A circular inset showing a microscopic view of several cells. The cells are stained with a green fluorescent marker, highlighting their internal structures and nuclei. The background is dark, making the green-stained cells stand out. The cells appear to be in various stages of division or differentiation.

Nuevas interacciones en la transición epitelio mesénquima: la quinasa Akt como efector del factor transcripcional Snail1

Patricia Villagrasa González

**NUEVAS INTERACCIONES EN LA
TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA: LA
QUINASA AKT COMO EFECTOR DEL
FACTOR TRANSCRIPCIONAL SNAIL1**



Universidad Autónoma de Barcelona
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Unidad de Biofísica-CEB, Facultad de Medicina

**NUEVAS INTERACCIONES EN LA TRANSICIÓN EPITELIO
MESÉNQUIMA: LA QUINASA AKT COMO EFECTOR DEL
FACTOR TRANSCRIPCIONAL SNAIL1**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Bioquímica
y Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Barcelona

Barcelona, 2010

Directora de Tesis

Director de Tesis

Doctoranda

Dra. Mireia Duñach
Masjuan

Dr. Antonio García de
Herreros

Patricia Villagrasa
González

A mis padres
A mi hermana
A toda mi familia
A mis amigos, especialmente
Ali, Marina y Montse
y, a ti Raúl.

"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: **la voluntad**".

Albert Einstein

ESQUEMA DE CONTENIDOS

ESQUEMA DE CONTENIDOS	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	1
NOTAS PARA EL LECTOR	7
ABREVIATURAS	7
ÍNDICE	9

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Figura I.1 Modelo propuesto para el conjunto de capacidades funcionales adquiridas por la mayoría e incluso, quizás todos los tumores humanos	18
Figura I.2 Características de la <i>EMT</i>	20
Figura I.3 Tres tipos de <i>EMT</i>	21
Figura I.4 Representación esquemática de <i>EMT</i> tipo 1	22
Figura I.5 Formación y delaminación de las células de la cresta neural	23
Figura I.6 <i>EMT</i> y fibrosis	24
Figura I.7 Contribución de la <i>EMT</i> a la progresión de un tumor	25
Figura I.8 Durante la progresión de un tumor existe gran heterogeneidad tanto morfológica como molecular	26
Figura I.9 La transformación de <i>stem cells</i> normales o la inducción del programa <i>EMT</i> en células diferenciadas tumorales podría generar CSC	27
Figura I.10 Representación esquemática de los marcadores de la <i>EMT</i>	29
Figura I.11 Esquema representativo de la regulación de la expresión	31

Figura I.12 Red molecular representativa que regula la <i>EMT</i>	33
Figura I.13 La superfamilia Snail1	36
Figura I.14 Esquema de la estructura de Snail1 en mamíferos	38
Figura I.15 Representación esquemática del promotor proximal de la E-cadherina humano	41
Figura I.16 Genes regulados por Snail1	42
Figura I.17 Representación de las diferentes isoformas de Akt	43
Figura I.18 Esquema representativo de la regulación de la activación de Akt por la PI3K (p85/p110) y por interacción directa con diversas proteínas	45
Tabla I.1 Sustratos identificados <i>in vivo</i> de Akt	47

RESULTADOS

Figura R.1 Snail1 induce fosforilación de Akt endógena	56
Figura R.2 Snail1 induce la fosforilación de Akt en condiciones basales y tras 5 min de estimulación con IGF-1	57
Figura R.3 Snail1 aumenta el estado de fosforilación de Akt, tanto en el citosol, como en el núcleo de células RWP1	59
Figura R.4 Células que expresan Snail1, presentan mayor actividad NFκB	61
Figura R.5 Células que expresan Snail1, presentan mayores niveles de P-FoxO1	62
Figura R.6 La coexpresión de Snail1 aumenta la actividad de Akt1	63
Figura R.7 La fosforilación de Akt inducida por Snail1 es dependiente de la actividad PI3K	64
Figura R.8 El mutante no represor de Snail1, Snail1-P2A también induce la fosforilación de Akt	66
Figura R.9 El mutante no represor de Snail1, Snail1-P2A, también induce la fosforilación de Akt en la S473 tanto en el citosol como en el núcleo	67

