev.* **11**, 2869–2882 (1997).
52. Szulc, J., Wiznerowicz, M., Sauvain, M. O., Trono, D. & Aebischer, P. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat. Methods* **3**, 109–116 (2006).
53. Jones, P. H. & Watt, F. M. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* **73**, 713–724 (1993).
54. Hudson, D. L., Weiland, K. L., Dooley, T. P., Simon, M. & Watt, F. M. Characterisation of eight monoclonal antibodies to involucrin. *Hybridoma* **11**, 367–379 (1992).
55. Achtstaetter, T., Hatzfeld, M., Quinlan, R. A., Parmelee, D. C. & Franke, W. W. Separation of cytokeratin polypeptides by gel electrophoretic and chromatographic techniques and their identification by immunoblotting. *Methods Enzymol.* **134**, 355–371 (1986).