



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Paper de l'exonucleasa TREX2 en la biologia i patologia de la pell

Joan Manils Pacheco

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Facultat de Medicina
Departament de Patologia i Terapèutica Experimental
Programa de Doctorat en Biomedicina

PAPER DE L'EXONUCLEASA TREX2 EN LA BIOLOGIA I PATOLOGIA DE LA PELL

Tesi Doctoral
Joan Manils Pacheco
Barcelona, febrer 2015

Memòria presentada per
Joan Manils Pacheco, llicenciat en Biologia,
Per optar al grau de **Doctor** per la **Universitat de Barcelona**.

Tesi realitzada sota la direcció de la
Dra. Concepció Soler Prat,
Professora del Departament de Patologia i Terapèutica Experimental de la
Universitat de Barcelona.

Tesi adscrita al Departament de Patologia i Terapèutica Experimental,
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona
Programa de Doctorat de Biomedicina,

Dra. Concepció Soler Prat

Joan Manils Pacheco

Als meus pares

AGRAÏMENTS

En primer lloc al Joan i la Dolors, els meus pares. Tot allò que es pot dir de bo d'uns pares, ho puc dir dels meus, ens estimen, ens recolzen, ens vetllen, ens guien amb bon criteri, ens ajuden, ens financen... res seria d'aquesta tesi sense la seva inestimable participació. Aquesta tesi també és seva, perquè sense la seva dedicació i sacrifici no hagués estat possible. Dono gràcies als pares per deixar-me ser i fer el que he volgut i ajudar-m'hi, i dono gràcies a l'atzar per haver-me donat uns pares tan superfantàstics. També agraeixo tenir uns germans, en Pere i en Bernat, que curiosament també són superfantàstics. I agraeixo a la meva estimada yaya Carmen el seu amor incondicional.

En segon lloc haig d'agrair a la Concepció que confiés en mi sense reserves (l'entrevista per la beca va ser improvisada en segons, i aquell dia recordo que no vaig sortir de casa amb les meves millors gales...). Ella m'ha ensenyat caràcters i virtuts, com la perseverància, la tenacitat, la pulcritud, el pensament crític i la passió pel que fas, tant útils per la ciència com per la vida.

Agraeixo a tots els que han passat pel laboratori d'immunologia: l'Elena, la Neus, la Laura, l'Inma, l'Aitor, la Monica, la Mercè (que junt al Ramon, el Gabriel i l'Aran m'han ensenyat a: always look on the bright side of live) i la Diana, les ganes d'ajudar i el bon tracte i el bon ambient que sempre ha imperat entre nosaltres, ha sigut un plaer treballar al vostre costat. Voldria agrair de forma especial a la Diana la paciència i la complicitat que ha tingut amb mi en la salut i en la malaltia, i la companyia que m'ha fet al llarg de tots aquests anys, per haver aguantat i compartit mocs, pets, xafarderies, jocs, bromes, sustos i molts somriures.

També és d'agrair la qualitat humana predominant als nostres passadissos, tots i cadascun dels investigadors i futurs investigadors que hi ha en els diferents laboratoris mereixen un gràcies personalitzat perquè mai han contestat no, a cap de les meves impertinents i constants demandes, ja fossin de material o coneixement. Així voldria donar les gràcies a tots ells i sobretot als qui he molestat més com: la gent de l'ala fisiològica del passadís (Dani, Cristina, Anamaria i Diana; la Betta i l'Edu; el Xavi, l'Alejandro, la Tanit, la Sònia, la Tania, la Carla, l'Héctor i el Xabi nou; les Annes, el Miguel, l'Ester i la Laura de bioquímica; la Bea, la Natalia, el Ruben i l'Edgardo; el Joni, la Laura, el David, l'Ester, Fran i Helena; Irantxu, la Mónica i la Tai; l'Andy i la Petra i la penya de nefro: Cristian, Gema, Inés, Meri, Laura i Marc.

Menció especial mereixen la cinquena planta, el Santi, la Natalia, la Silvia i la Mercè amb qui anar a treballar es va convertir en anar a compartir estones amb els amics. I no voldria deixar passar l'oportunitat de donar les gràcies als veïns de davant, la jefa Marga i les aliades Irene, Ester, Mercedes, Maye i Anusha, mai podré tornar-vos els anticossos que m'heu arribat a deixar, i molt menys els somriures que m'heu arrancat, però aquí us deixo aquestes línies per la posteritat perquè quedi constància de la gratitud que us tinc per haver sigut sempre altruïstament generoses i tremendament simpàtiques.

Gran part de la meva tesi s'ha produït gràcies a les màquines de serveis científicotècnics de Bellvitge, parlo del Benja, l'Ester, la Bea i l'Eva. Mil gràcies per ser excel·lents professionals i persones, m'heu ajudat molt i m'heu donat tots els capricis, descansareu de mi i les meves reserves a hores intempestives, i els "avui no dino per culpa d'en Joan" ben aviat, però segur que hi haurà qui em substitueixi...

Agraeixo tenir amics que em treguin a passejar quan no sé ben be que fer les estones fora del laboratori, amics que són família: l'Àlex, la Nuri i l'Anna, la Laia i en Roger, la Brisa, en Kiku, l'Alexis, l'Uri, la Cristina i en Joan, l'Isma, l'Ester i la Martina, i l'Anna i el Raimon de Barcelona. Agraeixo a la Consol, companya de carrera, de màster i de pis totes les atencions que m'ha procurat i la seva inestimable ajuda informàtica i a les companyes de pis forçoses, la Susana i la Nekane haver-me acollit a la seva morada sense cap queixa. Per descomptat no em puc oblidar de la Natalia, que altruïstament ha col·laborat en la confecció de la tesi, però també ha col·laborat a que la psique de l'autor no es perdés per sempre en les anades i tornades del procés d'escriptura.

Gairebé des del principi de la tesi que penso en posar als agraïments a l'Anna Alsina, que s'encarrega de fer la seva feina de manera brillantment eficient, tant de bo en sabés jo la meitat que ella de fer la meva. Trobo que m'he trobat molt poques persones que em facilitessin l'existència tant com ella. Moltíssimes gràcies Anna.

No vull deixar passar l'oportunitat d'agrair a la Conchi Mora, el Josep Maria de Anta, l'Andree Yeramian, el Joan Gil, l'Anna Bigas i el Jesús Paramio, que acceptessin formar part del meu tribunal de tesis, i que malgrat tenir preguntes que em podrien haver compromès en públic, es van portar tant i tant be i van ser del tot indulgents, fent gala d'una clemència mai vista.

Un gràcies també a Fortuna, que amb els capritxosos girs de la seva roda s'ha encarregat d'oferir-me la possibilitat de fer aquesta tesi. Estic en deute amb ella i la seva roda perquè em sento molt afortunat de ser com sóc, on sóc i sobretot amb qui sóc. Gràcies a la tesi he trobat el somriure més meravellós, es desperta amb mi cada matí i fa que qualsevol preocupació sigui més petita que un esquix.

Però sobretot t'agraeixo a tu, que estàs llegint aquestes línies i trobes a faltar el teu nom, be... hi vaig estar pensant fins a l'últim moment... i a l'hora de la veritat no me'n vaig recordar... així que et dec un gràcies i un disculpa.

De totes les coses que he descobert amb aquesta tesi, cap és tant important com haver-me adonat que no hi ha cap motiu que mereixi perdre el somriure.

“Bebedores ilustrísimos, y vosotros, preciosísimos chancrosos –pues a vos y no a otros dedico mis escritos–. Alcibíades, en el diálogo de Platón titulado El Banquete, en alabanza de su preceptor Sócrates, sin controversia príncipe de los filósofos, dice, entre otras palabras, que era semejante a los silenes. [...]

Decía aquél que así era Sócrates porque, viéndolo por defuera y estimándolo por su exterior apariencia, no hubieseis dado por él ni un aro de cebolla, hasta tal punto era feo de cuerpo y ridículo de porte, con la nariz puntiaguda, la mirada de un toro, la cara de bobo, simple en sus costumbres, rústico en el vestir, pobre de fortuna, desafortunado con las mujeres, inepto para todos los oficios de la república, siempre riendo, siempre bebiendo mano a mano con cualquiera, siempre burlándose, siempre disimulando su divino saber. Mas, destapando esa caja, hubieseis hallado en sus adentros una celeste e impagable droga; entendimiento más que humano, maravillosa virtud, coraje invencible, impar sobriedad, contento cierto, seguridad perfecta, menosprecio increíble de todo aquello por lo que los humanos tanto se desvelan, corren, trabajan, navegan y batallan.

[...] Es menester abrir este libro y sopesar cuidadosamente lo que en él se cuenta. Entonces podréis reconocer que su droga contiene muy otro valor del que prometía la caja, es decir, que las materias aquí tratadas no son tan descabelladas como el título por fuera insinuaba.

[...] Os conviene ser cautos para husmear, oler, y estimar estos buenos libros de alta enjundia, diligentes para darles caza y osados en su asalto. Así pues, mediante su curiosa lectura y frecuente meditación, romped el hueso y chupad el substantífico tuétano –eso es lo que pretendo daros a entender por medio de estos signos pitagóricos– con la esperanza cierta de que os volveréis sagaces y esforzados mediante dicha lectura.

[...] Ahora, queridos míos, ¡divertíos y leed el resto gayamente, para holganza del cuerpo y provecho de los riñones!”

Vivid Reíd

*“Amigos lectores que el libro leéis,
despojaos al punto de toda pasión,
y, al leerlo, nunca os escandalicéis,
porque no contiene ni mal ni infección.
Cierto es que aquí dentro muy poca instrucción
adquirir podríais, sino es el reír.
Más otro argumento no pude elegir,
viendo que os consume un duelo malsano.
Mejor que de llanto es de risa escribir,
Puesto que la risa es lo propio humano.”*

Pròleg de Gargantúa i Pantagruel. François Rabelais, sXVI.

1 Índex

1	Índex.....	1
2	Abreviatures.....	5
3	Introducció.....	13
3.1	La pell.....	15
3.1.1	Elements.....	15
3.1.1.1	Hipodermis:.....	16
3.1.1.2	Dermis:.....	16
3.1.1.3	Epidermis:.....	17
3.1.2	Processos de la pell.....	18
3.1.2.1	Cornificació:.....	18
3.1.2.2	Descamació:.....	22
3.1.2.3	Mort cel·lular a la pell.....	24
3.1.3	Apoptosi versus cornificació.....	25
3.1.4	Degradació del DNA en la pell.....	27
3.1.5	Sistema immunitari i pell: components cel·lulars.....	29
3.2	Patologies de la pell.....	31
3.2.1	Càncer de pell.....	31
3.2.1.1	Carcinomes de cèl·lula basal (BCC).....	32
3.2.1.2	Carcinomes de cèl·lula escamosa (SCC).....	32
3.2.2	Efectes de la radiació Ultravioleta (UV) en la pell.....	33
3.2.2.1	Mutagènesi.....	33
3.2.2.2	Inestabilitat cromosòmica.....	34
3.2.2.3	Fotoadaptació.....	37
3.2.3	Psoriasi.....	38
3.2.3.1	Característiques histològiques.....	39
3.2.3.2	Origen i progressió de la malaltia.....	41
3.2.3.3	Tractament.....	44
3.2.3.4	Models animals.....	44
3.3	L'exonucleasa TREX2.....	46
3.3.1	Propietats bioquímiques de TREX2.....	48
3.3.2	Funció de TREX2.....	50
3.3.3	Expressió.....	52
4	Objectius.....	55
5	Materials i mètodes.....	59
5.1	Mostres Humanes.....	61
5.1.1	TMA's (<i>Tissue Mycro Arrays</i>).....	61
5.1.2	Mostres de Psoriasi.....	61
5.2	Models animals.....	61
5.2.1	Estudi de la carcinogènesi induïda per la radiació UVB.....	62
5.2.2	Estudi dels efectes de la radiació UVB a curt termini.....	62

Índex

5.2.3	Tractament amb Imiquimod	63
5.2.4	Avaluació de la severitat de la inflamació induïda per Imiquimod.....	63
5.3	Histologia	64
5.3.1	Teixits en parafina	64
5.3.2	Teixits criopreservats	65
5.4	Tincions histològiques.....	65
5.4.1	Hematoxilina/Eosina (H/E)	65
5.4.2	Immunohistofluorescència (IHF)	65
5.4.3	Immunohistoquímica (IHQ)	66
5.5	Anàlisi en talls histològics	68
5.5.1	Quantificació de l'expressió de TREX2 en SCC	68
5.5.2	Quantificació de cèl·lules amb lesions al DNA	68
5.5.3	Quantificació del marcatge amb TUNEL de les pells irradiades amb UVB.....	68
5.5.4	Quantificació de les capes i gruix de l'epidermis.....	69
5.5.5	Quantificació d'infiltrats immunitaris en les pells irradiades amb UVB	70
5.5.6	Quantificació dels abscessos i les plaques de paraqueratosi en les pells tractades amb Imiquimod	70
5.6	Cultius cel·lulars.....	71
5.6.1	Cultius de la línia cel·lular HaCaT.....	71
5.6.2	Cultiu primari de queratinòcits humans	72
5.6.3	Cultiu primari de queratinòcits de ratolí.....	72
5.7	Experiments amb cèl·lules	73
5.7.1	Recompte cel·lular	73
5.7.2	Irradiació cel·lular	73
5.7.3	Expressió heteròloga de TREX2	74
5.7.4	Anàlisi de la formació de colònies	75
5.7.5	Anàlisi del cicle cel·lular.....	76
5.7.6	Anàlisi de l'apoptosi.....	76
5.7.7	Quantificació de la incorporació de Timidina tritiada no programada	77
5.7.8	Immunocitofluorescència (ICF)	78
5.7.9	Anàlisi dels micronuclis	80
5.8	Microscòpia i captació d'imatges.....	81
5.9	Anàlisi de proteïnes	81
5.9.1	Preparació d'extractes proteics.....	81
5.9.2	Quantificació de proteïnes.....	82
5.9.3	Immunoprecipitació i <i>pull-down</i>	82
5.9.4	Electroforèsi en gels d'acrilamida, transferència i Western blot.....	83
5.10	Anàlisi del RNA	85
5.10.1	Purificació de RNA i transcripció reversa (RT).....	85
5.10.2	Anàlisi de l'expressió gènica per PCR quantitativa (qPCR).....	86
5.11	Anàlisi estadístic.....	88
6	Resultats.....	89
6.1	Paper de TREX2 en la carcinogènesi de pell	91
6.1.1	L'expressió de TREX2 a la pell es regula per la radiació UVB i està alterada en les queratosis actíniques i els SCC	91

6.1.2	La deleció de <i>Trex2</i> augmenta la susceptibilitat a la tumorigènesi induïda per la radiació UVB.....	95
6.1.3	TREX2 promou l'eliminació del DNA danyat i l'apoptosi dels queratinòcits en la pell de ratolí irradiada amb UVB	99
6.1.4	La manca de TREX2 afecta la reparació del DNA i frena l'apoptosi dels queratinòcits irradiats amb UVB <i>in vitro</i>	103
6.1.5	TREX2 s'acumula en regions de cromatina poc condensada i en micronuclis.....	106
6.1.6	TREX2 es recluta en micronuclis amb DNA danyat, on interacciona amb la histona H2AX fosforilada	109
6.1.7	La pèrdua de TREX2 altera la resposta immunitària en la pell front la irradiació amb UVB.....	112
6.2	Paper de TREX2 en la PSORIASI	119
6.2.1	TREX2 es sobreexpressa en lesions psoriàsiques	119
6.2.2	La deficiència de TREX2 disminueix el fenotip psoriàtic induït per l'aplicació d'Imiquimod.....	122
6.2.3	El tractament amb Imiquimod provoca una expressió aberrant de TREX2.....	126
6.2.4	La deficiència de TREX2 disminueix el fenotip proinflamatori i la mort cel·lular induïts per l'Imiquimod.....	133
7	Discussió.....	137
7.1	Expressió de TREX2 en la pell	139
7.2	Mecanismes d'acció de TREX2: reparació vs degradació del DNA	142
7.3	TREX2 i γ H2AX	146
7.4	TREX2 i resposta immunitària.....	147
7.5	TREX2 i càncer	150
7.6	TREX2 i psoriasis	151
7.7	Models pel paper de TREX2 en la pell	153
8	Conclusions	157
9	Bibliografia	161

2 Abreviatures

6,4-PP	6,4-photoproducts
ABTS	2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid)
AIF	Apoptosi-inducing factor
AK	Actinic Keratosis
AP1	Activator Protein 1
APE	Human Apurinic/aprimidinic Endonuclease
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosine Triphosphate
ATR	Ataxia Telangiectasia Rad3-related
BCA	Bicinchoninic Acid
BCC	Basal Cell Carcinoma
BER	Base Excision Repair
CAD	Caspase Activated DNase
CAMP o LL37	Cathelicidin Antimicrobial Peptide
CCL	Chemokine (C-C motif) Ligand
CC-TT	Cytosines-Timidines
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copy-DNA
CLA	Cutaneous Lymphocyte Antigen
CMV	Citomegalovirus
CO ₂	Diòxid de Carboni
Co-IP	co-immunoprecipitació
Cp	Crossing points
CPD	Cyclobutane Pyrimidine Dimer
cSCC	cutaneous Squamous Cell Carcinoma
CTS	Cathepsines
CXCL10	C-X-C Motif Chemokine 10
Cyt-B	Cytochalasin-B
d8-pC	8 dies post-confluència
DAB	Diaminobenzidine
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DC	Dendritic Cell
DDR	DNA Damage Response
DEDD	DnaQ-like
DMBA	7,12-dimethyl benz(a)anthracene
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate
DSB	Double Strand Breaks
dsDNA	double strand DNA
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid

Abreviatures

EF-PPR	Error-Free Post-Replication Repair
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ES (cèl·lules)	Embrionic Stem Cells
EXO1	Exonuclease 1
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FASR	Fas Receptor
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF7	Fibroblast Grow Factor 7
FITC	Fluorescein IsoTioCyanate
GFP	Green Fluorescent Protein
GGR-NER	Global-Genomic Repair
γ H2AX	Phosphorylated H2AX
H/E	Hematoxilin/Eosin
H2AX	Histona 2AX
HAUS7	HAUS Augmin-Like Complex, Subunit 7
HH	Hedgehog
HLA	Human Leukocyte Antigen
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinomas
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HR	Homologous recombination
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSV1	Herpes Simplex Type 1
ICF	Immunocitofluorescència
IFI16	Gamma-interferon-inducible protein
IHF	Immunohistofluorèscencia
IHQ	Immunohistoquímica
I κ B- α	NF- κ -B Inhibitor α
IL	Interleukin
INF	Interferó
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
INV	Involucrin
IRF7	Interferon regulatory factor 7
K	Keratin
kDA	Kilodaltons
kJ	kilo Joule
KLK	Kalikreines
Km	Constant d'equilibri de Michaelis-Mentel
ko	Knock-Out
LEKT	Polyprotein lympho-epithelial kazal-type-related inhibitor
LEKTI	LEKT Inhibitor
Ly6g	lymphocyte antigen 6G

MBP	Maltose Binding Protein
μCi	Microcurie
mDC	Myeloid dendritic cell
ml	Mililitre
μl	Microlitre
mM	Milimolar
MMR	Mismatch Repair
MN	Micronuclis
MRE11	Meiotic Recombination 11
mRNA	messenger RNA
MSH2	MutS protein Homolog 2
MyD88	Myeloid Differentiation primary response 88
NAD ⁺	Nicotineamide Adenine Dinucleotide
NER	Nucleotide Excision Repair
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHEJ	Non-homologous end joining
NHEK	Normal Human Epidermal Keratinocytes
NK	Natural Killers
NKG2D	NK group 2, member D
NM23-H1	Nucleoside Diphosphate Kinase 1
NMSC	Non Melanoma Skin Cancer
OCT	Optimal Cutting Temperature
OHU	Hydroxyurea
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
PASI	Psoriasis Activity and Severity Index
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDC	Plasmacytoid dendritic cell
PK	Paraqueratosi
Pol	Polimerase
pre-C	Preconfluència
PRR	Pattern Recognition Receptors
PRR	Postreplication Repair
PS	Phosphatidyl-serine
PSA	PBS amb antibiòtic/antimicòtic
PSORS	Psoriasis Susceptibility
PVDF	Polyvinylidene fluoride
qPCR	quantitative PCR
RAD	DNA Repair Protein

Abreviatures

RAET1E	Retinoic Acid Early Transcript 1E
RIP Kinases	Receptor-Interacting Protein kinases
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	revoluciones per minut
RT	Reverse transcription
RT-PCR	Retrotranscription PCR
SC	Stratum Corneum
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Standard Error of the Mean
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPINK5	Serie Protease Inhibitor Kazal-type5
SSB	Single Strand Breaks
ssDNA	single strand DNA
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAK1	TGF β -activated Kinase 1
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	TBS-Tween
TCA	Trichloroacetic acid
TCR-NER	Transcriptional-Coupled Repair
TEWL	Trans-epidermal water loss
TG	Transglutaminases
TGF β	Transforming Growth Factor beta
Th	Lymphocyte T helper
TLR	Toll-Like Receptor
TMA _s	Tissue Micro Array
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPA	12-O-Tetradecanoylforbol-13-acetato
T-regs	Linfòcits T reguladors
TREX	Three prime repair exonuclease
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling
UCA	Urocanic acid
UV	Ultraviolet
UVA	Ultraviolet type A
UVB	Ultraviolet type B
UVC	Ultraviolet type C
VIH	Virus de la Immunodeficiència Humana
V _{max}	Velocitat màxima
WRN	Werner syndrome, RecQ helicase-like

Abreviatures

wt	Wild-type
YFP	Yellow Fluorescent Protein
Z-VAD-FMK	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone

3 Introducció

3.1 La pell

3.1.1 Elements

La superfície corporal dels animals terrestres està exposada a l'aire i a l'estrès mecànic, ambdós incompatibles amb presència de cèl·lules vives, en la interfase directa entre l'organisme i l'entorn. Mentre els artròpodes terrestres han desenvolupat un exosquelet que protegeix a les cèl·lules de sota de la dessecació i el dany mecànic, els tetràpodes terrestres utilitzen una capa de cèl·lules mortes i material extracel·lular dipositat com a barrera amb l'ambient.

En els humans, la pell és l'òrgan més gran del cos, amb una àrea total d'entre 1,5 i 2 m², i pot arribar a representar el 16% del pes corporal (Junqueira y Carneiro, 6a Ed. 2005). Participa en funcions crucials per la vida de l'organisme com evitar la pèrdua d'aigua per evaporació (dessecació); protegeix contra les agressions mecàniques o friccions; exerceix de barrera anatòmica impedit el lliure accés dels patògens del medi extern; dóna sensacions de tacte, pressió, fred, calor, vibració i dolor degut a la presència de multitud de terminals nerviosos i neuroreceptors; ajuda al manteniment de la temperatura corporal per mitjà de la suor i la vasodilatació de capil·lars sanguinis i ens protegeix de les radiacions solars.

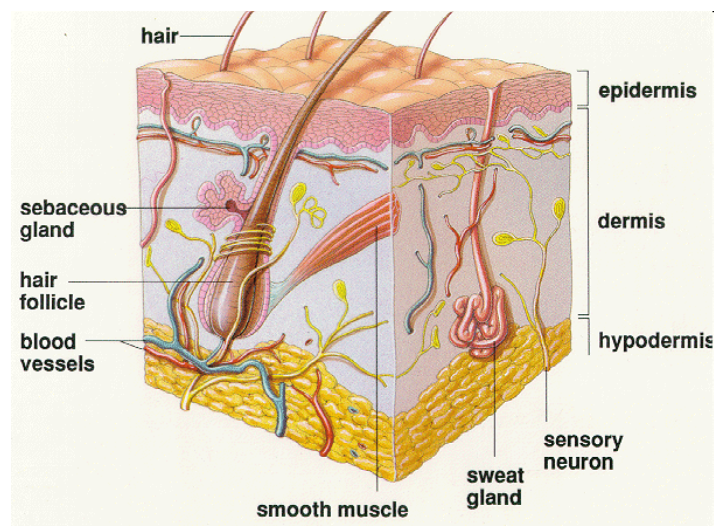


Figura II. Representació gràfica de les capes i estructures de la pell (Encyclopaedia Britannica Inc. 2006).

Introducció

La pell esta formada per dues capes: l'epidermis, d'origen ectodèrmic, i la dermis, d'origen mesodèrmic. Sota la dermis hi ha una altra capa, la hipodermis que no es considera part de la pell (Figura I1).

3.1.1.1 Hipodermis:

També s'anomena teixit subcutani, és una capa de teixit conjuntiu i adipós. La principal funció és adherir la pell i permetre'n el lliscament per les estructures internes com els ossos i els múscles. Donat la composició de teixit adipós confereix aïllament tèrmic.

3.1.1.2 Dermis:

És el teixit conjuntiu sobre el que descansa l'epidermis, esmorteix el cos de l'estrès mecànic i les tensions que ocorren a l'epidermis. Conté molts terminals nerviosos que permeten la sensació de temperatura i tacte, també és l'encarregada d'aportar nutrients a l'epidermis gràcies a la riquesa de vasos sanguinis i de retirar els metabòlits a través dels vasos limfàtics. A la dermis s'adhereixen les estructures annexes de la pell com són els pels, les ungles, les glàndules sudorípares i les glàndules sebàcies.

Es diferencien dues regions a la dermis:

Capa reticular, situada per sobre la hipodermis, està feta de teixit conjuntiu dens, rep el seu nom per l'elevada abundància de fibres de col·lagen, aquestes fibres són les que confereixen a la dermis les propietats elàstiques.

Capa papil·lar, just a sota de l'epidermis, més fina que la capa reticular. Formada per teixit conjuntiu lax. Ajuda a la síntesi de la làmina basal que separa la dermis de l'epidermis. És on hi ha la majoria de terminals dels capil·lars sanguinis i mecanoreceptors. S'anomena així per la presència de papil·les dèrmiques, prolongacions de la dermis que es projecten cap a l'epidermis però sense creuar la làmina basal, que permeten augmentar el contacte amb l'epidermis tant per assegurar-ne els nutrients com per adherir-la correctament.

3.1.1.3 Epidermis:

És la capa més externa i en contacte directe amb l'entorn. Constituïda principalment per queratinòcits que formen un epiteli pavimentós pluriestratificat. A més a més dels queratinòcits, l'epidermis conté altres tipus cel·lulars com melanòcits (contenen melanina), cèl·lules de Langerhans (amb funcions immunològiques) i cèl·lules de Merkel (mecanoreceptores) com es pot observar a la figura I2. L'epidermis esta composta per diferents capes que varien de grossor i estructura segons el lloc que estudiem, essent més gruixuda i complexa en les palmes dels peus i les mans.

Les capes de l'epidermis des de la més interna a la més externa són:

Estrat basal o germinatiu, compostat per queratinòcits mitòticament molt actius, que descansen sobre una làmina basal feta de material extracel·lular. És responsable de la constant renovació de l'epiteli. Es poden considerar les cèl·lules mare de l'epidermis, aquesta capa no sol tenir més d'una cèl·lula de gruix, donen lloc a les cèl·lules que migren cap amunt per formar l'estrat espinós. Es calcula que l'epidermis humana es renova cada 2-3 setmanes (Ovaere *et al.*, 2009)

Estrat espinós, s'anomena així perquè les cèl·lules tenen aparença espinosa, degut que s'han desenganxat de la làmina basal, la única adhesió que tenen és per mitjana de desmosomes entre les cèl·lules veïnes, això els confereix una forma estrellada. En aquesta capa és on els queratinòcits comencen el procés de diferenciació anomenat cornificació.

Estrat granulós, els queratinòcits d'aquesta capa comencen a sintetitzar elements estructurals i apareixen amb presència de grànuls al citoplasma que contenen queratohialina, que ajuda a unir els filaments intermedis del citoplasma de la cèl·lula. A més a més, els queratinòcits també excreten els cossos lamel·lars, estructures envoltades de membrana amb el contingut de lípids i proteïnes que ajudaran a formar l'estrat corni un cop alliberats a l'espai extracel·lular, i que confereixen a la pell les propietats de barrera impermeable. Alhora, les cèl·lules d'aquesta fase perden el nucli i els orgànuls cel·lulars fent que arribin a l'estrat corni com a cèl·lules mortes. Aquest procés de mort cel·lular no està encara del tot caracteritzat i no se'n coneixen tots els gens que hi tenen un paper determinant.

Introducció

Estrat lúcid, només present a la sola de peus i mans, és una fina capa de cèl·lules mortes.

Estrat corni, la més externa de les capes. Fet de queratinòcits plens de substàncies hidròfobes (queratina), sense nucli i morts. Aquestes cèl·lules (corneòcits) tenen uns desmosomes modificats, anomenats corneodesmosomes, que els confereixen més adhesió a les cèl·lules veïnes. Arribats a un punt, els corneodesmosomes seran destruïts per mitjà d'una cascada de proteòlisi i es desenganxaran en un procés que s'anomena descamació.

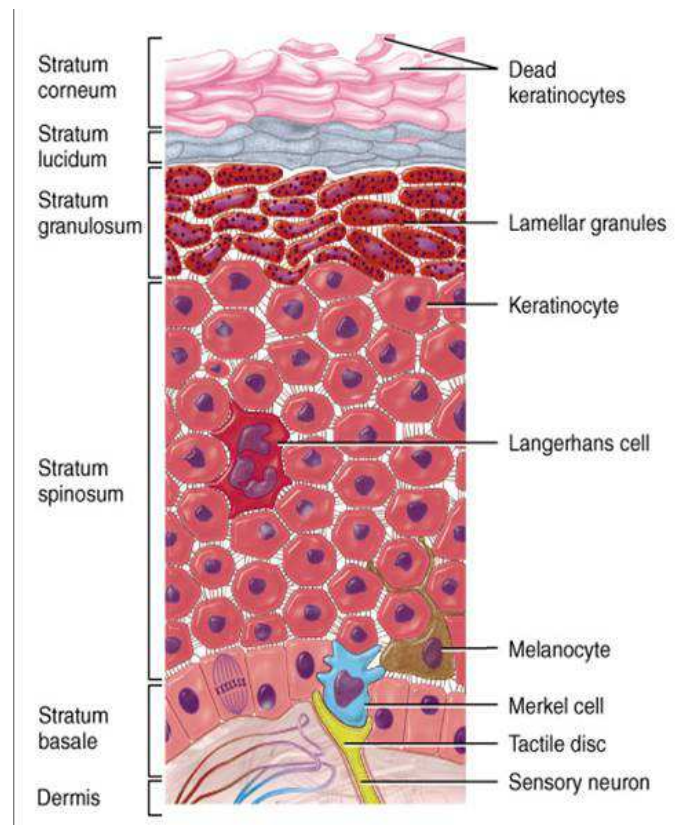


Figura I2. Representació gràfica de les diferents capes i tipus cel·lulars de l'epidermis.

3.1.2 Processos de la pell

3.1.2.1 Cornificació:

El procés de migració i diferenciació dels queratinòcits des de l'estrat basal a l'estrat corni s'anomena cornificació o queratinització. Proliferació, diferenciació i mort cel·lular ocorren seqüencialment. En condicions normals la constant proliferació de l'estrat basal està

contrarestada per la constant descamació de l'estat corni, així es rejuveneix constantment l'epidermis.

Les queratines K5 i K14 són les principals proteïnes estructurals dels queratinòcits basals, s'acoblen des dels desmosomes a la làmina nuclear formant els anomenats filaments intermedis, que juntament als microtúbuls i els filaments d'actina formen el citoesquelet (Figura I3). Una de les dues cèl·lules filles resultants de la mitosis, es desprèn de la làmina basal i emprendre el procés de cornificació, que comença amb la substitució de les K5 i K14 per K1 i K10. Les queratines es van substituint al llarg del procés de diferenciació i són un bon marcador per identificar les diferents capes de l'epidermis (Pan *et al.*, 2013).

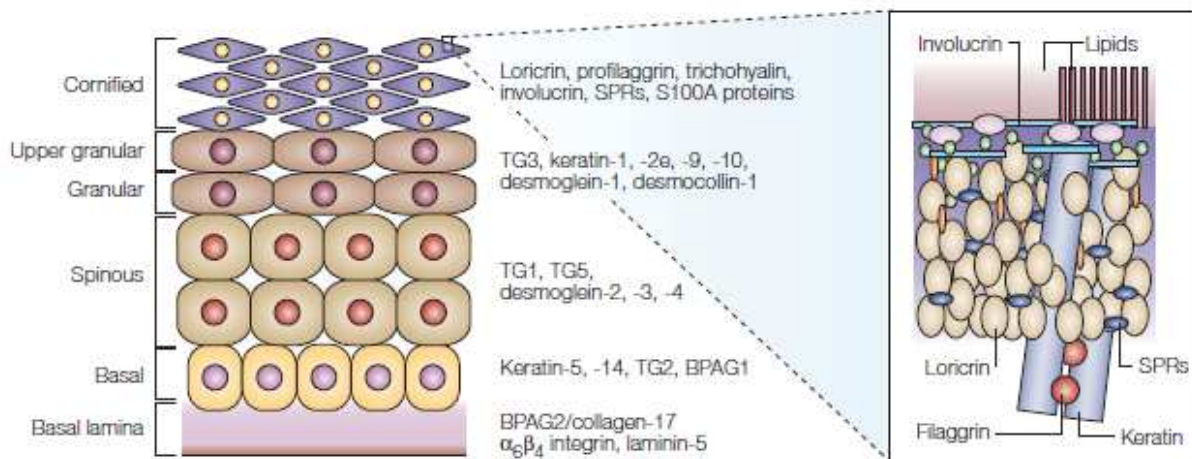


Figura I3. Esquema de les principals proteïnes diferencialment expressades en les diferents capes de l'epidermis. En el procés de transició de la làmina basal fins a l'estrat corni, els queratinòcits expressen diferents proteïnes en funció de l'estadi de diferenciació en que es troben. A nivell molecular, l'embolcall corni està format per proteïnes fortament unides per transglutaminasses i per lípids específics a la cara externa, per garantir les seves propietats físiques (Candi *et al.*, 2005).

D'especial rellevància és la síntesi de profilagrina, que s'acumula en els grànuls de queratohialina, en l'estrat granulós. La profilagrina és processada a filagrina per la caspasa 14 (Hoste *et al.*, 2011) i enforteix els filaments de queratina provocant el col·lapse de la cèl·lula i l'aspecte allargat i aixafat que presenten els corneòcits. Alhora s'expressen més proteïnes estructurals com la involucrina i la loricrina, que es van teixint unes amb les altres, gràcies a l'acció d'uns enzims anomenats transglutaminasses (TG), enfortint el citoesquelet just per sota de la membrana plasmàtica (Scharadin and Eckert, 2014).

Introducció

La característica resistència i insolubilitat de l'embolcall còrnic, es basa en la formació d'uns enllaços peptídics molt resistents, duts a terme per TG. A part de proteïnes estructurals per donar força al corneòcit també es sintetitzen molts lípids. Els corneòcits són bàsicament filaments intermedis immersos en xarxes de filagrina i rodejats de lípids, amb tots aquests elements fortament units per les TG (Figura I4).

Fases de la cornificació:

Fase d'iniciació, comença en l'estrat espinós amb la síntesi de proteïnes estructurals de l'estrat corni, i amb la síntesi i extrusió de certs lípids a l'espai intercel·lular.

Fase de reforç, en l'estrat granular, les TG uneixen covalentment lípids a la membranes i entrelliguen proteïnes (loricrin-SPR) i els desmosomes. Lípids i proteïnes dels cossos lamel·lars s'acomplexen i s'exposen en la cara exterior de la membrana, el DNA es degrada i els orgànuls es destrueixen.

Fase descamativa, en l'estrat corni, el corneòcit ja presenta una membrana completament diferent dels queratinòcits basals. Les TG segueixen afegint diferents substrats a la gran bastida que és la membrana citoplasmàtica, es degraden els corneodesmosomes per les kalikreïnes i el corneòcit es descama.

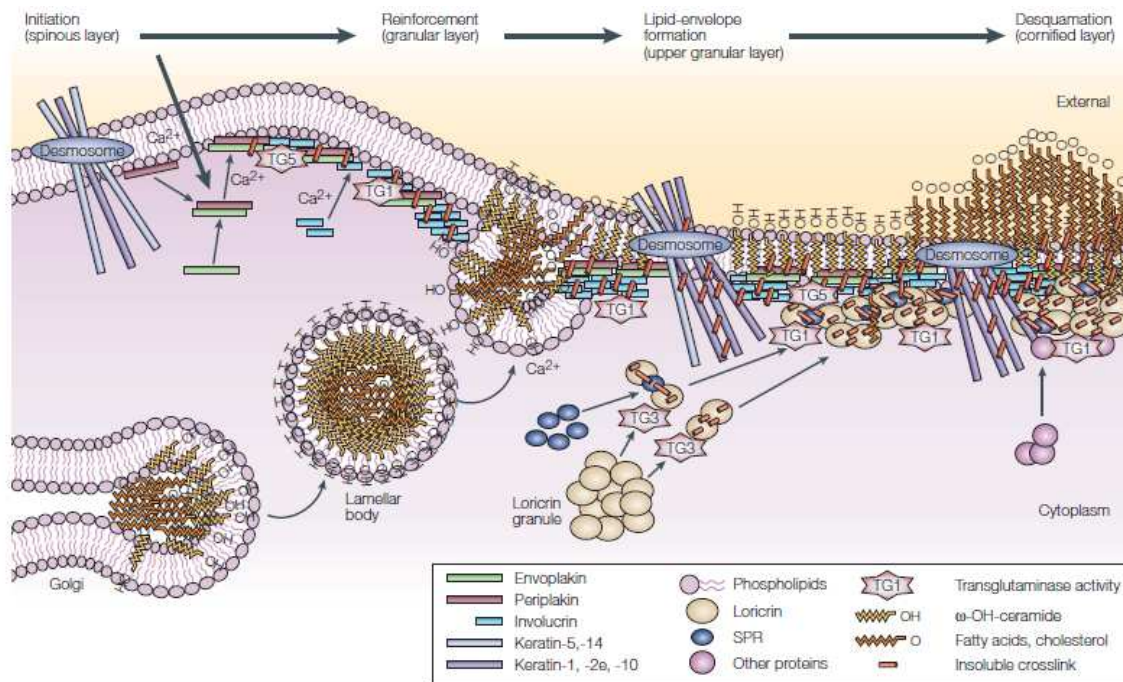


Figura I4. Representació de les fases de la formació de l'embolcall corni. Les propietats físiques de l'embolcall corni depenen de la natura dels substrats i de les unions, així com dels lípids dipositats (Candi *et al.*, 2005).

A més de la formació dels corneòcits, els queratinòcits es poden diferenciar a través de diferents programes i per diferents vies de cornificació originant diferents productes, com les ungles, els pèls, les papil·les filiformes de la llengua i inclòs els sebòcits que conformen la glàndula sebàcia accessòria al pèl.

Els pèls són miniòrgans amb múltiples funcions com la protecció, la regulació de temperatura, l'extensió del *sebum* i la suor per la pell, funcions tàctils o reparació de ferides. Podem separar l'epidermis en interfol·licular (entre fol·licles, majoritària en humans) i fol·licular (l'epidermis del fol·licle, majoritària en ratolins). Durant el procés de cornificació, els queratinòcits del pèl i les ungles pateixen unions més extensives del citoesquelet amb diferents proteïnes resultant en estructures molt més dures que l'estrat corni (Eckhart *et al.*, 2013). S'originen a partir d'unes cèl·lules mare que formen un fol·licle pilós que profunditza en la dermis. El fol·licle pilós està compost per la glàndula sebàcia, el múscul piloerector i el pèl en sí. Pateixen cicles de creixement (anagen), regressió per apoptosi (catagen) i quiescència (telogen) (Muller-Rover *et al.*, 2001) (Figura I5). En cada cicle es renova el pèl i el vell cau, en ratolins aquestes fases del

Introducció

creixement del pèl es donen de manera sincronitzada en tots els pèls del cos, fet que no passa en humans (Wagner *et al.*, 2010).

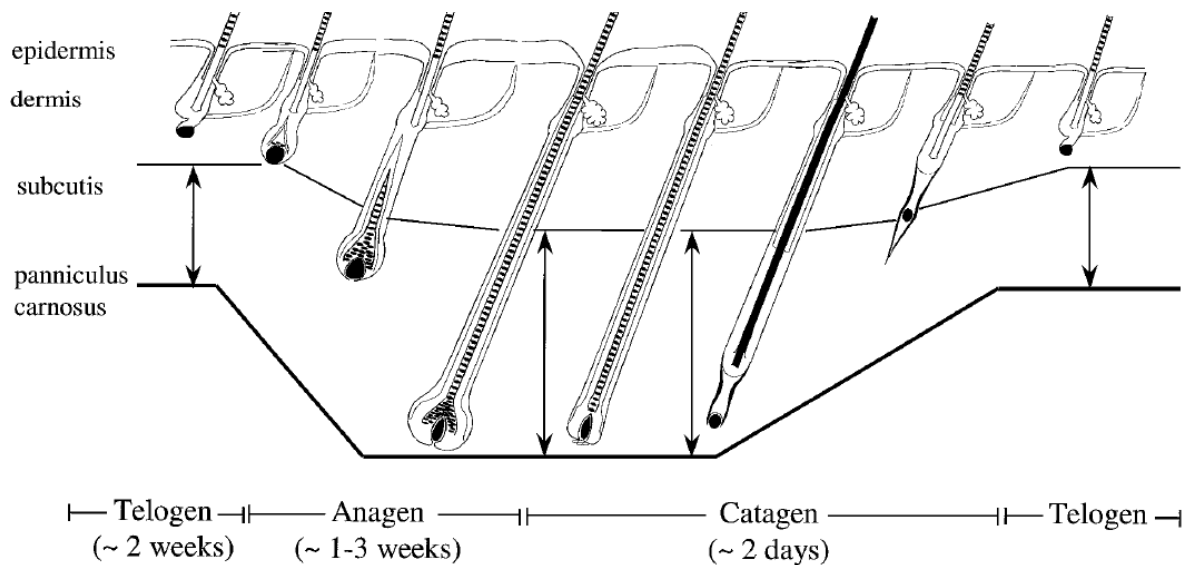


Figura 15. Esquema de l'augment i el descens de la longitud del fol·licle capil·lar durant les diferents fases del cicle de creixement del pèl. La durada aproximada de cada fase s'indica entre parèntesi (Muller-Rover *et al.*, 2001).

3.1.2.2 Descamació:

La integritat de l'estrat corni es manté per mitjà dels corneòcits units a corneodesmosomes (Naoe *et al.*, 2010). El seu gruix ve donat per la degradació controlada de les unions cèl·lula-cèl·lula. En la pell normal les cèl·lules de l'estrat corni estan unides tan sols per la perifèria gràcies als corneodesmosomes, un mal funcionament de la maquinària de descamació pot comportar patologies severes (Meyer-Hoffert and Schroder, 2011). Els corneodesmosomes són desmosomes modificats, aquesta modificació es produeix entre l'estrat granulos i l'estrat corni. La corneodesmosina és la responsable de la modificació, és produïda i emmagatzemada en els cossos lamel·lars i un cop excretada uneix covalentment els desmosomes entre dues cèl·lules (Ishida-Yamamoto *et al.*, 2011).

Les proteases extracel·lulars són les responsables de la descamació. Aquestes proteases (calicreïnes (KLK) i catepsines (CTS)) s'excreten com a proformes i s'activen al final d'una

cascada de proteòlisi. Les KLK s'excreten en l'estrat granulós junt als seus inhibidors LEKT (Polyprotein lympho-epithelial kazal-type-related inhibitor), que s'uneixen a les KLK, només a pH neutre, inhibint la funció proteasa. A mesura que el pH baixa en l'estrat corni, LEKT alliberen KLK i aquestes trenquen els corneodesmosomes fent possible el desprendiment de les cèl·lules (Ovaere *et al.*, 2009). Mutacions al gen que codifica per LEKT (SPINK5, Serine Protease Inhibitor Kazal-type 5) causen una excessiva descamació, en pacients amb el síndrome de Netherton (Walley *et al.*, 2001). A més a més, el ratolí *Spink5^{-/-}* mor al poc de néixer degut a una excessiva pèrdua d'aigua, pel mal funcionament de la barrera cutània (Yang *et al.*, 2004).

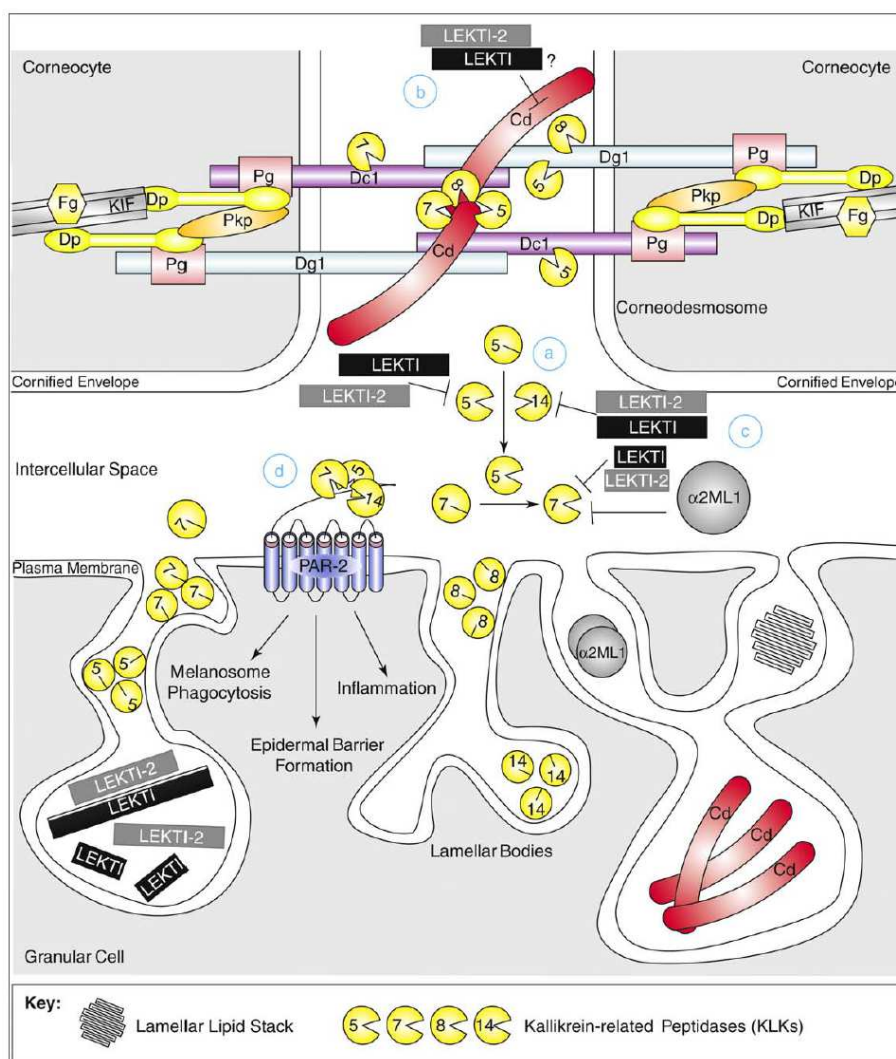


Figura I6. Model hipotètic sobre els mecanismes de descamació. Els cossos lamel·lars (LB) presents en les cèl·lules granulars s'aboquen a l'exterior de les cèl·lules. Els LB contenen material i enzims necessaris per la descamació (KLK), però també contenen els inhibidors de la descamació (LEKTI). Només quan es donen les condicions adequades, els inhibidors es desactiven i les KLK provoquen la descamació (Ovaere *et al.*, 2009).

3.1.2.3 Mort cel·lular a la pell

Diferents esdeveniments poden conduir a la mort cel·lular, ja sigui de forma programada o no programada. L'apoptosi és la via que inicialment és va identificar com a via de mort cel·lular programada. Es duu a terme per les caspases, unes proteases que s'activen de manera molt controlada i que digereixen elements crucials per la vida de la cèl·lula. Es pot dividir en extrínseca (quan arriben senyals externes de mort i s'activen receptors de membrana) i intrínseca (per senyals intracel·lulars d'estrès). L'apoptosi intrínseca pot ser dependent o independent de caspases.

La cornificació, com ja s'ha descrit, és la via de mort cel·lular programada que condueix a la diferenciació dels queratinòcits per la consecució de la barrera epidèrmica.

Posteriorment, s'ha establert que la necrosi, considerada com a mort accidental, també pot ocórrer de manera programada introduint el terme necroptosi. Aquesta via es orquestrada per les RIP kinases (Vanden Berghe *et al.*, 2014). El DNA alliberat durant la necrosi pot ser fagocitat per macròfags i també per les cèl·lules veïnes. La mort per necrosi és un potent inductor de la resposta immunitària (Pasparakis *et al.*, 2014).

La mort cel·lular per autofàgia és reconeixible per la massiva vacuolització del citoplasma de les cèl·lules, que en condicions d'estrès i manca de nutrients es digereixen a elles mateixes per evitar precisament la mort cel·lular. És una resposta protectora, activada per les cèl·lules moribundes per lluitar contra l'estrès, la seva inhibició accelera la mort cel·lular en comptes d'inhibir-la (Boya *et al.*, 2005).

L'anoikis, és l'apoptosi induïda per la pèrdua d'adhesió amb el substrat o les altres cèl·lules. El programa de mort cel·lular que s'engega per l'anoikis és executat per la maquinària de l'apoptosi intrínseca. En l'epidermis els queratinòcits tenen mecanismes per contrarestar-la.

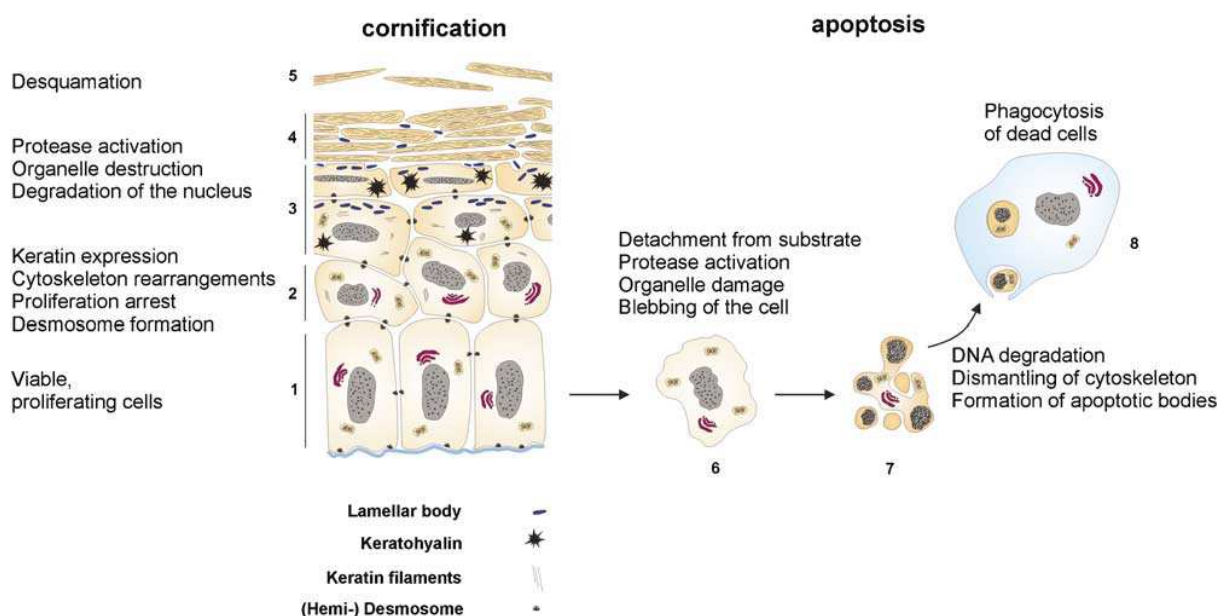
Per altra banda, la piroptosis, és un tipus de mort cel·lular dependent de la caspasa 1 i dona lloc a l'alliberació de les interleuquines IL1 β , IL1 α , i IL18. És una resposta de les cèl·lules per morir activant una resposta immunitària, sobretot quan han estat infectades per patògens.

Hi ha altres formes rares de mort cel·lular, com l'entosis, que va ser originalment descrita com "canibalisme cel·lular", consisteix en que una cèl·lula no fagocítica, engoleix una cèl·lula veïna, que roman aparentment normal en el citoplasma de l'altra fins que desapareix a conseqüència dels enzims hidrolítics dels lisosomes. O la parthanathos, que es dona per l'activació continuada de PARP1, consumint fins a depletar el NAD⁺ i conduint a la mort cel·lular per una via caspasa independent. La catàstrofe mitòtica, no és un mecanisme de mort en sí, és el procés pel qual es condueix a mort, ja sigui per apoptosi o per necrosis, i es dona quan falla la mitosis.

Els diferents tipus cel·lulars que componen la pell poden patir en algun moment algun dels processos de mort que s'han esmentat.

3.1.3 Apoptosi versus cornificació

Apoptosi i cornificació són processos que comporten la mort cel·lular de manera programada però per diferents camins o vies moleculars (Figura I7). Els components necessaris per l'apoptosi són presents en els queratinòcits, però aquesta és restringida a la capa basal, no a les superiors on ha començat la cornificació (Candi *et al.*, 2005; Galluzzi *et al.*, 2012).



Introducció

Figura 17. Canvis morfològics i bioquímics en els processos de cornificació i apoptosi (Lippens S, 2005). L'apoptosi és un procés relativament ràpid, es pot donar en poques hores, en comparació amb la cornificació, unes 2 setmanes. La diferenciació dels queratinòcits comença un cop es desenganxen de la làmina basal. La senyal per l'inici són les integrines B1 lliures. A la majoria de tipus cel·lulars, les integrines B1 lliures transduïxen senyals que activen l'apoptosi. Això és contrarestat pels queratinòcits amb una major expressió i transducció al nucli de NF-kB, un factor de transcripció anti-apoptòtic (Eckhart *et al.*, 2013).

L'apoptosi ocorre en cèl·lules individuals rodejades de cèl·lules viables. Les cèl·lules apoptòtiques poden ser reconegudes pels canvis morfològics que presenten, com arrodoniment, membrana arrugada com "bombollejant" i pèrdua d'adhesió al substrat. Aquests esdeveniments resulten de desmantellar el citoesquelet per l'acció de la caspasa 3. La cornificació ocorre en moltes làmines cel·lulars simultàniament, i no es perd l'adhesió focal. Els citoesquelets de les cèl·lules no tant sols no són desmantellats sinó que es modifiquen i lliguen de manera que les cèl·lules queden unides a les seves veïnes formant un tot. Durant la cornificació no s'activa la caspasa 3, ja que una degradació del citoesquelet seria deletèria (Lippens *et al.*, 2005).

Les caspases són les proteases indispensables per l'apoptosi, activades a través d'una cascada de proteòlisi. En l'epidermis no s'activen les caspases en el procés de diferenciació. Només la caspasa 14, que no participa en l'apoptosi, sembla jugar un paper en la cornificació. S'expressa gairebé només en la pell, en els queratinòcits que es diferencien i és crucial en la formació de la barrera epidèrmica proteolitzant la profilagrina a la forma activa, a la filagrina (Denecker *et al.*, 2007).

La destrucció del nucli ocorre en ambdós processos. En l'apoptosi el DNA es condensa i la DNasa activada per caspases (CAD) talla el DNA en fragments múltiples de 180pb, tret característic de l'apoptosi (DNA *laddering*). El nucli no és degradat del tot, ja que queda DNA dins els cossos apoptòtics. Per contra, durant el procés de cornificació no es condensa el DNA ni es degrada en fragments, però el DNA nuclear acaba desapareixent del tot. La DNasa o DNAases claus encara no s'han identificat (Eckhart *et al.*, 2012).

L'estadi final de l'apoptosi *in vivo*, és la fagocitosis dels cossos apoptòtics a càrrec dels macròfags. Receptors de la immunitat innata presents a la membrana dels macròfags reconeixen la *phosphatidyl-serine* (PS), exposada a la membrana de les cèl·lules apoptòtiques, i s'activa la

fagocitosis. A més a més, depenent dels nivells i durada de l'estímul es pot produir l'activació de diferents vies. El manteniment de la integritat de la membrana de les cèl·lules apoptòtiques evita una resposta immunitària exacerbada causada per l'activació d'altres receptors de la immunitat innata per part de components associats al dany cel·lular.

Alguns estudis mostren que la mort dels queratinòcits és un potent inductor de la inflamació en la pell (Cho *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). En el ratolí deficient per TAK1 (*TGFb-activated Kinase1*), que es requereix per l'activació de NF-kB, es dona una apoptosi augmentada i desenvolupen inflamació de la pell (Omori *et al.*, 2006).

En l'epidermis també hi ha cèl·lules dendrítiques (cèl·lules de Langerhans) però no fagociten els corneòcits. A més a més, hi ha controvèrsia sobre si els corneòcits expressen PS. En l'estadi final de la cornificació, les KLK s'activen i degraden els corneodesmosomes alliberant la cèl·lula de les seves veïnes caient al medi exterior (Lippens *et al.*, 2005; Proksch *et al.*, 2008; Eckhart *et al.*, 2013).

3.1.4 Degradació del DNA en la pell

La degradació del nucli dels queratinòcits durant el procés de diferenciació pot durar menys de 6 hores (Karasek, 1988). Aquesta degradació comporta talls en el DNA deixant extrems 3'-OH susceptibles de ser marcats amb TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*), però és molt difícil trobar marcatge per TUNEL a l'epidermis en condicions basals degut a la rapidesa del procés de degradació.

Existeixen altres processos que requereixen degradació del DNA, encara que sigui de manera limitada. Així en aquells llocs on es troben les lesions del DNA cal una certa digestió enzimàtica d'aquest DNA per poder dur a terme la reparació, igualment passa en processos com la recombinació (Barnes and Lindahl, 2004). Alguns dels enzims implicats en la degradació del DNA per una correcta reparació també poden estar implicats en la degradació del DNA durant la mort cel·lular i a l'inrevés (Zan *et al.*, 2011).

Introducció

Recentment, el DNA s'ha revelat com un inductor de resposta immunitària un cop alliberat al citoplasma (Hornung and Latz, 2010), tant si procedeix de patògens com si ve de l'hoste (Ishii and Akira, 2006). Fisiològicament el DNA intracel·lular està present al nucli o als mitocondris però no al citosol, on és reconegut com una senyal d'alarma i condueix a l'activació dels receptors de la immunitat innata per àcids nucleics, donant lloc a l'activació de l'inflamosoma i inducció de citokines proinflamatòries (Hornung *et al.*, 2009). S'han descrit varis tipus de sensors de DNA citoplàsmic, i un mal funcionament d'aquests comporta efectes patogènics. Alguns d'aquests sensors són crítics contra les infeccions víriques, per exemple IFI16 és essencial per controlar la replicació del Virus de la Immunodeficiència Humana (VIH). Per altra banda, una retirada insuficient de les estructures aberrants de DNA originades en cada replicació o provinents de retroelements, o un defecte en la degradació dels cossos apoptòtics en els lisosomes, comporta una acumulació de DNA al citoplasma i el desenvolupament d'autoimmunitat (Yoshida *et al.*, 2005; Stetson *et al.*, 2008).

En l'epidermis s'expressen diferents nucleases. Moltes d'elles presents en tots els tipus cel·lulars, com la CAD, que participa en l'apoptosi, o la DNasa2 encarregada de degradar el DNA fagocitat als lisosomes. Concretament, la deficiència d'aquest enzim provoca mort perinatal degut a una resposta autoimmunitària al DNA no degradat (Krieser *et al.*, 2002). A més a més, és la principal responsable de l'activitat nucleasa en l'epidermis (Fischer *et al.*, 2011a), encara que la seva absència en la pell no compromet l'eliminació del nucli durant la cornificació. Finalment, també hi ha nucleases que s'expressen exclusivament en l'epidermis, com la DNasa1L2 i TREX2 (Three-prime repair exonuclease 2) (Fischer *et al.*, 2007; Parra *et al.*, 2009).

La DNasa1L2 és una endonucleasa que s'expressa específicament als queratinòcits, principalment en els més diferenciats. S'ha descrit que el *knockdown* de la DNase1L2 a cultius *in vitro* de pell bloqueja l'enucleació dels corneòcits, generant paraqueratosi (Fischer *et al.*, 2007). Ara bé, el ratolí deficient per DNase1L2 és viable i fèrtil però només presenta romanents nuclears en les corneòcits de les ungles, els cabells, l'esòfag, les escames de la cua i la llengua. Per tant, altres nucleases participen *in vivo* en l'enucleació dels queratinòcits durant la cornificació en la pell (Fischer *et al.*, 2011b).

3.1.5 Sistema immunitari i pell: components cel·lulars

La pell forma una barrera activa que és el primer front immunològic de defensa contra infeccions. Cal una bona entesa entre les cèl·lules de l'epiteli, les de l'estroma i les del sistema immunitari per orquestrar una defensa efectiva de l'hoste i per mantenir o restaurar la homeòstasi tissular. Pràcticament tots els tipus cel·lulars dels sistema immunitari es troben a la pell, incloent subpoblacions específiques d'aquest teixit (Pasparakis *et al.*, 2014).

Les cèl·lules de Langerhans són les cèl·lules dendrítiques mieloides (mDC) de l'epidermis. Són cèl·lules presentadores d'antigen i desenvolupen gran varietat de funcions, des de promoure respostes immunitàries de limfòcits T CD8 (Romano *et al.*, 2012), a la expansió de Tregs (Seneschal *et al.*, 2012), fet que suggereix un paper en l'homeòstasi tissular d'aquestes cèl·lules. En la dermis trobem diferents subtipus de mDC, amb funcions proinflamàtores o antiinflamàtores. Així, diferents tipus d'inflamació de la pell es caracteritzen per la presència de diferents poblacions de mDC (Chu *et al.*, 2012). Les mDC es recluten a la pell quan hi ha processos d'inflamació. Les DC plasmacitoides (pDC) són mediadors importants de la resposta antivírica per la seva capacitat de produir grans quantitats de IFN de tipus 1 (IFN α /IFN β) (Gilliet *et al.*, 2008). Són especialistes en el reconeixement d'àcids nucleics tant exògens com endògens a través de l'elevada expressió dels receptors de la immunitat innata TLR7 i TLR9.

A part dels macròfags residents, els monòcits circulants també van a la pell per donar suport a les DC, en les funcions de vigilància i transport d'antígens cap als nòduls limfàtics. Els macròfags poden contribuir a la inflamació de la pell mitjançant l'alliberació de citoquines com IL12, però també ajuden en la resolució excretant IL10 i TGF β (Egawa *et al.*, 2013).

Els mastòcits contenen grànuls preformats en el seu citoplasma, que un cop en contacte amb l'antigen, són ràpidament excretats. Aquests grànuls alliberen mediadors proinflamatoris i molècules de reclutament dels limfòcits.

Els limfòcits T de memòria residents a la pell expressen CLA (*cutaneous lymphocyte antigen*). El receptor CLA, permet a aquests limfòcits ser reclutats a la pell gràcies a la E-selectina

Introducció

expressada en els vasos cutanis (Clark, 2010). Són necessaris i suficients per crear una resposta inflamatòria a la pell en absència de limfòcits T recirculants, canviant el concepte que els limfòcits T perifèrics extravassants són els principals efectors de la resposta immunitària a la pell. De fet, el nombre de limfòcits T residents a la pell és el doble dels circulants (Clark *et al.*, 2006). S'encarreguen de la defensa contra virus i patògens i de la vigilància dels tumors. Els limfòcits T $\gamma\delta$ són residents a la pell i són essencials en la protecció contra tumors, a través del receptor NKG2D (Natural Killer group2, member D) i les citocines IFN γ i IL17 (Silva-Santos, 2010). A més a més, juguen un paper clau en l'homeòstasi i la reparació tissular mitjançant l'expressió de FGF7 (*Fibroblast Grow Factor 7*) que promou la supervivència dels queratinòcits (Witherden and Havran, 2013).

Es coneix ben poc sobre els mecanismes i funcions dels limfòcits B en la pell. Les NK (*Natural Killers*), que indueixen l'apoptosi de cèl·lules infectades per virus o amb un fenotip tumoral, són també presents en la pell. Un altre component de la resposta immunitària en la pell, són els comensals residents. La superfície de la pell està colonitzada per comunitats de microorganismes que interaccionen amb l'epiteli i les cèl·lules immunitàries i que contribueix a l'homeòstasi del teixit. El microbioma de la pell ens protegeix de la infecció d'altres patògens per competència directa dels recursos i la fina regulació de l'activació del sistema immunitari (Findley *et al.*, 2013).

Degut a la seva posició estratègica, els queratinòcits reben senyals de l'ambient i les transmeten a les cèl·lules immunitàries de la pell. De fet, els queratinòcits són crucials en la regulació de l'homeòstasi i la inflamació de la pell. Aquesta comunicació es dona per l'expressió de diversos receptors de la immunitat innata (PRR, *pattern recognition receptors*), de citocines i de quimiocines. Els queratinòcits són membres actius de les respostes immunitàries innates i adaptatives. Per exemple, en resposta al dany epidèrmic els queratinòcits produeixen CCL20 que atrau cèl·lules dendrítiques mieloides CD11c + i limfòcits T productors de la IL17 als llocs de lesió (Kennedy-Crispin *et al.*, 2012). Al mateix torn, una infecció desencadena la secreció de citocines com el TNF α i IFN γ per part de les cèl·lules de la immunitat innata. El TNF α promou la síntesi de CCL20 en els queratinòcits, i l'IFN γ la síntesi de CXCL10 (recluta Th1) i Mx-1, un enzim antivíric dels queratinòcits (Nogales *et al.*, 2008).

3.2 Patologies de la pell

La pell doncs, és un òrgan complex, amb multitud de processos cel·lulars implicats en el seu correcte funcionament, englobant des de la constant proliferació de les cèl·lules mare de la làmina basal encarregades del renovament de l'epidermis fins a la diferenciació de les seves cèl·lules per tal d'assolir una barrera funcional. Un desequilibri que afecti la delicada homeòstasi pot provocar trastorns tan diversos com arrugues, pèrdua del pèl, ampolles, càncers i trastorns de la regulació immunitària potencialment mortals. Per exemple, l'exposició crònica a la llum solar accelera l'envelliment cutani, esmorteint les respostes immunitàries front a antígens externs i afavorint les neoplàsies. Les malalties de la pell són molt freqüents i afecten un terç de la població dels Estats Units a l'any (Taylor, 2003).

El contacte de la pell amb el medi extern fa que quedi exposada a agents ambientals que danyen els seus components. Algun d'aquests agents externs són químics que causen carcinogènesi a la pell. La carcinogènesi comprèn dues fases, la iniciació, en que la cèl·lula entra en contacte amb l'agent perjudicial i aquest causa un dany permanent al DNA (mutacions); i la promoció, la cèl·lula iniciada entra en contacte amb el mateix agent o un altre que li intensifica la proliferació, per sí sols els agents promotors no són carcinogènics. A més d'estar exposada als errors propis de les polimerases, que introdueixen mutacions, i a agents químics ambientals, la pell també està exposada a agents físics com la UVB, agent natural altament carcinogènic.

Una de les tasques crítiques de la pell és assegurar que el balanç entre la defensa activa i els mecanismes tolerogènics sigui l'adequat per mantenir la homeòstasi activant el sistema immunitari contra patògens però evitant respostes innecessàries contra autoantígens o microorganismes i químics ambientals innocus. El trencament de la tolerància a lo propi i la fallada dels mecanismes de regulació poden contribuir al desenvolupament de malalties inflamatòries de la pell, com la psoriasi (Di Meglio *et al.*, 2011).

3.2.1 Càncer de pell

El càncer de pell es el càncer més freqüent de tots, arribant a ser el 50% dels càncers que es diagnostiquen als Estats Units. Es pot dividir en melanomes (els que tenen major mortalitat) i

Introducció

NMSC (*Non Melanoma Skin Cancer*) que engloben els carcinomes de cèl·lula basal (BCC) que són el 80% dels NMSC i els carcinomes de cèl·lula escamosa (SCC) que són el 20% restant (Rubin *et al.*, 2005).

3.2.1.1 Carcinomes de cèl·lula basal (BCC)

Es creu que els BCC són originats per cèl·lules pluripotents de la capa basal de l'epidermis. La incidència augmenta amb l'edat i és major entre caucàsics que africans així com també preval més en homes que en dones. Es donen sobretot en àrees de la pell exposades al sol. La localització geogràfica també és important, ja que Austràlia presenta la major incidència mundial. Una activació inapropiada de la via de Hedgehog (HH) es troba esporàdicament en casos aïllats i en casos de BCC familiars, tant mateix p53 es troba mutat en un 50% dels BCC esporàdics, la majoria de les mutacions són transicions de CC-TT, mutacions signatura d'exposició a la radiació UVB (Rubin *et al.*, 2005).

3.2.1.2 Carcinomes de cèl·lula escamosa (SCC)

Els SCC provenen de queratinòcits de la capa espinosa de l'epidermis. El tipus més comú presenta queratinòcits atípics envaint la dermis, amb la formació de perles de queratina i ponts intercel·lulars. Aquests tumors es poden separar en ben diferenciats, moderadament i poc diferenciats (Gurudutt and Genden, 2011). Ocorren en àrees lesionades per la radiació UV, la majoria de cops en orelles, nas i cap. Apareixen com pàpules eritematoses, plaques o úlceres que no curen. La queratosis actínica (AK) és la lesió precursora dels SCC. Aproximadament un el 2-10% de AK no tractades avancen a SCC, i el 60% de SCC comencen com a AK (Alam and Ratner, 2001).

Aquests càncers tenen el potencial per esdevenir metastàtics i és important tractar-los adequadament per mitjà de l'extirpació quirúrgica o la crioteràpia, encara que també s'utilitzen cremes amb Fluorouracil (que atura la síntesi del DNA) o Imiquimod (que estimula el sistema immunitari). En el cas dels BCC s'han utilitzat amb èxit molècules inhibidores de la via de Hedgehog (Von Hoff *et al.*, 2009).

3.2.2 Efectes de la radiació Ultravioleta (UV) en la pell

La llum UV és el principal agent causal dels càncers de pell. Els efectes nocius de la llum UV, les lesions directes al DNA, estrès oxidatiu i inflamació junt amb immunosupressió, són els principals responsables de l'envelliment i el càncer de pell (Brash *et al.*, 1991; Narayanan *et al.*, 2010).

La radiació UV actua tant d'iniciadora com de promotora de la carcinogènesi. En la fase d'iniciació, el DNA pateix mutacions que inactiven supressors tumorals o que activen oncogens, i en la de promoció les cèl·lules pateixen subseqüents canvis bioquímics degut, entre d'altres factors, a l'augment de ROS que resulten en les lesions premalignes (Elmets and Athar, 2013).

3.2.2.1 Mutagènesi

La llum UV és la radiació electromagnètica provenint del sol, amb una longitud d'ona d'entre 100 i 400 nm. En funció dels espectres, la podem dividir en:

UVC, de 100 a 280 nm, és molt energètica i provoca greus lesions en les molècules dels organismes, per això s'anomena llum germicida. No arriba a la superfície terrestre degut que és absorbida per la capa d'ozó.

UVB, de 280 a 315 nm, la major part és absorbida per la capa d'ozó, però una part sí que arriba, i és la principal responsable dels càncers de pell.

UVA, de 315 a 400nm, no és absorbida per la capa d'ozó. La radiació UV té efectes beneficiosos molt importants en l'organisme, i té un paper rellevant en la formació de la vitamina D a partir de 7-dehydrocholesterol (Holick, 2007). Però també té molts efectes perjudicials sobre la pell, com són les cremades solars, inflamació, efecte mutagènic i immunosupressió.

La radiació UV lesiona directament macromolècules de la pell com proteïnes, lípids i DNA. Quan les lesions al DNA es donen en gens claus de les vies de l'apoptosi, el cicle cel·lular o la

Introducció

reparació del dany genètic, poden originar càncer (Schulman and Fisher, 2009; Fisher and James, 2010). La major part dels efectes tòxics de la llum UV són deguts a la radiació UVB, tot i que recentment la radiació UVA s'ha descrit que pot ser un factor important en els càncers de pell sobretot per la generació de radicals lliures al DNA (Greinert *et al.*, 2012). A part, les llums UV A, B i C danyen les fibres de col·lagen i provoquen l'envelliment de la pell (Matsuda *et al.*, 2013).

El DNA és una de les principals molècules que absorbeix la radiació UVB. La irradiació activa una reacció que normalment ocorre entre pirimidines adjacents, unint-les covalentment de manera aberrant, i genera els fotoproductes CPD (*Cyclobutane Pyrimidine Dímer*) i 6,4-PP (6,4 *photoproducts*). Els mamífers han desenvolupat mecanismes per reparar aquests dímers de pirimidines, el NER (*Nucleotide Excision Repair*) és una via de reparació amb diferents proteïnes implicades. Les lesions no reparades poden conduir a l'apoptosi, o be conduir a mutacions i la posterior activació d'oncogens (Chen *et al.*, 2014). Mutacions en algun dels enzims de la via de NER causen extrema sensibilitat a la llum solar i augmentada incidència de càncers de pell (Iyama and Wilson, 2013). Els fotoproductes interfereixen amb la replicació del DNA si no són reparats i causen mutacions específiques del DNA. Les mutacions específiques més freqüents causades per la UVB són substitucions de C (Citosina) per T (Timina) o substitució de CC per TT en les seqüències dipirimidíniques, que apareixen com mutacions signatura de la UV en molts càncers de pell (Wikonkal and Brash, 1999). La llum UVB causa també trencaments dobles de la cadena del DNA (DSB, Double Strand Breaks) i la UVA trencaments simples (SSB, Single Strand Breaks) (Svobodova *et al.*, 2012).

3.2.2.2 Inestabilitat cromosòmica

Les fotolesions del DNA provoquen DSB quan la seqüència de DNA s'intenta transcriure o replicar per les polimerases (Aguilera and Gomez-Gonzalez, 2008). Els DSB, són detectats per les proteïnes ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) i ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related*) que "pentinen" el DNA en busca d'aquestes lesions i fosforilen la serina c-4 de la histona H2AX (γ H2AX) dels nucleosomes adjacents al DSB (Burma *et al.*, 2001).

La histona H2AX, és un membre de la família de la histona H2A, una de les 5 unitats que conformen el nucleosoma que empaqueta el DNA en cromatina (H2A, H2B, H3, H4 i H1). En un 10% dels nucleosomes H2AX substitueix a la H2A, incorporant-se aleatòriament al llarg del genoma. La fosforilació de múltiples H2AX des del punt de DSB, actua com a plataforma de reclutament per múltiples enzims encarregats de la resposta al dany al DNA (DDR, *DNA Damage Response*), que s'encarregaran de reparar el trencament. Existeixen múltiples situacions que desencadenen en la formació de DSB i γ H2AX, com ara l'acció de la radiació ionitzant o els ROS, però també es dona en situacions fisiològiques com en la meiosi, integració de retrovirus, desenvolupament de les cèl·lules immunitàries o l'apoptosi. La H2AX es pot fosforilar per altres lesions del DNA a banda dels DSB, com ara els SSB produïts per la UV, com a conseqüència de l'actuació dels enzims de reparació del NER (Marti *et al.*, 2006). Així, pocs minuts després de la formació d'un DSB, es fosforilen les H2AX adjacents, esdevenint la γ H2AX un marcador excel·lent del grau de lesió del DNA d'una cèl·lula (Bonner *et al.*, 2008).

Els DSB que no aconsegueixen ser reparats correctament, donen lloc a material genètic acèntric, que en la següent divisió no podrà ser arrossegat a un dels dos pols del fus mitòtic durant l'anafase. Aquest material genètic "nàufrag", és embolcallat de membrana nuclear i resta en forma de micronucli en el citoplasma d'una de les dues cèl·lules filles (Figura I8). Si hi ha problemes en la formació del fus o en les proteïnes del centrosoma, els micronuclis poden contenir cromosomes sencers (Fenech *et al.*, 2011).

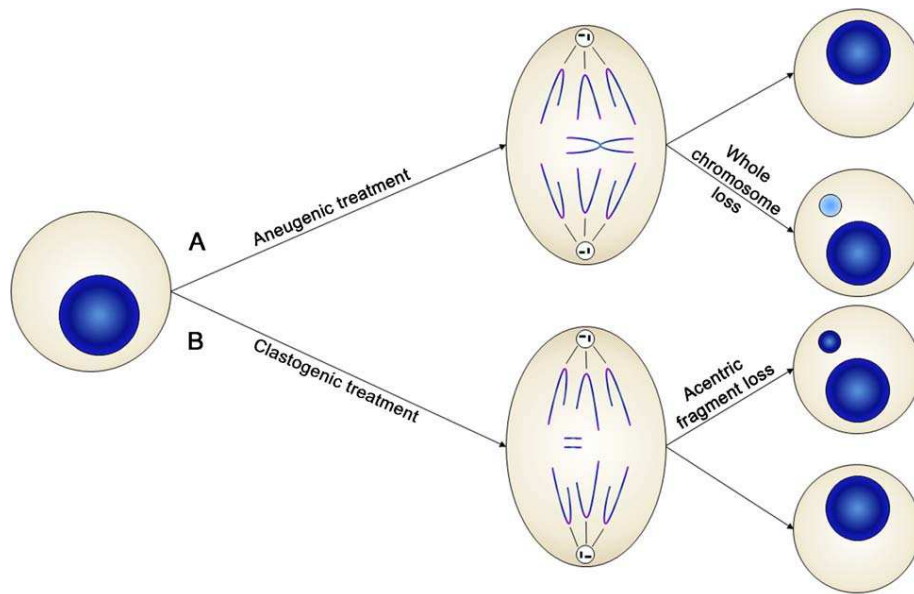


Figura 18. Mecanismes de formació dels micronuclis per (A) tractaments aneugènics, que malmeten la formació del fus mitòtic o (B) tractaments clastogènics, que causen DSB al DNA (Terradas *et al.*, 2010).

Els micronuclis poden ser expulsats del citoplasma de la cèl·lula (comporta pèrdua de material genètic), poden ser reincorporats al DNA del nucli en la següent divisió un cop desapareixen les membranes nuclears (pot comportar activació d'oncogens) o poden ser mantinguts al llarg del temps al citoplasma de la cèl·lula (Leach and Jackson-Cook, 2004). Existeix una gran controvèrsia sobre si el material genètic dels micronuclis és mitòticament i transcripcionalment actiu. Se sap que la funcionalitat de cada micronucli depèn sobretot dels elements que conformen la membrana nuclear, així els micronuclis molt petits no tindran complexos del porus nuclear i no podran importar proteïnes del citoplasma. Alguns autors troben que els micronuclis de cromosomes sencers es comporten com els nuclis, i que el DNA es replica originant cèl·lules filles sense anomalies (Huang *et al.*, 2012). Altres autors han descrit una replicació ineficient i asincrònica amb la del nucli, i com a conseqüència un creixent dany al DNA amb aparició de γ H2AX, que no es pot reparar per defectes en la DDR en el micronucli (Crasta *et al.*, 2012). La llum UV, generant directa o indirectament DSB és un agent inductor de micronuclis i d'instabilitat cromosòmica (Wischermann *et al.*, 2008).

3.2.2.3 Fotoadaptació

Els humans i els ratolins tenen la capacitat de fotoadaptar-se, que vol dir, desencadenar una menor resposta a futures irradiacions d'intensitat similar. Els mecanismes inclouen la pigmentació, la hiperplàsia epidèrmica i la hiperqueratosi de l'estrat corni, disminuint així la quantitat de radiació UV que arriba a les capes basals i la probabilitat d'inducció de carcinogènesi. A més a més, una contribució significativa en la fotoadaptació és l'augment de l'activitat de les vies de reparació del DNA (Norval *et al.*, 2007).

Després de la irradiació UV les cèl·lules de la pell mostren lesions CPD, sobretot en les capes més distals, i en menor grau a les capes basals. S'estabilitza p53, i s'expressa p21, que atura el cicle cel·lular per permetre la reparació del dany abans que la cèl·lula es divideixi. També augmenten els queratinòcits apoptòtics (*sunburned cells*) que no han pogut reparar el seu dany al DNA. Al mateix temps augmenta l'expressió d'enzims de reparació del DNA com MSH2 (*MutS protein homolog 2*) i s'observa un creixent infiltrat de cèl·lules immunitàries a la dermis, però no a l'epidermis (Lu *et al.*, 1999). La irradiació de la pell en absència d'antigen dispara una reacció inflamatòria estèril on es dona la síntesi de diferents citoquines proinflamatòries per part dels queratinòcits, com TNF α i IL6 (Paz *et al.*, 2008). L'epidermis pateix una hiperplàsia regenerativa que proporciona un engruiximent protector i un recanvi de les cèl·lules danyades 48h després de la irradiació (Lange *et al.*, 2013).

A banda del DNA, hi ha altres cromòfors en l'epidermis que absorbeixen els fotons de la radiació UVB, com el triptòfan, lípids de membrana, el 7-dehydrocholesterol o l'àcid trans-urocànic (UCA) en l'estrat corni. L'absorció de l'energia de la radiació UV genera canvis químics a la estructura d'aquests cromòfors que desemboquen en múltiples respostes, com l'excreció de diferents mediadors pro- i antiinflamatoris. La radiació UV transforma el trans-UCA a cis-UCA i aquest actua com a immunosupressor mitjançant l'activació de limfòcits Treg (Beissert and Schwarz, 1999).

La radiació UV també causa canvis a cèl·lules, com per exemple les cèl·lules de Langerhans, que en condicions normals capten antígens i drenen al gangli per presentar-los als limfòcits circulants activant la resposta immunitària contra patògens. Les cèl·lules de Langerhans amb

Introducció

dany al DNA que arriben al gangli presenten els antígens de manera defectuosa provocant l'activació de cèl·lules NKT que excreten IL4 com a mecanisme d'immunosupressió (Fukunaga *et al.*, 2010).

La radiació UV provoca una immunosupressió, reduint l'activació dels limfòcits T efectors i de memòria i la generació de limfòcits T i B reguladors, que contribueixen a suprimir la immunitat cel·lular. Així doncs la radiació UV afavoreix l'expansió de cèl·lules tumorals directament, provocant mutacions al DNA, i indirectament, alterant el sistema immunitari. Ara bé, s'ha vist que pot ser utilitzada com a teràpia pel tractament de malalties autoimmunitàries com la psoriasi (Halliday *et al.*, 2012) o l'esclerosi múltiple (Becklund *et al.*, 2010).

3.2.3 Psoriasi

La psoriasi és una de les malalties de la pell més comú, la pateix al voltant del 2% de la població. Existeixen diferents variants de psoriasi, com la *Psoriasi guttate*, la *Psoriasi inversa* o la pustular, la més comú però (85-90% dels casos) és la *Psoriasi vulgaris*. Encara que pot aparèixer en la infància, sovint apareix al principi de l'edat adulta i generalment persisteix de per vida. Consisteix en una inflamació crònica recurrent de la pell que origina lesions vermelloses amb plaques ben delimitades de múltiples esquames blanquinoses que es desprenen fàcilment. Aquestes plaques s'originen preferencialment en genolls, colzes, cap, tronc i esquena, encara que també poden afectar grans superfícies de pell (Figura I9) (Lowe *et al.*, 2007).



Figura I9. Lesió en forma de placa al colze d'un pacient, característica de la malaltia de la psoriasi (Perera *et al.*, 2012)

La superfície afectada és molt diferent entre pacients i determina el grau de severitat de la malaltia. Els aspectes clínics es poden quantificar de manera subjectiva per part del dermatòleg mitjançant l'índex de puntuació PASI (*Psoriasis Activity and Severity Index*). Aquesta eina

avalua la severitat per mitjà del grau d'envermelliment, el gruix i la descamació de les plaques i és útil per monitoritzar els efectes del tractament en els pacients. En un 25% de pacients psoriàsics es pot induir una lesió psoriàsica a través d'un trauma en la pell no afectada, el que s'anomena efecte Kobner (Weiss *et al.*, 2002).

3.2.3.1 Característiques histològiques

La psoriasi té una aparença molt definida histològicament (Figura I10). Hi ha un engruiximent evident de l'epidermis degut a la descontrolada proliferació dels queratinòcits (*acanthosis*) i l'elongació de les papil·les dèrmiques (on es dona una angiogènesi aberrant degut a l'ambient citoquínic i a les necessitats energètiques dels queratinòcits en divisió descontrolada). La dilatació marcada d'aquests capil·lars causa l'envermelliment de les lesions psoriàsiques. La diferenciació dels queratinòcits queda profundament afectada, la capa granular (on comença la diferenciació terminal) queda molt reduïda o absent en les lesions, així l'estrat corni es forma de queratinòcits mal diferenciats que retenen de manera aberrant el nucli (paraqueratosi) i resulta un estrat corni engruixit (hiperqueratosi). La descamació aberrant i el trencament de la barrera epidèrmica són fruit de la fallada dels queratinòcits a la hora d'adherir-se uns als altres adequadament. Un altre canvi histològic definitori és l'infiltrat de cèl·lules immunitàries, amb presència de neutròfils en l'estrat corni formant microabscessos, cèl·lules mononuclears intraepidèrmiques, i limfòcits T i DC en la dermis (Lowes *et al.*, 2014).

Introducció

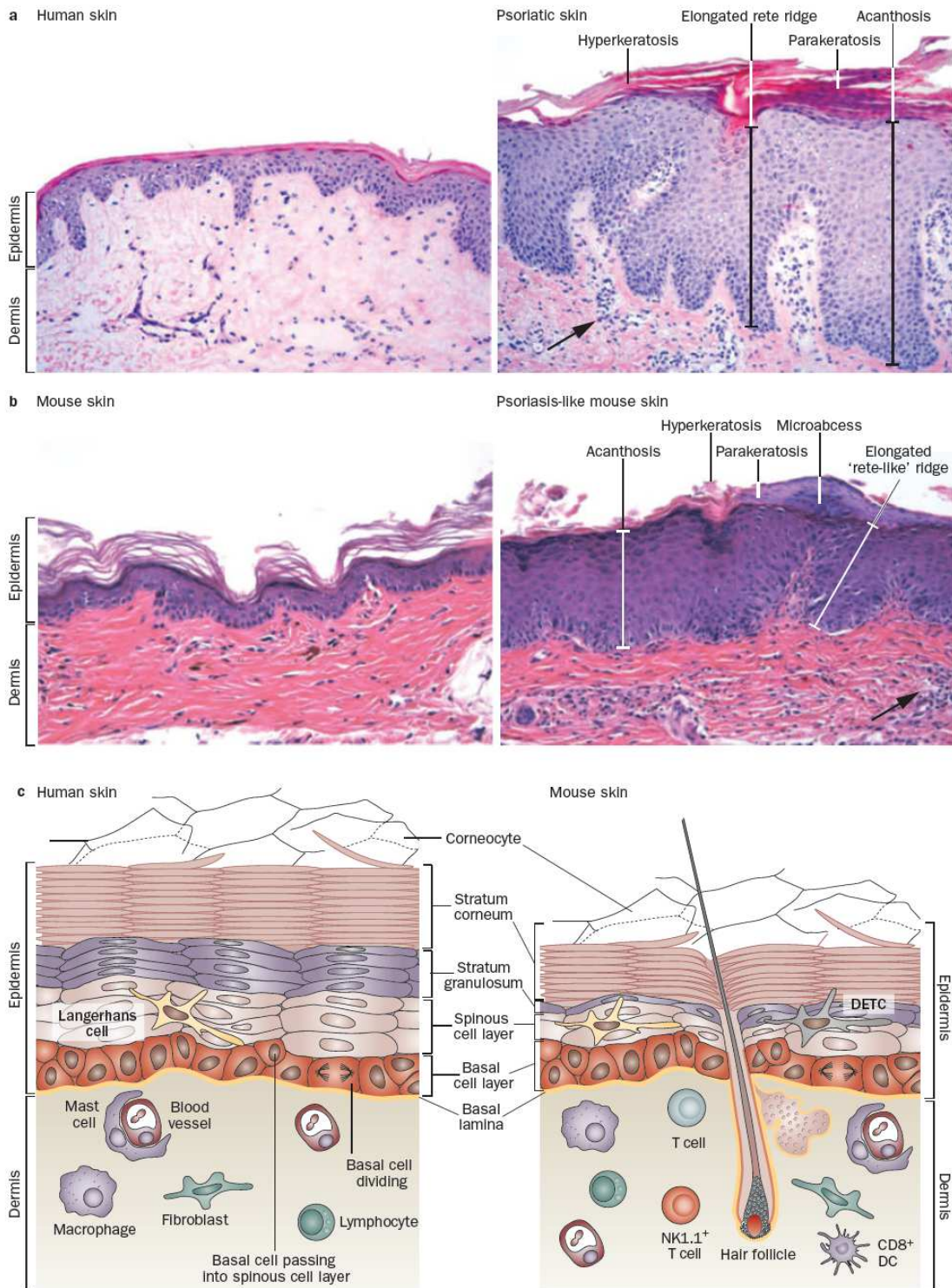


Figura I10. Comparació de la pell humana i de ratolí. **(A)** Característiques histològiques de la pell normal i pell psoriàsica humana. **(B)** Característiques histològiques de la pell normal i pell psoriàsica de ratolí. **(C)** Esquema a de la estratificació de la pell i les diferències de tipus cel·lulars entre humana i ratolí (Wagner *et al.*, 2010).

3.2.3.2 Origen i progressió de la malaltia

La malaltia es pot desencadenar per diferents estímuls com traumes, infeccions, medicaments, drogues, i concretament pel lligand de TLR7 Imiquimod. A més a més, es coneix que hi ha un component hereditari. Així, s'han trobat mutacions en regions cromosòmiques associades a la malaltia, aquests regions s'anomenen PSORS (Psoriasis susceptibility), i n'hi ha 12 descrites, algunes d'aquestes regions contenen gens del HLA (HLACw6), el gen del receptor de IL23 (IL23R) o gens de proteïnes expressades a la pell com la corneodesmosina (Nestle *et al.*, 2009).

En la patogènesi de la psoriasis podem diferenciar dues fases, la iniciació i la de manteniment de la malaltia. La majoria d'estudis es fan sobre la segona fase degut a la dificultat per obtenir mostres de la iniciació. Existeix un model per explicar les fases (Gilliet *et al.*, 2008) resumit en la Figura 4A. Lesions en la pell causen mort cel·lular i la producció de CAMP/LL37 per part dels queratinòcits. El CAMP/LL37 s'uneix al DNA i els complexos són reconeguts per TLR9 de les pDC que s'activen i produeixen IFN de tipus I (Lande *et al.*, 2007). Els complexos LL37/RNA també poden activar les pDC a través de TLR7, i les mDC es poden activar amb aquest complex a través de TLR8 (Ganguly *et al.*, 2009). Així, les mDC es poden activar tant per CAMP/LL37/RNA com pels IFN de tipus I, induint la secreció de citokines com IL12 i IL23 que determinaran l'activació i diferenciació de determinades subpoblacions de limfòcits T i la producció de citokines característiques de la psoriasis. Recentment, també s'ha relacionat la presència de DNA extracel·lular en l'epidermis associat amb les trampes de DNA dels neutròfils amb la iniciació de la psoriasis (Skrzeczynska-Moncznik *et al.*, 2012).

Introducció

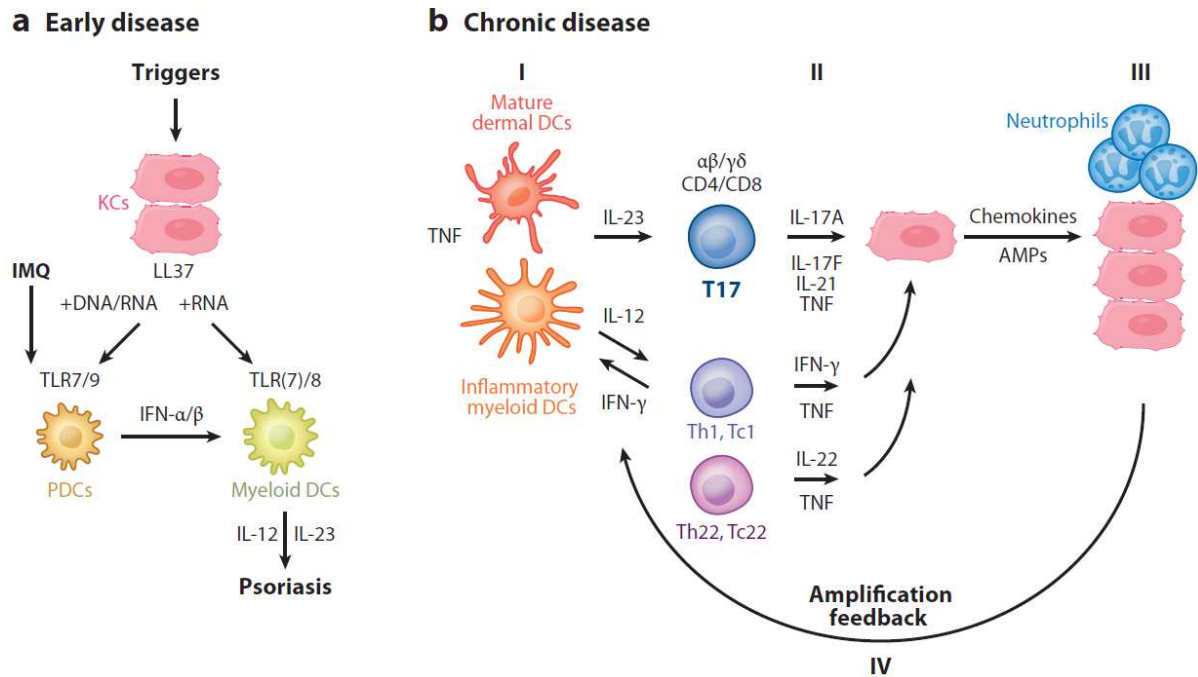


Figura 111. Vies d'iniciació i manteniment de la psoriasis. (A) Iniciació. Complexes d'àcids nucleics-CAMP/LL37 o Imiquimod activen els receptors TLR, específics de les pDC i mDC, provocant la síntesi d'interleuquines que desencadenaran la malaltia. (B) Cronificació. La principal via patogènica es dona quan (I) DC dèrmiques i mieloides maduren i produeixen citocines com IL23 i IL12. (II) Aquestes citocines produeixen l'activació de cèl·lules T17, Th1 i Th22 que contribueixen a la secreció de més interleuquines que actuen en els queratinòcits. (III) Els queratinòcits activats produeixen més quimiocines i pèptids antimicrobians que (IV) perpetuen la inflamació (Lowe *et al.*, 2014).

En la figura 4B es mostra el rol patogènic dels limfòcits T i les DC en el manteniment de l'activitat aberrant dels queratinòcits en les plaques psoriàsiques. L'activació i la diferenciació dels limfòcits T es dona per la IL12 i la IL23 produïdes principalment per les DC mieloides de la pell. Les lesions psoriàsiques contenen cèl·lules T que produeixen IFN γ , IL17 i IL22 (Ghoreschi *et al.*, 2007). Existeixen també limfòcits T CD8 que produeixen les mateixes interleuquines i s'anomenen Tc1, Tc17 i Tc22, respectivament. Els queratinòcits responen a aquestes citocines augmentant la proliferació, fet que malmet la seva diferenciació (Di Cesare *et al.*, 2009) i augmentant la producció de mRNA d'un gran ventall de productes inflamatoris, com Mx1 (pèptid antimicrobià amb funcions antivíriques), CCLs i CXCLs (quimiocines atraients) (Lowe *et al.*, 2007), que provoquen el reclutament i l'activació dels limfòcits T i neutròfils, generant-se un cicle de retroalimentació.

L'eix IL23/T17 és central en la patogènesi de la psoriasi (Lowes *et al.*, 2013). La IL23 és clau per la expansió i supervivència dels limfòcits T17, és una citoquina heterodimèrica composta per la subunitat IL23p19, exclusiva de IL23, i per IL12p40 (IL12B), comuna amb la IL12, i que senyalitza pel complex heterodimèric IL23R l'activació del qual acaba amb la fosforilació de STAT3 (Kastelein *et al.*, 2007). S'han trobat SNP (single nucleotide polymorphism) en IL12p40 i IL23R associats a psoriasi (Perera *et al.*, 2012). El bloqueig de IL17 o el seu receptor reverteix els caràcters clínics de la psoriasi en el 80% dels pacients tractats (Leonardi *et al.*, 2012; Papp *et al.*, 2012).

El primer indici que les DC podien ser importants pel desenvolupament de la malaltia va ser la constatació que, aquestes cèl·lules aïllades de plaques psoriàsiques podien activar una resposta dels limfòcits T amb producció de IL2 i IFN γ (Nestle *et al.*, 1994). En les lesions psoriàsiques s'han identificat a part de les mDC i les pDC, les Tip-DC (TNF and iNOS-producing DC) (Nestle *et al.*, 2005; Zaba *et al.*, 2009). Actualment, les DC són reconegudes com un factor clau en la patologia de la psoriasi ja que el nombre d'aquestes cèl·lules està molt augmentat en les lesions psoriàsiques, i es redueix dràsticament amb tots els tractaments efectius estudiats. Aquestes DC activen i mantenen els limfòcits T17 a través de la síntesi de IL23. Existeix un altre tipus de DC, l'únic present de manera normal en l'epidermis sana, que contràriament als altres tipus de DC disminueix en les lesions, les cèl·lules de Langerhans. Recentment, s'ha definit el paper que desenvolupen aquestes últimes en la patologia de la psoriasi. No participen en l'inici de la malaltia sinó que són fonamentals en la regulació de la inflamació al llarg de la malaltia protegint l'homeòstasi immunitària en una inflamació establerta. En la seva absència els ratolins desenvolupen psoriasi, però amb una inflamació més exacerbada (Glitzner *et al.*, 2014).

També són importants en la psoriasi les cèl·lules NK, sintetitzant TNF α , IFN γ i IL22, i les NKT que produeixen IFN γ , i estan presents en elevats nombres en les lesions, tot i que el seu rol exacte no es coneix (Dunphy and Gardiner, 2011).

Per últim, els queratinòcits també contribueixen, com ja s'ha comentat, en la patologia de la psoriasi. A més a més, són el principal tipus cel·lular amb expressió de IL17R en les lesions

Introducció

(Nograles *et al.*, 2008). En conjunt, les citoquines IL17, IFN γ , IL22 i TNF α , poden incrementar la proliferació dels queratinòcits i la síntesi de quimioquines, citoquines i pèptids antimicrobians, que actuaran sobre l'endoteli (entre molts altres) produint vasodilatació, neoangiogènesi i reclutament de noves cèl·lules immunitàries tancant un cicle sense fi (Fried and Arbiser, 2008).

3.2.3.3 Tractament

Existeix un gran espectre de teràpies per la psoriasi, depenent de la severitat de la malaltia. Els primers tractaments consistien en sabons amb derivats del carbó, o fototeràpia, i amb el temps els fàrmacs inhibidors del sistema immunitari com el metotrexat o els corticoesteroids van anar introduint-se amb èxit. La gran quantitat d'efectes no desitjats dels inhibidors no específics del sistema immunitari van fer que en la primera dècada del 2000 apareguessin els anomenats fàrmacs biològics, molt més específics i amb menys efectes secundaris i elevada eficàcia. Consisteixen en proteïnes que l'organisme produeix, anticossos o receptors solubles, modificades per contrarestar els efectes nocius d'altres molècules produïdes durant la patologia. Existeixen diferents fàrmacs contra TNF α (etanercept, adalimumab, infliximab i golimumab), contra IL17 (ixekizumab) o IL17R (brodalumab) aplicats amb èxit, i els més recents contra IL12 i IL23 (ustekinumab). Malgrat els grans progressos en el tractament la cura permanent roman elusiva (Crow, 2012a, b).

3.2.3.4 Models animals

Els models animals són claus per entendre el mecanisme i les causes de la psoriasi i així poder trobar-ne la cura definitiva. La psoriasi no existeix com a malaltia espontània en altres animals, tot i que algunes de les seves característiques s'han pogut induir en la pell de ratolins per modificacions genètiques o del sistema immunitari (Gudjonsson, 2007; Gudjonsson and Elder, 2007; Gudjonsson *et al.*, 2007). No existeix però un model murí que compleixi tots els trets distintius humans. Entre els models de psoriasi més utilitzats hi ha els xenotransplants de pell psoriàsica humana en ratolins immunodeficients; els ratolins transgènics, que expressen citoquines, molècules d'adhesió, factors de transcripció i mediadors immunitaris sota promotors específics de l'epidermis i ratolins ko complets o condicionals (Wagner *et al.*, 2010).

El factor de transcripció AP1 és un regulador clau de la resposta immunitària en la pell (Schonthaler *et al.*, 2011). Així, en patologies inflamatòries de la pell, com la psoriasi, s'ha descrit que els queratinòcits tenen una expressió reduïda de JUNB i que la deleció de JUNB a l'epidermis de ratolí causa una inflamació de la pell semblant a la de la psoriasi (Zenz *et al.*, 2005).

STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) és un dels factors de transcripció més activats en psoriasi que en la pell normal. IL6, IL12 i IL23 poden activar STAT3 a través del seu receptor (Kortylewski *et al.*, 2009). De fet, el ratolí transgènic que expressa constitutivament la forma activa de STAT3 desenvolupa una espècie d'inflamació a la pell com la psoriasi (Sano *et al.*, 2005).

La via del TNF α té un paper clau en l'apoptosi dels queratinòcits i la inflamació a la pell (Pasparakis *et al.*, 2014). TNF α senyalitza pel seu receptor i activa NF- κ B. Models animals on s'inhibeix aquest factor de transcripció desenvolupen una inflamació crònica semblant a la de psoriasi (Pasparakis *et al.*, 2002).

Recentment, la injecció dèrmica de IL23 ha aparegut com a model de psoriasi (Hedrick *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2013). Encara més revolucionari per la seva senzillesa és el model d'inducció d'inflamació epidèrmica semblant a la psoriasi mitjançant l'aplicació tòpica de Imiquimod (van der Fits *et al.*, 2009). L'Imiquimod és una imidazoquinolona originalment dissenyada per l'ús com a anàleg de nucleòsid contra infeccions víriques. Malgrat que el compost no té activitat semblant a la de nucleòsid, es va veure que era un bon estimulador de respostes immunitàries (McInturff *et al.*, 2005). És un lligand de TLR7, capaç d'induir NF- κ B a través de MyD88 (Hemmi *et al.*, 2002). És un medicament que s'utilitza pel tractament de queratosis actínica, berrugues genitals, BCC superficials i alguns casos de melanoma (Fang *et al.*, 2008). La forma comercial d'Imiquimod és Aldara, una crema que conté 5% del principi actiu. Es va observar que l'aplicació d'Aldara en alguns pacients provocava brots de psoriasi (Gilliet *et al.*, 2004). Així es va desenvolupar un model nou d'inflamació de l'epidermis a partir de l'administració

Introducció

tòpica d'Aldara en la pell dels ratolins, que comparteix moltes característiques inicials de la psoriasi, com l'activació de l'eix IL23/IL17 (van der Fits *et al.*, 2009).

La inflamació de l'epidermis als ratolins tractats amb Aldara no només depèn dels efectes de l'Imiquimod sobre el TLR7 de les pDC. Els excipients emprats en la fórmula farmacèutica sols, poden contribuir a la formació de la placa induint apoptosi en els queratinòcits, l'activació de l'inflamosoma i alliberació de IL1 (Walter *et al.*, 2013). L'activació de TLR7 en les pDC provoca la ràpida alliberació de IFN α , una activació aberrant pot ser suficient per conduir a psoriasi, així en alguns pacients tractats amb IFN α s'han donat casos de psoriasi espontània (Ganguly *et al.*, 2013). Com s'ha vist, les pDC semblen jugar un paper central en l'inici de la psoriasi, ja que en les plaques psoriàsiques naixents n'apareixen grans infiltrats (Nestle *et al.*, 2005) i són les primeres en activar-se pels complexos DNA-LL37/CAMP (Gilliet *et al.*, 2008). Sorprenentment però, l'abolició de les pDC en els ratolins o del receptor de IFN α no afecta la severitat de la psoriasi induïda per l'Imiquimod (Wohn *et al.*, 2013). D'aquesta manera l'eix pDC-IFN tipus I és important a l'inici de la inflamació però pot ser redundant en la formació de la placa (Ganguly *et al.*, 2013).

3.3 L'exonucleasa TREX2

L'escissió de nucleòtids de l'extrem 3'-OH del DNA (activitat exonucleasa 3'-5') és important en molts processos de la cèl·lula relacionats amb el metabolisme del DNA (Figura I12), des de la seva síntesi, garantint que el procés de replicació sigui fidel ajudant a corregir els errors de les polimerases (activitat de "proofreading"), passant per la recombinació i la reparació de dany, o la seva degradació en casos d'elevat dany genotòxic (apoptosi), ajudant a mantenir l'estabilitat del genoma i garantint la viabilitat de la cèl·lula i l'organisme (Mimitou and Symington, 2011; Sperka *et al.*, 2012; Syeda *et al.*, 2014; Ye *et al.*, 2014).

Els enzims capaços de tallar les unions fosfodiester entre nucleòtids del DNA són les nucleases. Les nucleases es poden dividir en funció del lloc de tall, així aquelles que tallen al mig d'una seqüència de DNA són endonucleases (sovint tallen entre seqüències molt específiques de

nucleòtids) i les que tallen pels extrems de la molècula, ja sigui el 5'-P o el 3'-OH, són exonucleases.

S'ha trobat activitat exonucleasa 3'-5' en proteïnes amb múltiples dominis funcionals com les DNA polimerases (Pol δ , Pol γ i Pol ϵ), les proteïnes de reparació del DNA (APE1 i APE2, MRE11 i EXO1), helicases que alliberen la tensió acumulada de la doble cadena del DNA durant la síntesi evitant que s'aturi la força de replicació (WRN), proteïnes del "checkpoint" del cicle cel·lular (RAD9 i RAD1) i fins i tot en el factor de transcripció p53 (Shevelev and Hubscher, 2002). A més també s'han trobat proteïnes amb activitat exonucleasa autònoma com TREX1 i TREX2. TREX2 és una proteïna amb activitat exonucleasa 3'-5' de la qual es coneix encara poc sobre la seva funció fisiològica, mecanisme d'acció i regulació.

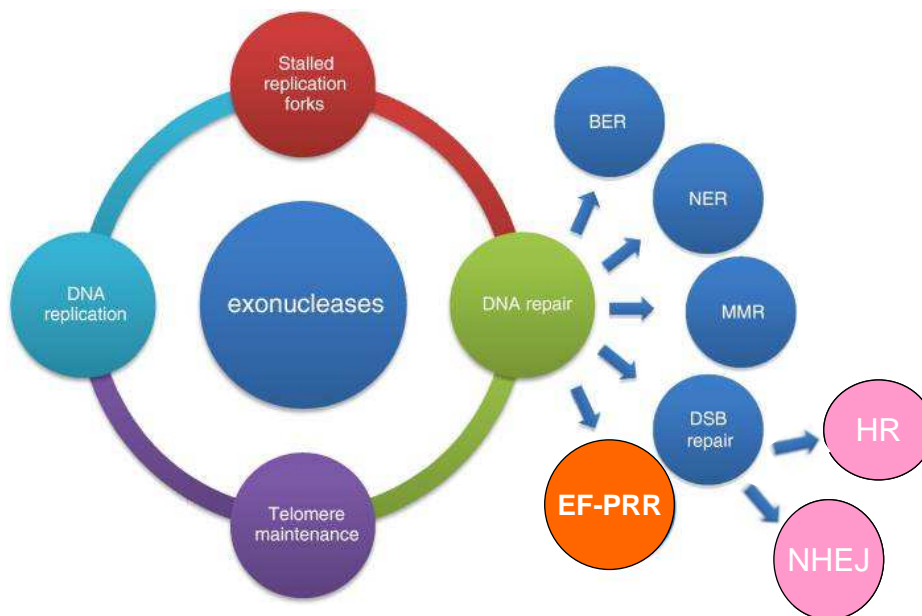


Figura I12. Processos del metabolisme del DNA on intervien exonucleases. L'activitat exonucleasa és important en el manteniment de la inestabilitat cromosòmica evitant errors durant la síntesi del DNA, i és present en gairebé tots els mecanismes de reparació de les diferents lesions (Mason and Cox, 2012).

Existeixen diferents vies de reparació del DNA en funció del tipus de lesió que s'ha produït (Helleday *et al.*, 2008):

Base Excision Repair (BER): Via que repara les modificacions químiques de les bases del DNA com metilacions, hidroxilacions, així com lesions espontànies i ruptures de cadena simple produïdes per rajos X o radicals lliures de l'oxigen.

Introducció

Nucleotide Excision Repair (NER): S'encarrega de treure els grans adductes o modificacions de base que distorsionen la doble hèlix, produïdes per UV i agents químics, utilitza la cadena complementària de motlle. Aquesta via està composta per dos subvies, TCR-NER (*Transcriptional-Coupled Repair*) que s'activa si el dany s'ha produït durant la transcripció i el GGR-NER (*Global Genomic Repair*) que actua quan el dany es produeix en qualsevol altre moment (Wood *et al.*, 2001).

Mismatch Repair (MMR): Procés pel qual es corregeixen les bases mal aparellades degut als errors que fan les polimerases durant la replicació.

Homologous recombination (HR): Utilitza la cadena homòloga com a patró per reparar ruptures dobles, evitant així la introducció d'errors en la seqüència.

Postreplication Repair (PRR): Aquesta via esquivia les incongruències del DNA que impedeixen la replicació, és a dir permet el pas de la forca de replicació a través de la lesió del DNA sense reparar-la.

Non-homologous end joining (NHEJ): Connecta i uneix dos extrems lliures de DNA sense necessitat que hi hagi homologia entre ells.

3.3.1 Propietats bioquímiques de TREX2

TREX2 va ser identificada a partir de cerques a bases de dades per homologia amb dominis exonucleasa presents en TREX1 (Hoss *et al.*, 1999; Mazur and Perrino, 1999). L'homologia entre ambdues seqüències proteiques és d'un 40%, però en els seus dominis *exo*, és del 80%. La principal diferència és que TREX1 té en l'extrem C-terminal 76 aminoàcids implicats en la seva localització al reticle endoplasmàtic que no té TREX2 (Lee-Kirsch *et al.*, 2007). TREX1 també posseeix un motiu ric en prolines no repetitiu d'interacció proteïna-proteïna que no és present a TREX2 (Perrino *et al.*, 2005; Brucet *et al.*, 2007). La caracterització bioquímica *in vitro* de TREX2 com a proteïna recombinant mostra semblances amb TREX1 per la preferència de substrats i la seva activitat exonucleasa (Hoss *et al.*, 1999; Mazur and Perrino, 1999). Ambdós enzims tenen una preferència 1000 cops més elevada per escindir deoxinucleòtids que ribonucleòtids (Mazur and Perrino, 1999), ara bé, tot i que la V_{max} per ssDNA i dsDNA és similar, la K_m de TREX2 per aquests substrats és 10 vegades més gran que la de TREX1, indicant una menor afinitat de TREX2 pel substrat (Mazur and Perrino, 2001).

Ambdues proteïnes només són actives quan dimeritzen (de Silva *et al.*, 2007; Perrino *et al.*, 2008). Cada monòmer de TREX2 està format per 5 làmines β antiparal·leles enrollades en 9 hèlix α (Figura I13). Basant-se en la seqüència peptídica i en la similitud estructural entre TREX2 i la subunitat epsilon de la DNA Pol III bacteriana, s'ha proposat que TREX2 està formada per tres dominis funcionals importants: un domini d'homodimerització, un d'unió al DNA i un d'activitat exonucleasa (Perrino *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007b; Perrino *et al.*, 2008; de Silva *et al.*, 2009).

Els enzims TREX1 i TREX2 utilitzen 2 ions Mg^{2+} per a poder exercir la seva funció deoxiribonucleasa i pertanyen a la superfamília d'exonucleases DnaQ-like (DEDD). La superfamília DEDD conté tant deoxiribo- com riboexonucleases, i s'ha dividit en dues subfamílies caracteritzades per la presència de 4 residus carboxil i una histidina (DEDD-h) o tirosina (DEDD-y) posicionats en el lloc catalític. TREX1 i TREX2 són els únics membres presents en mamífers de la subfamília DEDD-h. El domini exonucleasa DnaQ-like conté 3 motius de seqüències conservades denominats ExoI, ExoII i ExoIII, que s'agrupen al voltant del lloc actiu de l'enzim i contenen els 4 residus àcids conservats que serveixen com a lligand pels 2 ions Mg^{2+} (Perrino *et al.*, 2008).

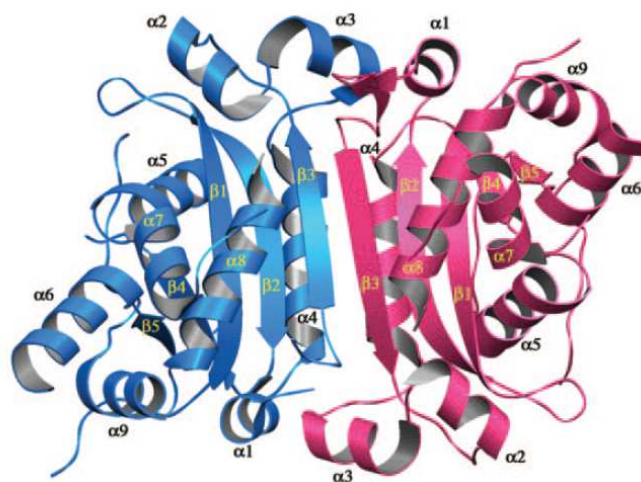


Figura I13. Estructura tridimensional dimèrica de TREX2. Cada monòmer conté 5 fulles β antiparal·leles envoltades per 9 hèlix α . Els monòmers (un de color vermell i un de color blau) dimeritzen sobre un pla perpendicular a l'estructura de fulles β que s'estén a través del dímer (Perrino *et al.*, 2005).

Introducció

El mecanisme d'interacció de TREX2 amb el DNA s'ha caracteritzat al detall *in vitro* (Perrino *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007b; de Silva *et al.*, 2007; Perrino *et al.*, 2008). A diferència d'altres exonucleases TREX2 forma homodímers *in vitro*. S'ha demostrat la unió cooperativa del DNA i la comunicació entre els monòmers que formen el dímer (Figura I14), essent la unió al DNA el pas limitant per la seva activitat. Els monòmers tenen interdependència entre sí, ja que si un dels monòmers està danyat en el lloc catalític l'activitat exonucleasa decreix fins a 7 cops, indicant comunicació al llarg de la superfície del dímer (Perrino *et al.*, 2008). Quan l'extrem lliure 3'-OH de ssDNA o dsDNA interacciona amb el centre actiu de TREX2, aquest centre actiu pateix un canvi conformacional, i gràcies a un efecte sinèrgic, el centre actiu de l'altre monòmer formador del dímer també canvia de conformació augmentant així l'afinitat pel DNA i l'eficiència catalítica (de Silva *et al.*, 2009).

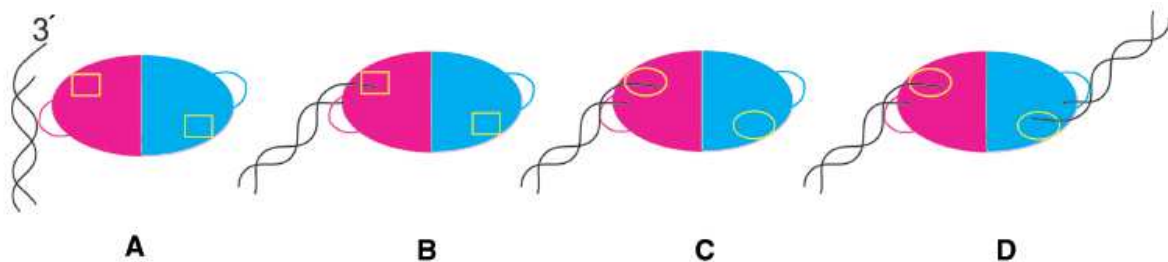


Figura I14. Model de la unió de TREX2 amb el DNA. (A) El DNA és reconegut per un “loop” ric en Arginina. (B) El “loop” posiciona l’extrem 3’ del substrat al centre actiu (rectangle groc). (C) Presència de ssDNA en el centre actiu induïx un canvi conformacional del centre actiu (oval groc) dels dos monòmers. (D) Ambdós monòmers tenen augmentada l’afinitat i la eficiència pel substrat (de Silva *et al.*, 2009).

3.3.2 Funció de TREX2

El primer treball realitzat per determinar la funció de TREX2 es va dur a terme eliminant el gen en cèl·lules ES (*embryonic stem cells*). Aquests estudis mostraven que la deleció del gen provoca greus reordenaments cromosòmics, translocacions robertsonianes, i afectació a la proliferació cel·lular, suggerint un paper en el manteniment de l'estabilitat cromosòmica d'aquesta exonucleasa (Chen *et al.*, 2007a). Ara bé, en posteriors estudis amb les mateixes ES *Trex2*^{-/-}, on s'expressava ectòpicament variants de TREX2 que tenien inhabilitat el motiu exonucleasa o bé el motiu d'unió al DNA, es descriu que les dues variants supprimeixen les translocacions robertsonianes de les ES *Trex2*^{-/-}. Això és especialment sorprenent, doncs TREX2

només té tres dominis funcional descrits, i s'atribueix el rescat del fenotip *Trex2*^{-/-} a algun domini no caracteritzat, a més a més la inactivació del domini exonucleasa causa un lleuger augment dels DSB i no translocacions cromosòmiques (Dumitrache *et al.*, 2009). Altres autors han descrit que TREX2 podria interaccionar amb la Pol δ incrementant la seva fidelitat conferint-li activitat “proofreading” quan hi ha desajustos en els “pools” de dNTP (Shevelev *et al.*, 2002).

Recentment, s'ha demostrat que TREX2, si s'expressa ectòpicament junt amb meganucleases, endonucleases de tall rar (reconeixen seqüències grans), pot alterar el funcionament normal de les vies de reparació “end-joining” dels DSB. Els extrems generats per la endonucleasa són ràpidament re-units per la maquinària de reparació del DNA de la via NHEJ, que soluciona els efectes mutagènics dels trencaments introduint molt poques mutacions. Si els extrems 3'-OH generats per l'endonucleasa són processats per TREX2, s'elimina la re-unió precisa d'aquests extrems, donant com a resultat la pèrdua de material genètic al reparar el trencament (Bennardo *et al.*, 2009). Aquests resultats s'han aprofitat per dissenyar teràpies i dirigir interrupció de gens essencials pels patògens amb cicles de latència incorporats en el genoma de les cèl·lules de l'organisme. Així s'han dut a terme amb èxit experiments *in vitro* expressant TREX2 i endonucleases contra el virus de l'Herpes simplex tipus 1 (HSV1) (Aubert *et al.*, 2014) o contra el correceptor del VIH (Certo *et al.*).

Un dels últims treballs sobre la funció de TREX2, també en condicions d'expressió heteròloga, apunta que podria ser un component de la via de reparació del DNA *error-free post-replication repair* (EF-PRR), que es requereix per fer *bypass* en les lesions al DNA que podrien bloquejar les polimerasses durant la replicació (Hu *et al.*, 2013). Així, TREX2 pot potencialment participar en múltiples vies relacionades amb el manteniment de la estabilitat genòmica. Malgrat tot la rellevància fisiològica en cèl·lules que l'expressin de forma nativa roman elusiva.

El nostre grup ha generat el ratolí *Trex2*^{-/-} i ha començat a determinar la rellevància funcional de TREX2 gràcies a la caracterització del model. Així, el ratolí *Trex2*^{-/-} és viable, fèrtil, no té una reduïda supervivència, ni un increment significatiu de la incidència espontània de tumors com s'esperaria si jugués un paper important en la reparació del DNA. A nivell cel·lular, no

Introducció

s'observa alteració de la proliferació ni s'observen alteracions cromosòmiques (Parra *et al.*, 2009). En protocols d'inducció de tumors amb el genotòxic químic DMBA (7,12-dimethyl benz(a)anthracene), el ratolí *Trex2*^{-/-} presenta una major susceptibilitat a desenvolupar tumors de pell, i això correlaciona amb un defecte en l'apoptosi dels seus queratinòcits. Aquests resultats suggereixen un paper com a supressor tumoral de TREX2 en condicions d'estrès genotòxic en queratinòcits (Parra *et al.*, 2009).

3.3.3 Expressió

En l'espècie humana el gen *TREX2* està en la regió cromosòmica Xq28, i en ratolí en la regió A7.3 del cromosoma X. L'estructura del gen és similar en humans i ratolins però no idèntica. En el ratolí, el gen està constituït per dos exons, localitzant-se la regió codificant íntegrament a l'exó 2. El splicing de l'intró de 623 bp genera una proteïna de 236 aa (aminoàcids) amb un pes molecular calculat de 25.9 kDa (Mazur and Perrino, 2001). En humans, s'ha descrit almenys 3 transcrits generats a partir de 3 exons i splicing alternatiu que donen lloc a 3 formes proteiques diferents de 279 (L1, *long*), 278 (L2), 236 (S, *short*) i aa que es diferencien només en l'extrem N-terminal (Chen *et al.*, 2007b) a banda d'altres possibles transcrits que inclouen varis exons del gen HAUS7 adjacent a TREX2 (Ensemble-www.ensembl.org/index.html). La isoforma curta (S, *short*) de 236 aa i 25.9 kDa és equivalent a la proteïna murina. Les dues isoformes (L1 i S) es diferencien únicament per 43 aa en la regió N-terminal de L1 absents en S, tot i que ambdues tenen iguals propietats bioquímiques (Chen *et al.*, 2007b). S'ha descrit una segona isoforma llarga (L2) molt minoritària que donaria una proteïna de 278 aa quasi idèntica a la L1.

Si bé inicialment, a partir d'estudis de RT-PCR no quantitativs es va creure que TREX2 tenia una expressió ubíqua (Mazur and Perrino, 2001; Chen *et al.*, 2007b), estudis del nostre laboratori mitjançant RT-PCR quantitativa (RT-qPCR) han demostrat una expressió de TREX2 predominantment en epitelis escamosos estratificats com la pell, la llengua, l'esòfag i el cèrvix. Els queratinòcits són el principal tipus cel·lular que expressa específicament TREX2, i concretament, es concentra al nucli d'aquests queratinòcits. El patró d'expressió en teixits humans és molt similar al de ratolins (Parra *et al.*, 2009).

Al comparar l'activitat 3'exonuclease a l'epidermis dels ratolins *Trex2*^{-/-} i wt s'ha demostrat que TREX2 és responsable de quasi la meitat d'aquesta activitat present a l'epidermis i els queratinòcits. Per altra part, s'ha descrit que a les cèl·lules HeLa l'expressió de TREX2 està regulada al llarg del cicle cel·lular disminuint en la fase M/G2 així com també en resposta al genotòxic Cisplatí (Chen *et al.*, 2007a).

L'interès del nostre laboratori radica en ampliar els escassos coneixements que encara es tenen de TREX2, tant pel que fa al mecanisme d'acció, la funció biològica i la regulació específica del gen i la proteïna. En aquesta tesi, emprant el ratolí *Trex2*^{-/-}, hem volgut aprofundir en la importància que tindria TREX2 tant en la homeòstasi com en les patologies de la pell.

4 Objectius

Objectius

L'objectiu global ha estat caracteritzar el paper de l'exonucleasa TREX2 en la biologia i patologia de la pell, sent els objectius específics:

1. Determinar la funció i mecanismes de TREX2 en la resposta de la pell a la radiació ultravioleta.
2. Analitzar la funció i mecanismes de TREX2 en la patologia de la psoriasi.

5 Materials i mètodes

5.1 Mostres Humanes

5.1.1 TMAs (*Tissue Mycro Arrays*)

Els TMAs de tumors SCC cutanis (cSCC) i de cap i coll (HNSCC, head and neck SCC) van ser proporcionats pels laboratoris del Dr. Agustí Toll (Hospital del Mar, IMIM, Barcelona) (Toll *et al.*, 2012) i la Dra. Juana M^a García-Pedrero (Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo) (Menendez *et al.*, 2012). Breument, sèries de pacients diagnosticats per cSCC o HNSCC, es van seleccionar per construir els *arrays*, sota la supervisió i aprovació de les institucions reguladores i d'acord amb els principis de la Declaració de Helsinki. Es va practicar una biòpsia de 1 mm³ de les àrees d'interès i es van fixar les mostres amb formol. Després es va procedir al muntatge d'un “master bloc” que contenia mostres de diferents pacients i 3 controls de pell sana.

5.1.2 Mostres de Psoriasi

Es van agafar biòpsies de pell de pacients amb psoriasi, es van incloure en medi de muntatge OCT (optimal cutting temperature, Sakura), es van congelar i posteriorment se'n van fer crioseccions. L'estudi va ser conduït sota els principis de la Declaració de Helsinki, va ser aprovat pel Comitè d'ètica de l'Hospital del Mar, i es va obtenir l'aprovació escrita de tots els participants, amb la col·laboració de la Dra. Marta Ferran (Hospital del Mar, IMIM, Barcelona).

5.2 Models animals

Vam utilitzar ratolins de la soca C57BL/6 wt i *Trex2*^{-/-} (*Trex2*^{tm1.2Coso}) generat pel nostre laboratori i descrit amb anterioritat (Parra *et al.*, 2009). Els ratolins es van mantenir en condicions lliures de patògens, d'acord amb els requeriments del Comitè Ètic i de Protecció Animal del Parc Científic de Barcelona. Tots els experiments es van conduir sota l'autorització de la Generalitat de Catalunya (DAAM 7067, DAAM 7170, DAAM 7894). Pel tractament dels ratolins amb UVB es va utilitzar la font a *CL-1000M Midrange Ultraviolet Crosslinker* (UVP Inc.) que emet llum UVB d'una longitud d'ona de 302 nm.

5.2.1 Estudi de la carcinogènesi induïda per la radiació UVB

Es van afaitar les esquenes de femelles wt o *Trex2*^{-/-} d'entre 8 i 10 setmanes d'edat amb l'ajut d'una afaitadora elèctrica (Wella contoura, Bio-services). Els ratolins es van irradiar 3 cops a la setmana durant 12 setmanes amb una dosi de 2 kJ/m² per exposició, les següents 12 setmanes es va pujar la dosi a 3 kJ/m² per exposició i a 5 kJ/m² per exposició en les últimes 26 setmanes. Es va dur a terme l'exploració visual dels ratolins setmanalment i el nombre i les mides dels tumors es van avaluar per calcular la incidència (percentatge de ratolins amb tumors) i la multiplicitat dels tumors (nombre mig de tumors per ratolí). Es van sacrificar aquells ratolins que durant l'experiment mostraven signes de disminuïda salut. Al finalitzar l'experiment es van sacrificar per dislocació cervical i es van agafar mostres de pell pel posterior estudi histopatològic.

5.2.2 Estudi dels efectes de la radiació UVB a curt termini

Ratolins femella wt i *Trex2*^{-/-} d'entre 8 i 10 setmanes d'edat, van ser exposats a diferents dosis de UVB un cop eliminat el pèl de l'esquena amb una afaitadora elèctrica. Anomenem tractament "agut", a la irradiació amb una sola dosi de UVB de 5 kJ/m² i tractament "crònic" a la irradiació de 3 vegades amb 2 kJ/m² deixant un dia de no irradiació entre els dies de irradiació tal i com es mostra a la figura M1. Els ratolins control es van afaitar però no van rebre cap dosi de UVB. Les mostres es van recollir a 24, 48 i 72 hores després de la irradiació. Aquests experiments es van fer amb 5 individus control i 6-7 individus irradiats per cada genotip i per cada grup experimental. Al finalitzar l'experiment es van sacrificar per dislocació cervical i es van agafar mostres de pell pels estudis posteriors a nivell histològic i d'expressió gènica i proteica.

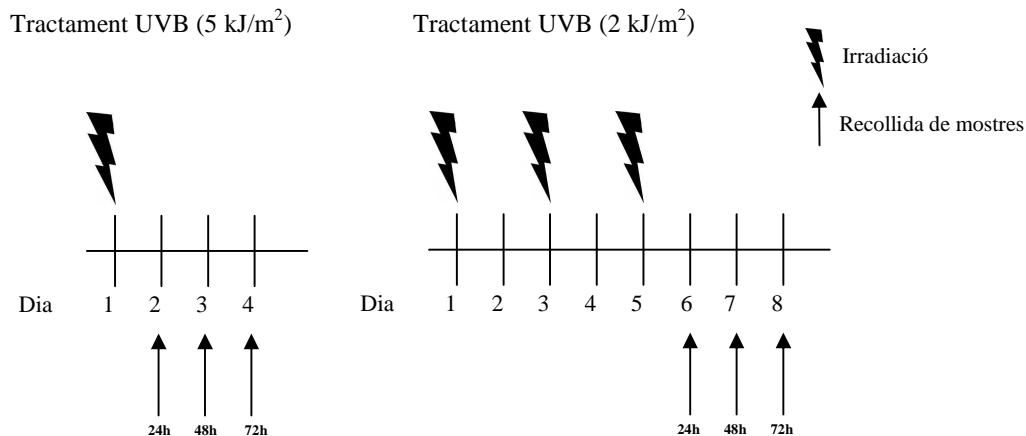


Figura M1. Representació esquemàtica dels protocols d'irradiació dels ratolins amb UVB de forma aguda (5 kJ/m²), i crònica (2 kJ/m², 3 vegades en dies no consecutius) i recollida de mostres a les 24, 48 i 72 hores posteriors a l'última irradiació.

5.2.3 Tractament amb Imiquimod

Es van afaitar les esquenes de femelles wt o *Trex2*^{-/-} d'entre 8 i 10 setmanes d'edat amb l'ajut d'una afaitadora elèctrica. Passades 24 hores de l'eliminació del pèl es va aplicar 125 mg de la crema que conté 5% d'Imiquimod, Aldara (3M Pharmaceuticals, Diegem, Belgium) a les esquenes dels ratolins, i es va repetir l'aplicació cada dia durant 4 o 8 dies. De manera similar es va aplicar als ratolins control una crema vehicle sense Imiquimod (Vaselina Pura, Laboratorios Rida, Valencia, Spain) amb el mateix protocol que als que rebien Imiquimod. Aquests experiments es van fer amb 5 individus control i 6-7 individus tractats per cada genotip i per cada grup experimental. Als dies indicats els ratolins es van sacrificar per dislocació cervical i es van agafar mostres de pell pel posterior estudi a nivell histològic i d'expressió gènica i proteica.

5.2.4 Avaluació de la severitat de la inflamació induïda per Imiquimod

Els ratolins eren avaluats diàriament al llarg dels dies de tractament. Es van pesar i es va mesurar el gruix de la pell dorsal amb l'ajut d'un micròmetre digital (Mitutoyo), mesurant el gruix d'un "pessic" o doblec de la pell. Es van donar puntuacions arbitràries per tal de quantificar la descamació i l'envermelliment de la pell com seguint pautes descrites anteriorment (van der Fits *et al.*, 2009). La descamació i l'envermelliment es van puntuar independentment per 2 investigadors amb una escala de 0 a 4 per definir el grau d'afectació on:

0, absència; 1, poc; 2, moderat; 3, marcat i 4, molt marcat. Totes les mesures es van prendre mitjançant assaig cec, es a dir, l'investigador no coneixia el genotip dels ratolins.

5.3 Histologia

5.3.1 Teixits en parafina

Les mostres de pell de ratolí es van fixar amb paraformaldehid al 4% en PBS (*phosphate buffered saline*) durant tota la nit. Al dia següent es van canviar a etanol al 70 % durant un dia, després es van canviar a etanol 96% durant 4 hores, després a etanol 99% durant 3 hores i per acabar es van posar en xilol durant 1 hora. Tot seguit es van deixar en una safata amb parafina fosa a l'estufa de 60°C durant tota la nit, al dia següent es va canviar la parafina per parafina nova i es van deixar 4 hora a l'estufa, per acabar es va procedir a muntar els blocs de parafina (Leica Paraffin Embedding Station EG1140H, Leica). Els blocs solidificats es van deixar al congelador fins al moment de tallar.

- Els talls es van fer de 5µm de gruix amb l'ajuda d'un micròtom (Leica RM2235), i es van deixar assecar sobre cobreobjectes recoberts de polilisina al 5% (Sigma). Un cop secs es va procedir al desparafinat i la rehidratació. Els talls es van deixar 1h a l'estufa de 60°C per desfer la parafina, i després es van submergir en una sèrie de cubetes amb diferents concentracions d'alcohols: (1) Xilol, es van deixar 15 minuts en cada cubeta (3 cubetes); (2) Etanol absolut, 3 minuts en cada cubeta (3 cubetes); (3) Etanol al 96%, 3 minuts en cada cubeta (3 cubetes); (4) Etanol al 70%, 3 minuts en cada cubeta (3 cubetes); (5) Etanol al 50%, 3 minuts en cada cubeta (3 cubetes); (6) Aigua destil·lada, 5 minuts (1 cubeta).

Un cop teníem els teixits en aigua ja estaven apunt per començar les tincions segons el que es desitgés (Hematoxilina/Eosina (H/E), Immunohistofluorescència (IHF) o Immunohistoquímica (IHQ).

5.3.2 Teixits criopreservats

Els teixits de psoriasi humana congelats a -80°C , es van deixar atemperar a -20°C dins el criostat (Leica CM 1850) durant 30 minuts i es van preparar amb OCT per tallar a $5\ \mu\text{m}$ de gruix. Els talls es van adherir per diferència tèrmica en cobreobjectes recoberts amb polilisina al 50%. Els talls es guardaven al congelador de -80°C fins que es volia procedir a les tincions, moment en que es deixaven una hora a temperatura ambient, es fixaven 15 minuts amb paraformaldehid, es rentaven amb PBS i es permeabilitzaven amb Tritó X-100 (Fluka Biochemika) al 0,1% durant 10 minuts. Després es rentaven 3 cops amb PBS i ja estaven apunt per la IHF.

5.4 Tincions histològiques

5.4.1 Hematoxilina/Eosina (H/E)

Els talls dels teixits hidratats es van submergir en hematoxilina (Sigma) entre 20 i 30 immersions, es van posar a la pica en una cubeta amb aigua corrent de l'aixeta per netejar l'excés i es van fer 3-5 sucades en una cubeta amb alcohol clorhídric al 1%, es van rentar de nou en una cubeta amb aigua i es van submergir en una cubeta amb eosina, entre 10 i 20 immersions. Finalment, es van passar per una sèrie de cubetes amb etanol en concentracions ascendents (70° , 96° i 100°) i després a una cubeta amb xilol, 1 minut en cada cubeta. Un cop en xilol es va procedir a muntar els cobreobjectes afegint medi de muntatge DPX (Sigma). Per l'anàlisi es va fer servir un microscopi de camp clar amb càmera incorporada.

5.4.2 Immunohistofluorescència (IHF)

Un cop desparafinats i hidratats, els talls es van sotmetre al desenmascarament d'epítops portant-los a ebullició durant 20 minuts en Tampó Citrat (10 mM Citrat de Sodi pH 6) o tampó Tris-EDTA (10 mM Tris Base, 1 mM EDTA, pH 9). Es van deixar refredar tota la nit i l'endemà es va procedir a la tinció.

Els talls es van rentar 2 cops amb PBS i es van delimitar amb un rotulador, *Dako pen* (Dako), de traç hidrofòbic les àrees dels teixits, per ajustar els volums de les incubacions. Totes les

Materials i Mètodes

incubacions es van fer en una cambra humida. Es van bloquejar les unions inespecífiques amb solució de bloqueig (FBS al 20% en PBS) durant 1 hora a temperatura ambient. La solució d'anticòs primari es va fer amb l'anticòs corresponent a la concentració indicada (Taula M1), diluint-lo en solució de bloqueig. Després del bloqueig es va afegir la solució d'anticòs primari sobre els talls i es van deixar a la cambra humida durant 1 hora. A la taula M1 es detallen els anticossos i dilucions utilitzades. Es van fer 3 rentats amb PBS, i es afegir la solució d'anticòs secundari marcats amb fluorocroms (anticòs diluït en solució de bloqueig). Passats 30 minuts es van fer 3 rentats amb PBS.

Finalment es va fer una incubació de 15 minuts amb DAPI (1/20.000 en PBS, SIGMA) o DRAQ5 (1/2000 en PBS, Biostatus). Es van rentar un cop més amb PBS i es va posar sobre els talls una gota de solució de muntatge ProLong Gold (Invitrogen) i un cobreobjectes. Es van deixar assecar protegits de la llum i es van analitzar al microscopi de fluorescència.

En aquells casos en que es volia fer doble marcatge amb TUNEL, abans de la incubació amb anticossos, es va utilitzar el kit *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein/TMR red* (Roche) seguint les instruccions del fabricant.

5.4.3 Immunohistoquímica (IHQ)

Es va procedir igual que en la IHF, fins al moment de l'adició de l'anticòs secundari. Tan sols es va fer un pas addicional just després del desenmascarament d'epítops per bloquejar les peroxidases endògenes submergint els talls en PBS amb 0.3% H₂O₂ durant 10 minuts.

El marcatge es va fer amb anticòs contra F4/80 amb el kit *ABC Peroxidase Staining Kit* (Pierce) segons instruccions del fabricant. Un cop fets els rentats de l'anticòs primari es van incubar els talls amb el corresponent anticòs secundari conjugat amb Biotina (1/200) durant 1 hora. Es van fer 3 rentats amb PBS, i es van incubar amb una solució d'Avidina conjugada amb HRP (horse radish peroxidase) (1/200) durant 1 hora, després de la qual es van fer 3 rentats amb PBS. Tot seguit es van incubar amb el substrat de la HRP, el DAB (Diaminobenzidina), submergint els talls en una cubeta amb 200ml de PBS, 1% DAB i 30% H₂O₂ durant 5-10 minuts. Un cop

teníem el contrast desitjat, es posaven els talls sota l'aigua corrent de l'aixeta per rentar l'excés de DAB, es feia una sucada en una cubeta d'hematoxilina i es feia una sucada en cada una de les cubetes d'un banc de cubetes amb etanol a concentracions creixents (70°, 96°, i 100°) fins a deixar els talls en xilol. Per acabar es muntava el cobreobjectes sobre una gota de DPX que es posava sobre el tall.

Per les mostres de HNSCC, els talls es van desparafinar i tractar amb *Envision Flex Target Retrieval solution low pH* (DAKO). La tinció es va fer en un sistema automatitzat (Dako Autostainer Plus) usant el *DakoEnVision Flex + Visualization System* (Dako). Aquesta tinció es va dur a terme al laboratori de la Dr. Juana M^a García-Pedrero (Hospital Universitario Central de Asturias).

Anticossos primaris	Origen	Dilució	Tampó de desenmascarament	Distribuidor
TREX2	Conill	1/50	Tris-EDTA	Parra <i>et al.</i> 2009
Involucrina	Ratolí	1/200	Tris-EDTA	Acris
CPD	Ratolí	1/500	Citrat	COSMO BIO CO
γ H2AX	Ratolí	1/500	Tris-EDTA	Upstate
Keratina 10 (K10)	Ratolí	1/200	Tris-EDTA	Abcam
CD3	Conill	1/200	Tris-EDTA	Abcam
CD11b	Conill	1/200	Tris-EDTA	Abcam
F4/80	Rata	1/50	Citrat	Abcam
Caspasa 3	Conill	1/50	Tris-EDTA	Cell signaling
hTREX2	Conill	1/100	Tris-EDTA	Cedit pel Dr. Perrino
Anticossos secundaris				
Anti-rabbit-555	Cabra	1/500	-	Life technologies
Anti-rabbit-488	Cabra	1/500	-	Life technologies
Anti-mouse-555	Cabra	1/500	-	Life technologies
Anti-mouse-488	Cabra	1/500	-	Life technologies
Anti-rat-biot	Cabra	1/200		Pierce

Taula M1. Anticossos utilitzats en els assaig d' IHF iHQ. S'indica la dilució emprada i característiques de preparació de la mostra.

5.5 Anàlisi en talls histològics

5.5.1 Quantificació de l'expressió de TREX2 en SCC

El marcatge de TREX2 va ser avaluat per dos investigadors independents sense conèixer els paràmetres de la mostra. Les dades es van dicotomitjar en negatives-poca expressió (0 punts) contra moderada-forta expressió (1 punt), tant en l'epiteli del tumor com en l'estroma.

5.5.2 Quantificació de cèl·lules amb lesions al DNA

Talls de pells de ratolí wt i *Trex2*^{-/-} sense irradiar o irradiades amb diferents tractaments de radiació UVB es van tenyir per IHF amb anticossos contra CPDs. Es van fer 2 fotos aleatòries de cada preparació a 20x. Després es va procedir al comptatge de cèl·lules positives per CPD i del nombre total de cèl·lules de l'epidermis en cada foto, i es va fer la mitjana de les dues fotos. Els valors es van expressar com tant per cent de nuclis CPD respecte el total de nuclis, i es va calcular de la següent manera:

$$\% \text{ de nuclis CPD} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de nuclis CPD} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de nuclis de l'epidermis}}$$

De cada grup experimental es va analitzar un com a mínim 5 ratolins. La mitjanana de cada espècimen es va introduir al GraphPad Prism per l'anàlisi estadístic. El comptatge es va dur a terme per dos investigadors independents sense conèixer el genotip de la mostra.

5.5.3 Quantificació del marcatge amb TUNEL de les pells irradiades amb UVB

Talls de pells wt i *Trex2*^{-/-} sense irradiar o irradiades amb diferents tractaments de radiació UVB es van tenyir amb TUNEL i es va avaluar el percentatge de longitud de l'estrat corni i el percentatge de cèl·lules TUNEL positius en aproximadament 1 cm de longitud de cada tall de pell.

Per determinar el percentatge de marcatge de TUNEL a l'estrat corni, de cada espècimen es van fer fotos a 20x resseguint tota la longitud de la pell. Després amb l'ajuda del programa ImageJ, es van quantificar les longituds de l'epidermis i les longituds de les marques de TUNEL de l'estrat corni (SC) de cada foto. Per cada ratolí es van sumar totes les longituds de l'epidermis i de les marques de TUNEL i es va calcular el percentatge d'estrat corni amb marcatge de TUNEL de la següent manera:

$$\% \text{ d'estrat corni (SC) TUNEL} = \frac{\text{Total longituds TUNEL (cm)} \times 100}{\text{Total longituds epidermis (cm)}}$$

De cada grup experimental hi havia com a mínim 5 ratolins. El tant per cent de cada espècimen es va introduir al GraphPad Prism per l'anàlisi estadístic. El comptatge es va dur a terme per dos investigadors independents sense conèixer el genotip de la mostra.

Pel comptatge dels nuclis positius per TUNEL en les capes vives de l'epidermis (estrat basal, espinós i granular), es van contar tots els nuclis positius de cada foto, es van sumar tots i es van dividir per la longitud total de l'epidermis de l'espècimen en concret de la següent manera:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de nuclis TUNEL per cm} = \frac{\text{Total n}^{\circ} \text{ de nuclis TUNEL positius}}{\text{Total longitud epidermis (cm)}}$$

De cada grup experimental hi havia com a mínim 5 ratolins. El tant per cent o el nombre de nuclis TUNEL de cada espècimen es va introduir al GraphPad Prism per l'anàlisi estadístic. El comptatge es va dur a terme per dos investigadors independents sense conèixer el genotip de la mostra.

5.5.4 Quantificació de les capes i gruix de l'epidermis

Talls de pells wt i *Trex2*^{-/-} sense irradiar o irradiades amb diferents tractaments de radiació UVB es van tenyir amb H/E. Es van fer 2 fotos aleatòries de cada preparació, i es va contar el nombre de capes cel·lulars que hi havia en dos punts aleatoris de les epidermis de cada una de les fotos.

Per saber el gruix de l'epidermis es van fer dos transectes, des de la làmina basal fins a l'estrat corni, de cada foto amb el software ImageJ, i es van convertir els píxels en unitats de longitud. De cada grup experimental hi havia com a mínim 5 ratolins. La mitjana de cada espècimen es va introduir al GraphPad Prism per l'anàlisi estadístic. El comptatge es va dur a terme per dos investigadors independents sense conèixer el genotip de la mostra.

5.5.5 Quantificació d'infiltrats immunitaris en les pells irradiades amb UVB

Per la quantificació del tipus d'infiltrat immunitari, es van fer IHF per CD11b i CD3 i IHQ per F4/80 en talls de pell wt i *Trex2^{-/-}* irradiats amb diferents protocols de radiació UVB. Es van fer 3 fotos aleatòries de cada preparació als augments del microscopi necessaris per la correcta visualització de la senyal. Després es va procedir al contatge de cèl·lules positives en cada preparació, i es va fer la mitjana de les dues fotos. De cada grup experimental hi havia com a mínim 5 ratolins. La mitjana de cada espècimen es va introduir al GraphPad Prism per l'anàlisi estadístic. El comptatge es va dur a terme per dos investigadors independents sense conèixer el genotip de la mostra.

5.5.6 Quantificació dels abscessos i les plaques de paraqueratosi en les pells tractades amb Imiquimod

Per a la quantificació dels abscessos, talls de pells wt i *Trex2^{-/-}* sense tractar o tractades amb radiació UVB o Imiquimod es van tenyir amb H/E. De cada espècimen es van fer fotos a 20x resseguint tota la longitud de la pell. Després amb l'ajuda del programa ImageJ, es van quantificar les longituds de l'epidermis i les longituds dels abscessos de l'estrat corni de cada foto. Per cada ratolí es van sumar totes les longituds de l'epidermis i dels abscessos i es va fer el percentatge de longitud amb abscessos de cada ratolí de la següent manera:

$$\% \text{ d'epidermis amb abscessos} = \frac{\text{Total longituds abscessos (cm)} \times 100}{\text{Total longituds epidermis (cm)}}$$

La quantificació del percentatge d'epidermis amb paraqueratosi (PK) es va fer de manera similar a la quantificació dels abscessos:

$$\% \text{ d'epidermis amb paraqueratosi (PK)} = \frac{\text{Total longituds PK (cm)} \times 100}{\text{Total longituds epidermis (cm)}}$$

De cada grup experimental hi havia com a mínim 5 ratolins. El tant per cent de cada espècimen es va introduir al GraphPad Prism per l'anàlisi estadístic. El comptatge es va dur a terme per dos investigadors independents sense conèixer el genotip de la mostra

5.6 Cultius cel·lulars

5.6.1 Cultius de la línia cel·lular HaCaT

Les cèl·lules HaCaT són una línia de queratinòcits humans immortalitzats espontàniament (Boukamp *et al.*, 1988), emprada en múltiples estudis *in vitro* per caracteritzar la biologia dels queratinòcits, per la capacitat que tenen de proliferar i diferenciar-se *in vitro*, si bé no conserven totes les propietats del queratinòcits primaris. Creixen en medi DMEM complementat amb 10% de FBS i 50 µg/ml de penicil·lina/estreptomicina (P/S) (PAA Laboratories).

Per l'expansió dels cultius, quan les cèl·lules arribaven al 90% de confluència, el medi s'aspirava i es rentaven dos cops amb PBS, tot seguit s'afegia un volum de tripsina-EDTA (GIBCO, Invitrogen) i es posaven a l'incubador de 37°C durant el temps necessari perquè es desenganxessin. Un cop desenganxades es bloquejava l'efecte de la tripsina afegint tres volums de medi de cultiu específic de cada línia. Les cèl·lules en suspensió es centrifugaven a 1250 rpm durant 5 minuts, el sobrenedant obtingut s'aspirava i el pellet de cèl·lules es ressuspenia en medi de cultiu per ser contades i sembrades en plaques a la densitat desitjada. Els cultius es mantenien en incubadors a 37°C i atmosfera de 5% de CO₂.

5.6.2 Cultiu primari de queratinòcits humans

Pels experiments amb cultius primaris de queratinòcits epidèrmics humans normals es van obtenir NHEK (*normal human epidermal keratinocytes*) comercials (CellnTec). Es van cultivar en medi CnT-02 i CnT-57 (CellnTec) que són baixos en calci (0,07 mM) complementats amb factors de creixement específics de queratinòcits i antibiòtic/antimicòtic 1% (PAA Laboratories), i en el cas del CnT-57 extracte de pituitària boví (6 µg/ml). El medi es va canviar cada dos dies. Per afavorir el creixement en els primers dies de cultiu s'utilitzava el medi CnT-57, i un cop el cultiu estava assentat es canviava al medi definit CnT-02. El cultiu es va mantenir a l'incubador cel·lular en les mateixes condicions que les línies. Per l'expansió de les cèl·lules es procedia d'igual manera que en les línies cel·lulars.

Pels estudis de diferenciació es van sembrar 1×10^5 cèl·lules per pou, en plaques de 6 pous. Es van deixar créixer les cèl·lules fins a preconfluència (Pre-C), o fins a 8 dies postconfluència (d8-pC), un cop arribats al punt desitjat es va treure el medi i es va rentar amb PBS dos cops abans d'afegir el tampó de lisis.

5.6.3 Cultiu primari de queratinòcits de ratolí

Pel cultiu primari de queratinòcits de ratolí es van adaptar els protocols descrits amb anterioritat (Pirrone *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2007). L'aïllament dels queratinòcits es fa a partir de pells de ratolí nounats (de 1 a 4 dies després de néixer, ja que més tard l'aparició del pèl en dificulta l'aïllament) de la soca C57BL/6.

Els ratolins es van sacrificar per decapitació, i es van tallar les extremitats amb material quirúrgic estèril. Els cossos es submergien en etanol 70% durant un minut per esterilitzar la superfície externa de la pell, i es mantenien en PBS amb 1% d'antibiòtic/antimicòtic (PSA 1%) (PAA Laboratories). Posteriorment es va separar la pell del cos dels ratolins, posant-la amb la dermis cara avall i l'epidermis cara amunt en una placa amb PSA 1%. Un cop es tenien totes les pells es col·locaven d'igual manera en una placa amb medi CnT-02 i Dispasa 2.5 mg/ml (Gibco-Invitrogen), i es col·locaven a la nevera a 4°C durant 4 hores. Transcorregut el temps, amb l'ajut d'unes pinces quirúrgiques es podia separar l'epidermis de la dermis.

Un cop separades les epidermis i posades amb la capa basal tocant el medi i l'estrat corni en contacte amb l'aire, es posaven en una placa amb medi i afegíem una solució de tripsina (Tryple, Invitrogen) diluïda 1:1 amb el medi i es posava la placa a l'incubador durant deu minuts. Transcorregut el temps la suspensió de cèl·lules es posava en un falcon de 50 ml a través d'un filtre de 70 µm de diàmetre de porus (Fisher Scientific) per eliminar corneòcits i restes epitelials, es van fer rentats de les epidermis afegint nou medi per augmentar el nombre de cèl·lules extretes. Un cop teníem tota la suspensió de cèl·lules filtrada es va centrifugar a 1250 rpm durant 5 minuts, es va aspirar el sobrenedant i es va resuspendre el pellet per contar el nombre de cèl·lules i poder sembrar-les a la densitat desitjada en plaques prèviament recobertes amb 7 µg/ml de col·lagen I (Millipore). El cultiu es va mantenir en incubador de 37°C i 5% de CO₂, canviant el medi cada dos dies. A partir del dia 7, el cultiu està format quasi exclusivament per queratinòcits, únic tipus cel·lular capaç de créixer en el medi CnT-02, lliure de Calci i amb factors de creixement específics per la seva proliferació.

5.7 Experiments amb cèl·lules

5.7.1 Recompte cel·lular

Es posaven 10 µl de les cèl·lules en suspensió a la cambra de Neubauer, es contaven les cèl·lules que hi havia en els 4 camps i es feia la mitjana, per saber el nombre de cèl·lules per camp. Es multiplicava la mitjana per 10⁴ per obtenir el nombre de cèl·lules/ml. Per saber el nombre total de cèl·lules es multiplicava la concentració pel volum total en que s'havia resuspès les cèl·lules.

5.7.2 Irradiació cel·lular

Cèl·lules HaCaT i queratinòcits primaris de ratolí sembrats en les plaques de 6 pous o de 24 pous crescuts sobre cobreobjectes de vidre, a dia 7 de cultiu van ser irradiats amb làmpares de radiació UVB (UVP Inc.) o UVC (Sankyo Denki) a una distància de la font d'emissió de 50 cm.

Materials i Mètodes

El monitoratge de la dosi rebuda per les cèl·lules es va fer amb l'ajuda d'un radiòmetre (UVP Inc.) amb sensors per UVB (UVX-31) o UVC (UVX-25).

Es treia el medi dels pous assegurant-se que hi quedava el mínim medi possible, i es posaven les plaques sense la tapa sota la font de radiació UV durant el temps necessari per assolir la dosi desitjada. Un cop aconseguida la dosi es posava medi fresc prèviament atemperat i les cèl·lules es guardaven a l'incubador de 37°C i 5% de CO₂ fins la posterior recollida en els intervals de temps desitjats.

Per l'estudi de mobilització de TREX2 als llocs de lesió en el DNA, es treia el cobreobjecte del pou amb medi i es col·locava, en sec, un tros de paper de filtre amb uns porus de 5 µm de diàmetre directament sobre les cèl·lules (Figura M2). S'irradiaven els cobreobjectes de manera que només passava la llum UV pels forats del porus, creant lesions molt localitzades en el DNA nuclear.

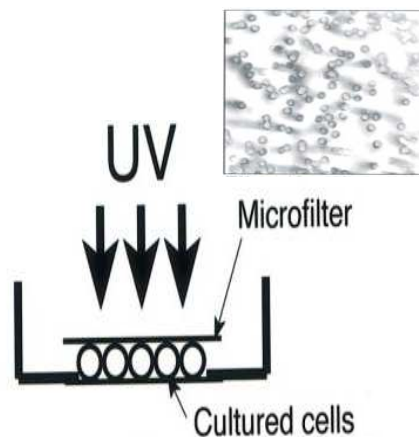


Figura M2. Generació de lesions localitzades en el DNA. Les cèl·lules s'irradien a través d'un filtre de policarbonat de manera que la llum només creua el filtre pels forats de 5 µm (Katsumi *et al.*, 2001).

5.7.3 Expressió heteròloga de TREX2

El cDNA murí i l'humà de les isoformes llarga (L1, corresponent a la forma de 837pb que codifica per una isoforma de 279 aminoàcids) i curta (S, corresponent a la forma de 708pb que codifica per una isoforma de 236 aminoàcids) es va subclonar en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen) o pEGFP-C1 (per l'obtenció d'una proteïna híbrida TREX2-YFP) (Gómez, D. Tesi

doctoral, 2015). Aquests vectors disposen d'un promotor de Citomegalovirus (CMV) que permet una elevada expressió de la proteïna en un ampli rang de cèl·lules de mamífer. Posseeix resistència a l'ampicilina i un lloc de clonatge múltiple on es pot insertar la seqüència del gen que es vol expressar. També disposa d'un gen que li confereix resistència a la neomicina i els seus derivats, gràcies al qual es pot fer la selecció d'aquelles cèl·lules transfectades de forma estable. La transfecció del DNA plasmídic en cèl·lules eucariotes es va fer usant el reactiu Lipofectamine-LTX (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant. Aquest reactiu facilita la formació de complexos entre lípids i el DNA amb molt poca toxicitat per la cèl·lula.

Cèl·lules HaCaT es van sembrar en plaques de 24 pous, 5000 cèl·lules/pou. La transfecció es va fer quan el cultiu arribava al 60-70% de confluència. Es va canviar el medi per medi sense antibiòtic. Es van preparar els complexos barrejant 1µg de DNA plasmídic en 100µl de medi Opti-MEM (Invitrogen) sense antibiòtic ni FBS i després es va afegir 1 µl de Lipofectamina, es va barrejar suaument i es va deixar 30 minuts a temperatura ambient. Per als controls es va utilitzar el plàsmid sense insert. Després es va afegir la solució de complexos directament als pous amb les cèl·lules, i es van deixar les plaques 24 hores a l'incubador de 37°C i 5% de CO₂. L'endemà el medi es va canviar per medi fresc DMEM suplementat amb 10% FBS i antibiòtic.

Per la selecció dels clons amb expressió estable de les proteïnes TREX2 i YFP, es van tractar les cèl·lules afegint al medi G418 (100 µg/mL; Sigma). Les cèl·lules supervivents al cap de 7 dies es van tripsinitzar i es van passar pel MoFlo Astrios (Beckman Coulter) per separar i seleccionar aquelles que tenien una major expressió, d'aquesta manera es va obtenir uns cultius amb una expressió relativament homogènia dels inserts.

5.7.4 Anàlisi de la formació de colònies

Aquest assaig es va fer en queratinòcits primaris de ratolí i de la línia humana HaCaT. El comptatge de colònies formades a partir de cèl·lules individuals dona informació sobre la capacitat de supervivència de les cèl·lules front estímuls.

Materials i Mètodes

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 6 pous a una densitat de $2,5 \times 10^5$ cel/ml pel que fa als queratinòcits de ratolí primaris o 10.000 cel/ml les HaCaT-YFP i HaCaT-YFP-TREX2. L'endemà de la sembra es van irradiar amb les dosis desitjades d'UV i es van mantenir en cultiu durant 10 dies perquè les cèl·lules que resistissin la irradiació poguessin créixer i formar clons. Transcorreguts els 10 dies, es va retirar el medi dels pous, es van rentar dos cops amb PBS i es va afegir una solució de 0.5% de blau de metilè en aigua i etanol al 50%. Es van mantenir les plaques amb la solució de tinció durant 20 minuts en agitació a temperatura ambient, i després es van rentar dos cops amb aigua. Es van deixar assecar les plaques i després es van contar les colònies de cada pou.

5.7.5 Anàlisi del cicle cel·lular

Queratinòcits primaris de ratolí es van sembrar en plaques de 6 pous. A dia 7 de cultiu es van irradiar amb UVB, UVC o es van deixar sense irradiar. Passades 18 hores de la irradiació, es van desenganxar de la placa amb Tripsina, es van centrifugar a 1250 rpm durant 5 minuts per rentar la tripsina i el pellet de cèl·lules es va fixar amb etanol al 80% afegint-lo gota a gota, vortejant el vial de cèl·lules suaument perquè amb la fixació no es fessin agregats. Un cop fixades les cèl·lules es guardaven a -20°C fins el posterior anàlisi. El dia anterior a l'anàlisi, els vials amb cèl·lules es van centrifugar i es van rentar amb PBS, afegint en l'últim rentat una solució de PBS amb 20 $\mu\text{g/ml}$ de iodur de propidi (Sigma) i 1% de tritó X-100 (Biorad). Les cèl·lules es van incubar tota la nit a 4°C . El dia següent es va afegir RNAsa 10 $\mu\text{l/ml}$ (Sigma) i es va deixar actuar durant 30 minuts. Les mostres es van analitzar per citometria de flux (FACSCanto II, Becton Dickinson).

5.7.6 Anàlisi de l'apoptosi

L'apoptosi es va determinar amb els kits *Annexin V-FITC Apoptosi Detection kit* (eBioscience) i el reactiu *LIVE_DEAD-Far Red* (Life Technologies) i *Cell death Detection ELISAPLUS*, 10X (Roche, Mannheim, Alemanya), que ens permetien determinar els estadis d'apoptosis i l'alliberació de DNA nucleosomal al citoplasme, respectivament.

Queratinòcits de ratolí en cultiu de dia 7 es van irradiar amb UV. Passades 18 hores de la irradiació, es va treure el medi dels pous i es va afegir la solució de tinció d'*Annexin V-FITC* i *Live_DEAD-Far Red* al pou per evitar el marcatge de cèl·lules que perdessin l'integritat de la membrana com a resultat de la tripsinització. Assenyalar que els queratinòcits primaris són altament resistents a la tripsinització. Les cèl·lules es van deixar tenyir durant 10 minuts a l'incubador, i posteriorment es van fer 3 rentats de cada pou amb PBS. Després es va afegir tripsina per obtenir una solució de cèl·lules i es van analitzar les cèl·lules marcades per citometria de flux (FACSCanto II, Becton Dickinson).

Les cèl·lules *Annexin V-FITC* positives corresponien a les apoptòtiques tempranes i les doble positives per *Annexin V-FITC* i *LIVE_DEAD-Far Red* corresponien a les apoptòtiques tardanes.

La detecció de l'apoptosi mitjançant el kit *Cell death Detection ELISAPLUS*, 10X (Roche, Mannheim, Alemanya), es basa en la detecció dels mono- i oligonucleosomes presents en la fracció citosòlica de les cèl·lules en apoptosi, utilitzant anticossos monoclonals contra DNA i contra histones.

Es van sembrar queratinòcits de ratolí en plaques de 96 pous, a una densitat de 10.000 cèl·lules/pou, en arribar a dia 7 de cultiu es van irradiar amb UVB i passades 18 hores es van lissar. En alguns pous es va afegir Z-VAD-FMK, que és un inhibidor de les caspases, una hora abans de la irradiació. Els lisats citosòlics es van transferir a una placa recoberta d'estreptavidina i es van incubar 1 hora amb una barreja d'anticossos anti-histona-biotina i anti-DNA-peroxidasa. Es van rentar els pous per eliminar l'excés d'anticòs i es va afegir el substrat per la peroxidasa ABST. L'absorbància dels pous es va llegir en un espectrofotòmetre (Tecan Infinite 200).

5.7.7 Quantificació de la incorporació de Timidina tritiada no programada

Per l'anàlisi de síntesi de DNA no programada (UDS, uncheduled DNA synthesis) en resposta a la radiació UV, es va utilitzar 3H-Timidina seguint protocols estandaritzats. Queratinòcits primaris de ratolí es van sembrar en plaques de 24 pous, a una densitat de 40.000 cèl·lules/pou i es van deixar créixer fins a dia 7. En aquest punt, es va canviar el medi complet per medi sense

Materials i Mètodes

suplements, per no estimular la divisió cel·lular, i amb *hydroxyurea* (OHU) 20 mM durant 3 hores. La OHU inhibeix l'enzim *dihydrophosphate reductase*, encarregat de la síntesi de deoxiribonucleotids necessaris per la síntesi de DNA. Amb la OHU aconseguim que la cèl·lula aturi la divisió, i que només pugui incorporar els nucleòtids de Timidina marcats radioactivament que li afegim al medi en processos de síntesi de DNA associat a la reparació.

Passades les 3 hores amb OHU, es treia el medi i irradiàvem les cèl·lules amb la dosi desitjada de UVB o UVC. Un cop irradiades els posàvem més medi sense suplement amb OHU 20 mM i Timidina tritiada (20 mCi/ml) durant 4 hores. Es van fer 3 rentats amb PBS i es van fixar amb 1 ml/pou de metanol fred deixant la placa tota la nit a 4°C. L'endemà es van fer 3 rentats de 0.5 ml amb 10% Àcid Tricloroacètic (TCA) (Sigma) i seguidament es van posar 0.5 ml/pou de SDS 1%-NaOH 0.3% i es van deixar 10 minuts a l'agitador. Per acabar es van posar 0,4 ml del lisat de cada pou en un vial de centelleig (Kartell S.p.A., Milan, Italia) amb 4 ml de líquid de centelleig (EcoLite), es van vortejar 5 segons i es van posar en una màquina per la quantificació (β TriCarb 2900).

5.7.8 Immunocitofluorescència (ICF)

Es van sembrar les cèl·lules en plaques de 24 pous que contenien cobreobjectes. En el cas dels queratinòcits primaris de ratolí, havien d'estar tractats amb col·lagen I. Un cop arribaven a la confluència desitjada, s'irradiaven globalment a través d'un filtre de porus de 5 μ m de diàmetre o es deixaven sense irradiar. Passades 18 hores de la irradiació, es va treure el medi i es van rentar 2 cops amb PBS. Es van fixar durant 15 minuts a temperatura ambient afegint paraformaldehid al 4% al mateix pou. Després es van rentar 2 cops amb PBS i es va afegir tritó X-100 (Fluka Biochemika) al 0,1% durant 10 minuts per permeabilitzar les membranes. Passat el temps es van rentar 2 cops amb PBS i es van bloquejar les unions inespecífiques amb solució de bloqueig (FBS al 20% en PBS) durant 1 hora a temperatura ambient. La solució d'anticòs primari es va fer amb l'anticòs corresponent a la concentració indicada pel fabricant, diluint-lo en solució de bloqueig. A la taula M2 s'indiquen les dilucions dels anticòsos emprats. Després del bloqueig es van passar els cobreobjectes, amb les cèl·lules a la cara de dalt, a una cambra humida per evitar la dessecació de la solució d'anticòs, ja que es van fer servir volums de 25 μ l

per cada cobreobjectes. Es va afegir la solució d'anticòs primari sobre el cobreobjectes i es va deixar a les fosques durant 1 hora a temperatura ambient. Tot seguit es van passar de nou els cobreobjectes a la placa de 24 pous per fer 3 rentats amb PBS, i es van tornar a la cambra humida per afegir la solució d'anticòs secundari (anticòs diluït en solució de bloqueig). Passats 30 minuts els cobreobjectes es van tornar a passar a la placa per fer 3 rentats amb PBS.

Finalment es va fer una incubació de 15 minuts amb DAPI (1/20.000 en PBS, SIGMA) o DRAQ5 (1/2000 en PBS, Biostatus). Es van rentar un cop més amb PBS i es van col·locar amb les cèl·lules cap per avall sobre una gota de solució de muntatge ProLong Gold (Invitrogen) en un portaobjectes. Es van deixar assecar protegits de la llum i es van analitzar al microscopi de fluorescència.

En aquells casos en que es volia marcar amb TUNEL, abans de la incubació amb anticossos, es va utilitzar el kit *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche) seguint les instruccions del fabricant.

Anticossos primaris	Origen	Dilució	Distribuidor
mTREG2	Conill	1/50	Generat al laboratori
Involucrina	Ratolí	1/200	Acris
Rad51	Conill	1/100	Santa Cruz
γ H2AX	Ratolí	1/500	Upstate
K10	Ratolí	1/200	Abcam
hTREG2	Conill	1/100	Cedit pel Dr. Perrino
Anticossos secundaris			
Anti-rabbit-555	Cabra	1/500	Life technologies
Anti-rabbit-488	Cabra	1/500	Life technologies
Anti-mouse-555	Cabra	1/500	Life technologies
Anti-mouse-488	Cabra	1/500	Life technologies

Taula M2. Anticossos utilitzats per ICF. S'indica l'origen i les dilucions emprades.

5.7.9 Anàlisi dels micronuclis

Els micronuclis són marcadors d'exposició a genotòxics, indiquen inestabilitat cromosòmica i són presents en elevada freqüència en tumors. S'ha desenvolupat una metodologia pel comptatge dels micronuclis de les cèl·lules anomenada "*Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*", àmpliament utilitzada per conèixer el grau d'exposició a genotòxics de les persones o la toxicitat de certs fàrmacs en el genoma (Fenech, 2007). Aquesta tècnica utilitza cèl·lules en cultiu tractades amb genotòxics i *cytochalasin-B* (Cyt-B), que és un inhibidor de l'ensamblatge dels microfilaments de l'anell contràctil en la citoquinesis. El resultat són cèl·lules binucleades que, si han sofert dany al DNA, presenten micronuclis. Comptant només els micronuclis de les cèl·lules binucleades podem avaluar l'efecte genotòxic del fàrmac, ja que d'aquesta manera només contem els micronuclis de nova formació, causats pel tractament, excloent els micronuclis basals del cultiu.

Queratinòcits primaris de ratolí es van sembrar en plaques de 24 pous que contenien cobreobjectes col·lagenats. A dia 7 de cultiu es van irradiar amb UVB i es van tractar amb Cytochalasin-B (Cyt-B, 0,5 µg/mL, Sigma) quan s'indica o es van deixar sense irradiar. Al cap de 18 hores es van fixar i es van processar per immunocitofluorescència per detectar TREX2 i γH2AX. Es va comptar al microscopi, la presència de cèl·lules amb micronuclis en més de 1000 cèl·lules per condició i es va calcular:

$$\text{- Percentatge de cèl·lules amb micronuclis (MN)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cèl·lules amb MN} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de cèl·lules analitzades}}$$

$$\text{- Percentatge de cèl·lules binucleades (BN) amb MN} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cèl. BN amb MN} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de cèl·lules analitzades}}$$

$$\text{- Percentatge de MN positius per TREX2} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de MN TREX2} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de MN}}$$

- Percentatge de MN positius per γ H2AX = $\frac{\text{n}^\circ \text{ de MN } \gamma\text{H2AX} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de MN}}$

- Percentatge de MN per TREX2 i γ H2AX = $\frac{\text{n}^\circ \text{ de MN TREX2 i } \gamma\text{H2AX} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de MN}}$

5.8 Microscòpia i captació d'imatges

Tant per les fotos de camp clar com per les de fluorescència es va utilitzar el microscopi Nikon E-800. Per els estudis de col·localització es va utilitzar el microscopi confocal de rastreig (Leica TCS-SL filter-free, Leica Microsystems, Germany). Les imatges es van processar amb el software ProgRes CapturePro (Jenoptik) i LSC Lite (Leika).

5.9 Anàlisi de proteïnes

5.9.1 Preparació d'extractes proteics

Lisats totals de cèl·lules i de pell es van generar en tampó de lisis (1% Nonidet P-40, 1% deoxycholate, 0,1% SDS, 50 mmol/L HEPES pH 7,5, i 150 mmol/L NaCl,) amb inhibidors de proteases (10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 86 μ g/ml iodoacetamide, 1 mM PMSF i 1 mM Na_3VO_4) a 4°C. Les cèl·lules crescudes en plaques es van rentar 2 cops amb PBS i se'ls va afegir el tampó de lisis directament al pou, es van rascar per tal d'optimitzar la recol·lecta de material cel·lular amb un "scraper" (Nunc) i es va traspasar el lisat a un eppendorf. Pel que fa als teixits, fragments de pell es van pulveritzar amb l'ajuda d'un morter i nitrogen líquid, es va recollir la pols en un tub i s'hi va afegir el tampó de lisis.

Els tubs amb els lisats es van deixar girant en un orbital a 4°C durant 15 minuts, després es van centrifugar a 4°C a màxima velocitat, el sobrenedant es va passar a un nou tub i es van guardar a -80°C fins el seu anàlisi.

Materials i Mètodes

Per l'anàlisi d'histones, al pellet de material insoluble que ens quedava després de centrifugar, vam afegir 0.2 M de HCl i vam deixar els tubs de nou en l'orbital a 4°C durant 15 minuts. Després vam tamponar la solució amb Tris-HCl 1,5 M pH 7,5.

Els extractes per les immunoprecipitacions i els assajos de *pull-down* es van obtenir en tampó de lisis (1% NP-40, 10% glicerol, 50 mM/L HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl) amb els inhibidors de proteïnes mencionats abans, a 4°C.

5.9.2 Quantificació de proteïnes

Els lisats es van mantenir en gel per la quantificació de la proteïna amb el mètode BCA (Thermo scientific). Es va posar 1 µl dels lisats en una placa de 96 pous, i s'hi va afegir 200 µl de la solució de BCA, es va deixar 30 minuts a 37°C i es va llegir la concentració pel mètode de l'absorbància de 595 nm en un espectrofotòmetre (Tecan Infinite 200). Un cop quantificades, es va ajustar la concentració de les mostres afegint més tampó de lisis amb inhibidors a les més concentrades per igualar-les. En alguns casos es van fer *pools* de les mostres ajuntant els lisats individuals de cada un dels grups experimentals.

5.9.3 Immunoprecipitació i *pull-down*

Es va fer servir *Dynabeads Protein A* (Lifetechnologies), per unir 10 µg d'anticòs en 50 µl de *beads*, es van rentar i es van incubar amb 1 mg d'extractes proteics en un orbital en rotació durant 2 hores a 4°C. Pels estudis de co-immunoprecipitació, 1 mg de proteïna d'extractes no irradiats o irradiats amb UVB de cèl·lules HaCaT-YFP i HaCaT-YFP-TREX2 es van incubar amb anticòs anti-GFP crosslinkat a *beads* magnètiques (MBL). Es van incubar en un orbital en rotació durant 2 hores a 4°C. Pels *pull-down*, 2 mg de proteïna d'extractes no irradiats o irradiats amb UVB de cèl·lules de queratinòcits de ratolí es van incubar amb proteïna MBP o MBP-TREX2 unides a *beads* magnètiques d'amilosa (New England Biolabs). Es van incubar en un orbital en rotació durant 2 hores a 4°C.

Passat el temps d'incubació es van rentar les beads amb el tampó de rentat (20 mM HEPES pH 7.5, 0.1% Nonidet P-40, 10% glicerol, i 150 mM NaCl) i es van eluir els complexos proteïna anticòs amb tampó Laemmli durant 5 minuts a 100°C. Un cop separat l'eluit de les *beads* magnètiques es va fer l'electroforesi.

5.9.4 Electroforèsi en gels d'acrilamida, transferència i Western blot

Les mostres en tampó Laemmli (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.7% β -mercaptoetanol, 10% glicerol, traces de blau de bromofenol i aigua) es van bullir a 95 °C durant 5 minuts. La separació de les proteïnes es va fer per electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic (SDS-PAGE), amb el sistema Mini-Protean 3 (BioRad- Laboratories). Segons la mida de les proteïnes d'interès es van preparar gels de diferents percentatges d'acrilamida. Es van carregar les mostres als gels i es va fer l'electroforesi en tampó SDS-PAGE (25 mM Tris, 192 mM glicina i 0.1% SDS) a 110V constants. Un cop separades les proteïnes del gel es van transferir a membranes de PVDF (BioRad) prèviament activades amb metanol. La transferència es va fer en tampó de transferència (25mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol i aigua bidestil·lada) a 100V constants durant 90 minuts a 4°C. Un cop transferides les proteïnes, les membranes es van rentar 2 vegades durant 5 minuts amb TBS-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 0.05% Tween-20), i es van bloquejar les unions inespecífiques durant 1 hora a temperatura ambient amb llet desnatada al 5% en TBS-T. Després es van fer 3 rentats de 5 minuts amb TBS-T i es van incubar amb solució d'anticòs primari (anticòs diluït en TBS-T i NaAz al 0.02%) durant 90 minuts a temperatura ambient o a 4°C tota la nit. Els anticossos utilitzats es mostren a la Taula M3. En acabat es van fer 3 rentats de 5 minuts amb TBS-T i es van incubar amb la solució d'anticòs secundari (anticòs diluït en TBS-T sense NaAz) durant 45 minuts a temperatura ambient. Es van rentar 5 cops amb TBS-T durant 5 minuts i es van posar al *cassette* per revelar. Finalment se'ls va afegir a sobre el substrat de la HRP *EZ-ECL Chemiluminescence Detection Kit for HRP* (Biological Industries), i es va deixar desenvolupar la reacció en la cambra fosca en contacte amb films fotosensibles (Kodak) durant els temps d'exposició necessaris per veure els resultats. En el cas de les mostres de psoriasi, per comprovar l'especificitat de l'anticòs anti-hTREG2, es va preincubar el sèrum de l'anticòs amb proteïna recombinant hTREG2 durant 1 hora a 4°C, després es va preparar la solució d'anticòs

Materials i Mètodes

primari, afegint TBS-T a aquesta mescla i es van incubar les membranes. En el revelat, les bandes específiques de hTRES2 de la membrana no apareixien, perquè competien per l'anticòs amb la proteïna recombinant, i les inespecífiques sí.

Anticossos primaris	Tipus	Origen	Dilució	Pes molecular (kDa)	Distribuidor
TRES2	Policlonal	Conill	1/1000	28	Generat al lab.
γ H2AX (Ser139)	Monoclonal	Ratolí	1/1000	17	Upstate
H2AX	Policlonal	Conill	1/1000	17	Abcam
STAT1(Tyr701)	Monoclonal	Conill	1/1000	84, 91	Cell signaling
STAT3 (Tyr705)	Monoclonal	Conill	1/1000	79, 86	Cell signaling
p53 (Ser15)	Policlonal	Conill	1/1000	53	Cell signaling
Caspasa 3	Policlonal	Conill	1/1000	35, 19, 17	Cell signaling
I κ B- α	Policlonal	Conill	1/1000	35, 41	Santa Cruz
PCNA	Monoclonal	Ratolí	1/1000	37	BD
β Actina	Monoclonal	Ratolí	1/10.000	45, 50	Sigma
Involucrina	Monoclonal	Ratolí	1/3000	170	Sigma
GFP	Policlonal	Conill	1/2000	27	Roche
PARP (p85)	Policlonal	Conill	1/1000	89	Cell signaling
IL18	Policlonal	Conill	1/200	18	Santa Cruz
Ly-6G	Policlonal	Conill	1/100	15-25	Biorbyt
NOS2	Policlonal	Conill	1/200	130	Santa Cruz
hTRES2	Policlonal	Conill	1/2000	28	Cedit per F. Perrino
Anticossos secundaris					
Anti-mouse HRP	Policlonal	Conill	1/10.000		Biorad
Anti-Rabbit HRP	Policlonal	Cabra	1/10.000		Biorad
A/G HRP	-	-	1/20.000		Pierce

Taula M3. Anticossos emprats en l'anàlisi per western blot. S'indica el tipus i dilucions. Quan l'antigen és humà es precedeix el nom amb la lletra h, d'humà. Si no s'indica, l'antigen és murí.

5.10 Anàlisi del RNA

5.10.1 Purificació de RNA i transcripció reversa (RT)

El RNA total de teixits o cèl·lules s'es va aïllar amb el kit comercial d'extracció de RNA *NucleoSpin RNA/Protein* (Macherey-Nagel) seguint les especificacions de la casa comercial.

Les mostres de pell es van homogeneïtzar amb l'ajuda d'un morter en presència de nitrogen líquid. Es posava el teixit al morter, s'abocava nitrogen líquid i es pulveritzava mecànicament, tot seguit es recollia la pols en un tub amb l'ajuda d'una espàtula i s'hi afegia tampó de lisis.

Per l'aïllament de RNA de cèl·lules, els pous on havien crescut les cèl·lules es rentaven amb PBS dos cops i s'afegia el tampó de lisis al pou mateix, després es recollia el lisat amb l'ajuda d'una pipeta i es procedia a la purificació del RNA.

Un cop purificat es quantificava amb un espectrofotòmetre Nanodrop amb el *software* Nanodrop ND-1000 3.3, després s'ajustaven les concentracions. Per la conversió del RNA en cDNA es va fer una reacció de retrotranscripció amb el *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Life technologies) segons instruccions del comercial. Per la reacció es va usar 1µg de RNA.

En el cas de les mostres humanes, per millorar la sensibilitat i la detecció en la qPCR, vam utilitzar primers específics per TREX2 (hTX704R: GCAATACTAGGGCACCAGAC) i per HPRT (hHPRTR: AGACGTTTCAGTCCTGTCCATAA) en la retrotranscripció (RT) en lloc dels *random* primers i els oligo dT.

El programa de temperatures utilitzat va ser: 25°C durant 10 min, 37°C durant 120 min, 85°C durant 5 min i 4°C indefinidament. Un cop acabat el programa ja teníem el cDNA per analitzar mitjançant qPCR.

5.10.2 Anàlisi de l'expressió gènica per PCR quantitativa (qPCR)

La qPCR permet analitzar perfils d'expressió gènica avaluant l'abundància relativa dels transcrits per determinar patrons d'expressió entre mostres. Els nivells d'expressió es van normalitzar amb els nivells de gens amb expressió constitutiva com HPRT, SDHA o β Actina. Les amplificacions del cDNA es van fer amb SYBR *Green* o sondes TaqMan (Applied Biosystems) segons instruccions del fabricant amb un volum final de reacció de 5 μ l. Les sondes i primers utilitzats es mostren a la taula M4 i taula M5 respectivament. Com a controls negatius es van usar mostres en que en el moment de la transcripció reversa no se'ls va afegir enzim sinó aigua.

Les reaccions de qPCR es van desenvolupar en un equip Real Time ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). El programa utilitzat per l'amplificació de la qPCR consisteix en: 1 cicle de 2 minuts a 50°C; 1 cicle de 10 minuts a 95°C; 40 cicles de 15 segons a 95°C i 60 segons a 60°C; 1 cicle final de 15 segons a 95°C, 15 segons a 60°C i 15 segons a 95°C.

La quantitat de producte fluorescent es determina al final de cada cicle, mitjançant lectura única. El software SDS 2.2.2 (Applied Biosystems) es va usar per determinar els punts de creuament (C_p , crossing points), corresponents al nombre de cicles en que la fluorescència del pou supera un llindar predeterminat. Els C_p superiors a 40 queden fora del límit de sensibilitat del sistema. L'expressió relativa (R) dels gens analitzats es va calcular en base a la eficiència d'amplificació, i la diferència de C_p entre mostres control i mostres problema, segons la fórmula:

$$R = E (\text{problema})^{\Delta C_p (\text{control-mostra})} / E (\text{normalitzador})^{\Delta C_p (\text{control-mostra})}$$

On E és l'eficàcia d'amplificació i ΔC_p la diferència entre el valor de C_p del control respecte la mostra.

Gen	Referència	Gen	Referència
CAMP	Mm00438285_m1	Loricrin	Mm01219285_m1
CCL5	Mm01302427_m1	MPO	Mm01298424_m1
CCL20	Mm01268754_m1	Mx1	Mm00487796_m1
CXCL10	Mm00445235_m1	SDHA	Mm01352366_m1
IFN α	Mm03030145_gH	TGF β	Mm00441724_m1
IFN β	Mm00439552_s1	TNF α	Mm00443258_m1
IFN γ	Mm00801778_m1	TREX2	Mm04210320_m1
IL1 α	Mm00439620_m1	hTREX2 (S)	Hs01095167_g1
IL1 β	Mm00434228_m1	hHPRT1	Hs01003267_m1
IL10	Mm00439616_m1	hBActin	Hs99999903_m1
II1RA	Mm004466186_m1		

Taula M4 Gens i números de referència de les sondes TaqMan (Applied Biosystems) utilitzats per les qPCR. Totes les sondes detecten ratolí, excepte les que tenen una h davant, que reconeixen humà.

Gen	Primer forward	Primer reverse
IL12 α	GTACCAGACAGAGTTCCAGG	CGCAGAGTCTCGCCATTATG
IFN κ	CTGACAGTCTACCTGGAGTTG	GTTCTTGCTTGAAGGTGGGTG
iNOS	CTCGGAGGTTACCTCACTG	GTGCTGCAGACACCATGGTG
IRF7	GAGCAAGACCGTGTTTACG	CATGATGGTCACATCCAGG
Raet1e	AGCAGTGACCAAGCGCCATC	CCTTGATGGTCAAGTTGCAC
mKRT10	GTACGAGAAGCATGGCAAC	GGCATTGTCAATCTGCAGC
mIL17a	CAGAAGGCCCTCAGACTAC	CAGCTTCCCTCCGCATTG
mIL23a	CAAGGACTCAAGGACAACAG	GGTGTGAAGTTGCTCCATG
INV	TCTCCCTCCTGTGAGTTTG	CTTGTTCCCTGCTGGATATG
hTREX2 (L1)	GATCGAGTTGGCCGAGGATG	CAGGAAGACAAAGGTCTCGG

Taula M5. Gens i seqüència de primers de usats per la qPCR amb SYBR Green (Applied Biosystems). Totes els primers reconeixen ratolí, excepte les que tenen una h davant, que reconeixen humà.

5.11 Anàlisi estadístic

Tots els anàlisis estadístics van ser realitzats amb el software Graphpad Prism 5. El test de Mann-Whitney es va aplicar per l'estudi de la multiplicitat de tumors a punts temporals concrets i per comparar entre genotips o condicions experimentals. La incidència de tumors es va analitzar aplicant la *Log-rank* (Mantel-Cox). El test de la *t* de Student no aparellat es va aplicar per l'estudi de les dades en queratinòcits. Associacions entre l'expressió de TREX2 i variables categòriques dels SCC es van analitzar pel mètode de la X^2 i el test exacte de Fisher segons el cas. Tots els tests van ser de dues cues. Les dades s'expressen com la mitjana \pm SEM (error estàndard de la mitjana). Els p valors de ≤ 0.05 es van considerar estadísticament significatius.

6 Resultats

6.1 Paper de TREX2 en la carcinogènesi de pell

6.1.1 L'expressió de TREX2 a la pell es regula per la radiació UVB i està alterada en les queratosis actíniques i els SCC

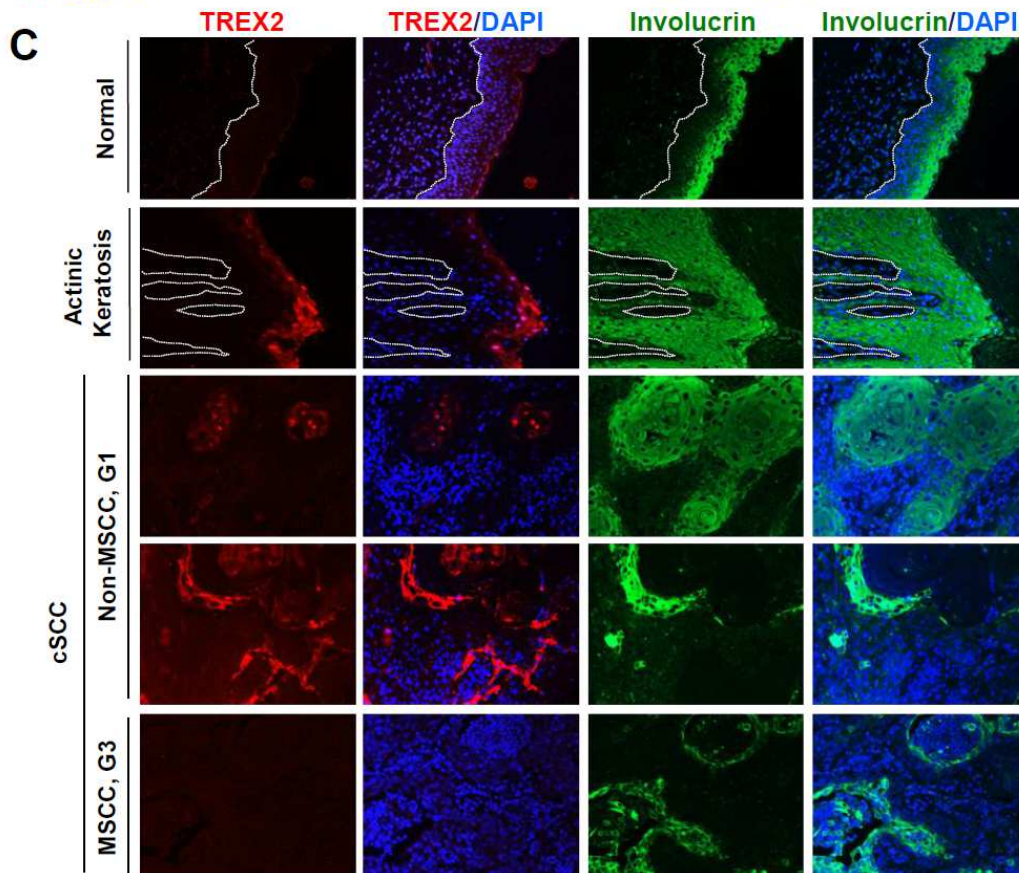
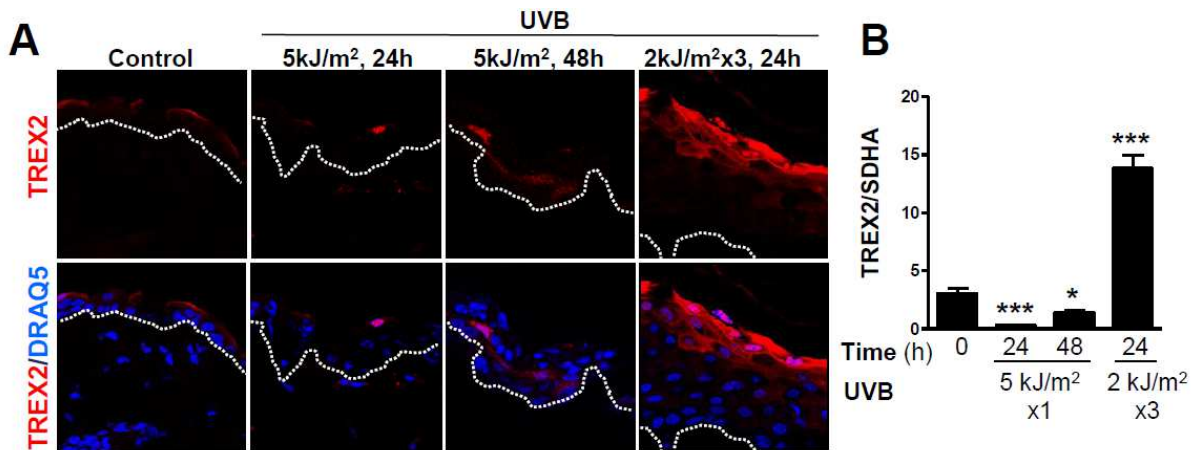
Per determinar si *TREX2* era un dels múltiples gens diana de la radiació UVB, vam analitzar la seva expressió en pell de ratolí després d'una irradiació aguda (5 kJ/m², una vegada) i crònica (2 kJ/m², repetida 3 vegades en dies alternatius). Curiosament, la irradiació aguda amb llum UVB disminueix de forma transitòria els nivells de mRNA de *TREX2*, mentre que la irradiació crònica en fa incrementar molt la seva expressió, com reflexen les dades d'immunofluorescència (Fig. R1A) de RT-qPCR (Fig. R1B). L'expressió de *TREX2* es detecta principalment en les capes suprabasals de la pell on els queratinòcits estan més diferenciats. L'estrat corni i la capa granular confereixen propietats físiques i bioquímiques a la pell per aconseguir funcions de barrera (Candi *et al.*, 2005). Paral·lelament, en els cultius primaris de queratinòcits humans s'observa que els que presenten un marcatge de *TREX2* més intens, són els que també presenten més marcatge d'Involucrina (Fig. R2A), un marcador de diferenciació dels queratinòcits (Watt, 1983). Així doncs, l'expressió de *TREX2* està regulada per la radiació UVB i al llarg del procés de diferenciació dels queratinòcits.

Els SCC són els càncers epitelials més freqüents en humans. Encara que els SCC de diferents llocs mostren varies associacions epidemiològiques, s'originen pel trencament de l'homeòstasi dels queratinòcits (Oberszyn, 2008; Leemans *et al.*, 2011). L'estudi de *TREX2* mitjançant immunohistofluorescència de mostres humanes de lesions precanceroses (queratosis actínica) i tumors derivats de queratinòcits, incloent SCC cutanis (cSCC) (Fig. R1C) i de cap i coll (HNSCC) (Taula R1), revela que en la carcinogènesi de tumors escamosos *TREX2* pateix una desregulació de l'expressió. La senyal de *TREX2* en la pell normal es detecta principalment en la capa granular de l'epidermis. Ara bé, en les lesions de queratosis actínica, l'expressió es detecta en més capes de l'epidermis mostrant predominantment una localització nuclear. Els patrons de localització i els nivells d'expressió de *TREX2* en cSCC varien en funció del grau de diferenciació tumoral i característiques metastàsiques. Així, el marcatge de *TREX2* exhibeix patrons heterogenis al llarg del tumor, però sent relativament més intens en àrees diferenciades

Resultats

principalment de tumors ben diferenciats i no metastàsics. A més a més, es pot detectar un intens marcatge en l'estroma associat al tumor en un grup significatiu de cSCC no metastàsics. Per altra banda, la pèrdua d'expressió de TREX2 està associada als cSCC metastàsics i tumors poc diferenciats. Anàlogament, en HNSCC, que són induïts principalment per genotòxics ambientals, la pèrdua d'expressió d'aquesta exonucleasa la trobem significativament associada amb la metàstasi nodal i estadis avançats de la malaltia (Taula R1).

Figura R1. L'expressió de TREX2 augmenta en les pells irradiades amb UVB crònicament i les queratosis actíniques mentre que disminueix o es perd en els cSCC. (A) Immunotinció de TREX2 en les pells de ratolí i **(B)** expressió del mRNA en les pells tractades amb radiació UVB de forma aguda (5 kJ/m²) o crònica (2 kJ/m² X 3). El gràfic mostra la mitjanana i la SEM d'almenys 5 ratolins. Diferències entre pells tractades i no tractades: test de la *t* de Student (*, P < 0.05; ***, P < 0.001). **(C)** Expressió de TREX2 en la pell humana sana, queratosis actínica i cSCC determinada per IHF. Nuclis tenyits amb DRAQ5 o DAPI com s'indica. Les línies blanques discontinües indiquen el límit entre epidermis i dermis. Magnificació original, 40x (A) i 20x (C). **(D)** Avaluació de l'expressió en cSCC segons les característiques de diferenciació i metàstasi. P valors del test de la Xi-quadrat estan indicats.



D

cSCC characteristics	N	Loss of TREX2 expression		Stromal TREX2 expression	
		n (%)	P	n (%)	P
Metastatic features					
Non-metastatic SCC (Non-MSCC)	47	8 (17)	<0.0001	15 (32)	0.0001
Metastatic SCC (MSCC)	46	32 (69)		3 (7)	
Metastasis	47	35 (74)		2 (4)	
Differentiation Grade					
Well-differentiated (G1)	29	6 (21)	0.0005	7 (24)	0.3937
Moderately Differentiated (G2)	54	32 (59)		8 (14)	
Poorly Differentiated (G3)	10	8 (80)		3 (30)	

A

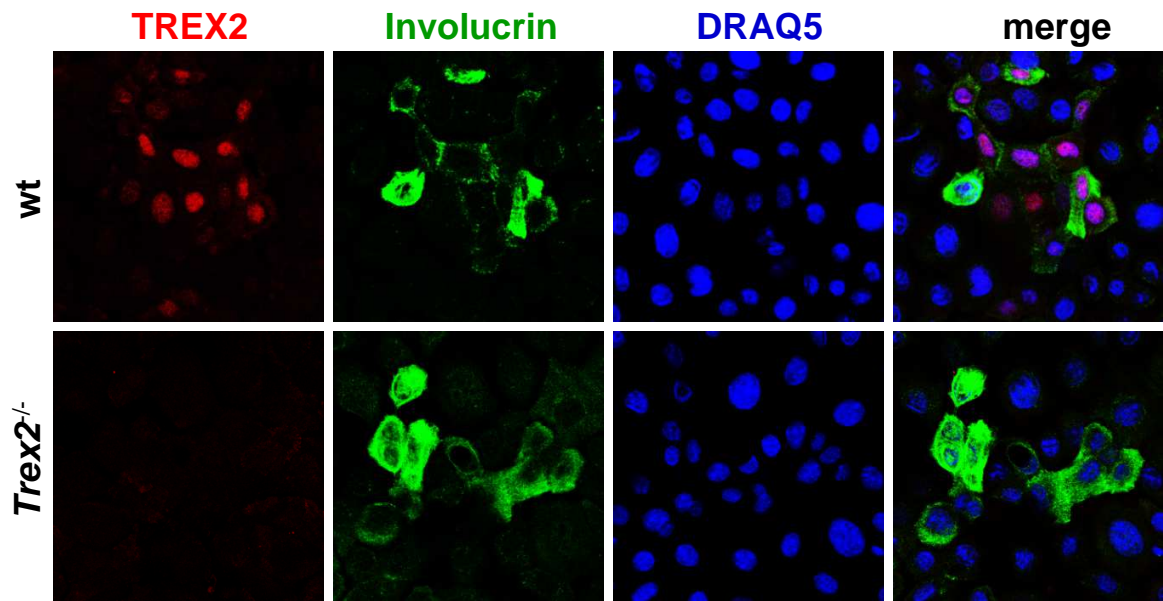


Figura R2. Expressió de TREX2 a queratinòcits de ratolí. (A) Queratinòcits de ratolí wt o *Trex2*^{-/-} marcats amb anticossos contra TREX2 i involucrina. Nuclis marcats amb DRAQ5. Magnificació original 63x.

HNSCC Characteristic	Loss of TREX2 expression		P	Stromal TREX2 expression	
	N	n (%)		n (%)	P
<u>pT classification</u>					
T1-T2	41	28 (68)	0.719 [#]	12 (29)	0.251 [#]
T3	47	35 (74)		7 (15)	
T4	45	34 (76)		9 (20)	
<u>pN classification</u>					
N0	44	26 (59)	0.014 ^{&}	14 (32)	0.042 ^{&}
N1-3	89	71 (80)		14 (16)	
<u>Disease stage</u>					
I-II	19	10 (53)	0.048 ^{&}	8 (42)	0.029 ^{&}
III-IV	114	87 (76)		20 (18)	
<u>Pathological grade</u>					
Well-differentiated	38	28 (74)	0.323 [#]	8 (21)	0.207 [#]
Moderately Differentiated	59	46 (78)		9 (15)	
Poorly Differentiated	36	23 (64)		11 (31)	
<u>Site</u>					
Pharynx	65	51 (78)	0.177 ^{&}	12 (18)	0.528 ^{&}
Larynx	68	46 (68)		16 (24)	

Taula R1. Relació entre l'expressió de TREX2 i els caràcters clinicopatològics dels pacients amb HNSCC. Nombre i percentatge de tumors amb guanys o pèrdues d'expressió de TREX2 en l'epiteli escamós, o el guany d'expressió de TREX2 en l'estroma associat als tumors. Anàlisi estadístic amb el test de la [#]Xi-quadrat i el test exacte de [&]Fisher.

6.1.2 La deleció de *Trex2* augmenta la susceptibilitat a la tumorigènesi induïda per la radiació UVB

La deleció de *Trex2* en ratolins provoca un augment de la susceptibilitat de tumors induïts en pell pel genotòxic DMBA (Parra *et al.* 2009). Per ampliar el coneixement sobre la funció biològica d'aquesta proteïna, ens vam plantejar estudis d'inducció de tumors en pell de ratolí usant radiació ultravioleta B (UVB), que és un genotòxic natural i principal causa de l'aparició de tumors de pell en humans.

Resultats

La majoria dels tumors desenvolupats pels ratolins wt i *Trex2*^{-/-} es van localitzar a l'orella, excepte un que va aparèixer en la esquena d'un ratolí *Trex2*^{-/-}. En els ratolins *Trex2*^{-/-} l'aparició de tumors es va donar abans (setmana 39) que en els wt (setmana 46), i la incidència de tumors va ser significativament major en els ratolins *Trex2*^{-/-} que en els wt (Fig. R3A; P=0,025, Log-rank Mantel-Cox Test). Al final de l'experiment, 86% dels ratolins *Trex2*^{-/-} havien desenvolupat tumors, en contrast amb només un 46% de ratolins wt. El nombre mitjà de tumors per ratolí també va ser significativament més elevat en els ratolins *Trex2*^{-/-} que als wt (Fig. R3B), mentre que no hi va haver diferències pel que fa a la mida dels tumors entre els dos genotips (Fig. R3C) ni dels tipus de tumors (Fig. R3D i Fig. R4). Així, la deficiència de TREX2 està associada amb una major tumorigènesi en resposta a la inducció amb UVB, recolzant el rol supressor de tumors d'aquesta exonucleasa en la pell en resposta al dany al DNA.

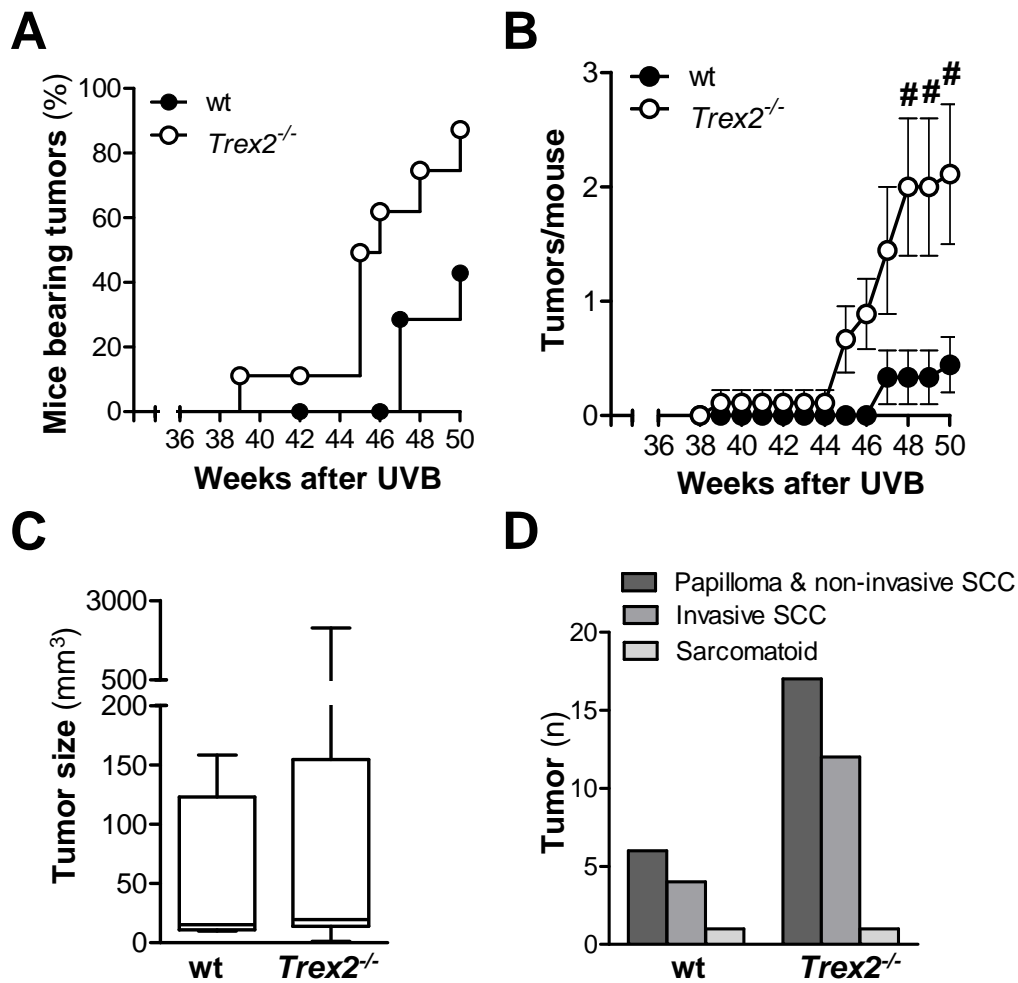


Figura R3. El dèficit de TREX2 incrementa la susceptibilitat a la carcinogènesi induïda per la radiació UVB. Ratolins wt (n=9) i *Trex2*^{-/-} (n=9) es van irradiar amb el protocol de carcinogènesi per UVB detallat en Materials i Mètodes. **(A)** Incidència de tumors en els ratolins wt i *Trex2*^{-/-} usant l'anàlisi de supervivència de Kaplan-Meier. **(B)** Multiplicitat de tumors en els ratolins *Trex2*^{-/-} i wt. Nombre mig de tumors per ratolí. Els gràfics mostren la mitjana i la SEM. **(C)** Distribució de mides i **(D)** anàlisi histopatològic dels tumors de pell dels ratolins wt i *Trex2*^{-/-} irradiats amb UVB al final de l'experiment. Diferències significatives entre genotips (A) Test de Mantel-Cox (p < 0.05) i (B) Test de Mann-Whitney (#, P < 0.05).

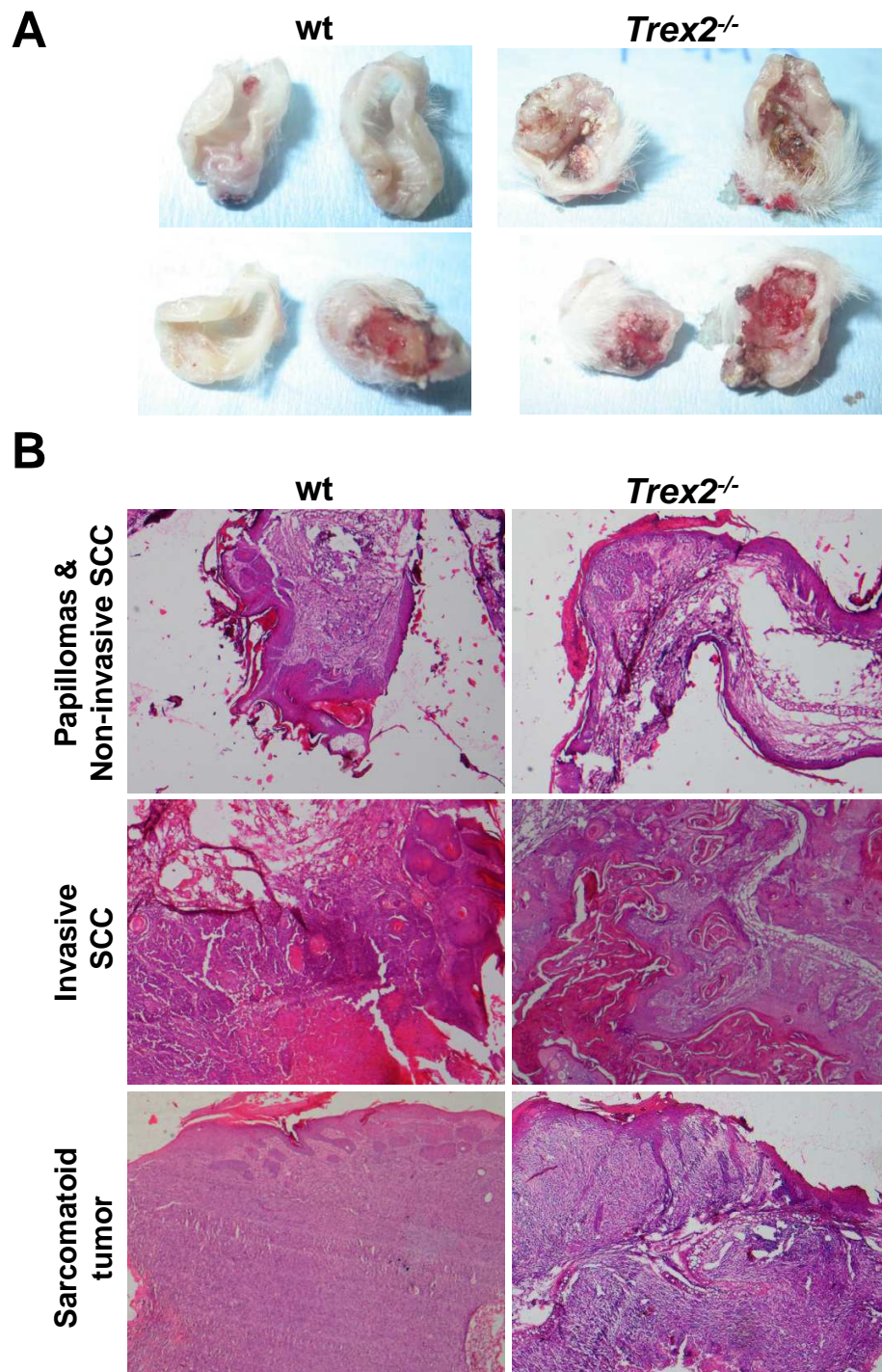


Figura R4. Estudi macroscòpic de la carcinogènesi induïda per UVB en ratolins wt i *Trex2^{-/-}*. (A) Imatges representatives de l'aparença macroscòpica dels tumors. **(B)** Seccions histològiques dels tumors de les orelles tenyides amb H/E. Magnificació original 4x.

6.1.3 TREX2 promou l'eliminació del DNA danyat i l'apoptosi dels queratinòcits en la pell de ratolí irradiada amb UVB

La radiació UVB actua com a iniciador i a la vegada com a promotor de tumors (Afaq *et al.*, 2005) i la resposta de la pell a la radiació UVB varia en funció de l'exposició i de la dosis rebuda. Així, per determinar el paper que juga TREX2 en la protecció contra la tumorigènesi induïda per UVB, vam estudiar els efectes de la deficiència de TREX2 en l'eliminació del DNA danyat i l'apoptosi després d'irradiar els ratolins amb una sola dosi de 5 kJ/m² (irradiació aguda) o amb la repetició de 3 dosis de 2 kJ/m² a dies alternatius (irradiació crònica).

L'anàlisi per IHF de les lesions CPD al DNA induïdes per la radiació UVB indica que el dany al DNA és més persistent en les pells dels ratolins *Trex2*^{-/-} (Fig. R5A). El marcatge de les lesions CPD roman més elevat en els ratolins *Trex2*^{-/-} que en els wt 48 hores després de la irradiació aguda o crònica (Fig. R5B). A més a més, les dades dels assaigs d'IHF (Fig. R5C) i de western blot (Fig. R5D i R5E) de la histona fosforilada H2AX (γ H2AX), una modificació primerenca en els llocs on hi ha hagut DSB (Rogakou *et al.*, 1998), indiquen que 48 hores després de l'exposició aguda a UVB, aquest marcador de ruptures al DNA també està significativament més augmentat en l'epidermis dels ratolins *Trex2*^{-/-} que en els wt. Els baixos nivells de fosforilació de la histona H2AX en resposta a la dosi crònica feien molt difícil el seu anàlisi, encara que no vam observar diferències òbvies. També són molt reduïts els nivells de CPDs i γ H2AX a les 72 hores posteriors a la irradiació aguda o crònica, segurament per l'elevat recanvi dels queratinòcits en resposta a la irradiació que promou una ràpida eliminació dels queratinòcits més danyats.

El marcatge de TUNEL (Fig. R6), un marcador de fragmentació del DNA en forma de DSB que es dona durant l'apoptosi i altres tipus de mort cel·lular i que també es genera pel dany en el DNA, mostra un patró de marcatge diferencial en l'epidermis del ratolí deficient de TREX2 comparat amb el ratolí wt després de la irradiació aguda i crònica amb UVB. Això es veu reflexat per la significativa menor presència de nuclis TUNEL positius en l'epidermis del ratolí *Trex2*^{-/-} respecte el wt després de la irradiació aguda amb UVB (Fig. R6A i R6B). A més a més, hi ha una major acumulació de cromatina marcada amb TUNEL en l'estrat corni de les pells

Resultats

dels ratolins *Trex2*^{-/-} que en les pells dels wt tant després de la irradiació aguda com crònica (Fig. R6A). Per tant, TREX2 evita l'acumulació de DNA danyat en els corneòcits, estadi final de diferenciació dels queratinòcits que comporta la seva mort.

Per altra banda, els anàlisis d'immunofluorescència (Fig R6A) i western blot (Fig. R6C) de la caspasa 3 activa, un efector terminal de l'apoptosi, mostren que en absència de TREX2 es veu significativament reduïda l'apoptosi depenent de caspasa 3 fins les 72 hores posteriors a la irradiació crònica. El marcatge de TUNEL i caspasa 3 activa coincideixen en la majoria de queratinòcits que estan morint en les pells irradiades crònicament. Ara bé, no es detecta caspasa 3 activa després de la irradiació aguda amb UVB, assenyalant que les cèl·lules TUNEL positives que es detecten en les pell irradiades amb UVB de forma aguda, possiblement moren per mecanismes independents de caspasa 3, com han descrit altres autors (Takeuchi *et al.*, 2004). De fet, la inducció de la mort cel·lular per UV té lloc per altres vies apart de l'apoptosi, com la necrosi, depenent de la dosi i la freqüència de la irradiació. En aquest context, s'ha descrit que el número de queratinòcits TUNEL positius després de la irradiació aguda amb UVB és superior al número de cèl·lules positives per caspasa 3 activa (Takeuchi *et al.* 2004). En conjunt, aquestes dades indiquen que TREX2 està implicada en la degradació del DNA del queratinòcits que estan morint com a conseqüència de la irradiació UVB, i que en absència de TREX2 una fracció de queratinòcits amb dany al DNA no acabaria morint.

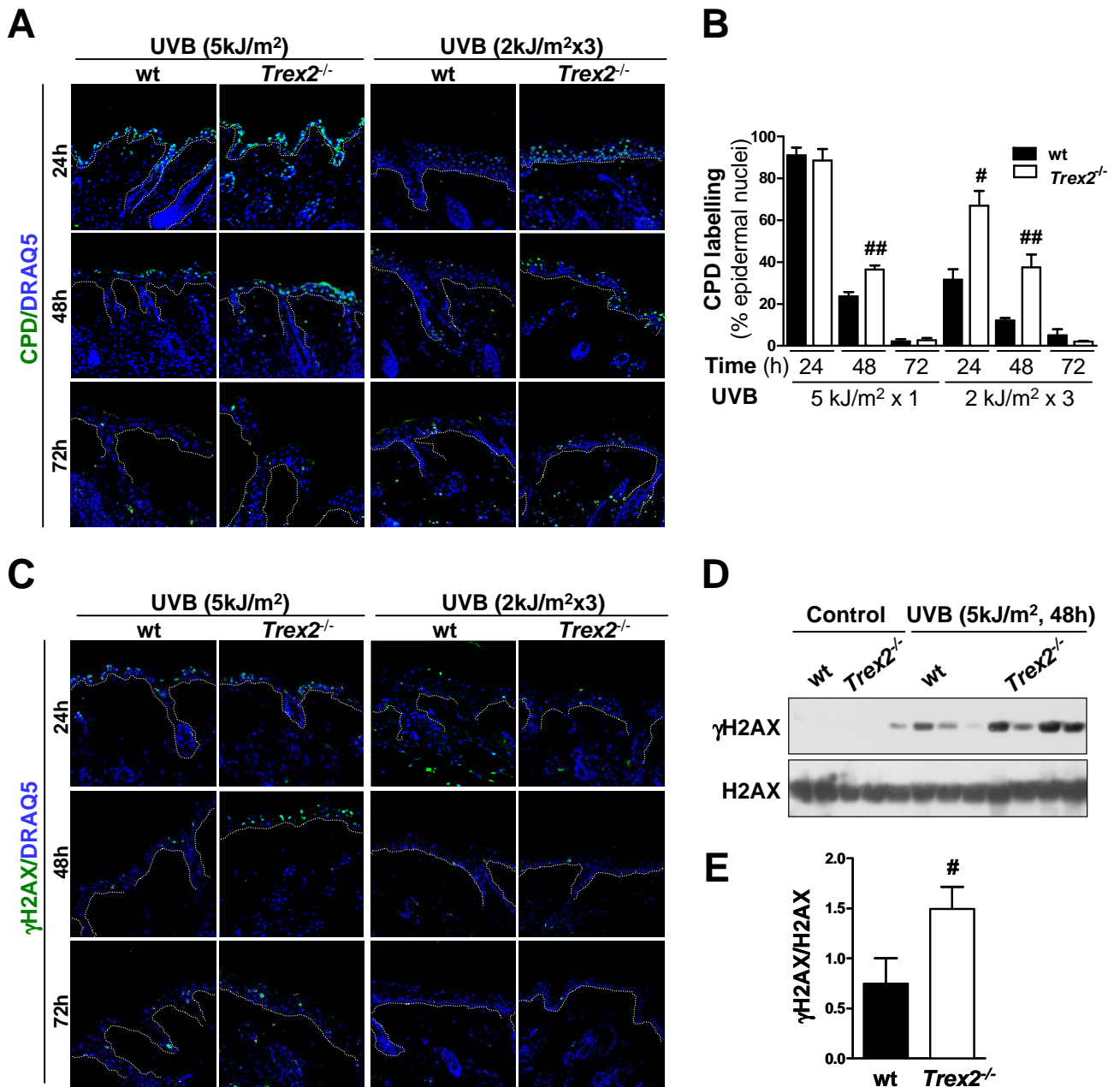


Figura R5. La pèrdua de TREX2 provoca l'acumulació de DNA lesionat en les pells irradiades amb UVB. (A) IHF de CPDs en les pells dels ratolins wt i *Trex2*^{-/-} irradiades amb UVB. (B) Quantificació de les cèl·lules de l'epidermis positives per CPD. (C) IHF de γ H2AX de les pells dels ratolins wt i *Trex2*^{-/-} irradiades amb UVB. Nuclis marcats amb DRAQ5. La línia de punts indica el marge entre dermis i epidermis. Magnificació original 40x. (D) Western blot de γ H2AX i H2AX i (E) quantificació de les bandes per densitometria. Els valors es van normalitzar per H2AX i es presenten com a unitats arbitràries. Els gràfics mostren la mitjanana i la SEM d'almenys 4 ratolins. Diferències entre genotips: Test de Mann-Whitney (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$).

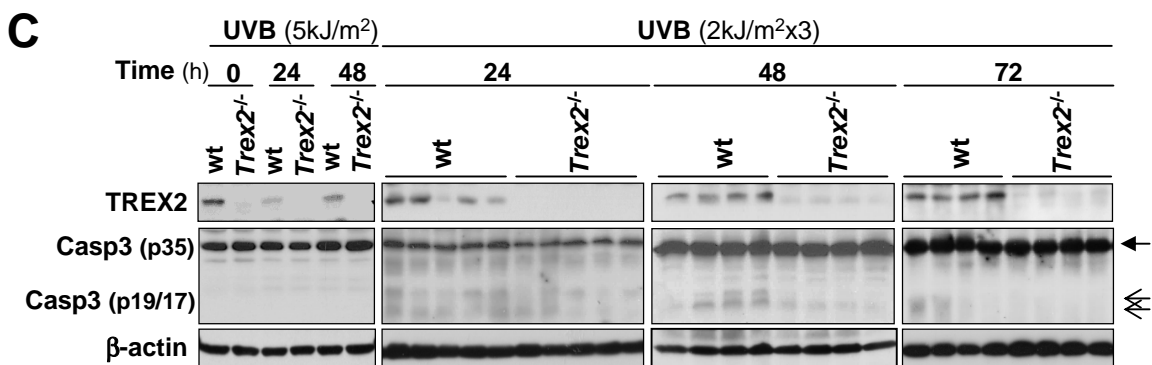
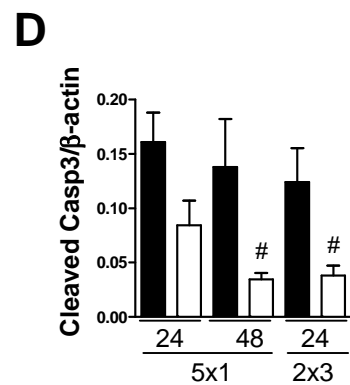
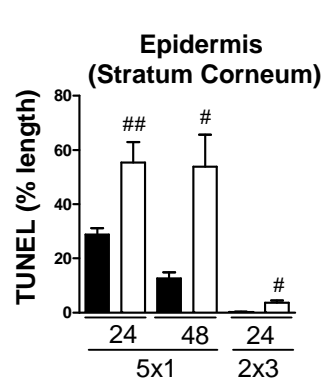
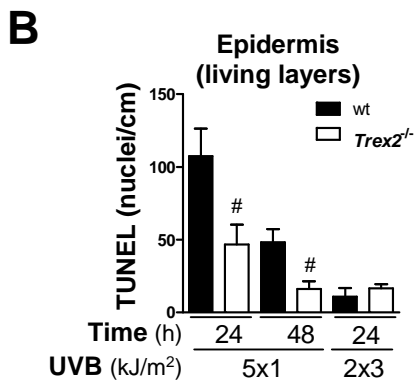
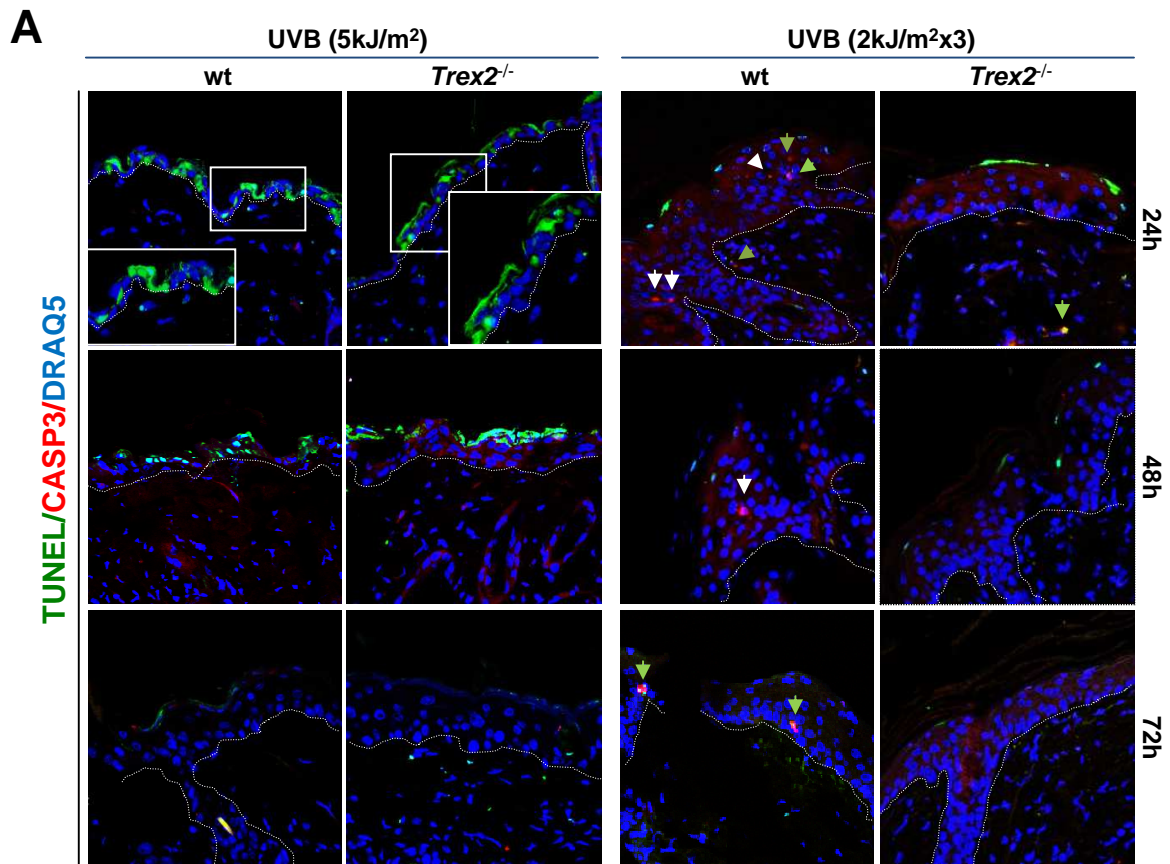


Figura R6. TREX2 està involucrat en la degradació del DNA i facilita la mort cel·lular en les pells irradiades amb UVB. (A) Imatges representatives de la IHF de caspasa 3 processada i TUNEL en les pells de ratolins wt i *Trex2*^{-/-} irradiades amb UVB. Les fletxes blanques indiquen cèl·lules amb marcatge únic per caspasa 3 processada, les fletxes verdes indiquen cèl·lules doble-positives per caspasa 3 processada i TUNEL. Nuclis marcats amb DRAQ5. La línia de punts indica el marge entre dermis i epidermis. Magnificació original 63x. (B) Quantificació dels diferents patrons de la senyal de TUNEL en les pells dels ratolins wt i *Trex2*^{-/-}. Els nuclis TUNEL positius en l'estrat basal, espinós i granulós (*living layers*) i el percentatge del patró de TUNEL lineal en l'estrat corni són relatius a la longitud de l'epidermis. (C) Western blot de caspasa 3 total i processada i de TREX2. Imatge representativa de mostres agrupades (*pools*) de les pells tractades amb el protocol agut (5 kJ/m²) o de mostres individuals del tractament crònic (2 kJ/m² X 3). (D) Quantificació per densitometria de les bandes de caspasa 3 processada normalitzades per β-Actina i representada com a unitats arbitràries. Els gràfics mostren la mitjana i la SEM d'almenys 4 ratolins de cada genotip. Diferències significatives entre genotips: Test de Mann-Whitney (#, P < 0.05; ##, P < 0.01).

6.1.4 La manca de TREX2 afecta la reparació del DNA i frena l'apoptosi dels queratinòcits irradiats amb UVB *in vitro*

Per excloure efectes sistèmics degut a l'acció de diferents tipus cel·lulars en la pell, i profunditzar en el coneixement de l'acció de TREX2 en la fisiologia de la cèl·lula, vam analitzar la reparació del DNA, la progressió del cicle cel·lular i l'apoptosi en cultius primaris de queratinòcits de ratolins wt i *Trex2*^{-/-} irradiats amb UVB.

La incorporació de Timidina tritiada no programada (UDS) permet l'estudi de la reparació global del genoma. Els queratinòcits *Trex2*^{-/-} incorporen una menor quantitat de Timidina en resposta a la irradiació amb UVC (Fig R7A) i UVB (wt=108 ± 2,9 %, n=3, *Trex2*^{-/-} 99,9 ± 3,4 %, n=3, respecte les no irradiades), indicant que TREX2 podria col·laborar en la reparació de les lesions al DNA. Pel que fa a la progressió del cicle cel·lular després de la irradiació amb UVB o UVC en ambdós genotips és semblant, induint-se l'aturada en el *checkpoint* de la fase G1 per igual. Ara bé, l'absència de TREX2 està associada amb un lleuger però significatiu descens en el percentatge de les cèl·lules apoptòtiques en fase SubG1 (Fig. R7B).

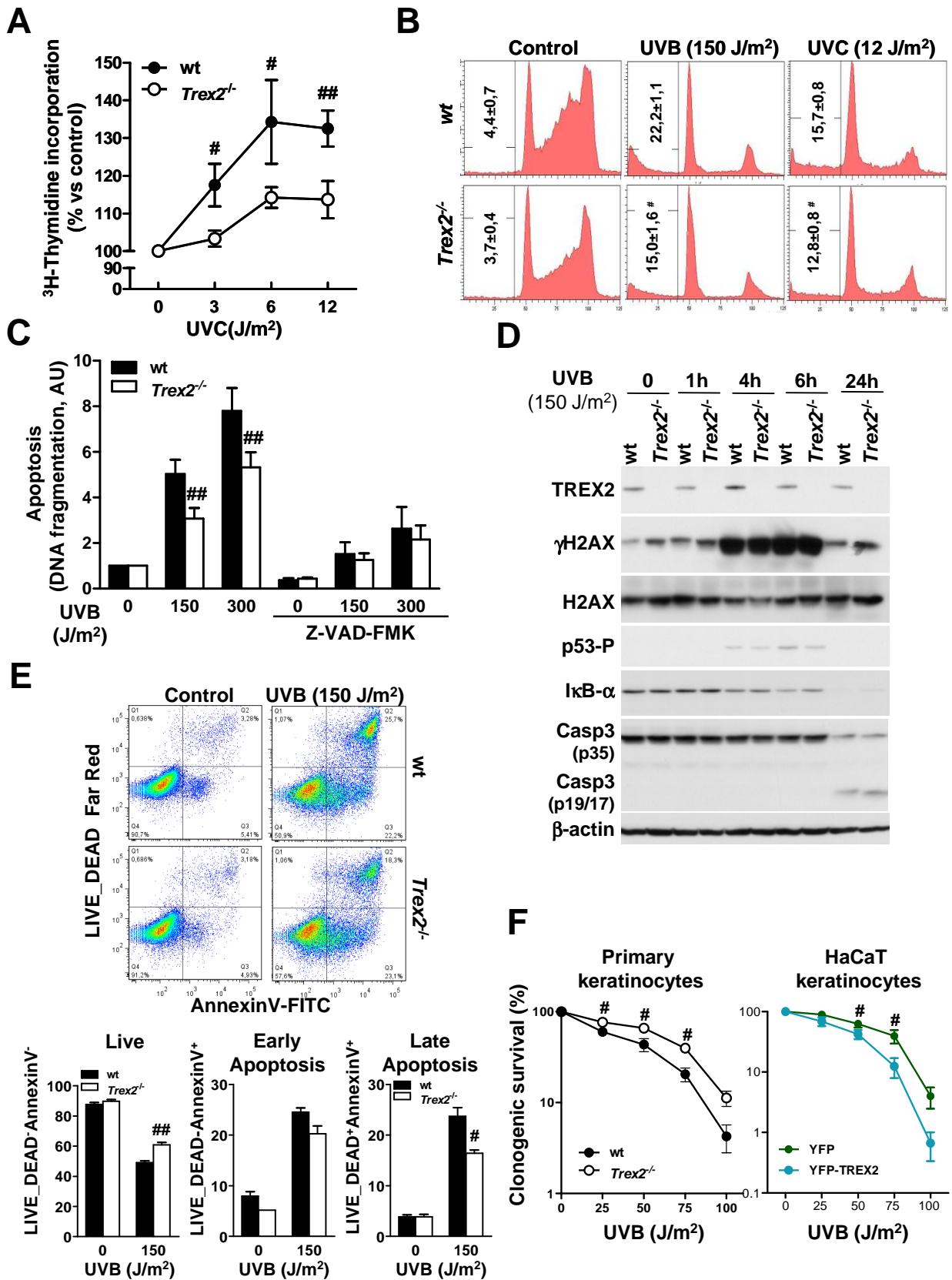
El tractament amb radiació UVB induïx una reducció significativa de l'alliberament de fragments de DNA al citoplasma, un tret característic de l'apoptosi, dels queratinòcits *Trex2*^{-/-} en comparació amb els wt (Fig. R7C). L'alliberació d'aquests fragments de DNA al citoplasma en resposta a UVB pot ser bloquejada per l'inhibidor de caspases Z-VAD-FMK, indicant que les cèl·lules pateixen una apoptosi dependent de caspases.

Resultats

L'anàlisi per western blot mostra que els queratinòcits en cultiu expressen TREX2 i confirma la manca d'expressió en els queratinòcits *Trex2*^{-/-} (Fig R7D). Els cultius de queratinòcits wt i *Trex2*^{-/-} responen de la mateixa manera a la irradiació amb UVB en quant a senyalització del dany al DNA: fosforilació de H2AX i p53, degradació d'IkB α i proteòlisis de la caspasa 3 (Fig. R7D i R8)..

Adicionalment, dels resultats obtinguts per FACS es pot deduir que el dèficit de TREX2 en els queratinòcits irradiats amb UVB dificulta el pas dels primers estadis de l'apoptosi (Annexin_V single-positive) que poden ser reversibles, als estadis finals, que són ja irreversibles (Annexin-V and Live_Death double-positive) (Fig R7E). En concordança, l'assaig de supervivència clonal en resposta a la radiació UVB mostra que els queratinòcits *Trex2*^{-/-} són més resistents que els wt (Fig.R7F). També, l'expressió estable de la proteïna YFP-TREX2 en la línia cel·lular de queratinòcits HaCaT dona lloc a un augment de la susceptibilitat a la radiació UVB, en quant a formació de colònies, comparada amb les colònies formades per les mateixes cèl·lules que només expressen YFP com a control. Col·lectivament, els resultats obtinguts *in vitro* reflexen una paper dual de la proteïna TREX2 intervenint en la reparació del dany al DNA en resposta a radiació UV i promovent l'apoptosi de forma irreversible, essent aquesta última funció la que preval.

Figura R7. El dèficit de TREX2 afecta la reparació del DNA i l'apoptosi dels queratinòcits tractats amb radiació UVB. (A) Síntesi de DNA per la reparació de les lesions induïdes per UVC quantificada per la incorporació de Timidina tritiada no programada (UDS). El gràfic mostra el percentatge d'incorporació de ³H-Timidina de les cèl·lules tractades respecte les no tractades. (B) Progressió del cycle cel·lular dels queratinòcits wt i *Trex2*^{-/-}. S'indica el percentatge de cèl·lules en fase SubG1. (C) Quantificació de la fragmentació del DNA apoptòtic de queratinòcits wt i *Trex2*^{-/-} en cultiu irradiats amb UVB. Quan s'indica, les cèl·lules es van preincubar amb Z-VAD-FMK durant 1 hora. La fragmentació del DNA és relativa al de les cèl·lules no tractades. (D) Western blot de la resposta al dany al DNA de queratinòcits wt i *Trex2*^{-/-} tractats amb UVB. Nivells de proteïna TREX2, H2AX, γ H2AX, fosforilació de p53, IkB α , caspasa 3 activa i processada i β -Actina. (E) Anàlisi de la transició de l'apoptosi per citometria de flux marcant les cèl·lules irradiades amb UVB amb Annexin-V i LIVE/DEAD. Percentatges de les marcades amb un marcador, les doble marcades i les no marcades respecte el total de cèl·lules analitzades. (F) Supervivència clonal de queratinòcits wt i *Trex2*^{-/-} i HaCaT amb expressió ectòpica de YFP o YFP-TREX2 irradiats amb diferents dosis de radiació UVB. Els gràfics mostren la mitjana i SEM d'almenys 4 experiments independents. Es mostra un experiment representatiu d'un total de tres experiments independents en B, D i E. Significació pel test de la *t* de Student: #, P<0.05, ## P<0.01.



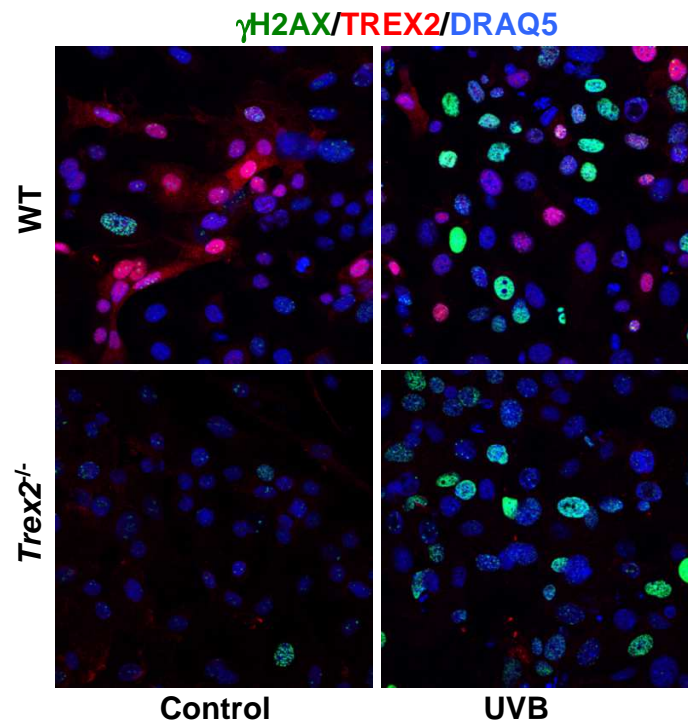


Figura R8. Detecció del dany al DNA induït per la radiació UVB. (A) Queratinòcits de ratolí wt o *Trex2*^{-/-} no irradiats o irradiats amb UVB (150 J/m²). Al cap de 18 hores es van fixar i es va fer la ICF per TREX2 i γ H2AX.

6.1.5 TREX2 s'acumula en regions de cromatina poc condensada i en micronuclis

L'anàlisi de la distribució subcel·lular de TREX2 per immunofluorescència a queratinòcits primaris en cultiu mostra una localització d'aquesta proteïna en múltiples focis distribuïts discontinuament en àrees del nucli amb cromatina poc condensada, aquelles àrees on la cromatina comença a condensar-se durant el procés de la mort cel·lular per apoptosi, com reflexa el marcatge amb TUNEL (Fig R9H). Per contra, no es detecta senyal per TREX2 en els cossos apoptòtics característics dels últims estadis de la mort cel·lular programada (Fig. R9I), suggerint una acció transitòria en la progressió de l'apoptosi. A més a més, s'observa una senyal intensa de TREX2 en aquelles cèl·lules positives per Involucrina que es van desenganxant de la placa degut a la mort cel·lular produïda per diferenciació dels queratinòcits (Fig. R9C, R9J i R9K). Destacar l'intens marcatge observat en els micronuclis de cèl·lules tant mononucleades

com binucleades (Fig. R9D i R9F). La mida i la densitat dels focis de TREX2 en els micronuclis de les cèl·lules binucleades com a conseqüència del tractament amb *cytochalasin-B* (Cyt-B), una droga que inhibeix la citoquinesi, és major que en els nuclis originals (Fig. R9F), evidenciant que TREX2 s'acumula en la cromatina que no s'incorpora en el DNA nuclear de les cèl·lules filles que s'acaben de dividir. De fet, TREX2 també es troba present en alguns nuclis metafàsics (Fig. R9G). En concordança, l'expressió ectòpica de YFP-TREX2 (Fig. R9L-P), però no YFP (Fig. R9Q i R9R) en la línia cel·lular de queratinòcits humans HaCaT reproduïx els mateixos patrons de localització subcel·lular descrits per la proteïna endògena a queratinòcits primaris de ratolí. Per tant, TREX2 es recluta diferencialment a les estructures nuclears en funció de l'estat de la cromatina.

Resultats

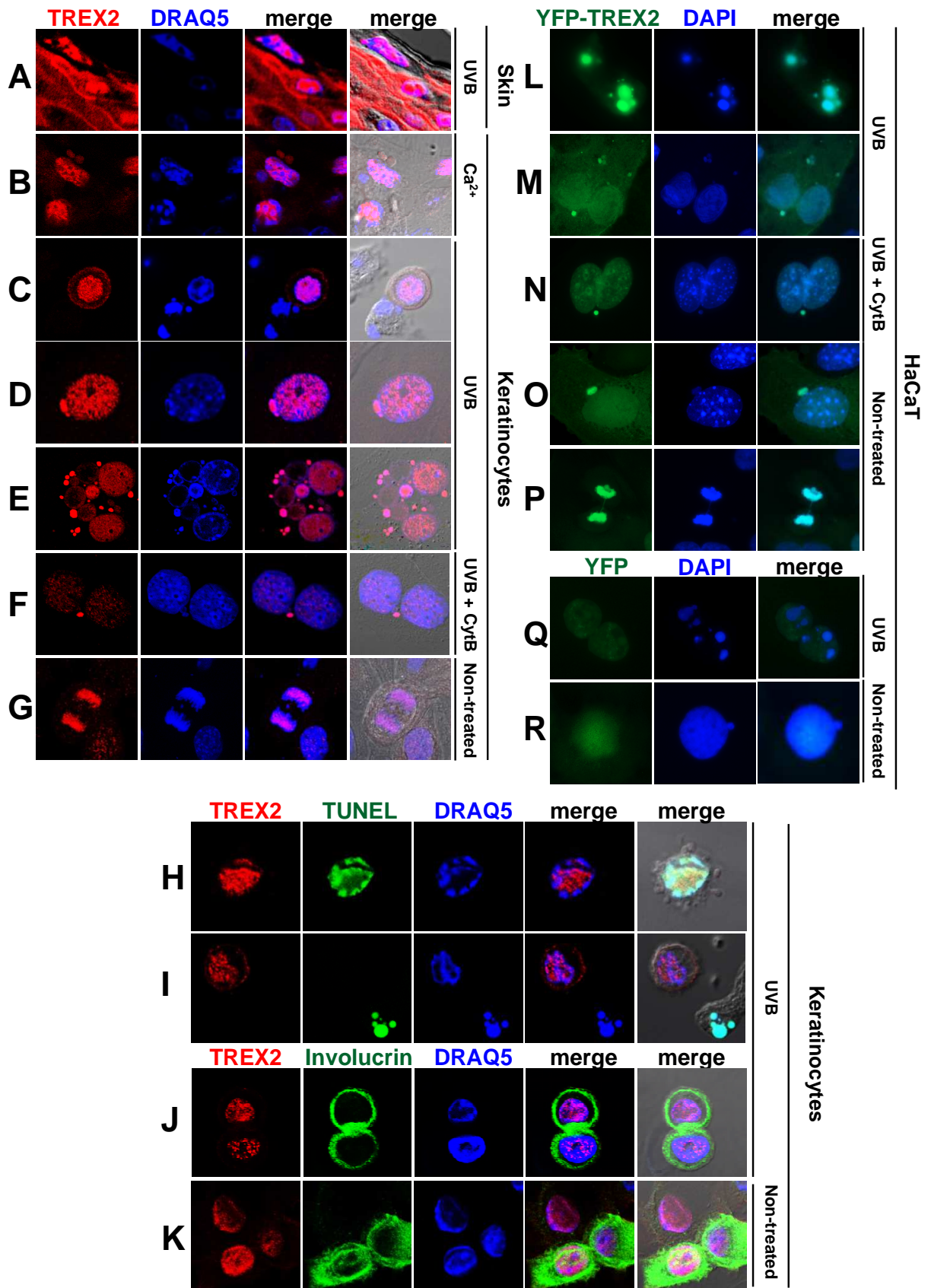


Figura R9. TREX2 s'acumula en regions de cromatina poc densa i en micronuclis. (A) Pell de ratolí irradiada amb UVB (2 kJ/m² X3). (B) Queratinòcits de ratolí tractats amb Ca²⁺. (C-E; H-J) Queratinòcits de ratolí tractats amb UVB (150 J/m²) o (F) *Cytochalasin B* (Cyt-B) abans de la irradiació amb UVB i (G) queratinòcits no tractats en mitosis o (K) en diferenciació, marcats amb anticossos contra TREX2 i involucrina o TUNEL, com s'indica. (L-P) Cèl·lules HaCat amb expressió estable de YFP-TREX2 o (Q i R) YFP, irradiades amb UVB (150 J/m²) (L,M i Q), o (N) tractades amb Cyt-B abans de la irradiació amb UVB o (O,P i R) no tractades. Nuclis marcats amb DRAQ5 o DAPI com s'indica. Imatges de fluorescència amb contrast de fase representatives dels patrons trobats. Magnificació original 63x (A-K) i 100x (L-R).

6.1.6 TREX2 es recluta en micronuclis amb DNA danyat, on interacciona amb la histona H2AX fosforilada

Per determinar si TREX2 és mobilitzada als llocs de dany al DNA, vam irradiar queratinòcits primaris de ratolí en cultiu amb UVC a través d'un filtre amb un diàmetre de porus de 5 µm, de tal manera que la irradiació de les cèl·lules es dona només en punts molt concrets del nucli. La localització de les lesions es va fer analitzant el marcatge de γH2AX. L'anàlisi per microscopia confocal no va mostrar que TREX2 es mobilitza als llocs on hi havia hagut lesió al DNA (Fig. R10A i R10B), mentre que altres proteïnes conegudes pel seu rol en la reparació de lesions al DNA com RAD51 sí que s'hi reclutaven (Fig. R11), com ja s'havia descrit (Haaf *et al.*, 1999). Només es va detectar superposició de TREX2 amb alguns focis γH2AX del nucleosoma, en queratinòcits irradiats globalment (Fig. R10C). Per altra part, sí que vam observar col·localització de TREX2 amb γH2AX en molts micronuclis (Fig. R10D).

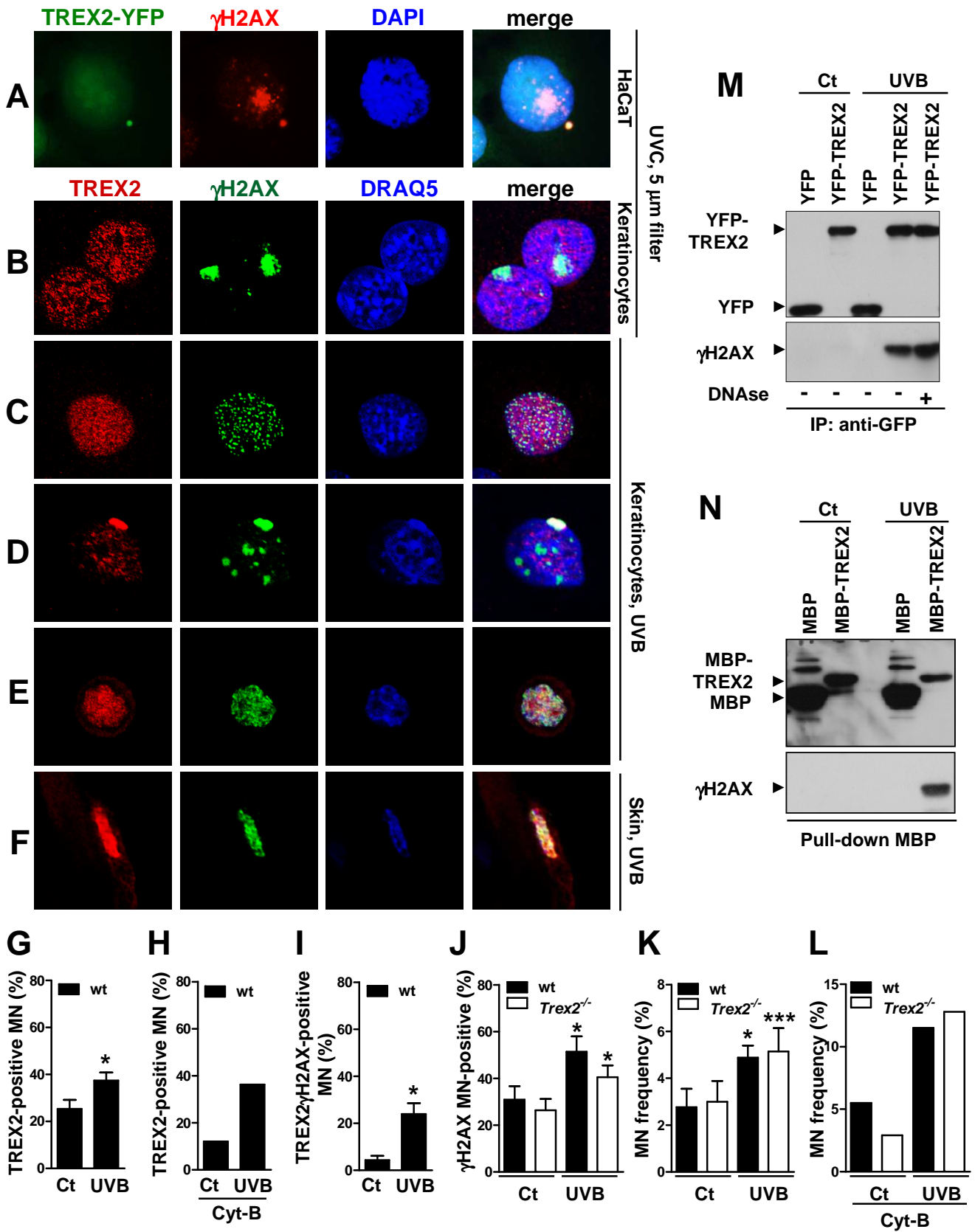
S'ha descrit que la fosforilació de la histona H2AX és clau no només per la senyalització del dany sinó també per la degradació del DNA durant la mort cel·lular (Baritaud *et al.*, 2010). Un marcatge homogeni de γH2AX afectant tota la cromatina del micronucli s'associa amb la seva degradació independentment de la degradació nuclear (Terradas *et al.*, 2010). En aquest context, vam observar una col·localització substancial de TREX2 i γH2AX en els queratinòcits desenganxant-se del substrat en cultiu (Fig. R10E) i en els queratinòcits que estan morint de les capes suprabasals de la pell irradiada amb UVB (Fig. R10F).

Resultats

Per determinar si la col·localització de TREX2 i γ H2AX observada per immunofluorescència podia estar mediada per una interacció entre ambdues proteïnes es van dur a terme experiments d'immunoprecipitació. Les co-immunoprecipitacions (CoIP) demostren que TREX2 interacciona amb γ H2AX en les cèl·lules HaCaT que sobreexpressen YFP-TREX2 irradiades amb UVB. La interacció és independent de la unió al DNA de qualsevol de les dues proteïnes, doncs el tractament amb DNAsa dels extractes cel·lulars, previ a la CoIP no l'elimina (Fig. R10M). La interacció també es va analitzar per mitjà d'una altra aproximació experimental, el *pull-down*, on es confirma que γ H2AX s'associa també amb MBP-TREX2 (Fig. R10N). En conjunt, aquests resultats indiquen que TREX2 pot accedir als extrems lliures del DNA interaccionant amb la proteïna H2AX fosforilada, preferentment en la cromatina en procés de degradació.

La irradiació dels queratinòcits amb UVB provoca un augment significatiu de la freqüència de micronuclis positius per TREX2 (Fig. R10G i R10H), γ H2AX (Fig. R10J) i TREX2- γ H2AX dobles positius (Fig. R10I). Ara bé, no es van observar diferències en la freqüència de micronuclis basals o induïts per UVB (Fig. R10K i R10L), ni de micronuclis γ H2AX positius (Fig. R10J) entre els queratinòcits wt o *Trex2*^{-/-}. Per tant, TREX2 no condiciona la formació de micronuclis, encara que no podem excloure que afecti l'estat del DNA micronuclear.

Figura R10. TREX2 col·localitza i interacciona amb γ H2AX en els micronuclis. IHF de lesions al DNA produïdes per la irradiació amb UVC a través d'un filtre amb porus de 5 μ m de diàmetre de (A) cèl·lules HaCaT-YFP o (B) queratinòcits primaris de ratolí. (C) queratinòcits primaris de ratolí globalment irradiats amb UVB (150 J/m²), (D) amb micronuclis, (E) desenganxant-se del substrat, i (F) pell de ratolí irradiada amb UVB marcada amb anticossos contra γ H2AX i TREX2. (G) Percentatge de micronuclis TREX2 positius comptats en absència o (H) presència de Cyt-B i (I) percentatge de micronuclis doble positius per TREX2 i γ H2AX o (J) positius per γ H2AX. (K) Freqüència de micronuclis en queratinòcits de ratolí wt o *Trex2*^{-/-} no irradiats o irradiats amb UVB (150 J/m²) en absència o (L) presència de Cyt-B. En presència de Cyt-B només es van comptar els micronuclis de les cèl·lules binucleades. Les dades representen la mitjanana i la SEM de 3 experiments independents (G, I, J i K), i la mitjana d'un experiment on es van contar més de mil cèl·lules per condició (H, L). (M) Interacció de TREX2 i γ H2AX en cèl·lules HaCaT amb expressió estable de YFP-TREX2 irradiades amb UVB (150 J/m²) analitzada per immunoprecipitació i (N) *Pull-down* amb proteïna MBP-TREX2 i lisats de queratinòcits primaris de ratolí irradiats amb UVB. Nuclis marcats amb DRAQ5 o DAPI. Diferències significatives entre tractats i no tractats segons el test de la *t* de Student no aparellat (*, P < 0.05; ***, P < 0.001).



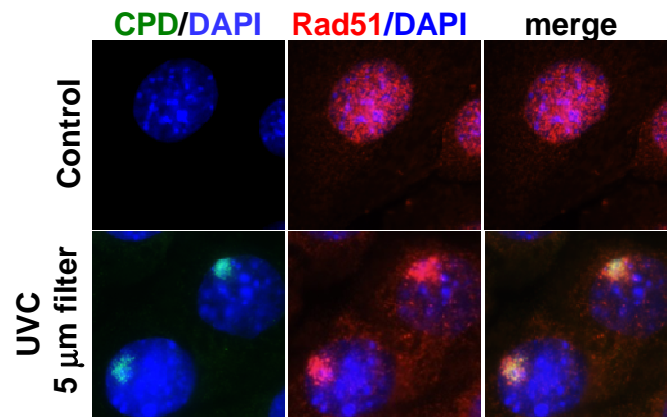


Figura R11 . Detecció del dany al DNA induït per la radiació UVC. Queratinòcits de ratolí no tractats o irradiats amb UVC (100 J/m^2) a través d'un filtre amb porus de $5 \mu\text{m}$ de diàmetre es van marcar amb anticossos contra RAD51 i CPD. Nuclis marcats amb DRAQ5 Magnificació original 63x (A) i 100x (B).

6.1.7 La pèrdua de TREX2 altera la resposta immunitària en la pell front la irradiació amb UVB

L'estudi histopatològic de les pells de ratolins irradiats amb UVB de forma aguda o crònica, revela que els ratolins *Trex2*^{-/-} són més resistents que els wt a la inflamació de la pell induïda per la radiació UVB (Fig. R12A). Així, el nombre relatiu d'abscessos en l'epidermis i de cèl·lules infiltrants en la dermis és menor en les pells de ratolins *Trex2*^{-/-} que en les wt 48 hores després de la irradiació aguda (Fig. R12C). Les pells wt exhibeixen més infiltrat immunitari perifol·licular 24 hores després de la irradiació crònica i 48 hores després de la irradiació aguda que les pells *Trex2*^{-/-}. Aquest infiltrat consta principalment de neutròfils i macròfags, significativament disminuïts en les pells *Trex2*^{-/-} respecte dels wt, però no de CD3, la presència dels quals disminueix molt després de la irradiació amb UVB, fet que es pot associar al conegut efecte immunosupressor descrit per la irradiació UVB (Fig. R13A). A més a més, en les pells irradiades crònicament, l'augment en el nombre de capes cel·lulars en l'epidermis, que pot actuar com a mesura de protecció de la pell contra la irradiació, és menor en el ratolí *Trex2*^{-/-} que en el wt (Fig. 12B).

Per definir a nivell molecular els canvis que ocorren diferencialment en les pells irradiades amb UVB en absència de TREX2, vam mesurar el mRNA de gens de les principals citokines proinflamatòries (TNF α , IL6, IL12 α , IL1 α i IL1 β), antiinflamatòries (IL10 i TGF β), quimioquines (CCL5 i CXCL10), interferons (IFN γ i IFN κ), gens induïts per interferons de tipus 1 (Mx1 i IRF7), gens de defensa (iNOS), pèptids antimicrobians (CAMP/LL37) i gens de resposta a estrès (Raet1e) que són lligands dels receptors NKG2D, tant de les pells wt com *Trex2*^{-/-} en les diferents exposicions a UVB. L'absència de TREX2 disminueix la inducció de molts d'aquests gens a la pell irradiada amb UVB (Fig. R12D), en concordança amb el fenotip amb menys inflamació que presenten les pells dels ratolins *Trex2*^{-/-}. Concretament, l'augment de mRNA induït per la dosi aguda de radiació UVB dels gens IL6, CAMP i Raet1e a 24 i 48 hores, i de TNF α i IL12 α 48 hores després d'irradiar és menor en els ratolins *Trex2*^{-/-} que en els wt. Anàlogament, 24 hores després de la irradiació crònica, els increments del mRNA de TNF α , IL12 α , Raet1e, CAMP, IFN γ i dels gens dependents d'IFN γ , CXCL10, CCL5 i iNOS són significativament més baixos en les pells del ratolí *Trex2*^{-/-} respecte del wt. En coherència amb aquests resultats, la fosforilació dels factors de transcripció STAT1 i STAT3 induïda per la senyalització del receptor per IFN γ i IL6, respectivament, també es més baixa en la pell irradiada del ratolí *Trex2*^{-/-} que en el wt (Fig. R13C). No s'observen diferències en la inducció del mRNA d'IL1 α , IL10, TGF β , IFN κ i IRF7 (Fig. R13B), ni en l'abundància de la proteïna I κ B α (Fig. R13C). En resum, aquestes patró diferencial subratlla la rellevància de TREX2 en el modelatge de la resposta inflamatòria de la pell contra la radiació UVB.

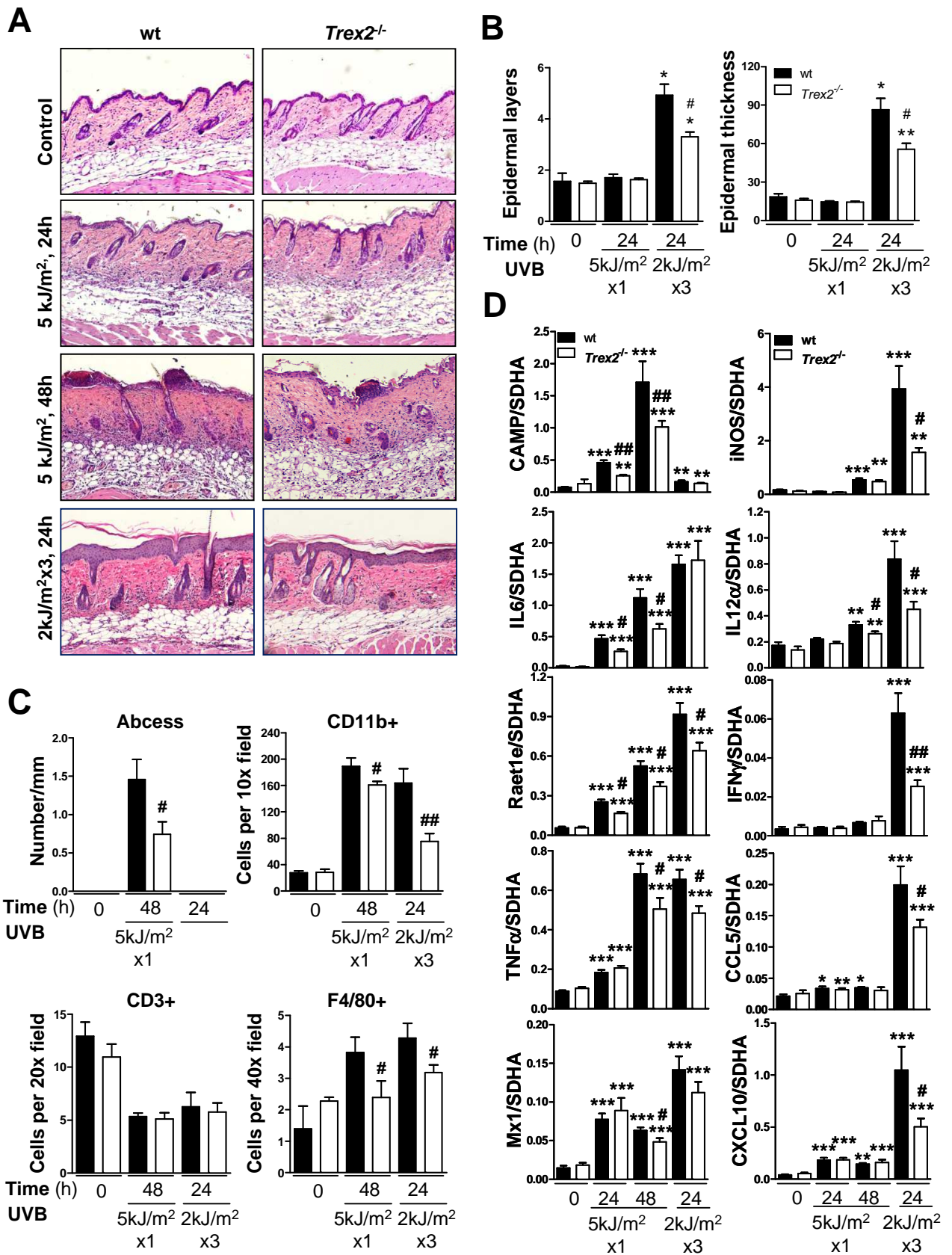


Figura R12. L'absència de TREX2 afecta la resposta inflamatòria de la pell en resposta a la radiació UVB. (A) Talls histològics tenyits amb H/E de les pells wt i *Trex2*^{-/-}, tractades amb radiació UVB i els controls. Imatges representatives de les diferències entre les pell wt i *Trex2*^{-/-} pel que fa al nombre d'abscessos, la hiperplàsia de l'epidermis i l'infiltrat immunitari. (B) El nombre d'infiltrats és relatiu a la longitud de l'epidermis. Caracterització de l'infiltrat immunitari de cèl·lules mieloides (CD11b), limfòcits T (CD3) i macròfags (F4/80). Els gràfics mostren el nombre mitjà de cèl·lules contades en els camps de microscòpia indicats. (C) Quantificació de la hiperplàsia epidèrmica comptant el nombre de cèl·lules presents en cada capa des de la làmina basal fins a l'estrat corni i el gruix de l'epidermis. (D) Expressió de gens immunitaris induïts per la radiació UVB en les pells de ratolins wt i *Trex2*^{-/-} determinada per RT-qPCR. Els gràfics mostren la mitjana i la SEM d'almenys 4 ratolins per condició i genotip. Diferències significatives del test de Mann-Whitney entre genotips: (#, P<0.05, ## P<0.001); entre tractats i no tractats (*, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001).

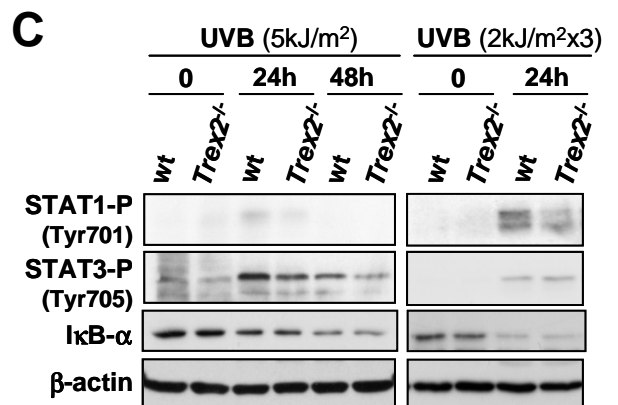
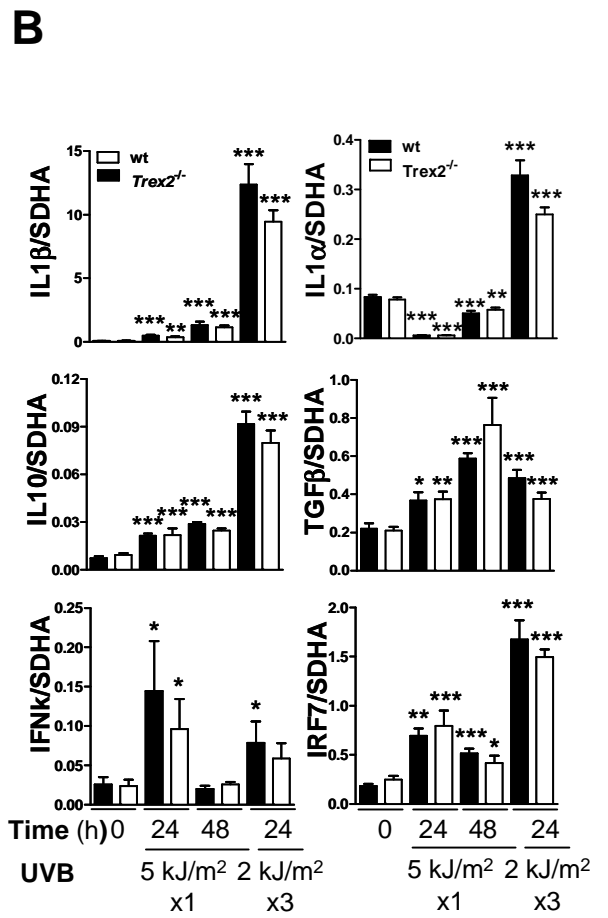
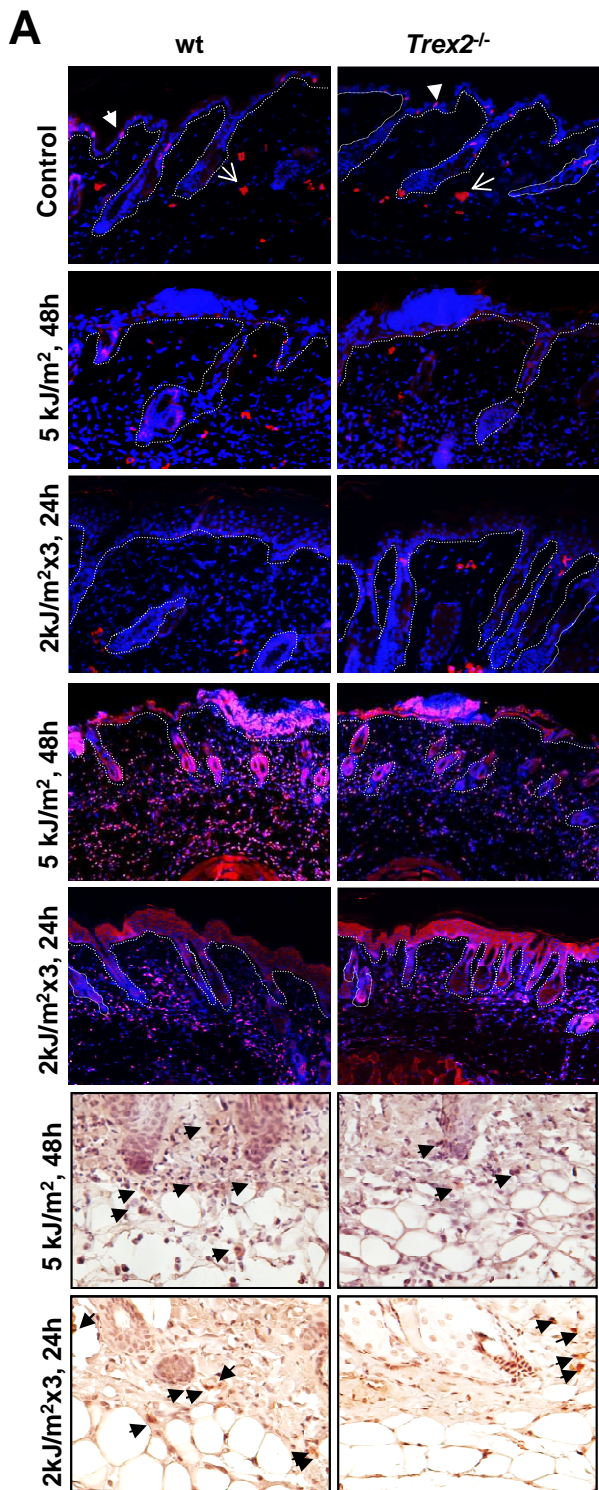


Figura R13. Resposta inflammatòria en resposta a la irradiació amb UVB en les pells dels ratolins wt i *Trex2*^{-/-}. (A) Detecció de cèl·lules mieloides (CD11b), limfòcits T (CD3) i macròfags (F4/80). (B) Expressió de gens immunitaris analitzats per RT-qPCR i (C) nivells de fosforilació de STAT1 i STAT3 i proteïna total IκBα en extractes proteics de pells de ratolí wt i *Trex2*^{-/-} irradiats amb UVB determinats per Western blot. Els gràfics mostren les mitjanes amb la SEM d'almenys 5 ratolins per cada condició i genotip. Diferències significatives pel test de Mann-Whitney entre genotips: #, P<0.05, ### P<0.001, i entre control i tractats: *P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

Resultats

6.2 Paper de TREX2 en la PSORIASI

6.2.1 TREX2 es sobreexpressa en lesions psoriàsiques

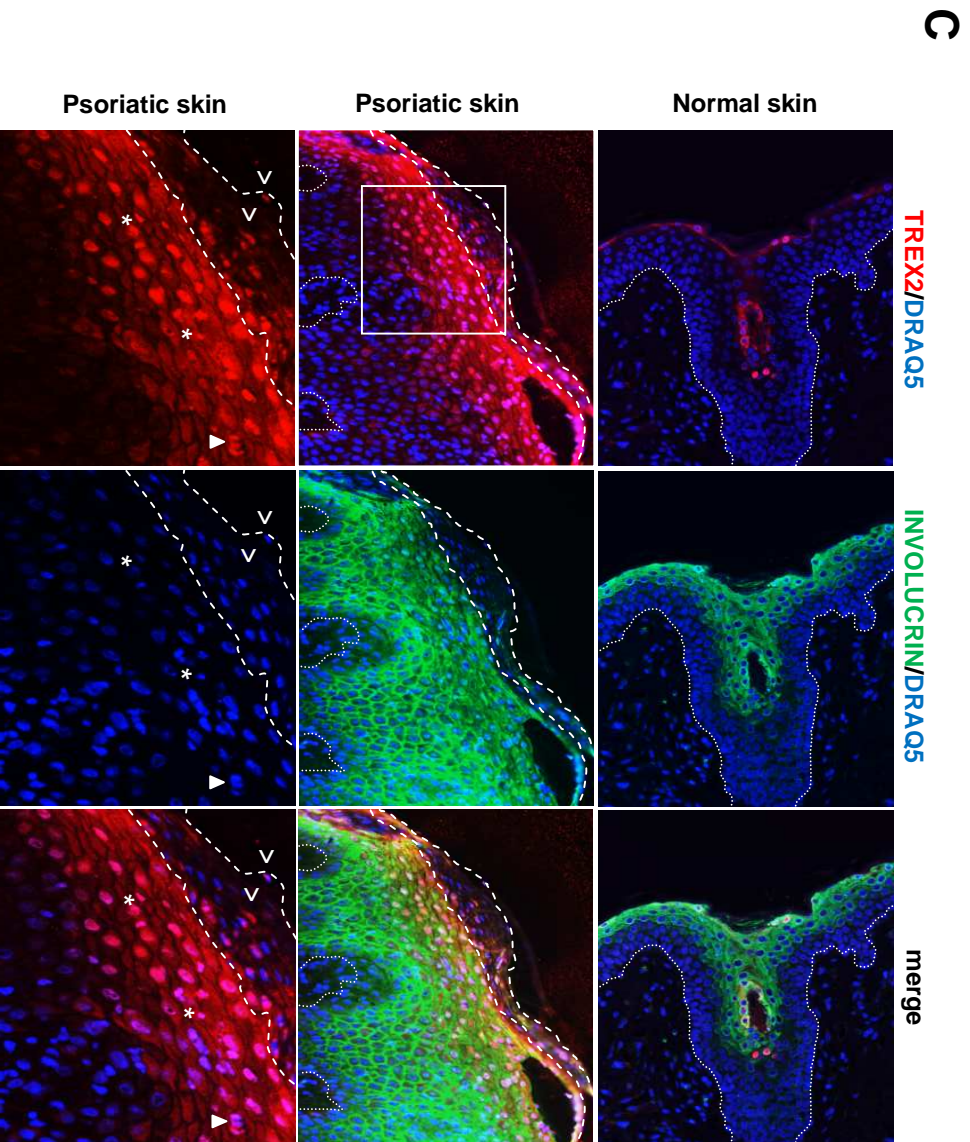
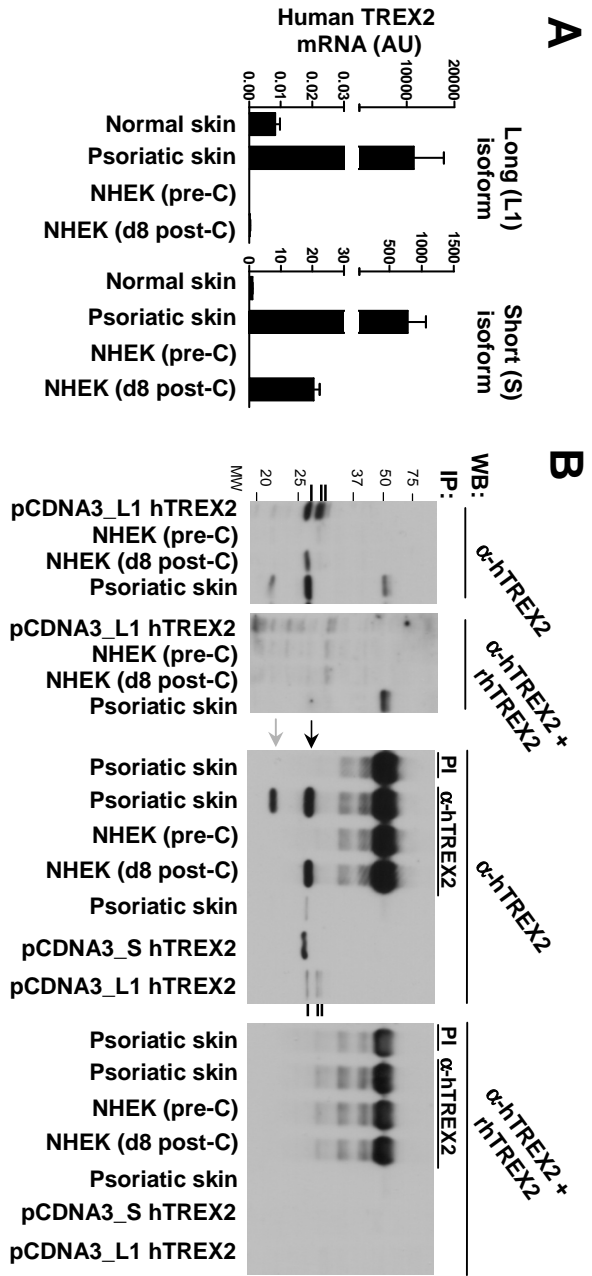
En diferents estudis d'anàlisi massius d'expressió gènica a pell normal en relació a la lesió psoriàsica en humans, es detecta un nivell d'expressió de TREX2 molt més elevat en les lesions psoriàsiques en relació a la pell no lesionada ((Reischl *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2008; Gudjonsson *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014). Per confirmar i caracteritzar aquesta alteració es van dur a terme estudis de RT-qPCR per determinar l'expressió dels diferents trànscrips de TREX2 en pell humana sana i psoriàsica. En comparació amb la pell normal, tant el trànscrip S, que codifica per la isoforma de 236 aminoàcids, com el trànscrip L1, que codifica per la isoforma de 279 aminoàcids, amb pesos moleculars aparents d'aproximadament 26 i 30 kDa, respectivament, s'expressaven en quantitats molt superiors en la lesió psoriàsica (Fig. R14A). La sobreexpressió de TREX2 no era tan sols un esdeveniment transcripcional. Com s'observa en els anàlisis de western blot (Fig. R14B) i d'immunofluorescència (Fig. R14C), els nivells de proteïna eren molt superiors en la lesió psoriàsica respecte la pell normal. En les extractes totals i les immunoprecipitacions de pell psoriàsica es detecta la banda de 26 kDa corresponent a la isoforma curta, però no la isoforma llarga de 30 kDa. A més a més, detectàvem una banda d'aproximadament 19 kDa. Tampoc detectàvem el transcrit L1 ni la isoforma proteica de 30 kDa en els queratinòcits primaris humans (NHEK) en cultiu a l'estadi de preconfluència, o en l'estadi de postconfluència en el que adquireixen marcadors de diferenciació. De fet, quan s'expressava de forma ectòpica el cDNA que codifica per la isoforma L1 a la línia cel·lular HaCaT, que no expressa quantitats detectables de TREX2 de forma endògena, es generaven tres isoformes proteiques de pesos moleculars aparents d'aproximadament 30, 29 i 26 kDa, que correspondrien a l'inici de traducció a partir de cadascun dels tres ATG que hi ha en pauta de lectura a l'inici de l'*open reading frame*. El primer i el tercer corresponen als inicis de traducció dels trànscrips L1 i S (Fig. R14B). En aquest context, si bé no podem descartar que sigui un producte de proteòlisi, la banda de 19 kDa detectada en les mostres de psoriasis pot ser resultat de l'ús com inici de transcripció del següent ATG, situat 107 aminoàcids més avall de l'ATG inicial de la isoforma llarga de 279 aminoàcids. Per tant, l'inici de traducció d'ús preferent dels trànscrips de TREX2 per la maquinària traduccional *in vivo* i *in vitro*, a queratinòcits primaris i

Resultats

línies de queratinòcits transfectades, seria el que codifica per la isoforma proteica de 26 kDa, i en condicions d'elevada expressió també podria emprar-se un de més intern generant-se una isoforma de 19 kDa. Aquesta isoforma potencialment podria interaccionar amb el DNA però li mancarien residus crítics per l'activitat exonucleasa (Perrino *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007b; Perrino *et al.*, 2008).

Per altra banda, l'anàlisi d'immunohistofluorescència, mostra com la proteïna TREX2 en la pell normal humana, presentava una expressió restringida en les capes més superiors i diferenciades de l'epidermis i de la beina del fol·licle pilós, tant en el nucli com en el citoplasma dels queratinòcits. L'elevada expressió de TREX2 es correlacionava amb la diferenciació dels queratinòcits, com indica l'expressió d'involucrina, un marcador de diferenciació dels queratinòcits (Eckert *et al.*, 2004). Ara bé, en la pell psoriàsica, l'expressió de TREX2 sembla desmantellar-se i s'expandeix a la majoria de capes suprabasals de l'epidermis. Assenyalar que en la lesió psoriàsica, el marcatge per TREX2 era present i intens tant en els queratinòcits en diferenciació, com en cèl·lules en procés de divisió o de mort. A més a més, també es detectava expressió a corneòcits de regions paraqueratòsiques i hiperqueratòsiques de l'estrat corni (Fig. R14C). TREX2 es localitza en el citoplasme i el nucli, on s'acumula. Coincidint amb estudis previs, l'expressió de la involucrina s'alterava a la lesió psoriàsica (Bernard *et al.*, 1988). A l'epidermis psoriàsica, la involucrina és present a totes les capes suprabasals, però no a l'estrat corni, mentre que en la pell normal l'expressió es restringeix a l'estrat granular i l'estrat espinós.

Figura R14. TREX2 se sobreexpressa en les lesions psoriàsiques. (A) Nivells dels transcrits L1 i S de *TREX2* analitzats per RT-qPCR en les pells normals i psoriàsiques i en cultius primaris de queratinòcits humans (NHEK) preconfluents o al cap de 8 dies postconfluència. El gràfic mostra la mitjanana i la SEM d'almenys 3 mostres per condició. (B) Anàlisi per western blot de l'expressió de TREX2 en els lisats totals i immunoprecipitats de les mostres de psoriasi i NHEK preconfluents i al cap de 8 dies postconfluència. Com a control positiu es van analitzar lisats de HaCaT amb expressió heteròloga estable dels transcrit L1 i S de *TREX2*, que codifiquen per la isoforma curta (236 aa) i llarga (279 aa) de *TREX2*. L'especificitat de la senyal es va comprovar preincubant l'anticòs amb proteïna humana recombinant (rhTREX2), que disminueix la senyal de les bandes en els pesos esperats de *TREX2* però no de les bandes inespecífiques. (C) Expressió de *TREX2* i involucrina en la pell humana normal i psoriàsica determinada per IHF. Nuclis tenyits amb DRAQ5. Les línies discontinües indiquen els límits de l'estrat corni amb presència de paraqueratosis; els asteriscs indiquen nuclis apoptòtics; les fletxes obertes indiquen nuclis paraqueratòsics; les fletxes tancades indiquen mitosis. Magnificació original 20x (panels superiors) i 40x (panel inferior, corresponent requatre panel pell psoriàsica).



6.2.2 La deficiència de TREX2 disminueix el fenotip psoriàsic induït per l'aplicació d'Imiquimod

Amb l'evidència que TREX2 es desregula en les lesions psoriàsiques, ens vam preguntar si aquesta exonucleasa estava implicada en la patologia de la psoriasi. Per conèixer la rellevància de TREX2 en aquesta patologia de la pell, vam avaluar el desenvolupament de la psoriasi en el ratolí *Trex2*^{-/-} utilitzant un model murí d'inducció transitòria d'inflamació cutània molt semblant al de la psoriasi humana, mitjançant l'aplicació a l'esquena dels ratolins d'Aldara (nom comercial de la pomada que conté el principi actiu Imiquimod) (van der Fits *et al.*, 2009). L'avaluació del pes corporal i la severitat de la inflamació a la superfície de la pell tractada va mostrar un fenotip diferencial en ratolins deficients de TREX2 en relació als wt. Concretament, els ratolins *Trex2*^{-/-} van perdre menys pes, amb diferències significatives als dies 2, 3 i 6 de tractament (Fig. R15A), i mostraven significativament menys descamació i eritema (Fig. R15B i R15C) que els wt en els dies 3 i 4. Aquests mateixos dies el gruix de la pell tractada també era significativament menor en els ratolins *Trex2*^{-/-} que en els wt (Fig. R15D i R15E). Per altra banda, no es van observar diferències de pes en les melses (Fig. R15F), indicant que no hi havia diferències a nivell sistèmic. Per tant, en absència de TREX2 s'altera la resposta específicament en la pell.

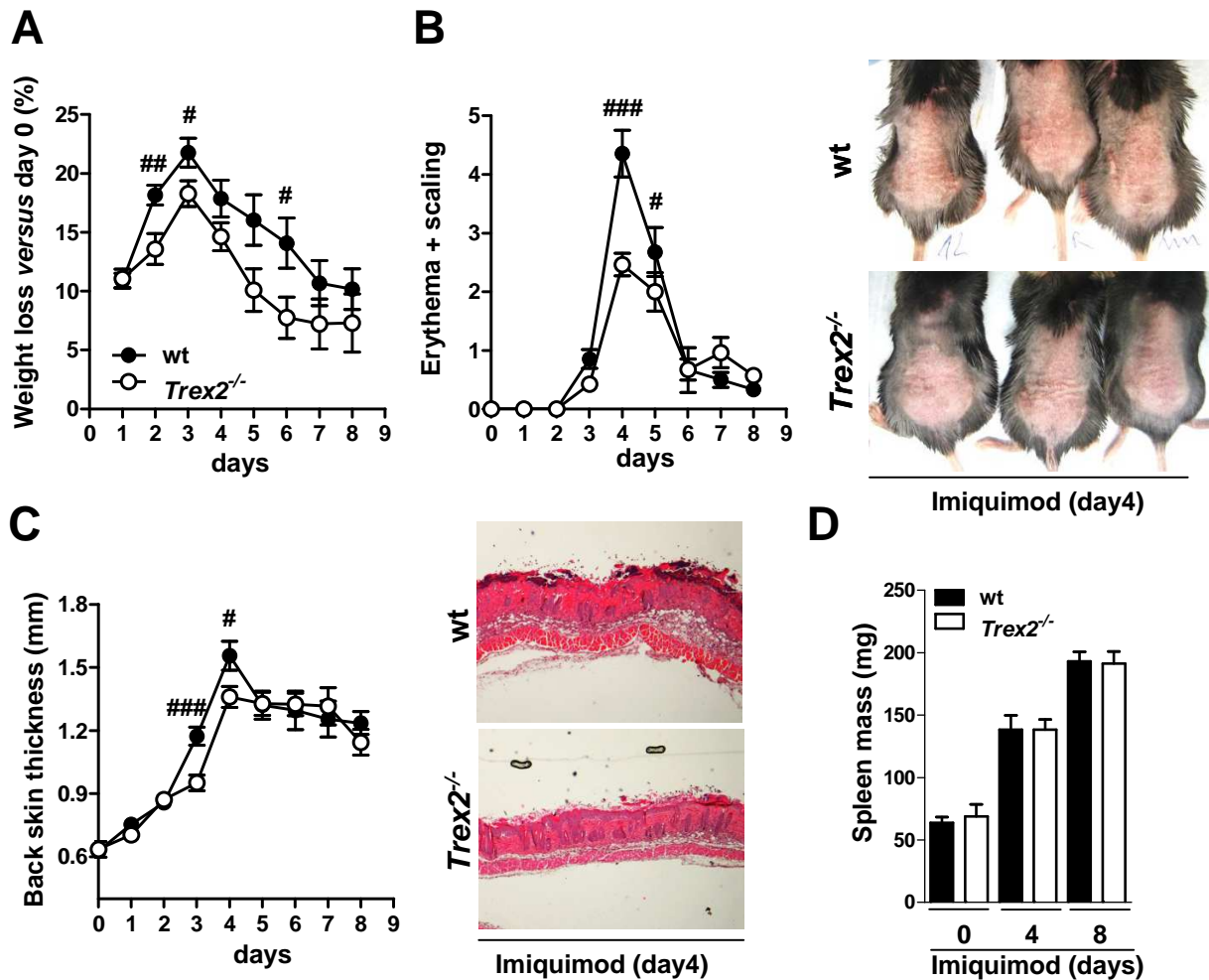


Figura R15. L'absència de TREX2 disminueix la severitat de la inflamació induïda per Imiquimod en la pell. **(A)** Percentatge de pèrdua de pes dels ratolins wt i *Trex2*^{-/-} tractats amb Imiquimod al llarg del temps respecte el pes a dia 0 de tractament. **(B)** Representació gràfica del grau de descamació i eritema de 0 a 4: 0, cap; 1, poc; 2, moderada; 3, marcada; 4, molt marcada. **(C)** Vista macroscòpica de l'aparença dels ratolins wt i *Trex2*^{-/-} a dia 4 del tractament amb Imiquimod. **(D)** Gruix de la pell de l'esquena dels ratolins wt i *Trex2*^{-/-} al llarg del temps. La mesura correspon a la de la pell doblada. **(E)** Tall histològic representatiu de les pells wt i *Trex2*^{-/-} tenyits amb H&E. Magnificació original 10x. **(F)** Representació gràfica del pes mig de les melses wt i *Trex2*^{-/-} a dia 4 i dia 8 de tractament amb Imiquimod. Els gràfics mostren la mitjana i la SEM d'almenys 6 ratolins de cada genotip. Diferències significatives entre genotips: Test de Mann-Whitney (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$).

Resultats

Posteriorment, l'anàlisi histopatològic de les seccions de pell ens va revelar l'existència de diferències significatives a nivell d'inflamació entre els ratolins *Trex2*^{-/-} i els wt. Es va analitzar la pell a dia 4 de tractament, moment en el que eren més evidents les diferències fenotípiques i a dia 8, coincidint amb el final de tractament i quan molts dels efectes transitoris de l'Imiquimod ja han pràcticament desaparegut. Sense tractament les pells dels ratolins *Trex2*^{-/-} eren histològicament iguals que les dels wt. No s'observaven defectes anatòmics en l'arquitectura de la pell ni es detectaven infiltrats de cèl·lules del sistema immunitari (Fig. R16A). Ara bé, a dia 4 de tractament amb Imiquimod, la formació de microabscessos a la superfície de l'epidermis, resultat de la infiltració principalment de neutròfils, era significativament inferior en les pells dels ratolins *Trex2*^{-/-} comparada amb les dels wt, on gairebé recobrien tota la longitud de l'epidermis (Fig. R16A i R16B). A dia 8 de tractament ja no s'observaven abscessos en cap dels dos genotips. Per tant, aquestes dades indiquen que el fenotip inflamatori transitori induït per l'imiquimod té una cinètica transitòria similar en presència i absència de TREX2, però quantitativament és menor en absència de TREX2.

A més a més, l'anàlisi histològic mostrava que l'augment de paraqueratosi, provocat pel tractament amb Imiquimod i resultat d'una desregulació del procés de diferenciació dels queratinòcits, era més elevat en els ratolins *Trex2*^{-/-} en comparació amb els wt. Les diferències eren evidents i significatives a dia 4 de tractament i es mantenien en menor grau encara que no de forma significativa fins el dia 8 (Fig. R16A i R16B). Aquestes dades i el fet que TREX2 és present a les zones de paraqueratosi de les mostres de psoriasis humana (Fig. R14C), suggereix que aquesta exonucleasa pot tenir un paper rellevant en el procés de diferenciació aberrant dels queratinòcits en la placa psoriàsica.

Així, les dades obtingudes indiquen que TREX2 és un actor actiu en la inflamació de la pell induïda per Imiquimod i que, sota condicions d'estrés, TREX2 col·laboraria en la degradació nuclear associada al procés de cornificació o diferenciació terminal dels queratinòcits.

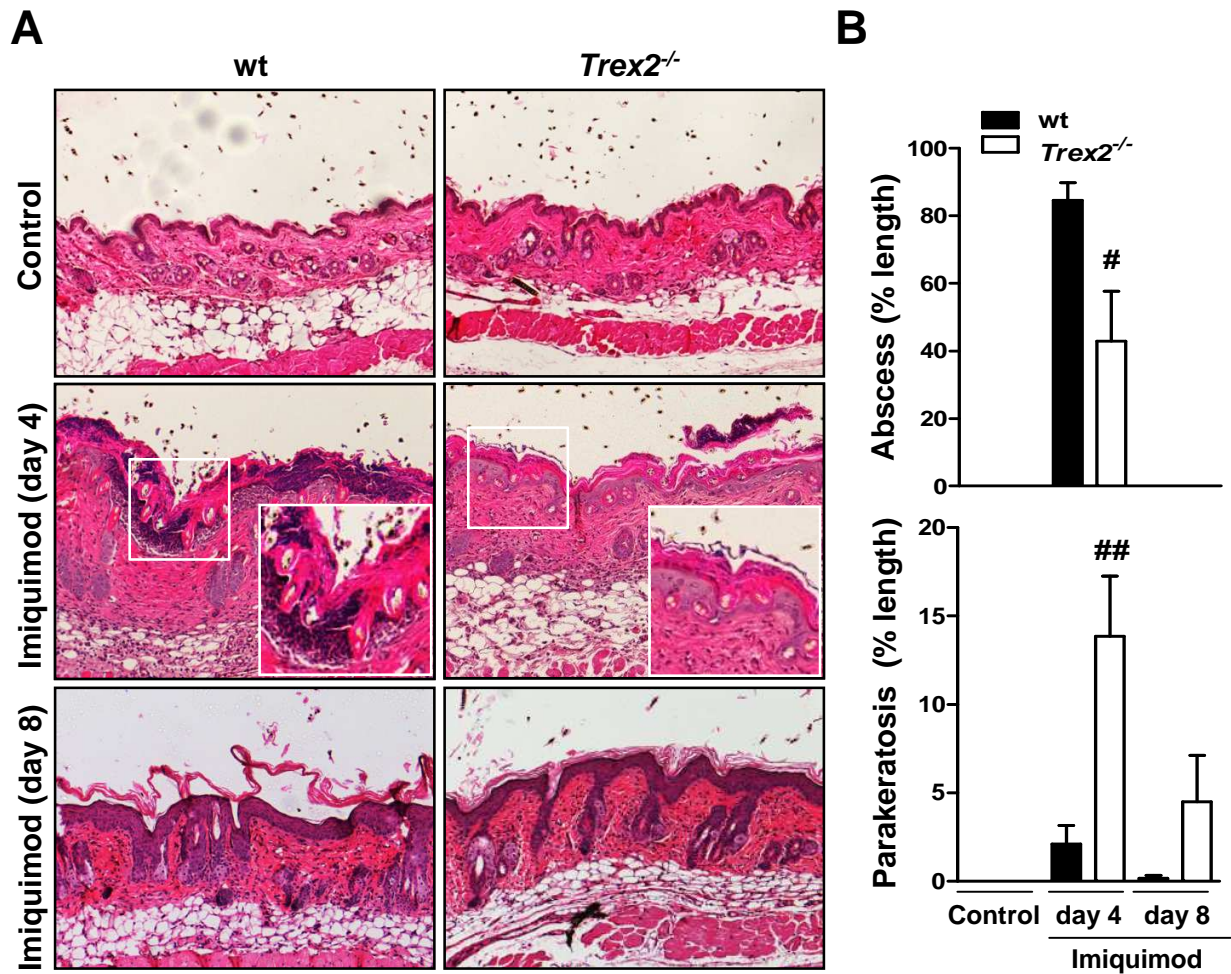


Figura R16. Menys absessos i més paraqueratosi induïts per l'Imiquimod en absència de TREX2. (A) Tall histològics tenyits amb H/E representatius de les pells wt i *Trex2*^{-/-} controls i tractades 4 o 8 dies amb Imiquimod. Magnificació original 20x. (B) Representació gràfica de la quantificació dels abscessos i les plaques de paraqueratosi en les pells dels ratolins wt i *Trex2*^{-/-} controls i tractades 4 o 8 dies amb Imiquimod. Els valors corresponen al percentatge mig de pell afectada en relació a la longitud total de l'epidermis. Els gràfics mostren la mitjana i la SEM d'almenys 6 ratolins de cada genotip. Diferències significatives entre genotips: Test de Mann-Whitney (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$).

6.2.3 El tractament amb Imiquimod provoca una expressió aberrant de TREX2

Donat que l'absència de TREX2 a ratolí augmentava els nivells de paraqueratosi i conferia resistència a la inflamació de la pell tractada amb Imiquimod, vam analitzar la seva expressió i localització en la pell de ratolí en condicions control i als 4 i 8 dies de tractament.

Com s'il·lustra a la Figura R17, l'expressió de TREX2 en la pell del ratolí normal, com a l'humana (Fig. R14C), es va detectar principalment a l'estrat granular de l'epidermis. Aquest patró es mantenia tant en la fase d'anagen com de telogen del creixement del pèl i els nivells d'expressió es correlacionaven positivament amb el grau de diferenciació dels queratinòcits com quedava palès per la seva localització tissular i per l'expressió del marcador de diferenciació K10. A més a més, també es va observar un fort marcatge de TREX2 en la glàndula sebàcia i en la beina interna de l'arrel del fol·licle capil·lar. L'especificitat de la tinció de l'anticòs quedava demostrada inequívocament per l'absència de marcatge a les mostres procedents del ratolí *Trex2*^{-/-}. El fet que no s'observessin alteracions aparents en el desenvolupament del pèl, ni en l'estructura del fol·licle, ni de la glàndula sebàcea en el ratolí *Trex2*^{-/-} indica que l'expressió de TREX2 no en condiona la seva formació ni desenvolupament.

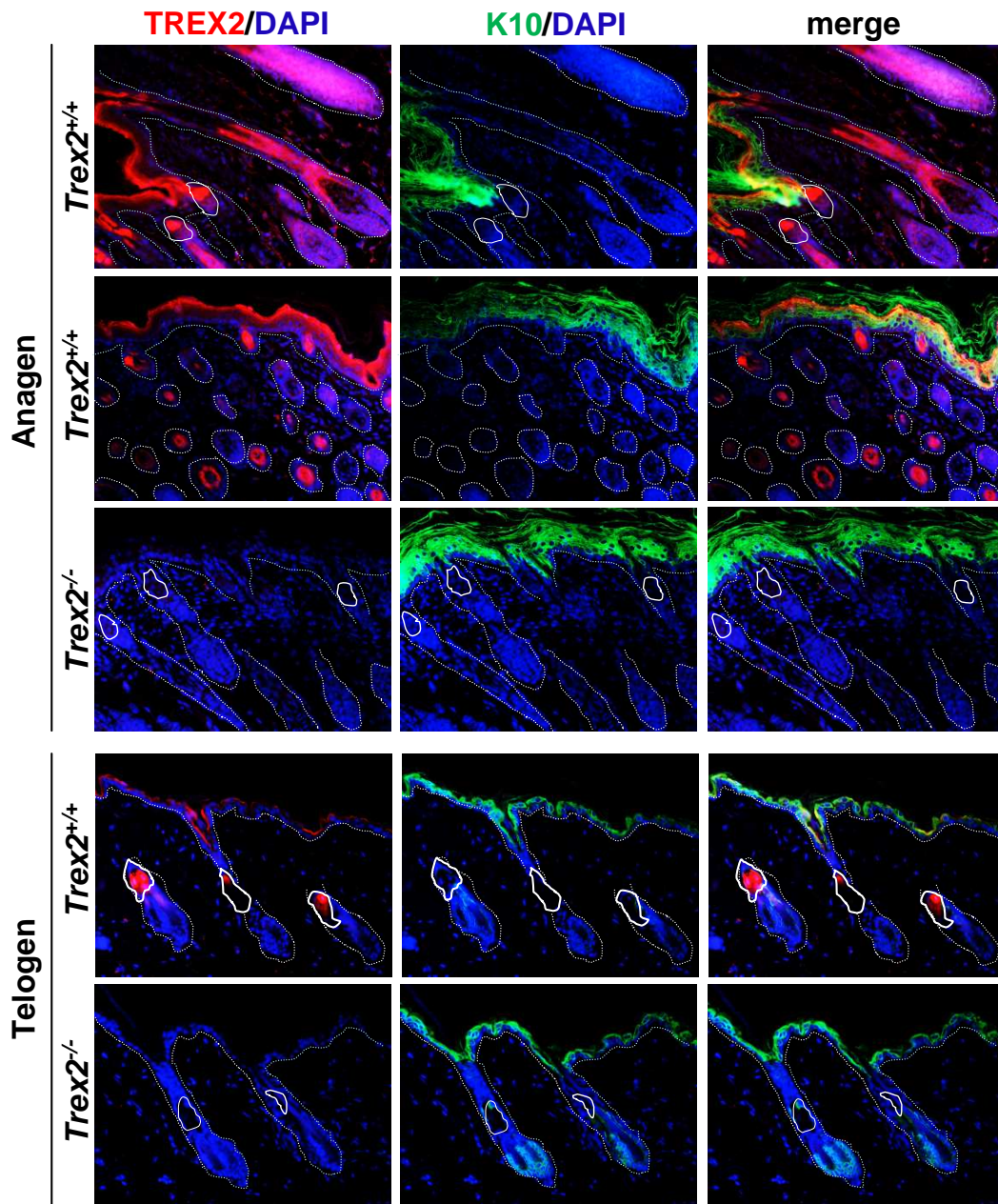
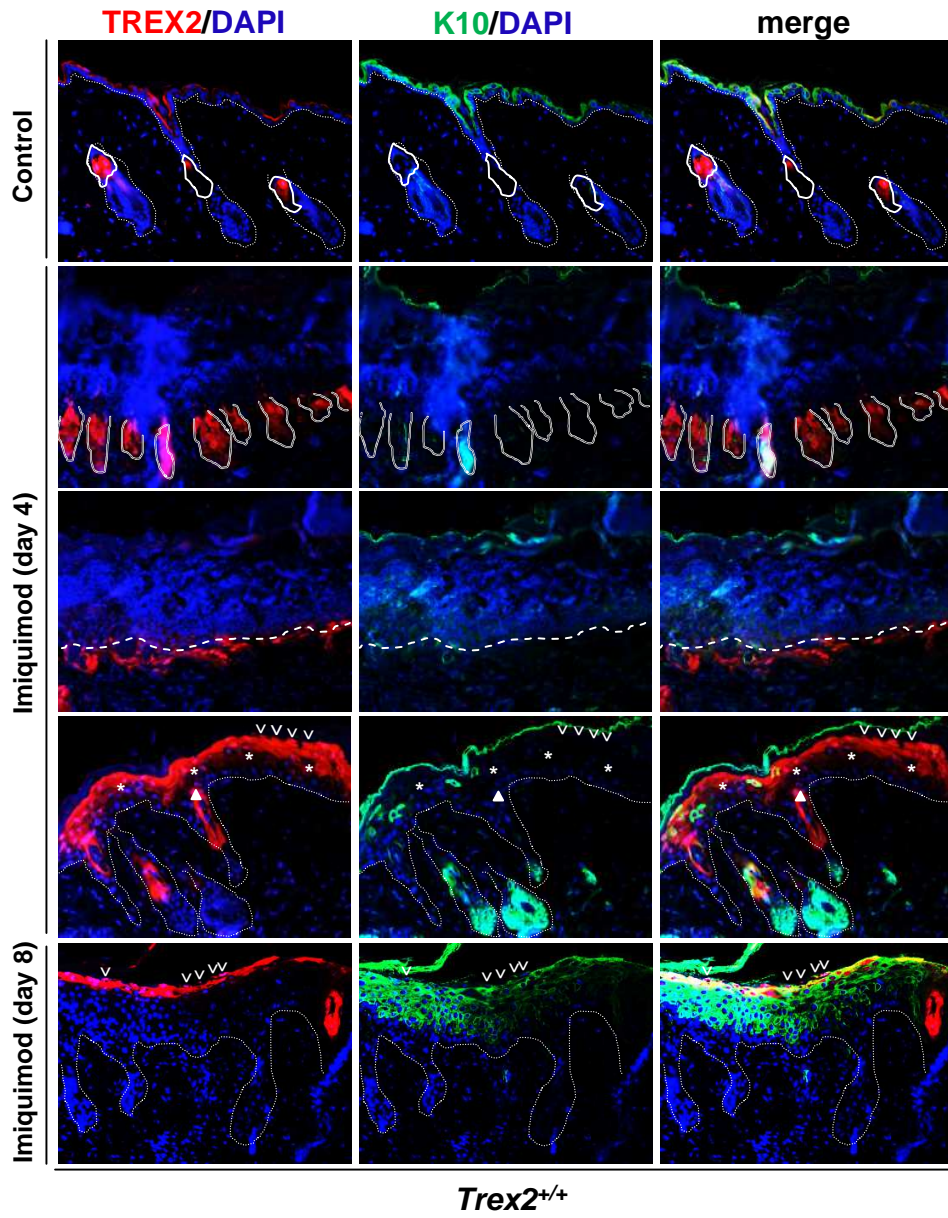


Figura R17. L'expressió de TREX2 es localitza en les capes més diferenciades de l'epidermis, en la glàndula sebàcia i en la beina interna de l'arrel del pèl. Expressió de TREX2 i K10 en pells de ratolí wt i *Trex2*^{-/-} a les fases d'anagen i telogen del pèl. El nuclis es van marcar amb DAPI. Línies de punts indiquen límit entre dermis i epidermis. Magnificació original 20x.

Resultats

Anàlogament al que havíem observat en les lesions psoriàsiques humanes (Fig 14C), la inducció del fenotip psoriàsic amb Imiquimod en ratolí es correlacionava amb un gran augment dels nivells d'expressió de TREX2 i amb una localització tissular aberrant (Fig. R18A). L'anàlisi per IHF de l'expressió de TREX2 a les pells tractades amb Imiquimod durant 4 dies va mostrar dos patrons diferenciats d'elevada expressió de TREX2, localitzats un en les zones amb infiltració leucocitària i un altre en les regions amb hiperplàsia, hiperqueratosi i paraqueratosi. En les regions amb elevada infiltració leucocitària i una epidermis danyada amb signes de regeneració, hi havia un marcatge molt intens de TREX2 en les regions corresponents a les glàndules sebàcies, que patien una gran hipertròfia com a resultat del tractament amb Imiquimod. A les imatges de contrast de fase (Fig. R19) es pot visualitzar la morfologia de les glàndules sebàcies i la immunolocalització de TREX2. Per altra banda, en les regions amb hiperplàsia i sense abscessos es va detectar expressió de TREX2 en múltiples capes de l'epidermis suprabasals, amb un patró de marcatge similar de TREX2 a l'observat en la psoriasis humana (Fig. R14C), detectant-se un marcatge intens de TREX2 en queratinòcits en procés de divisió, diferenciació o de mort i en nombrosos corneòcits. L'especificitat d'aquest marcatge es va comprovar en les pells *Trex2*^{-/-} (Fig. R18B). Per tant, el fenotip psoriàsic tant en humans com en ratolí està associat a una elevada inducció de TREX2, que s'expressa tant a queratinòcits proliferatius, com en procés de mort cel·lular o diferenciació.

A



B

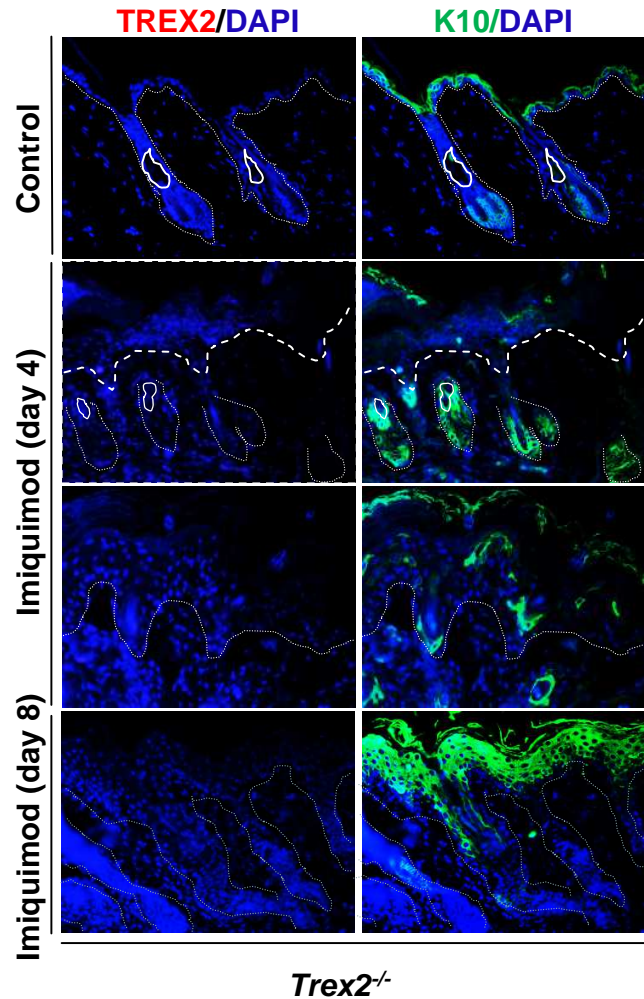


Figura R18. El tractament amb Imiquimod provoca una expressió aberrant de TREX2 en la pell. Anàlisi per IHQ de l'expressió de TREX2 i K10 en pells de ratolí (A) wt o (B) *Trex2*^{-/-} control o tractades durant 4 o 8 dies amb Imiquimod. Nuclis marcats amb DAPI. Magnificació original 20x. Línies de punts fins indiquen límit entre dermis i epidermis, línies de ratlles discontinües indiquen epidermis en regeneració, línies contínues indiquen límits de la glàndula sebàcia.

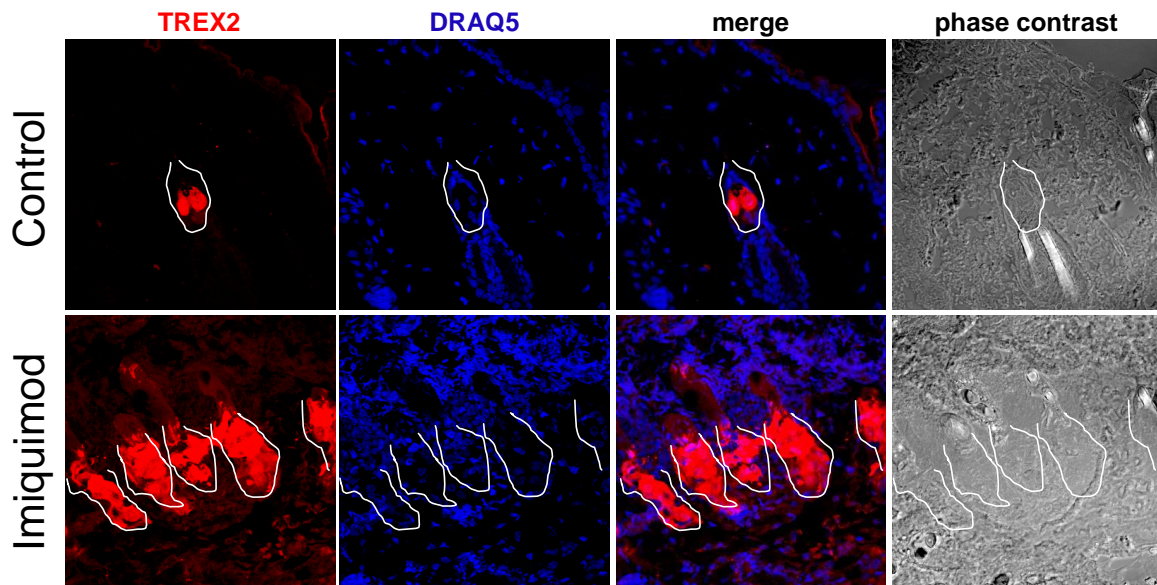


Figura R19. Expressió de TREX2 en la glàndula sebàcia. Anàlisi per IHQ de l'expressió de TREX2 en pells de ratolí wt control o tractades durant 4 dies amb Imiquimod. Nuclis marcats amb DRAQ5. Magnificació original 63x. Línies discontinúes indiquen límits de la glàndula.

A més a més, vam observar que TREX2 es concentrava a regions nuclears positives per γ H2AX (Fig R20), un marcador, com he esmentat anteriorment, de ruptures dobles en el DNA (Baritaud *et al.*, 2010). S'observava principalment a queratinòcits suprabasals, tant amb cromatina compactada (asterisc), com no compactada (fletxa) i a romanents nuclears de l'estrat corni (fletxa oberta). Així, de forma similar al que havíem observat en les pells irradiades amb UVB (Fig. R10), TREX2 colocalitza amb la γ H2AX en queratinòcits estressats, podent participar en el processament del DNA i facilitar tant la mort cel·lular com la degradació nuclear, que té lloc durant el procés de diferenciació dels queratinòcits.

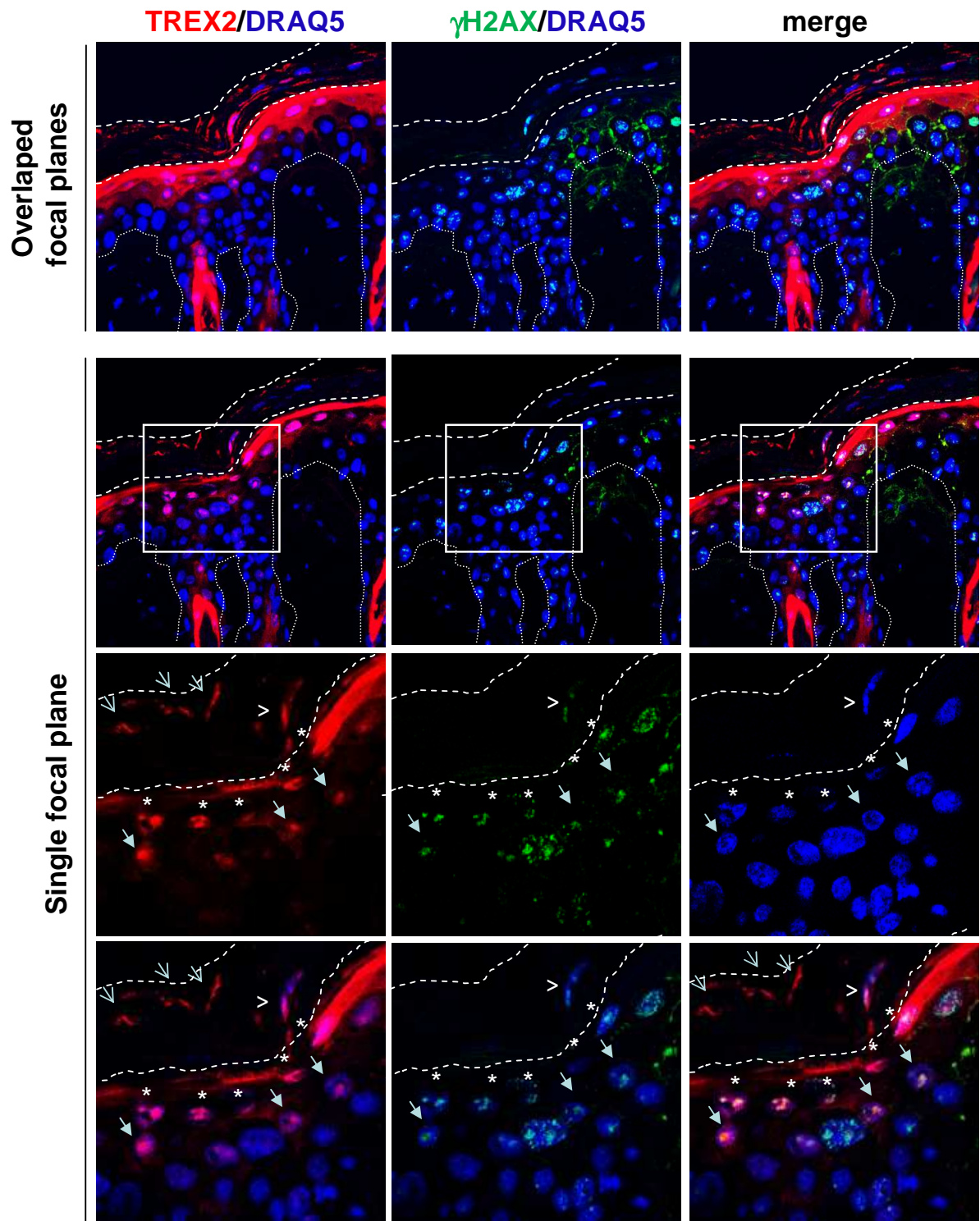


Figura R20. Colocalització de TREX2 i γ H2AX en queratinòcits de pells tractades amb Imiquimod. Anàlisi per microscòpia confocal de l'expressió de TREX2 i γ H2AX en pells de ratolí wt tractades durant 4 dies amb Imiquimod. Nuclis marcats amb DRAQ5. Asteriscs indiquen nuclis amb cromatina compactada i fletxes tancades indiquen nuclis amb cromatina no compactada on hi ha col·localització de TREX2 i γ H2AX; fletxes obertes indiquen presència de TREX2 en la hiperqueratosi; caps de fletxes indiquen nuclis paraqueratòsics. Línies de punts fins indiquen límit entre la dermis i l'epidermis, línies de ratlles discontinües indiquen límits d'estrat corni. Magnificació original 63x.

6.2.4 La deficiència de TREX2 disminueix el fenotip proinflamatori i la mort cel·lular induïts per l'Imiquimod

L'Imiquimod afecta la integritat de l'epidermis, alterant la proliferació, diferenciació i mort dels queratinòcits i induint una resposta proinflamatòria (Walter *et al.*, 2013; Ha *et al.*, 2014; Works *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2014). El fet que tant a la pell psoriàsica humana com a la murina hi hagués una expressió aberrant de TREX2 en queratinòcits proliferant, diferenciant-se o morint, juntament amb l'alteració del fenotip psoriàsic en absència de TREX2 suggeria un paper rellevant de TREX2 en l'inici i/o desenvolupament d'aquesta patologia inflamatòria de la pell. Per caracteritzar l'efecte de la deficiència de TREX2 en la resposta immunitària a l'Imiquimod, vam analitzar en les pells dels ratolins wt i *Trex2*^{-/-} la inducció de l'expressió de les principals citocines implicades en la psoriasi (IL23, IL1 α , TNF α , IL1 α , IL1 β , IL6, IL17 α , IFN γ i IFN κ) i gens proinflammatoris (iNOS, MPO) o amb funcions alhora antimicrobicides i de capacitat d'interacció amb el DNA, com el pèptid antimicrobià CAMP/LL37, implicats en la patogènesi de la psoriasi (Fig. R19A). Així mateix, també es va analitzar l'expressió de marcadors de diferenciació dels queratinòcits, com la involucrina, K10 i loricrina.

L'expressió de la IL23, principal citocina associada a l'inici de la patogènesi de la psoriasi, augmenta en les pells tractades amb Imiquimod (Fig. R21A), coincidint amb les dades descrites anteriorment i que caracteritzen aquest model murí d'inducció de psoriasi (van der Fits *et al.*, 2009). Per altra banda, sorprenentment, no es va detectar expressió de la interleuquina IL17, l'altra citocina clau en el desenvolupament i cronicitat de la psoriasi. Probablement, la no detecció d'expressió del mRNA de la IL17 estigui relacionada amb la soca de ratolí i la transitorietat de la inducció. S'ha descrit que la inducció de la IL17 és inferior a la soca C57BL/6 en relació a la soca Balb/c, que és més sensible a l'Imiquimod i que la inducció

Resultats

transitòria d'IL17 és posterior a la de IL23 (van der Fits *et al.*, 2009). En concordança amb el fenotip psoriàsic més lleu observat en les pells *Trex2^{-/-}*, la deficiència de TREX2 disminuïa significativament la inducció de la citoquina IL23. A més a més, la inducció del mRNA de citoquines proinflamatories de la immunitat innata amb un paper rellevant en la patologia de la psoriasi, com TNF α i IL1 α , del pèptid antimicrobià CAMP/LL37, i dels gens proinflamatoris MPO i iNOS disminuïa significativament en les pells tractades dels ratolins *Trex2^{-/-}* respecte les wt. Consistentment, també trobem una menor quantitat de STAT3 fosforilat (activat per diverses citoquines proinflamatories), i nivells proteics disminuïts d'iNOS i Ly-6g, marcadors d'infiltració i activació de leucòcits, en les pells *Trex2^{-/-}* respecte les wt (Fig. R21B). També, coincidint amb els anàlisis d'immunofluorescència (Fig. R18), trobàvem nivells molt elevats del transcrit (Fig. R21A) i la proteïna TREX2 (Fig. R21B) en les pells dels ratolins wt tractats amb Imiquimod comparades amb les control. Per altra banda, l'expressió de la loricrina, un dels principals gens relacionats amb la diferenciació dels queratinòcits, que es troba fortament desregulada en la psoriasi (Kim *et al.*, 2011), era significativament més baixa en les pells dels ratolins *Trex2^{-/-}* en relació a les dels wt a dia 8 de tractament amb Imiquimod. En resum, aquests resultats demostren que en absència de TREX2 es frena la resposta inflamatòria i s'altera el patró de diferenciació anòmala associat a la psoriasi.

Finalment, per determinar si la deficiència de TREX2 afectava la mort cel·lular induïda per l'Imiquimod, vam analitzar l'activació de la caspasa 3 i el processament de PARP, marcadors de mort cel·lular per apoptosi. Així mateix, vam fer un marcatge de TUNEL per detectar mort cel·lular tant per apoptosi com per necrosi i, a més a més, avaluar si hi podia haver diferències en l'acumulació de DNA fragmentat. Com s'observa a la figura R21B, els nivells de caspasa 3 activa (fragment p17/19) i de PARP processat (p85) induïts pel tractament amb Imiquimod eren inferiors als extractes de les pells *Trex2^{-/-}* que als de les pells wt a dia 4. A dia 8 els nivells de caspasa 3 activa eren més baixos, però es mantien les diferències entre genotips, i no es detectava processament de PARP.

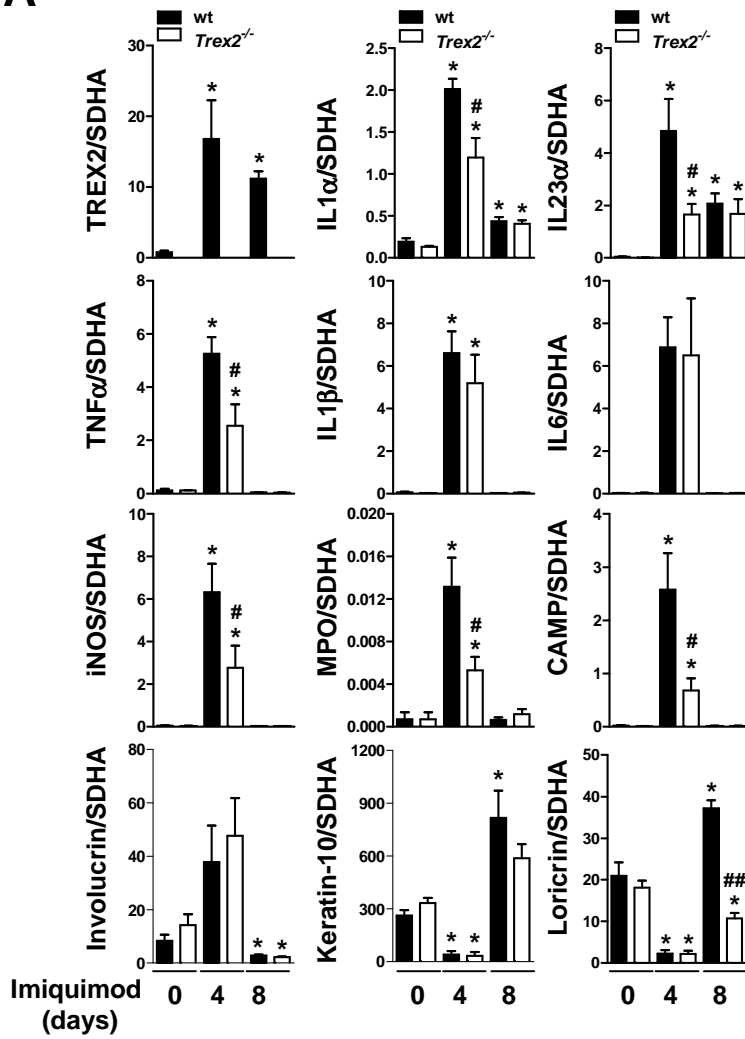
Per altra banda, el marcatge de TUNEL (Fig R21C) mostrava que en les regions d'abcessos era on principalment s'observava una diferència important entre ambdós genotips. El marcatge de TUNEL era menor en els ratolins *Trex2^{-/-}* que en els wt. A més a més, el patró també era

diferent. En les pells deficientes per TREX2 el marcatge de TUNEL s'acumulava en les capes més distals, mentre que en la pell wt, hi ha cèl·lules positives distribuïdes en una regió àmplia (Fig. R21C). Per tant, TREX2 condiciona la mort cel·lular induïda per l'Imiquimod.

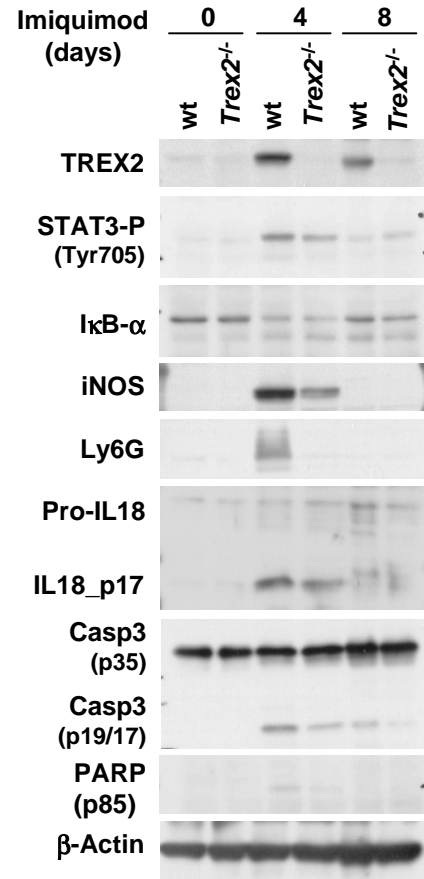
En conjunt, aquests resultats mostren que l'aplicació d'Imiquimod en les pells dels ratolins provoca una sobreexpressió i localització aberrant de TREX2, que afavoriria la mort dels queratinòcits, que estan sotmesos a un *turnover* accelerat, i la conseqüent resposta inflamatòria.

Figura R21. Deregulació de la resposta immunitària, la diferenciació i l'apoptosi en les pells deficientes de TREX2 en resposta a l'Imiquimod. (A) Expressió de gens immunitaris induïts per l'Imiquimod en les pells de ratolins wt i *Trex2*^{-/-} determinada per RT-qPCR. Els gràfics mostren la mitjana i la SEM d'almenys 6 ratolins per condició i genotip. Diferències significatives del test de Mann-Whitney entre genotips: (#, P<0.05, ## P<0.001) entre tractats i no tractats (*, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001). (B) Nivells de proteïnes claus en la senyalització de la resposta immunitària i l'apoptosi en extractes proteics de pells de ratolí wt i *Trex2*^{-/-} tractats amb Imiquimod. Cada carril correspon a un "pool" de com a mínim 4 lisats de pells de la mateixa condició i genotip. (C) Imatges representatives del marcatge TUNEL en pells wt i *Trex2*^{-/-} tractades amb Imiquimod durant 4 dies.

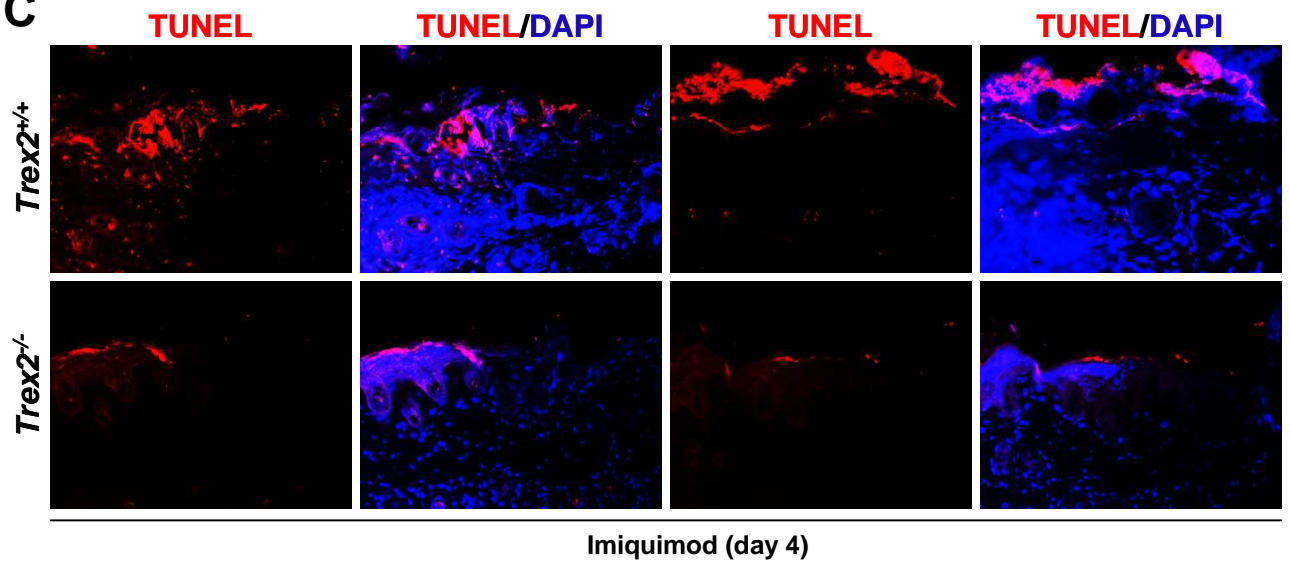
A



B



C



7 Discussió

L'exonucleasa TREX2 va ser identificada al genoma de mamífers fa més de 15 anys (Mazur and Perrino, 1999), i si bé a nivell bioquímic i molecular es va caracteritzar ràpidament i actualment es coneixen bastant bé les seves propietats estructurals i els mecanismes d'interacció amb el DNA (Perrino *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007b; de Silva *et al.*, 2007; Perrino *et al.*, 2008), encara se sap relativament poc sobre la seva rellevància fisiològica i les vies cel·lulars en les que està implicada. Precisament, la generació del ratolí *Trex2*^{-/-} deu anys després (Parra *et al.* 2009) va permetre començar a profunditzar en el coneixement de la funció biològica d'aquesta exonucleasa. Concretament, es va identificar TREX2 com un supressor tumoral en condicions d'estrès genotòxic en queratinòcits, on majoritàriament s'expressa (Parra *et al.*, 2009). Els resultats d'aquesta tesi mostren que TREX2, promou intrínsecament la mort dels queratinòcits danyats, modelant així extrínsecament la resposta immunitària de la pell a la radiació UVB, principal agent natural implicat en la carcinogènesi de la pell, i a l'Imiquimod, agent inductor d'un fenotip psoriàsic transitori. TREX2 promou la mort dels queratinòcits danyats impeding-ne la reversió al facilitar degradació del DNA més que la seva reparació. En conjunt, les nostres dades indiquen que TREX2 tindria un paper teixit específic clau en el manteniment de l'homeòstasi de la pell en resposta a agents exògens o endògens que acaben generant condicions d'estrès cel·lular.

7.1 Expressió de TREX2 en la pell

Els estudis duts a terme prèviament pel nostre laboratori delimitaven l'expressió de TREX2 a l'epiteli estratificat de la pell, la llengua, l'esòfag i el cèrvix, i concretament als queratinòcits. Malgrat altres autors han descrit l'expressió de mRNA de TREX2 a cèl·lules embrionàries o de proteïna a altres tipus i línies cel·lulars, o teixits com fetge i pulmons (Chen *et al.*, 2007b), nosaltres no detectem expressió de TREX2 a nivell de proteïna ni mRNA a cap altre tipus cel·lular diferent del queratinòcit. L'anàlisi de l'expressió tissular per western blot i immunofluorescència a diferents teixits, emprant com a control negatiu les mostres del ratolí *Trex2*^{-/-}, ens ha permès descartar hibridacions inespecífiques que sovint donen els anticossos per reactivitats creuades. Si bé en el ratolí només es coneix un transcrit per TREX2, a humans se n'han descrit almenys tres (Chen *et al.*, 2007b). El comú a ambdues espècies codifica per la isoforma de 236 aminoàcids (transcrit S). El transcrit L1 humà codifica per una isoforma de 279 aminoàcids, que conté 43 aminoàcids addicionals als de la isoforma S a l'extrem N-terminal.

Discussió

Curiosament, les nostres dades demostren que a partir del transcrit L1 també es genera la isoforma S, segurament per l'ús preferent de l'ATG intern, com es dedueix dels estudis d'expressió heteròloga i pel fet que ni en situacions on es detecta una sobreexpressió del transcrit L1, com en psoriasi, no detectem a nivell proteic la isoforma de 279 aminoàcids.

Amb els experiments realitzats en aquesta tesi hem acotat més l'expressió teixit específica de TREX2, al trobar que els nivells d'expressió d'aquesta exonucleasa estan relacionats amb l'estat de diferenciació dels queratinòcits. Així, els queratinòcits de les capes més diferenciades són els que presenten un marcatge més intens de TREX2 en els anàlisis d'immunofluorescència. L'expressió més elevada es detecta majoritàriament en la capa granular, tant a la pell murina com a la humana. En les mostres de pell humana, que presenten més capes que la de ratolí, es fa evident l'augment d'expressió de TREX2 a les capes suprabasals, paral·lelament a l'augment de l'expressió de marcadors de diferenciació com la Involucrina o la K10. D'acord amb aquesta observació, en cultius primaris de queratinòcits de ratolí, l'expressió heterogènia de TREX2 es correlaciona amb l'expressió de la involucrina. Aquesta correlació també l'hem observat en els cultius de queratinòcits humans, que comencen la diferenciació quan arriben a la confluència (Poumay and Pittelkow, 1995). En aquest model, l'expressió de TREX2 es detecta a nivell de proteïna només a partir del dia 5 de confluència, quan també s'està induint l'expressió d'altres gens de diferenciació, com la involucrina.

Fixant-nos amb més detall en els anàlisis d'immunofluorescència de pell també hem identificat l'expressió de la proteïna TREX2 en les glàndules sebàcies associades als pèls, així com en la beina interna de l'arrel del pèl. Aquest patró d'expressió s'associa una vegada més amb la diferenciació del queratinòcit, i suggereix que, TREX2 podria tenir un paper important en la cornificació i/o en la fisiologia de les estructures accessòries de la pell, com els pèls i les glàndules sebàcies. En ratolins amb delecions de gens que codifiquen per proteïnes estructurals de la pell, com la Loricrina, es troben defectes i un retardament en la formació de la barrera epidèrmica, que provoquen una major permeabilitat de substàncies del medi extern i una augmentada fragilitat dels seus corneòcits (Koch *et al.*, 2000). En d'altres casos, com en la delecio de la K10, es dona una hiperproliferació dels queratinòcits i un augment del mida d'aquests així com hipertròfia de les glàndules sebàcies i hipersecreció de lípids (Reichelt and

Magin, 2002; Reichelt *et al.*, 2004). En el cas del *knockout* de la DNAsa1L2, que presenta un patró d'expressió extremadament semblant al de TREX2, incloent expressió majoritària en la capa granular, glàndula sebàcia i la beina interna del pèl (Fischer *et al.*, 2007) s'observa una defecte en l'eliminació del DNA dels corneòcits i, com que queda DNA acumulat en els cabells, les propietats mecàniques d'aquests queden alterades esdevenint més trencadissos (Fischer *et al.*, 2011b). En el ratolí *Trex2*^{-/-} no hem trobat defectes en la formació de l'estrat corni, ni en l'arquitectura del pèl o les glàndules sebàcies en condicions basals, si bé no s'han dut a terme els estudis per conèixer les característiques de fortalesa i elasticitat dels pèls. Ara bé, en situacions d'estrès cel·lular, com el causat pel tractament amb l'Imiquimod en el model d'inducció de psoriasi a ratolí, sí que s'observa un augment de la paraqueratosi en la pell amb deficiència de TREX2. Aquest fet que suggereix un paper rellevant de TREX2 en la degradació del DNA nuclear durant el procés de cornificació en condicions d'estrès.

Les funcions de la glàndula sebàcia tot just s'estan redescobrint. Relegada a un segon pla d'importància es creia que tan sols servia per generar el sebum i que estava implicada en la formació de l'acne. No és fins al 1999 que s'estableix la primera línia immortalitzada de sebòcits humans (Zouboulis *et al.*, 1999) i els descobriments apunten que participa de manera prominent en l'homeòstasi de la pell. S'encarrega d'excretar lípids i antioxidants a la cara externa de la pell que mantenen la integritat de la barrera epidèrmica i protegeixen els queratinòcits de la llum UVB (Marques *et al.*, 2002). Recentment, s'ha vist que també participa de manera activa en la defensa de l'organisme en front de les agressions bacterianes gràcies a la síntesi i secreció de múltiples proteïnes antimicrobianes com les β -defensines o el CAMP/LL37 (Lee *et al.*, 2008). L'abundant acumulació de TREX2 en els sebòcits més diferenciats podria indicar que aquestes cèl·lules, derivades dels queratinòcits, acumulen proteïna per posteriorment excretar-la a l'exterior on podria actuar com agent antimicrobià o antivíric. Aquesta funció de TREX2 encara no ha estat testada però serà interessant fer-ho en un futur. En aquest sentit, s'ha descrit que la DNAsa1L2, endonucleasa present a l'estrat corni, inhibeix la formació dels biofilms necessaris per la colonització de *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylo-coccus aureus*, contribuint així a la immunitat innata en la pell (Eckhart *et al.*, 2007).

7.2 Mecanismes d'acció de TREX2: reparació vs degradació del DNA

Les nostres dades indiquen que en queratinòcits amb dany al DNA, TREX2 intrínscament influeix més en la degradació del DNA que no pas en la seva reparació. TREX2 afavoreix l'execució irreversible de la mort cel·lular, que a la vegada influeix i condiciona la resposta immunitària associada a la regulació de la reparació del DNA i la resposta anti-tumoral.

La llum UVB causa diverses lesions directament sobre el DNA, essent la formació de CPDs una de les més freqüents. Aquestes lesions interfereixen amb processos vitals de la cèl·lula com la replicació o la transcripció i si no es reparen a temps originen trencaments dobles de la cadena del DNA, amb la conseqüent fosforilació de la H2AX (γ H2AX). En la pell del ratolí *Trex2*^{-/-}, les lesions CPD i la fosforilació de H2AX en resposta a la UVB perduren en major grau al llarg del temps respecte del ratolí wt. Això pot ser degut a dos motius, o no es reparen eficientment les CPDs o les cèl·lules amb lesions al DNA no són eliminades per apoptosi o per altres vies de mort cel·lular a partir dels mateixos umbrals de dany en les pells *Trex2*^{-/-}. Per contra, la incorporació de ³H-Timidina en resposta a les lesions produïdes per la radiació UV està atenuada en els queratinòcits *Trex2*^{-/-}, indicant que TREX2 col·labora d'alguna manera en l'escissió i reparació del dany al DNA. Aquest resultat *in vitro*, es correspon i pot explicar la permanència de lesions CPD durant més temps en les pells *Trex2*^{-/-} que en les wt, ja que sense TREX2 l'eliminació i reparació del dany seria menys eficient. Però, paradoxalment, en absència de TREX2 els queratinòcits són més resistents a la mort induïda per la radiació UVB, enlloc de ser més sensibles, com succeeix amb gens implicats en la reparació de lesions al DNA causades per la radiació UVB. Si TREX2 tingués un paper clau en la reparació de les lesions al DNA, trobaríem disminuït el nombre de clons en l'assaig de supervivència clonal dels queratinòcits *Trex2*^{-/-} respecte dels wt, ja que en no poder reparar eficientment el dany les cèl·lules moririen. No tan sols no és així, sinó que els queratinòcits *Trex2*^{-/-} sobreviuen més que els wt, indicant que TREX2 tindria més aviat un paper proapoptotic. Així, els nostres resultats indiquen que en els queratinòcits irradiats amb UVB, TREX2 no participa significativament en la ruta de reparació NER, responsable de l'eliminació de lesions al DNA induïdes per UV. Aquesta dada és congruent amb la inexistència d'activitat exonucleasa 3'-5' en els mecanismes de NER (Shuck *et al.*, 2008; Jarrett *et al.*, 2012). De fet, s'ha descrit *in vitro* que TREX2 pot modificar la

reparació del DNA per les vies EF-PRR i NHEJ tant de manera positiva com negativa (Bennardo *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2013), i la seva prevalència semblaria estar determinada pel tipus de lesió i el context cel·lular. En aquest sentit, cal assenyalar que existeix una gran diversitat en la reparació del dany al DNA i l'apoptosi en resposta a UV entre diferents tipus cel·lulars, com per exemple fibroblasts i queratinòcits (D'Errico *et al.*, 2003).

Sorprenentment, en els queratinòcits deficients per TREX2, malgrat la reparació del DNA es troba afectada no s'observen diferències en els nivells de fosforilació de γ H2AX, però si que s'observen *in vivo* a les pells irradiades. Com que la fosforilació de γ H2AX també és necessària per l'execució de la mort cel·lular, tant per apoptosi com per necrosi (Baritaud *et al.*, 2010; Imreh *et al.*, 2011), la manca de diferències en els nivells de γ H2AX a queratinòcits podria ser conseqüència del balanç entre l'augment dels nivells de γ H2AX per una reparació deficient del DNA i la disminució per una mort cel·lular deficient. Per altra part, els nivells de γ H2AX més elevats en les pells deficients de TREX2, però no en els queratinòcits *Trex2*^{-/-}, es poden explicar pel fet que *in vivo* entren en joc molts més factors i tipus cel·lulars capaços de regular la reparació del dany al DNA i la mort cel·lular que no estan presents en el cultiu com ara les citokines produïdes per cèl·lules immunitàries (Schwarz and Schwarz, 2009). De fet, les diferències en els nivells de CPDs i γ H2AX són paral·leles a les dels nivells d'inducció d'IL12, una citocina que té un paper clau en la via NER de reparació del dany al DNA (Schwarz *et al.*, 2002).

Per altra part, la major persistència de CPDs i γ H2AX en les pells del ratolí *Trex2*^{-/-}, es pot deure a un defecte en la mort cel·lular dels queratinòcits danyats. Les nostres dades demostren per diferents aproximacions experimentals que els queratinòcits de la pell dels ratolins *Trex2*^{-/-} pateixen menys mort cel·lular en resposta a la radiació UVB. Tant els anàlisis *in vitro* (alliberació de DNA apoptòtic al citoplasma, marcatge amb Annexin V, cicle cel·lular) com *in vivo* (marcatge de TUNEL i caspasa 3 activa), ens mostren que TREX2 promou la mort cel·lular i que la seva absència provoca que cèl·lules amb lesions al DNA sobrevisquin enlloc de morir. Cal assenyalar, que la determinació de mort cel·lular per apoptosi o altres formes en la pell no és tan senzilla com podria semblar *a priori*. A més a més, diferents autors troben resultats contradictoris en quant als esdeveniments que condueixen a la mort dels queratinòcits en la pell.

Discussió

Així, en resposta a la radiació UVB, no sempre coincideix el marcatge de TUNEL i el de caspasa 3 activa (Takeuchi *et al.*, 2004). El procés de mort cel·lular associada a la diferenciació s'ha descrit que ocorre sense processament de la caspasa 3 (Lippens *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2005), però alguns autors han descrit activació de la caspasa 3 en condicions normals (Okuyama *et al.*, 2004). Per altra banda, en el procés de cornificació el nucli dels queratinòcits es degrada generant extrems lliures de DNA (Ishida-Yamamoto *et al.*, 1998; Eckhart *et al.*, 2012). En canvi en la pell en condicions normals és extremadament difícil trobar cèl·lules TUNEL positives (Haake *et al.*, 1998; Eckhart *et al.*, 2013). El ràpid recanvi dels queratinòcits per les cèl·lules de la làmina basal sumat al procés de diferenciació i la fagocitosi de les cèl·lules danyades per macròfags podrien ser la causa de la dificultat de detectar cèl·lules apoptòtiques en l'epidermis. Així doncs no existeix un mètode perfecte per determinar l'apoptosi en la pell, i la millor manera és abordar-la des de diferents metodologies. A més a més, existeixen d'altres tipus de morts cel·lulars com l'apoptosi independent de caspases i la necrosi. Concretament, en l'apoptosi independent de caspases la fragmentació nuclear és depenent d'AIF (Yu *et al.*, 2006), així que les cèl·lules es marcarien amb TUNEL i no s'activarien les caspases. També, en la necrosi pot haver-hi degradació del DNA sense activació de les caspases (Galluzzi *et al.*, 2009).

Les nostres dades clarament demostren que TREX2 condiciona tant el processament del DNA com la mort dels queratinòcits *in vivo* a la pell en resposta a la radiació UVB. El marcatge amb TUNEL de les pells irradiades dóna un patró ben diferent entre ambdós genotips. Mentre que a les pells wt es detecta un gran número de nuclis TUNEL positius als estrats vius de l'epidermis, a les pells *Trex2*^{-/-} n'hi ha menys. Però a l'estrat corni, la imatge és invertida. El marcatge TUNEL és més abundant en absència de TREX2, fet que indica una acumulació de DNA fragmentat més elevada. Per altra part, l'activació de la caspasa 3 només es detecta després del tractament crònic de la pell. El fet que el marcatge de TUNEL i de caspasa 3 activada no sempre coincideixi i difereixi en funció de la dosi i patró d'irradiació indica una activació diferencial de les vies de mort cel·lular depenent de l'administració de UVB i de la presència o absència de TREX2. En la pell, les cèl·lules que es desenganxen de la làmina basal tenen mecanismes que inhibeixen l'apoptosi (Lippens *et al.*, 2009). El TUNEL marca extrems lliures del DNA, ja siguin generats per apoptosi o necrosi, per acció directa de genotòxics o per reparació (Grasl-Kraupp *et al.*, 1995; Kanoh *et al.*, 1999). Per tant, el marcatge únic de TUNEL no és indicatiu del tipus de

mort cel·lular. El tipus de mort cel·lular amb patró TUNEL positiu i caspasa 3 activa negatiu s'ha descrit que ocorre en varietats de ratolí pigmentats, com els C57BL/6. Seria una mort dependent de melanina, degut a la generació de radicals superòxid produïts per la incidència d'elevades dosis de radiació UV en la melanina (Takeuchi *et al.*, 2004). El marcatge de nuclis TUNEL positius més elevat als estrats basal, espinós i suprabasal de les pells wt en relació a les *Trex2*^{-/-} indica un paper actiu de TREX2 degradant el DNA i mantenint així extrems 3'-OH lliures, que acabaran afavorint de forma irreversible la mort cel·lular. Aquesta hipòtesi també es recolza en els resultats obtinguts *in vitro*, on veiem que el pas dels queratinòcits *Trex2*^{-/-} a estadis tardans de l'apoptosi en resposta a la radiació UVB es veu compromès. En absència de l'estímul, la inducció de la mort cel·lular per apoptosi és reversible en les fases inicials (anastasis) i la cèl·lula pot sobreviure malgrat l'activació de caspasa 3 i la fragmentació del DNA (Tang *et al.*, 2012). Això provoca que les cèl·lules que sobreviuen puguin presentar aberracions cromosòmiques i activació d'oncogens (Tang *et al.*, 2012). Per altra banda, el marcatge més elevat TUNEL a l'estrat corni de les pells *Trex2*^{-/-} respecte les wt indica una major acumulació de DNA fragmentat/danyat en l'estrat corni en absència de TREX2. Per tant, TREX2 té un paper clau en la degradació del DNA nuclear durant el procés de diferenciació terminal dels queratinòcits en pells irradiades amb UVB.

Les nostres dades demostren que la deficiència de TREX2 disminueix la mort cel·lular per apoptosi, depenent de caspasa 3, en pells irradiades de forma crònica amb UVB o tractades amb Imiquimod. Per tant, en resposta a estímuls que indueixen mort cel·lular, TREX2 *in vivo* promou l'apoptosi dels queratinòcits. El fet que *in vitro* no s'observin diferències en l'activació de la caspasa 3 entre els queratinòcits wt i *Trex2*^{-/-} en resposta a la radiació UVB, però que la pèrdua de TREX2 dificulti el pas a estadis irreversibles de l'apoptosi, indica que TREX2 actua per sota de l'activació de les caspases, facilitant la degradació del DNA i la subsegüent mort cel·lular.

La cornificació és un altre tipus de mort cel·lular programada que té lloc durant la diferenciació terminal dels queratinòcits, que va associada a la degradació del nucli, entre altres components subcel·lulars (Eckhart *et al.*, 2013). Defectes en l'eliminació del nucli dels corneòcits generen paraqueratosi, freqüent en malalties de la pell on existeix un gran recanvi dels queratinòcits

Discussió

degut a una exacerbada proliferació, com és el cas de la psoriasi. El fet que els ratolins *Trex2*^{-/-} presenten índexs de paraqueratosi més elevats que els wt en resposta a Imiquimod, indica que TREX2 té un paper rellevant en la degradació nuclear durant la diferenciació terminal dels queratinòcits en condicions d'estrés. La presència de TREX2 en l'estrat corni i en els nuclis paraqueratòtics tant en la pell psoriàsica humana com en la de ratolí recolza aquesta hipòtesi. De fet, hi ha un gran desconeixement dels gens implicats en la degradació del DNA nuclear durant el procés de cornificació. Fins ara, només la endonucleasa DNase1L2, s'ha relacionat amb l'enucleació dels queratinòcits és la DNase1L2, però a epitelis concrets, com el plantar i el d'ungles i pèl (Fischer *et al.*, 2011b).

Resumint, les nostres dades indiquen que TREX2 en els queratinòcits té un paper clau promovent la degradació del DNA, i que aquest rol preval sobre les funcions reparadores, afavorint així la mort cel·lular i l'eliminació de cèl·lules danyades.

7.3 TREX2 i γ H2AX

TREX2 es concentra en els micronuclis, on veiem que col·localitza amb la γ H2AX, que juga un rol crític tant en la reparació com en la degradació del DNA durant els processos de mort cel·lular per apoptosi i necrosi (Lu *et al.*, 2006; Baritaud *et al.*, 2010). Per altra part, no detectem mobilització ni redistribució de TREX2 als llocs d'inducció puntual de dany al nucli. Si bé no podem descartar que és doni per sota els nivells de detecció o amb una cinètica diferent a l'analitzada. La fosforilació de la histona nucleosomal H2AX ocorre quan es donen ruptures dobles al DNA, i els nivells/marcatge són relativament molt elevats en contextos associats a degradació de cromatina en comparació a situacions de reparació, com als nuclis de queratinòcits patint mort o diferenciació cel·lular i també en determinats MNs (Lippens *et al.*, 2009; Terradas *et al.*, 2010; Eckhart *et al.*, 2013). Sorprenentment, tot i augmentar la presència de MNs positius per TREX2 en resposta a la radiació UV, no hem trobat que sigui necessari per la seva formació ni per la seva eliminació. Així, els queratinòcits wt i *Trex2*^{-/-} mostren les mateixes freqüències de formació de MNs, encara que no podem excloure que el contingut i la conformació del DNA dels MNs sigui diferent entre els dos genotips.

In vivo s'observa col·localització de TREX2 i γ H2AX en queratinòcits de les pells tractades tant amb UVB, com amb Imiquimod. A més a més, experiments de *pull-down* i co-immunoprecipitació demostren que hi pot haver una interacció directa entre TREX2 i γ H2AX. Per tant, és temptador especular si TREX2, interaccionant amb H2AX, pot formar part del degradasoma (Baritaud *et al.*, 2010), participant de manera directa en la degradació del DNA un cop es generen extrems 3' lliures.

7.4 TREX2 i resposta immunitària

La radiació UV desencadena una complexa comunicació cel·lular entre els queratinòcits i les cèl·lules immunitàries, que genera una resposta immunitària coordinada per mantenir l'homeòstasi de la pell i la immunovigilància contra el càncer (Pasparakis *et al.*, 2014). En absència de TREX2, tant en el model d'irradiació amb UVB com en el d'inducció de psoriasis per Imiquimod, s'altera la resposta immunitària. La importància de la immunovigilància en el càncer de pell queda palesa per l'elevada incidència de SCC en individus immunodeprimits (Mackintosh *et al.*, 2013). Per altra banda, la psoriasis és una malaltia inflamatòria associada a una infiltració de cèl·lules immunitàries (Lowe *et al.*, 2014).

La mort dels queratinòcits, pot ser un potent inductor de la resposta immunitària en la pell, ja sigui per necrosi (Cho *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Bonnet *et al.*, 2011) o per apoptosi (Nenci *et al.*, 2006; Omeri *et al.*, 2006; Panayotova-Dimitrova *et al.*, 2013; Weinlich *et al.*, 2013). Cada cop hi ha més evidències que cèl·lules danyades, estressades o en procés de mort cel·lular, alliberen o exposen molècules en la seva superfície que actuen com a senyals de perill en el sistema immunitari, són els anomenats DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) (Kaczmarek *et al.*, 2013). La majoria d'aquestes molècules (com el DNA o l'ATP) no fan funcions immunològiques dins la cèl·lula però un cop alliberades esdevenen immunogèniques. Inicialment, l'emissió de DAMPs es creia exclusiva de la necrosi, però recentment s'ha descrit que també s'alliberen durant l'apoptosi, beneficiant la resposta antitumoral (Obeid *et al.*, 2007; Garg *et al.*, 2012; Galluzzi *et al.*, 2014). La fagocitosis de cèl·lules apoptòtiques per part dels macròfags desencadena l'alliberació de citokines antiinflamatòries com IL10 i TGF β (Chung *et al.*, 2007). Tot i això aquest procés també pot

Discussió

desencadenar una resposta inflamatòria si es dona un segon estímul conjuntament, com el reconeixement de PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) o d'altres senyals (Hou *et al.*, 2013).

Senyals de dany com el DNA genòmic en l'espai extracel·lular, condueix a la producció d'IFNs de tipus I i citoquines proinflamatòries. Inesperadament, el dèficit de TREX2 no altera la resposta d'IFNs de tipus I i redueix la inflamació. Malgrat l'acumulació de DNA observat en els ratolins *Trex2*^{-/-} després de la irradiació amb UV, no es produeix una resposta inflamatòria diferencial a través de IFN tipus I. El més probable és que el DNA acumulat en l'estrat corni dels ratolins *Trex2*^{-/-} resulti inaccessible a les cèl·lules dendrítiques de la pell, responsables de la majoria de l'IFN produït en resposta a la detecció de fragments de DNA. S'ha descrit que les cèl·lules de Langerhans, cèl·lules dendrítiques intraepidèrmiques, no fagociten els queratinòcits morts terminalment diferenciats (Boehncke *et al.*, 1993). Per altra part, les senyals dels queratinòcits morint, més abundants en el wt que en el ratolí *Trex2*^{-/-}, poden ser fàcilment detectats per les diferents poblacions de cèl·lules dendrítiques, incloent les cèl·lules de Langerhans, pDC i mDC, i les NK, provocant la seva activació i la regulació de l'expressió de múltiples gens, com citoquines proinflamatòries i antiinflamatòries. Recentment, s'ha vist que les cèl·lules de Langerhans no estan implicades en l'inici de la psoriasi però regularien negativament la inflamació durant la fase activa de la malaltia mentre que el paper de les pDCs és més controvertit. Les pDCs no serien essencials per l'inici del fenotip psoriasic a ratolí (Wohn *et al.*, 2013), però l'instigarien (Glitzner *et al.*, 2014).

Els nostres resultats revelen la participació de TREX2 promovent i modelant la resposta immunitària a la radiació UVB i l'Imiquimod. Específicament, la pèrdua de TREX2 comporta una reducció dels gens induïts per UVB importants per la immunovigilància de tumors com IL12, IFN γ , CXCL10 i RAET1E (Vesely *et al.*, 2011; Franciszkiewicz *et al.*, 2012). La IL12 i l'IFN γ promouen la diferenciació i activació dels limfòcits T citotòxics, que són claus per inhibir la iniciació i progressió del càncer (Lin *et al.*, 2014). A més a més, la IL12 és necessària per la inducció dels enzims reparadors del DNA de la via NER, en resposta a les lesions produïdes per UV (Schwarz *et al.*, 2002). La major presència de lesions al DNA produïdes per la radiació UV en les pells dels ratolins *Trex2*^{-/-} en comparació amb les dels wt es pot atribuir a

la menor inducció d'aquesta citoquina. Així mateix, el menor augment en els ratolins *Trex2*^{-/-} de les citoquines IL6 i TNF α , citoquines proinflamatòries que regulen proliferació i mort dels queratinòcits (Tsaalbi-Shtylik *et al.*, 2009), es pot correlacionar amb les alteracions en la mort cel·lular, hiperplàsia i inflamació observada en les pells *Trex2*^{-/-} en resposta a la radiació UV.

Anàlogament, l'absència de TREX2 altera la resposta inflamatòria induïda per l'Imiquimod.. Concretament, es desregula l'expressió de gens associats al fenotip psoriàsic, incloent citoquines com la IL23, IL1 α i TNF α ; enzims proinflamatoris, com la MPO i la iNOS, i pèptids antimicrobians, com el CAMP/LL37. La IL23, secretada per les DC activades, és clau per la expansió i supervivència dels limfòcits T17, responsables de la síntesi de la IL17, havent-se implicat l'eix IL23/IL17 en la inflamació associada a la psoriasi en ratolins i humans (Gaffen *et al.*, 2014). El TNF α s'ha relacionat amb el reclutament de mDC i T17 (Meissner *et al.*, 2003) terapèutic d'anticossos contra IL23, TNF i IL17 ha demostrat la importància d'aquestes citoquines en la patologia de la psoriasi (Lowe *et al.*, 2013; Lowe *et al.*, 2014). Els nivells reduïts en les pells deficientes per TREX2 de MPO, expressada majoritàriament en neutròfils (Ly6G+), es relaciona amb la menor formació d'abscessos. Apart, en l'infiltrat psoriàsic s'ha descrit un tipus de DC absents en la pell normal, que són productores de TNF α i iNOS, les Tip-DCs (Lowe *et al.*, 2005), que seria interessant saber si contribueixen a les diferències observades en l'expressió d'aquests gens en absència de TREX2. La IL1 α , alliberada pels queratinòcits estressats o en procés de mort promou la inflamació (Feldmeyer *et al.*, 2010) i l'alliberació de factors mitogènics per part de les cèl·lules estromals (Werner *et al.*, 2007) i el reclutament de cèl·lules mieloides (Rider *et al.*, 2011). Finalment, el CAMP/LL37, produït en bona part pels queratinòcits en resposta entre altres estímuls a la IL17 i TNF α , s'ha relacionat tant amb l'inici, com amb el manteniment de la inflamació crònica (Gilliet and Lande, 2008; Lande *et al.*, 2014).

Així, les nostres dades indiquen que TREX2 regula/modela positivament la resposta immunitària de la pell front estímuls estressants. Els mecanismes moleculars encara no els coneixem en detall, però segurament estan relacionats amb el seu rol afavorint la degradació del DNA en cèl·lules danyades i la subsegüent mort cel·lular, bé per apoptosi, be per necrosi o per altres vies. La mort cel·lular no és invisible pel sistema immunitari i el processament del DNA apoptòtic i necròtic pot condicionar el seu reconeixement pel sistema immunitari innat. En aquest sentit s'ha vist que els fragments de DNA petits són més immunogènics que els grans

Discussió

(Dombrowski *et al.*, 2011). Així, és temptador hipotetitzar que TREX2, degradant el DNA a partir dels extrems 3'OH, condicionaria la mida del DNA fragmentat i el seu reconeixement, per part dels receptors d'àcids nucleics de les cèl·lules de la immunitat innata. Els fragments de DNA genòmic propi units al pèptid antimicrobià LL37/CAMP s'ha vist que tenen un paper crucial en l'activació de les DC (Lande *et al.*, 2007), i dels queratinòcits estimulats amb TNF α (Chiliveru *et al.*, 2014).

Paradoxalment, la deficiència de TREX2 genera un fenotip immunitari clarament diferenciat del generat per la deficiència de TREX1, proteïna amb la que comparteix una elevada homologia estructural i bioquímica (Hoss *et al.*, 1999; Mazur and Perrino, 1999, 2001a, b). El ratolí *Trex1*^{-/-} tampoc presenta una elevada freqüència de mutacions espontànies ni elevada incidència de càncers, desenvolupa una miocarditis d'origen autoinflamatori (Morita *et al.*, 2004). Mutacions en el gen TREX1 s'han associat amb malalties autoimmunitàries com el síndrome de Aicardi-Goutieres i Lupus Eritematos (Crow and Rehwinkel, 2009). TREX1, que es troba ancorada a la membrana externa del reticle endoplasmàtic, és clau per la degradació del DNA present al citoplasma procedent d'estructures aberrants generades en la replicació, segments de DNA de retrovirus endògens, i DNA produït per la retrotranscriptasa de virus com el VIH. En absència de TREX1 s'acumula aquest DNA que genera una resposta per IFN de tipus I generant autoimmunitat (Morita *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2010; Schoggins *et al.*, 2011). La localització subcel·lular en diferents compartiments, l'expressió de TREX2 limitada en epitelis estratificats, i un fenotip diferencial dels ratolins *knockout* per aquestes exonucleases constaten que TREX1 i TREX2 tenen funcions molt específiques i no redundants entre sí.

7.5 TREX2 i càncer

Segons estimacions de l'OMS (Organització Mundial de la Salut), uns 3 milions de persones a l'any són diagnosticades de càncers de pell SCC, el que implica la meitat de tots els càncers diagnosticats al món (World Health Organization, 2011). La incidència de SCC va augmentant i, malgrat que rarament comprometen la vida, poden afectar severament la salut (Albert and Weinstock, 2003). El dèficit de TREX2 augmenta la carcinogènesi de la pell induïda per genotòxics químics (Parra *et al.*, 2009) i per UVB en ratolí. Ambdós agents són els principals desencadenants de les múltiples alteracions genètiques que porten a l'aparició de tumors

derivats de queratinòcits. Les nostres dades indiquen que l'expressió de TREX2 als tumors escamosos està desregulada. De manera similar al que s'ha descrit pel supressor tumoral NM23-H1, que també posseeix activitat exonucleasa 3'-5' (Boissan *et al.*, 2010), *TREX2* s'expressa abundantment en les lesions premalignes però l'expressió es perd amb la desdiferenciació dels tumors. Aquesta troballa concorda amb la hipòtesi que TREX2 actuaria com un supressor tumoral en la tumorigènesi de tumors escamosos. Els nostres resultats indiquen que TREX2 és important en les primeres fases de l'aparició dels tumors en ratolí, ja que els ratolins deficients per aquesta exonucleasa tenen més incidència de tumors induïts per UVB però no s'observen diferències en les característiques metastàsiques dels tumors respecte els ratolins wt. Els estudis en humans realitzats al nostre laboratori, on es va determinar la presència de SNPs en el gen *TREX2* en els tumors i teixit no tumoral, reflecteixen una major incidència del conjunt de variants rares de *TREX2* en els pacients amb tumors escamosos, si bé la freqüència és molt baixa (Gómez D, Tesi doctoral 2015). Aquest fet suggereix que la variabilitat gènica en *TREX2* podria ser un factor predisposant en l'aparició de tumors escamosos. En aquest context, confirmant el rol de supressor tumoral de TREX2, s'ha descrit una mutació en la línia germinal que inactiva el gen *TREX2* i que estaria associada a la predisposició a càncer colorectal (Smith *et al.*, 2013). Calen però més estudis a gran escala per tal de confirmar les associacions entre variants de *TREX2* i incidència de SCCs o altres patologies de la pell.

7.6 TREX2 i psoriasi

Hem observat que l'exonucleasa TREX2, a més a més de tenir un paper rellevant en el queratinòcit en resposta al dany al DNA causat per carcinògens com el DMBA (Parra *et al.*, 2009) o la radiació UV, és un actor actiu en la patogènesi de la psoriasi, una de les malalties inflamatòries de la pell més comuna, caracteritzada per una proliferació descontrolada i una diferenciació alterada dels queratinòcits, hiperqueratosi, paraqueratosi i infiltració de cèl·lules immunitàries (Lowe *et al.*, 2014).

Les nostres dades demostren que una sobreexpressió i alteració del patró d'expressió de TREX2 en les lesions psoriàsiques. Confirmem així les dades prèvies d'expressió de mRNA mitjançant l'ús de microarrays on es detectava un gran augment de l'expressió de *TREX2* en la pell psoriàsica en comparació amb la pell normal (Reischl *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2008; Li *et*

Discussió

al., 2014). Si bé en la pell psoriàsica hi ha una elevada inducció tant del transcrit L1 com del transcrit S, que codifiquen per la isoforma llarga (279 aminoàcids) i curta (236 aminoàcids) de TREX2 respectivament, a nivell de proteïna només es detecta l'expressió de la isoforma curta. Així, a nivell proteic només hi ha sobreexpressió de la isoforma de 236 aminoàcids, que coincideix amb l'única isoforma detectada a ratolí. TREX2 s'expressa principalment en els queratinòcits de la capa granular, la més llunyana a la basal. En la pell psoriàsica, l'expressió de TREX2 s'estén, i s'observa una elevada expressió a un gran nombre de capes suprabasals. A més a més, TREX2 també s'acumula a regions hiperqueratòsiques i paraqueratòsiques de l'estrat corni. Aquest augment de l'expressió pot ser una conseqüència de la desregulació de la proliferació i diferenciació dels queratinòcits i/o del procés inflamatori associat a la psoriasi. En estudis futurs serà interessant determinar quines citoquines i/o factors de creixement estan implicats en aquest fort augment de l'expressió de TREX2 en l'epidermis psoriàsica.

Malgrat TREX2 s'acumula en àrees de paraqueratosi i hiperqueratosi de les lesions psoriàsiques humanes i murines, l'activitat de TREX2 no sembla ser suficient per eliminar tots els romanents nuclears. És ben sabut que en la malaltia de la psoriasi existeix una desregulació i una pèrdua de funció de molts enzims de la pell, com ara la DNAsa1L2, caspasa 14 o mesotrypsin (Fischer *et al.*, 2011b; Hoste *et al.*, 2013; Yamamoto-Tanaka *et al.*, 2014). Donat que l'enucleació requereix diferents vies, la disfunció permanent o transitòria d'una de les vies pot ser suficient pel desenvolupament de la paraqueratosi. De fet, la pèrdua d'expressió o funció d'aquests enzims en la psoriasi, podria desencadenar la sobreexpressió de TREX2 com a mecanisme per tal de compensar la disminució de les altres vies d'enucleació. A més a més caldria comprovar la funcionalitat de TREX2 en les lesions psoriàsiques, per descartar que no estigués funcionant aberrantment. En aquest sentit seria interessant aprofundir en la genètica de la malaltia i caracteritzar els polimorfismes del gen de TREX2 en malalts de psoriasi per tal d'esbrinar si mutacions en el gen poden ser causa de la malaltia.

El model murí d'inducció d'un fenotip psoriàsic amb l'Imiquimod, un anàleg del receptor TLR7, ha permès determinar la funció i rellevança de múltiples molècules implicades en la patogènesis de la psoriasi (van der Fits *et al.*, 2009; Hoste *et al.*, 2013; Wohn *et al.*, 2013; Di Meglio *et al.*, 2014; Ha *et al.*, 2014). El fet que el ratolí deficient de TREX2 presenti un fenotip

més lleu que el ratolí wt indica que TREX2 té un paper actiu en la generació d'aquesta patologia. Les nostres dades han permès identificar l'exonucleasa TREX2 com un regulador de la mort cel·lular, l'enucleació dels queratinòcits i la inflamació en la pell tractada amb Imiquimod. Per tant, TREX2 juga un paper clau en la patofisiologia de la psoriasi i podria ser considerada una diana pel tractament.

7.7 Models pel paper de TREX2 en la pell

En aquesta tesi s'ha estudiat el paper de TREX2 en diferents models de patologia de la pell, expandint els resultats previs pel que fa a la carcinogènesi i aportant noves implicacions pel que fa a la malaltia de la psoriasi. En ambdues patologies, hi ha una desregulació de l'expressió de TREX2, fet que subratlla la importància que pugui tenir en el seu desenvolupament. En condicions d'estrès, la pèrdua de TREX2 causa alteracions en la mort cel·lular i la resposta inflamatòria de la pell. Així, en els queratinòcits exposats a la radiació UV, TREX2 intrínsicament seria clau en la degradació del DNA més que en la seva reparació, promovent l'execució de la mort cel·lular i la subseqüent resposta immunitària associada amb un increment de la reparació del DNA i immunitat antitumoral (Fig. D1). Anàlogament, en els queratinòcits exposats a l'Imiquimod, TREX2 facilitaria la degradació del DNA i la mort cel·lular modelant l'activació de la resposta immunitària associada al fenotip psoriàsic (Fig. D2). Com que l'expressió de TREX2 es restringeix a la pell, és possible que sigui un mecanisme de defensa específic dels queratinòcits per fer front als múltiples agents nocius als que estan exposats. Alhora, podria constituir una diana específica pel tractament de patologies associades a la pell.

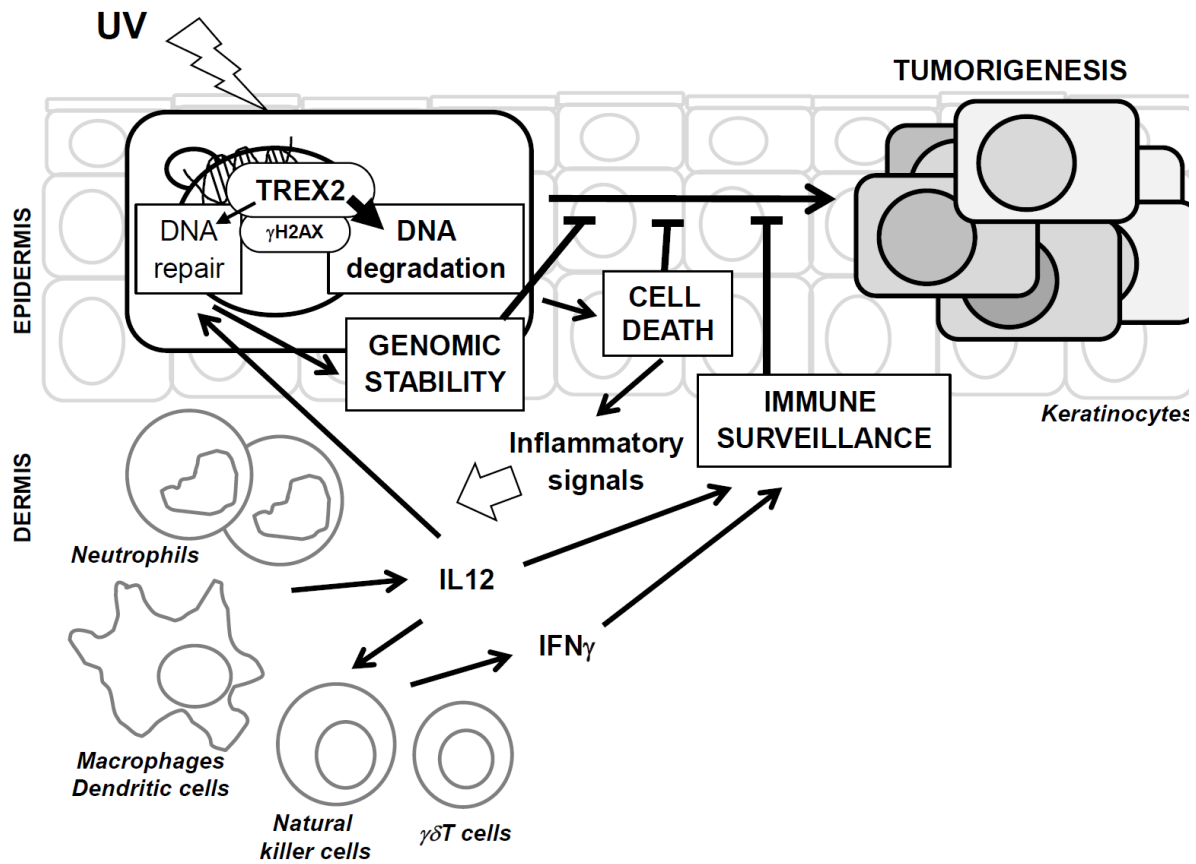


Figura D1. Model de l'acció de TREX2 en la pell irradiada amb UVB. TREX2 estaria involucrat tant en la reparació com en la degradació del DNA promovent la mort cel·lular dels queratinòcits danyats, i com a conseqüència s'activa, per l'emissió de DAMPS, la immunitat innata. TREX2 interaccionaria amb γ H2AX, que juga un paper central en la reparació del DNA danyat i l'apoptosi. Promovent la mort cel·lular, TREX2 actua com a estímul pel desencadenament d'una resposta immunitària associada amb la protecció de l'epidermis, la reparació del DNA i la immunovigilància de tumors. A més TREX2 participaria en la destrucció del nucli dels queratinòcits, per una correcta diferenciació en condicions d'estrès. La pèrdua de funció de TREX2 comportaria l'augment d'inestabilitat genòmica en els queratinòcits i una defectiva resposta immunitària en front a agents causants de dany al DNA, facilitant la carcinogènesi, i comprometent la correcta formació de la barrera epidèrmica.

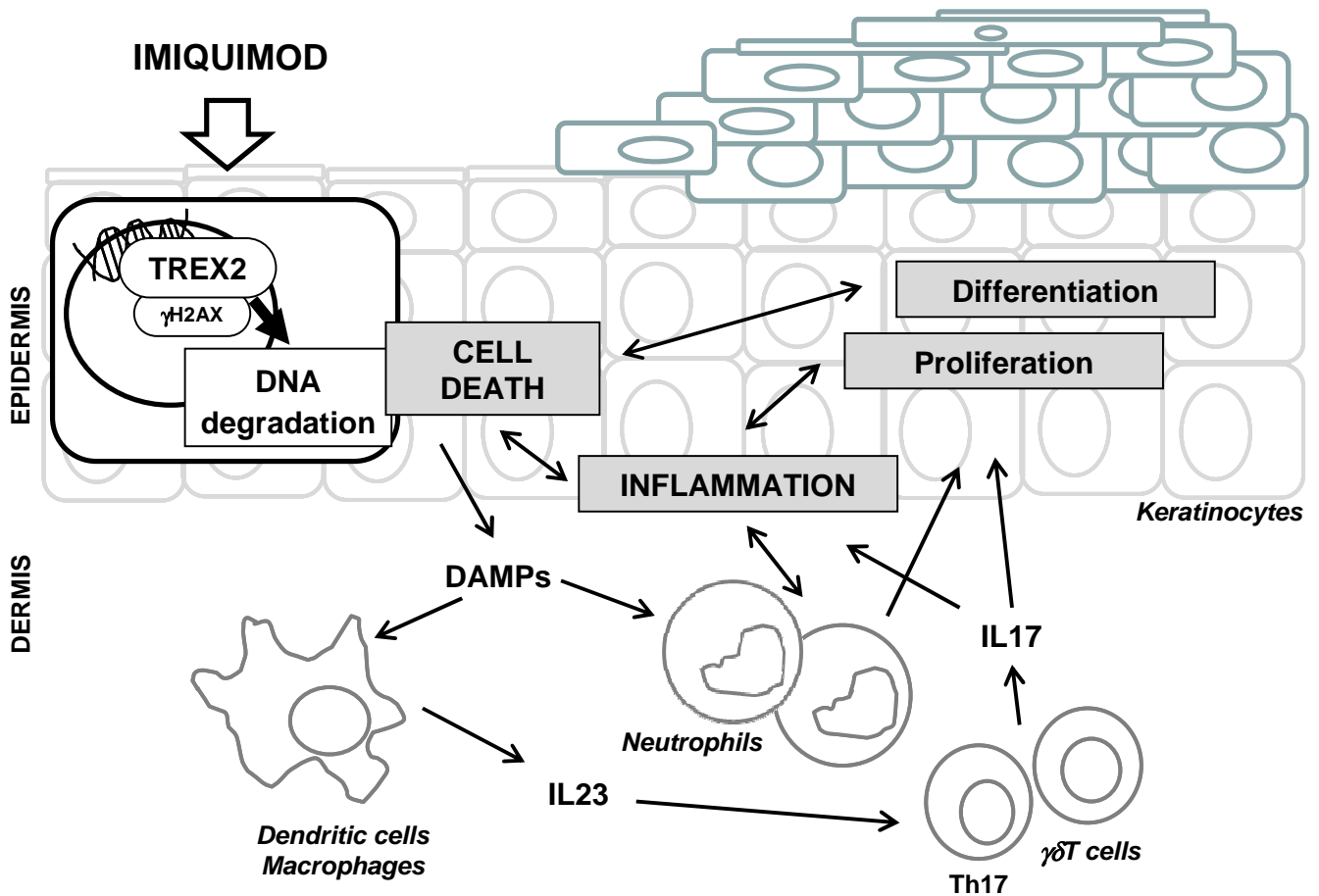


Figura D2. Model de l'acció de TREX2 en la inducció de psoriasi per l'Imiquimod. TREX2 facilitaria la degradació del DNA durant la mort cel·lular dels queratinòcits danyats i el procés de cornificació. Promovent la mort cel·lular i possiblement determinant la mida dels fragments de DNA, TREX2 modula l'activació de les cèl·lules dendrítiques i la subseqüent inducció de la citoquina IL23, clau en el procés inflamatori associat a la psoriasi.

8 Conclusions

1. L'expressió de TREX2 es troba alterada en patologies de la pell, com la carcinogènesi de tumors escamosos i la psoriasi. Així, hi ha un augment de l'expressió de TREX2 en lesions premalignes i una pèrdua en els tumors més indiferenciats i metastàsics. Per altra part, en lesions psoriàsiques es dona un fort increment i canvis en el patró d'expressió de TREX2 respecte la pell sana.
2. La deficiència de TREX2 en ratolins augmenta la susceptibilitat de patir tumors induïts per la radiació UVB en la pell. Aquest fenotip està associat a alteracions en l'eliminació de dany i la degradació del DNA, la mort cel·lular i la resposta inflamatòria. Així, en resposta a la radiació UVB, TREX2 intrínsecament promou la mort dels queratinòcits, que alhora afavoreix una resposta immunitària caracteritzada per la inducció de gens clau en la regulació de la reparació del DNA i la immunitat antitumoral. Per tant, TREX2 té un paper multifuncional clau en la resposta protectora de la pell front la radiació UVB.
3. La deficiència de TREX2 en ratolins disminueix el fenotip psoriàsic induït per l'Imiquimod. Concretament, TREX2 afavoreix la mort cel·lular i la resposta inflamatòria inicial. A més a més, TREX2 està implicada en la degradació del DNA durant la diferenciació terminal dels corneòcits, disminuint la paraqueratosis. Així, TREX2 té un paper actiu i rellevant en la patogènesi associada a la psoriasi.
4. En cèl·lules danyades, diferenciant-se o morint, TREX2 es recluta a regions nuclears de cromatina poc densa i als micronuclis, on interactua amb la γ H2AX.

9 Bibliografia

- Afaq, F., Adhami, V.M., and Mukhtar, H. (2005). Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res* 571, 153-173.
- Aguilera, A., and Gomez-Gonzalez, B. (2008). Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* 9, 204-217.
- Alam, M., and Ratner, D. (2001). Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 344, 975-983.
- Albert, M.R., and Weinstock, M.A. (2003). Keratinocyte carcinoma. *CA Cancer J Clin* 53, 292-302.
- Baritaud, M., Boujrad, H., Lorenzo, H.K., Krantic, S., and Susin, S.A. (2010). Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. *Cell Cycle* 9, 3166-3173.
- Barnes, D.E., and Lindahl, T. (2004). Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 38, 445-476.
- Becklund, B.R., Severson, K.S., Vang, S.V., and DeLuca, H.F. (2010). UV radiation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis independent of vitamin D production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6418-6423.
- Beissert, S., and Schwarz, T. (1999). Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *J Invest Dermatol Symp Proc* 4, 61-64.
- Bennardo, N., Gunn, A., Cheng, A., Hasty, P., and Stark, J.M. (2009). Limiting the persistence of a chromosome break diminishes its mutagenic potential. *PLoS Genet* 5, e1000683.
- Bernard, B.A., Asselineau, D., Schaffar-Deshayes, L., and Darmon, M.Y. (1988). Abnormal sequence of expression of differentiation markers in psoriatic epidermis: inversion of two steps in the differentiation program? *J Invest Dermatol* 90, 801-805.
- Bonnet, M.C., Preukschat, D., Welz, P.S., van Loo, G., Ermolaeva, M.A., Bloch, W., Haase, I., and Pasparakis, M. (2011). The adaptor protein FADD protects epidermal keratinocytes from necroptosis in vivo and prevents skin inflammation. *Immunity* 35, 572-582.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-771.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276, 42462-42467.
- Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 328-340.
- Clark, R.A. (2010). Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *J Invest Dermatol* 130, 362-370.
- Crasta, K., Ganem, N.J., Dagher, R., Lantermann, A.B., Ivanova, E.V., Pan, Y., Nezi, L., Protopopov, A., Chowdhury, D., and Pellman, D. (2012). DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 482, 53-58.
- Crow, J.M. (2012a). Psoriasis uncovered. *Nature* 492, S50-51.
- Crow, J.M. (2012b). Therapeutics: Silencing psoriasis. *Nature* 492, S58-59.
- Crow, Y.J., and Rehwinkel, J. (2009). Aicardi-Goutieres syndrome and related phenotypes: linking nucleic acid metabolism with autoimmunity. *Hum Mol Genet* 18, R130-136.
- Chen, M.J., Dumitrache, L.C., Wangsa, D., Ma, S.M., Padilla-Nash, H., Ried, T., and Hasty, P. (2007a). Cisplatin depletes TREX2 and causes Robertsonian translocations as seen in TREX2 knockout cells. *Cancer Res* 67, 9077-9083.
- Chen, M.J., Ma, S.M., Dumitrache, L.C., and Hasty, P. (2007b). Biochemical and cellular characteristics of the 3' → 5' exonuclease TREX2. *Nucleic Acids Res* 35, 2682-2694.
- Chiliveru, S., Rahbek, S.H., Jensen, S.K., Jorgensen, S.E., Nissen, S.K., Christiansen, S.H., Mogensen, T.H., Jakobsen, M.R., Iversen, L., Johansen, C., and Paludan, S.R. (2014). Inflammatory cytokines break down intrinsic immunological tolerance of human primary keratinocytes to cytosolic DNA. *J Immunol* 192, 2395-2404.
- Cho, Y.S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M., and Chan, F.K. (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137, 1112-1123.
- de Silva, U., Perrino, F.W., and Hollis, T. (2009). DNA binding induces active site conformational change in the human TREX2 3'-exonuclease. *Nucleic Acids Res* 37, 2411-2417.

- Di Cesare, A., Di Meglio, P., and Nestle, F.O. (2009). The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 129, 1339-1350.
- Di Meglio, P., Duarte, J.H., Ahlfors, H., Owens, N.D., Li, Y., Villanova, F., Tosi, I., Hirota, K., Nestle, F.O., Mrowietz, U., Gilchrist, M.J., and Stockinger, B. (2014). Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions. *Immunity* 40, 989-1001.
- Di Meglio, P., Perera, G.K., and Nestle, F.O. (2011). The multitasking organ: recent insights into skin immune function. *Immunity* 35, 857-869.
- Dombrowski, Y., Peric, M., Koglin, S., Kammerbauer, C., Goss, C., Anz, D., Simanski, M., Glaser, R., Harder, J., Hornung, V., Gallo, R.L., Ruzicka, T., Besch, R., and Schaubert, J. (2011). Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. *Sci Transl Med* 3, 82ra38.
- Dumitrache, L.C., Hu, L., and Hastay, P. (2009). TREX2 exonuclease defective cells exhibit double-strand breaks and chromosomal fragments but not Robertsonian translocations. *Mutat Res* 662, 84-87.
- Dunphy, S., and Gardiner, C.M. (2011). NK cells and psoriasis. *J Biomed Biotechnol* 2011, 248317.
- Eckert, R.L., Crish, J.F., Efimova, T., Dashti, S.R., Deucher, A., Bone, F., Adhikary, G., Huang, G., Gopalakrishnan, R., and Balasubramanian, S. (2004). Regulation of involucrin gene expression. *J Invest Dermatol* 123, 13-22.
- Eckhart, L., Fischer, H., Barken, K.B., Tolker-Nielsen, T., and Tschachler, E. (2007). DNase1L2 suppresses biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Br J Dermatol* 156, 1342-1345.
- Eckhart, L., Fischer, H., and Tschachler, E. (2012). Mechanisms and emerging functions of DNA degradation in the epidermis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17, 2461-2475.
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., and Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta* 1833, 3471-3480.
- Elmets, C.A., and Athar, M. (2013). Milestones in photocarcinogenesis. *J Invest Dermatol* 133, E13-17.
- Fang, L., Lonsdorf, A.S., and Hwang, S.T. (2008). Immunotherapy for advanced melanoma. *J Invest Dermatol* 128, 2596-2605.
- Feldmeyer, L., Werner, S., French, L.E., and Beer, H.D. (2010). Interleukin-1, inflammasomes and the skin. *Eur J Cell Biol* 89, 638-644.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2, 1084-1104.
- Fischer, H., Eckhart, L., Mildner, M., Jaeger, K., Buchberger, M., Ghannadan, M., and Tschachler, E. (2007). DNase1L2 degrades nuclear DNA during corneocyte formation. *J Invest Dermatol* 127, 24-30.
- Fischer, H., Scherz, J., Szabo, S., Mildner, M., Benarafa, C., Torriglia, A., Tschachler, E., and Eckhart, L. (2011a). DNase 2 is the main DNA-degrading enzyme of the stratum corneum. *PLoS One* 6, e17581.
- Fischer, H., Szabo, S., Scherz, J., Jaeger, K., Rossiter, H., Buchberger, M., Ghannadan, M., Hermann, M., Theussl, H.C., Tobin, D.J., Wagner, E.F., Tschachler, E., and Eckhart, L. (2011b). Essential role of the keratinocyte-specific endonuclease DNase1L2 in the removal of nuclear DNA from hair and nails. *J Invest Dermatol* 131, 1208-1215.
- Fried, L.E., and Arbiser, J.L. (2008). Application of angiogenesis to clinical dermatology. *Adv Dermatol* 24, 89-103.
- Fukunaga, A., Khaskhely, N.M., Ma, Y., Sreevidya, C.S., Taguchi, K., Nishigori, C., and Ullrich, S.E. (2010). Langerhans cells serve as immunoregulatory cells by activating NKT cells. *J Immunol* 185, 4633-4640.
- Gaffen, S.L., Jain, R., Garg, A.V., and Cua, D.J. (2014). The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol* 14, 585-600.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Alnemri, E.S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Bertrand, M.J., Bianchi, K., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D.E., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Cecconi, F., Chan, F.K., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.M., Di Daniele, N., Dixit, V.M., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Fimia, G.M., Flavell, R.A., Fulda, S., Garrido, C., Gougeon, M.L., Green, D.R., Gronemeyer, H., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Hengartner, M.O., Ichijo, H., Joseph, B., Jost, P.J., Kaufmann, T., Kepp, O., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., Lopez-Otin, C., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J.C., Martin, S.J., Martinou, J.C., Medema, J.P., Meier, P., Melino, S., Mizushima, N., Moll, U., Munoz-Pinedo, C., Nunez, G., Oberst, A., Panaretakis, T., Penninger, J.M.,

Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Ravichandran, K.S., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Shi, Y., Simon, H.U., Stockwell, B.R., Szabadkai, G., Tait, S.W., Tang, H.L., Tavernarakis, N., Tsujimoto, Y., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Villunger, A., Wagner, E.F., Walczak, H., White, E., Wood, W.G., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Melino, G., and Kroemer, G. (2014). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ* 22, 58-73.

- Ganguly, D., Chamilos, G., Lande, R., Gregorio, J., Meller, S., Facchinetti, V., Homey, B., Barrat, F.J., Zal, T., and Gilliet, M. (2009). Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med* 206, 1983-1994.
- Ganguly, D., Haak, S., Sisirak, V., and Reizis, B. (2013). The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 13, 566-577.
- Garg, A.D., Krysko, D.V., Verfaillie, T., Kaczmarek, A., Ferreira, G.B., Marysael, T., Rubio, N., Firczuk, M., Mathieu, C., Roebroek, A.J., Annaert, W., Golab, J., de Witte, P., Vandenabeele, P., and Agostinis, P. (2012). A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J* 31, 1062-1079.
- Ghoreschi, K., Weigert, C., and Rocken, M. (2007). Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis. *Clin Dermatol* 25, 574-580.
- Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8, 594-606.
- Gilliet, M., and Lande, R. (2008). Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol* 20, 401-407.
- Glitzner, E., Korosec, A., Brunner, P.M., Drobits, B., Amberg, N., Schonhaler, H.B., Kopp, T., Wagner, E.F., Stingl, G., Holcman, M., and Sibilica, M. (2014). Specific roles for dendritic cell subsets during initiation and progression of psoriasis. *EMBO Mol Med* 6, 1312-1327.
- Grasl-Kraupp, B., Ruttikay-Nedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W., and Schulte-Hermann, R. (1995). In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21, 1465-1468.
- Greinert, R., Volkmer, B., Henning, S., Breitbart, E.W., Greulich, K.O., Cardoso, M.C., and Rapp, A. (2012). UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic Acids Res* 40, 10263-10273.
- Gudjonsson, J.E., Ding, J., Johnston, A., Tejasvi, T., Guzman, A.M., Nair, R.P., Voorhees, J.J., Abecasis, G.R., and Elder, J.T. (2010). Assessment of the psoriatic transcriptome in a large sample: additional regulated genes and comparisons with in vitro models. *J Invest Dermatol* 130, 1829-1840.
- Gurudutt, V.V., and Genden, E.M. (2011). Cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Skin Cancer* 2011, 502723.
- Ha, H.L., Wang, H., Pisitkun, P., Kim, J.C., Tassi, I., Tang, W., Morasso, M.I., Udey, M.C., and Siebenlist, U. (2014). IL-17 drives psoriatic inflammation via distinct, target cell-specific mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E3422-3431.
- Haaf, T., Raderschall, E., Reddy, G., Ward, D.C., Radding, C.M., and Golub, E.I. (1999). Sequestration of mammalian Rad51-recombination protein into micronuclei. *J Cell Biol* 144, 11-20.
- Haake, A.R., Roublevskaia, I., and Cooklis, M. (1998). Apoptosis: a role in skin aging? *J Investig Dermatol Symp Proc* 3, 28-35.
- Halliday, G.M., Damian, D.L., Rana, S., and Byrne, S.N. (2012). The suppressive effects of ultraviolet radiation on immunity in the skin and internal organs: implications for autoimmunity. *J Dermatol Sci* 66, 176-182.
- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., and Wang, X. (2009). Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* 137, 1100-1111.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., and Sharma, R.A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8, 193-204.
- Holick, M.F. (2007). Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357, 266-281.
- Hornung, V., and Latz, E. (2010). Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol* 10, 123-130.
- Hoss, M., Robins, P., Naven, T.J., Pappin, D.J., Sgouros, J., and Lindahl, T. (1999). A human DNA editing enzyme homologous to the Escherichia coli DnaQ/MutD protein. *EMBO J* 18, 3868-3875.

- Hoste, E., Denecker, G., Gilbert, B., Van Nieuwerburgh, F., van der Fits, L., Asselbergh, B., De Rycke, R., Hachem, J.P., Deforce, D., Prens, E.P., Vandenabeele, P., and Declercq, W. (2013). Caspase-14-deficient mice are more prone to the development of parakeratosis. *J Invest Dermatol* *133*, 742-750.
- Huang, Y., Jiang, L., Yi, Q., Lv, L., Wang, Z., Zhao, X., Zhong, L., Jiang, H., Rasool, S., Hao, Q., Guo, Z., Cooke, H.J., Fenech, M., and Shi, Q. (2012). Lagging chromosomes entrapped in micronuclei are not 'lost' by cells. *Cell Res* *22*, 932-935.
- Imreh, G., Norberg, H.V., Imreh, S., and Zhivotovsky, B. (2011). Chromosomal breaks during mitotic catastrophe trigger gammaH2AX-ATM-p53-mediated apoptosis. *J Cell Sci* *124*, 2951-2963.
- Ishida-Yamamoto, A., Takahashi, H., Presland, R.B., Dale, B.A., and Iizuka, H. (1998). Translocation of profilaggrin N-terminal domain into keratinocyte nuclei with fragmented DNA in normal human skin and loricrin keratoderma. *Lab Invest* *78*, 1245-1253.
- Ishii, K.J., and Akira, S. (2006). Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. *Trends Immunol* *27*, 525-532.
- Iyama, T., and Wilson, D.M., 3rd. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)* *12*, 620-636.
- Kanoh, M., Takemura, G., Misao, J., Hayakawa, Y., Aoyama, T., Nishigaki, K., Noda, T., Fujiwara, T., Fukuda, K., Minatoguchi, S., and Fujiwara, H. (1999). Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation* *99*, 2757-2764.
- Karasek, J. (1988). Nuclear morphology of transitional keratinocytes in normal human epidermis. *J Invest Dermatol* *91*, 243-246.
- Kastelein, R.A., Hunter, C.A., and Cua, D.J. (2007). Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* *25*, 221-242.
- Kim, B.E., Howell, M.D., Guttman-Yassky, E., Gilleaudeau, P.M., Cardinale, I.R., Boguniewicz, M., Krueger, J.G., and Leung, D.Y. (2011). TNF-alpha downregulates filaggrin and loricrin through c-Jun N-terminal kinase: role for TNF-alpha antagonists to improve skin barrier. *J Invest Dermatol* *131*, 1272-1279.
- Kortylewski, M., Xin, H., Kujawski, M., Lee, H., Liu, Y., Harris, T., Drake, C., Pardoll, D., and Yu, H. (2009). Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* *15*, 114-123.
- Lande, R., Chamilos, G., Ganguly, D., Demaria, O., Frasca, L., Durr, S., Conrad, C., Schroder, J., and Gilliet, M. (2014). Cationic antimicrobial peptides in psoriatic skin cooperate to break innate tolerance to self-DNA. *Eur J Immunol* *45*, 203-213.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.H., Homey, B., Cao, W., Su, B., Nestle, F.O., Zal, T., Mellman, I., Schroder, J.M., Liu, Y.J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* *449*, 564-569.
- Lange, S.S., Bedford, E., Reh, S., Wittschieben, J.P., Carbajal, S., Kusewitt, D.F., DiGiovanni, J., and Wood, R.D. (2013). Dual role for mammalian DNA polymerase zeta in maintaining genome stability and proliferative responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, E687-696.
- Leach, N.T., and Jackson-Cook, C. (2004). Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei? *Mutat Res* *554*, 89-94.
- Lee, D.Y., Yamasaki, K., Rudsil, J., Zouboulis, C.C., Park, G.T., Yang, J.M., and Gallo, R.L. (2008). Sebocytes express functional cathelicidin antimicrobial peptides and can act to kill propionibacterium acnes. *J Invest Dermatol* *128*, 1863-1866.
- Leemans, C.R., Braakhuis, B.J., and Brakenhoff, R.H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* *11*, 9-22.
- Leonardi, C., Matheson, R., Zachariae, C., Cameron, G., Li, L., Edson-Heredia, E., Braun, D., and Banerjee, S. (2012). Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med* *366*, 1190-1199.
- Li, B., Tsou, L.C., Swindell, W.R., Gudjonsson, J.E., Tejasvi, T., Johnston, A., Ding, J., Stuart, P.E., Xing, X., Kochkodan, J.J., Voorhees, J.J., Kang, H.M., Nair, R.P., Abecasis, G.R., and Elder, J.T. (2014). Transcriptome analysis of psoriasis in a large case-control sample: RNA-seq provides insights into disease mechanisms. *J Invest Dermatol* *134*, 1828-1838.

- Lin, R., Chen, L., Chen, G., Hu, C., Jiang, S., Sevilla, J., Wan, Y., Sampson, J.H., Zhu, B., and Li, Q.J. (2014). Targeting miR-23a in CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes prevents tumor-dependent immunosuppression. *J Clin Invest* 124, 5352-5367.
- Lippens, S., Hoste, E., Vandenabeele, P., Agostinis, P., and Declercq, W. (2009). Cell death in the skin. *Apoptosis* 14, 549-569.
- Lowes, M.A., Bowcock, A.M., and Krueger, J.G. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445, 866-873.
- Lowes, M.A., Russell, C.B., Martin, D.A., Towne, J.E., and Krueger, J.G. (2013). The IL-23/T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses. *Trends Immunol* 34, 174-181.
- Lowes, M.A., Suarez-Farinas, M., and Krueger, J.G. (2014). Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol* 32, 227-255.
- Mackintosh, L.J., Geddes, C.C., and Herd, R.M. (2013). Skin tumours in the West of Scotland renal transplant population. *Br J Dermatol* 168, 1047-1053.
- Mason, P.A., and Cox, L.S. (2012). The role of DNA exonucleases in protecting genome stability and their impact on ageing. *Age (Dordr)* 34, 1317-1340.
- Mazur, D.J., and Perrino, F.W. (1999). Identification and expression of the TREX1 and TREX2 cDNA sequences encoding mammalian 3'→5' exonucleases. *J Biol Chem* 274, 19655-19660.
- Mazur, D.J., and Perrino, F.W. (2001a). Excision of 3' termini by the Trex1 and TREX2 3'→5' exonucleases. Characterization of the recombinant proteins. *J Biol Chem* 276, 17022-17029.
- Mazur, D.J., and Perrino, F.W. (2001b). Structure and expression of the TREX1 and TREX2 3' → 5' exonuclease genes. *J Biol Chem* 276, 14718-14727.
- McInturff, J.E., Modlin, R.L., and Kim, J. (2005). The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol* 125, 1-8.
- Meissner, A., Zilles, O., Varona, R., Jozefowski, K., Ritter, U., Marquez, G., Hallmann, R., and Korner, H. (2003). CC chemokine ligand 20 partially controls adhesion of naive B cells to activated endothelial cells under shear stress. *Blood* 102, 2724-2727.
- Meyer-Hoffert, U., and Schroder, J.M. (2011). Epidermal proteases in the pathogenesis of rosacea. *J Invest Dermatol Symp Proc* 15, 16-23.
- Morita, M., Stamp, G., Robins, P., Dulic, A., Rosewell, I., Hrivnak, G., Daly, G., Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2004). Gene-targeted mice lacking the Trex1 (DNase III) 3'→5' DNA exonuclease develop inflammatory myocarditis. *Mol Cell Biol* 24, 6719-6727.
- Muller-Rover, S., Handjiski, B., van der Veen, C., Eichmuller, S., Foitzik, K., McKay, I.A., Stenn, K.S., and Paus, R. (2001). A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol* 117, 3-15.
- Naoe, Y., Hata, T., Tanigawa, K., Kimura, H., and Masunaga, T. (2010). Bidimensional analysis of desmoglein 1 distribution on the outermost corneocytes provides the structural and functional information of the stratum corneum. *J Dermatol Sci* 57, 192-198.
- Nenci, A., Huth, M., Funteh, A., Schmidt-Supprian, M., Bloch, W., Metzger, D., Chambon, P., Rajewsky, K., Krieg, T., Haase, I., and Pasparakis, M. (2006). Skin lesion development in a mouse model of incontinentia pigmenti is triggered by NEMO deficiency in epidermal keratinocytes and requires TNF signaling. *Hum Mol Genet* 15, 531-542.
- Nestle, F.O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y.J., and Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 202, 135-143.
- Nestle, F.O., Kaplan, D.H., and Barker, J. (2009). Psoriasis. *N Engl J Med* 361, 496-509.
- Nestle, F.O., Turka, L.A., and Nickoloff, B.J. (1994). Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest* 94, 202-209.
- Nograles, K.E., Zaba, L.C., Guttman-Yassky, E., Fuentes-Duculan, J., Suarez-Farinas, M., Cardinale, I., Khatcherian, A., Gonzalez, J., Pierson, K.C., White, T.R., Pensabene, C., Coats, I., Novitskaya, I., Lowes, M.A., and Krueger, J.G. (2008). Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol* 159, 1092-1102.
- Norval, M., Cullen, A.P., de Gruijl, F.R., Longstreth, J., Takizawa, Y., Lucas, R.M., Noonan, F.P., and van der Leun, J.C. (2007). The effects on human health from stratospheric ozone depletion and its interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci* 6, 232-251.

- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Metivier, D., Larochette, N., van Endert, P., Ciccosanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13, 54-61.
- Oberyshyn, T.M. (2008). Non-melanoma skin cancer: importance of gender, immunosuppressive status and vitamin D. *Cancer Lett* 261, 127-136.
- Omori, E., Matsumoto, K., Sanjo, H., Sato, S., Akira, S., Smart, R.C., and Ninomiya-Tsuji, J. (2006). TAK1 is a master regulator of epidermal homeostasis involving skin inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 281, 19610-19617.
- Ovaere, P., Lippens, S., Vandenabeele, P., and Declercq, W. (2009). The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends Biochem Sci* 34, 453-463.
- Pan, X., Hobbs, R.P., and Coulombe, P.A. (2013). The expanding significance of keratin intermediate filaments in normal and diseased epithelia. *Curr Opin Cell Biol* 25, 47-56.
- Panayotova-Dimitrova, D., Feoktistova, M., Ploesser, M., Kellert, B., Hupe, M., Horn, S., Makarov, R., Jensen, F., Porubsky, S., Schmieder, A., Zenclussen, A.C., Marx, A., Kerstan, A., Geserick, P., He, Y.W., and Leverkus, M. (2013). cFLIP regulates skin homeostasis and protects against TNF-induced keratinocyte apoptosis. *Cell Rep* 5, 397-408.
- Papp, K.A., Leonardi, C., Menter, A., Ortonne, J.P., Krueger, J.G., Kricorian, G., Aras, G., Li, J., Russell, C.B., Thompson, E.H., and Baumgartner, S. (2012). Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med* 366, 1181-1189.
- Parra, D., Manils, J., Castellana, B., Vina-Vilaseca, A., Moran-Salvador, E., Vazquez-Villoldo, N., Tarancon, G., Borrás, M., Sancho, S., Benito, C., Ortega, S., and Soler, C. (2009). Increased Susceptibility to Skin Carcinogenesis in TREX2 Knockout Mice. *Cancer Res* 69, 6676-6684.
- Pasparakis, M., Haase, I., and Nestle, F.O. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 14, 289-301.
- Perera, G.K., Di Meglio, P., and Nestle, F.O. (2012). Psoriasis. *Annu Rev Pathol* 7, 385-422.
- Perrino, F.W., de Silva, U., Harvey, S., Pryor, E.E., Jr., Cole, D.W., and Hollis, T. (2008). Cooperative DNA binding and communication across the dimer interface in the TREX2 3' --> 5'-exonuclease. *J Biol Chem* 283, 21441-21452.
- Perrino, F.W., Harvey, S., McMillin, S., and Hollis, T. (2005). The human TREX2 3' -> 5'-exonuclease structure suggests a mechanism for efficient nonprocessive DNA catalysis. *J Biol Chem* 280, 15212-15218.
- Poumay, Y., and Pittelkow, M.R. (1995). Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol* 104, 271-276.
- Reischl, J., Schwenke, S., Beekman, J.M., Mrowietz, U., Sturzebecher, S., and Heubach, J.F. (2007). Increased expression of Wnt5a in psoriatic plaques. *J Invest Dermatol* 127, 163-169.
- Rider, P., Carmi, Y., Guttman, O., Braiman, A., Cohen, I., Voronov, E., White, M.R., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2011). IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol* 187, 4835-4843.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.
- Rubin, A.I., Chen, E.H., and Ratner, D. (2005). Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 353, 2262-2269.
- Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472, 481-485.
- Schonthaler, H.B., Guinea-Viniegra, J., and Wagner, E.F. (2011). Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway. *Ann Rheum Dis* 70 Suppl 1, i109-112.
- Schwarz, A., Stander, S., Berneburg, M., Böhm, M., Kulms, D., van Steeg, H., Grosse-Heitmeyer, K., Krutmann, J., and Schwarz, T. (2002). Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nat Cell Biol* 4, 26-31.
- Schwarz, T., and Schwarz, A. (2009). DNA repair and cytokine responses. *J Invest Dermatol Symp Proc* 14, 63-66.

- Seneschal, J., Clark, R.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C.M., and Kupper, T.S. (2012). Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity* 36, 873-884.
- Shevelev, I.V., and Hubscher, U. (2002). The 3' 5' exonucleases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 364-376.
- Shevelev, I.V., Ramadan, K., and Hubscher, U. (2002). The TREX2 3'→5' exonuclease physically interacts with DNA polymerase delta and increases its accuracy. *ScientificWorldJournal* 2, 275-281.
- Skrzeczynska-Moncznik, J., Włodarczyk, A., Zabieglo, K., Kapinska-Mrowiecka, M., Marewicz, E., Dubin, A., Potempa, J., and Cichy, J. (2012). Secretory leukocyte proteinase inhibitor-competent DNA deposits are potent stimulators of plasmacytoid dendritic cells: implication for psoriasis. *J Immunol* 189, 1611-1617.
- Takeuchi, S., Zhang, W., Wakamatsu, K., Ito, S., Hearing, V.J., Kraemer, K.H., and Brash, D.E. (2004). Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15076-15081.
- Tang, H.L., Tang, H.M., Mak, K.H., Hu, S., Wang, S.S., Wong, K.M., Wong, C.S., Wu, H.Y., Law, H.T., Liu, K., Talbot, C.C., Jr., Lau, W.K., Montell, D.J., and Fung, M.C. (2012). Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Mol Biol Cell* 23, 2240-2252.
- Taylor, S.C. (2003). Epidemiology of skin diseases in ethnic populations. *Dermatol Clin* 21, 601-607.
- Terradas, M., Martin, M., Tusell, L., and Genesca, A. (2010). Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutat Res* 705, 60-67.
- Tian, S., Krueger, J.G., Li, K., Jabbari, A., Brodmerkel, C., Lowes, M.A., and Suarez-Farinas, M. (2012). Meta-analysis derived (MAD) transcriptome of psoriasis defines the "core" pathogenesis of disease. *PLoS One* 7, e44274.
- Tsaalbi-Shtylik, A., Verspuy, J.W., Jansen, J.G., Rebel, H., Carlee, L.M., van der Valk, M.A., Jonkers, J., de Gruijl, F.R., and de Wind, N. (2009). Error-prone translesion replication of damaged DNA suppresses skin carcinogenesis by controlling inflammatory hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21836-21841.
- van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J.S., Kant, M., Boon, L., Laman, J.D., Cornelissen, F., Mus, A.M., Florencia, E., Prens, E.P., and Lubberts, E. (2009). Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* 182, 5836-5845.
- Wagner, E.F., Schonhaler, H.B., Guinea-Viniegra, J., and Tschachler, E. (2010). Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nat Rev Rheumatol* 6, 704-714.
- Walter, A., Schafer, M., Cecconi, V., Matter, C., Urosevic-Maiwald, M., Belloni, B., Schonewolf, N., Dummer, R., Bloch, W., Werner, S., Beer, H.D., Knuth, A., and van den Broek, M. (2013). Aldara activates TLR7-independent immune defence. *Nat Commun* 4, 1560.
- Watt, F.M. (1983). Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 81, 100s-103s.
- Weinlich, R., Oberst, A., Dillon, C.P., Janke, L.J., Milasta, S., Lukens, J.R., Rodriguez, D.A., Gurung, P., Savage, C., Kanneganti, T.D., and Green, D.R. (2013). Protective roles for caspase-8 and cFLIP in adult homeostasis. *Cell Rep* 5, 340-348.
- Weiss, G., Shemer, A., and Trau, H. (2002). The Koebner phenomenon: review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 16, 241-248.
- Werner, S., Krieg, T., and Smola, H. (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 127, 998-1008.
- Wikonkal, N.M., and Brash, D.E. (1999). Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4, 6-10.
- Witherden, D.A., and Havran, W.L. (2013). Cross-talk between intraepithelial gammadelta T cells and epithelial cells. *J Leukoc Biol* 94, 69-76.
- Wohn, C., Ober-Blobaum, J.L., Haak, S., Pantelyushin, S., Cheong, C., Zahner, S.P., Onderwater, S., Kant, M., Weighardt, H., Holzmann, B., Reizis, B., Becher, B., Prens, E.P., and Clausen, B.E. (2013). Langerin(neg) conventional dendritic cells produce IL-23 to drive psoriatic plaque formation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 10723-10728.
- Wood, R.D., Mitchell, M., Sgouros, J., and Lindahl, T. (2001). Human DNA repair genes. *Science* 291, 1284-1289.

- Works, M.G., Yin, F., Yin, C.C., Yiu, Y., Shew, K., Tran, T.T., Dunlap, N., Lam, J., Mitchell, T., Reader, J., Stein, P.L., and D'Andrea, A. (2014). Inhibition of TYK2 and JAK1 ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis by inhibiting IL-22 and the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* *193*, 3278-3287.
- Yamamoto-Tanaka, M., Makino, T., Motoyama, A., Miyai, M., Tsuboi, R., and Hibino, T. (2014). Multiple pathways are involved in DNA degradation during keratinocyte terminal differentiation. *Cell Death Dis* *5*, e1181.
- Yan, N., Regalado-Magdos, A.D., Stiggelbout, B., Lee-Kirsch, M.A., and Lieberman, J. (2010). The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat Immunol* *11*, 1005-1013.
- Yang, T., Liang, D., Koch, P.J., Hohl, D., Kheradmand, F., and Overbeek, P.A. (2004). Epidermal detachment, desmosomal dissociation, and destabilization of corneodesmosin in *Spink5*^{-/-} mice. *Genes Dev* *18*, 2354-2358.
- Yao, Y., Richman, L., Morehouse, C., de los Reyes, M., Higgs, B.W., Boutrin, A., White, B., Coyle, A., Krueger, J., Kiener, P.A., and Jallal, B. (2008). Type I interferon: potential therapeutic target for psoriasis? *PLoS One* *3*, e2737.
- Yin, C., Zhang, T., Qiao, L., Du, J., Li, S., Zhao, H., Wang, F., Huang, Q., Meng, W., Zhu, H., Bu, H., Li, H., Xu, H., and Mo, X. (2014). TLR7-expressing cells comprise an interfollicular epidermal stem cell population in murine epidermis. *Sci Rep* *4*, 5831.
- Yu, S.W., Andrabi, S.A., Wang, H., Kim, N.S., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2006). Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 18314-18319.
- Zaba, L.C., Krueger, J.G., and Lowes, M.A. (2009). Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol* *129*, 302-308.
- Zhang, D.W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.J., Lin, S.C., Dong, M.Q., and Han, J. (2009). RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* *325*, 332-336.
- Zouboulis, C.C., Seltmann, H., Neitzel, H., and Orfanos, C.E. (1999). Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol* *113*, 1011-1020.