Figura R.10 Snail1-P2A aumenta la actividad quinasa de Akt1 <i>in vivo</i>	68
Figura R.11 Representación esquemática de la estructura primaria de Snail1 y los diferentes mutantes utilizados en los ensayos quinasa <i>in vitro</i>	70
Figura R.12 Akt1 fosforila Snail1-WT y Snail1-Ct <i>in vitro</i> pero no el dominio rico en serinas	71
Figura R.13 Akt1 fosforila el mutante puntual de Snail1, Snail1-T177A y el mutante Snail1-S/D (proteína abierta), pero no el mutante Snail1-Nt	73
Figura R.14 Akt1 fosforila principalmente el dominio C-terminal de Snail1	74
Figura R.15 Comparación del grado de fosforilación de las formas mutadas de Snail1	74
Figura R.16 Akt1 fosforila el mutante puntual Snail1-S246A	75
Figura R. 17 El mutante Snail1- Δ 28 interacciona con Akt1 con una afinidad similar a la de Snail1-WT	76
Figura R.18 Listado de diferentes proteínas que interaccionan con Akt y modulan su actividad	77
Figura R.19 Snail1-WT incrementa la actividad quinasa de Akt1	78
Figura R.20 El incremento <i>in vitro</i> de la actividad quinasa de Akt1 por Snail1, no es debido a una mayor fosforilación de los residuos responsables de su activación, al menos para el caso de la T308	79
Figura R.21 Snail1 y Snail1-P2A inmunoprecipitan con Akt en células RWP1. El dominio PH de Akt no participa en la interacción	82
Figura R.22 Snail1 interacciona mayoritariamente con el Akt nuclear	84
Figura R.23 Snail1 y Akt endógeno coimmunoprecipitan en el núcleo de células MiaPaca2 y SW620	85
Figura R.24 Snail1 y Akt colocalizan en células HT-29 M6	86
Figura R.25 Akt se une a la región -178/+92 del promotor de la <i>CDH1</i> independientemente de la presencia de Snail1	87

Figura R.26 Snail1 necesita de la actividad quinasa de Akt para reprimir el promotor de la E-cadherina	89
Figura R.27 El mutante de Akt kinase dead interacciona con Snail1	89
Figura R.28 Snail1 requiere la actividad quinasa de Akt para reprimir la E-cadherina	90
Figura R.29 Akt fosforila la histona H3 <i>in vitro</i>	92
Figura R.30 La P-S28 es una marca principalmente mitótica tanto en células HT-29 M6 como en células RWP1 control y Snail1	93
Figura R.31 La P-S10 no es consecuencia de la interacción Snail1/Akt en el promotor de la E-cadherina	94
Figura R.32 La P-S28 tampoco es consecuencia de la interacción Snail1/Akt en el promotor de la E-cadherina	95
Figura R.33 Células que expresan Snail1 presentan más Akt1 y Akt2 nuclear	98
Figura R.34 Las células que expresan Snail1 presentan más Akt1 y Akt2 en la fracción cromatídica que las células control	99
Figura R.35 Snail1 ectópico interacciona tanto con Akt1 como con Akt2. La interacción entre las proteínas endógenas sólo se da entre Snail1 y Akt2	100
Figura R.36 Snail1 provoca un cambio de isoforma de Akt en el promotor de la E-cadherina en células HT-29 M6	102
Figura R.37 Ni Akt1 ni Akt2 son reclutadas al promotor de la Fibronectina	103
Figura R.38 Western-blot mostrando la interferencia de Akt1 y Akt2	104
Figura R.39 La interferencia tanto de Akt1 como de Akt2 impide la represión de la E-cadherina y la completa activación de la Fibronectina por Snail1	105
Figura R.40 Western-blot mostrando la interferencia de Akt1 y Akt2	106
Figura R.41 La interferencia de Akt1 incrementa los cambios moleculares provocados por Snail1 en células HT-29 M6	108

Figura R.42 La expresión de Akt2 es necesaria para la activación de marcadores mesenquimales como consecuencia de la interferencia de Akt1. La interferencia de las dos isoformas causa una mayor represión de la E-cadherina	109
Figura R.43 La interferencia de Akt1 y de ambas isoformas a la vez aumenta la expresión de Zeb1	110
Figura R.44 La interferencia de Akt1 o de Akt1 y Akt2 conjuntamente no afecta a la expresión de Akt3	111
Figura R.45 La interferencia de Akt apenas disminuye los niveles de Akt activa	112

DISCUSIÓN

Figura D.1 Mecanismos responsables de la migración de carcinomas mediados por Akt	119
Figura D.2 Modelo propuesto por Tschlis y colaboradores	124
Figura D.3 Estructura de Akt y algunas de las proteínas que interaccionan y modulan su actividad	139
Figura D.4 Modelo propuesto que describe la relación directa entre Snail1 y Akt estudiada en este trabajo	148

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla M.M.1 Secuencias de oligonucleótidos usados para Snail1 y para Snail1-P2A	160
Tabla M.M.2 Secuencias de oligonucleótidos usados para Snail1- Δ 28	161
Tabla M.M.3 Secuencias de oligonucleótidos usados para Snail1-SRD	162
Tabla M.M.4 Serinas mutadas en el mutante Snail1-S/A y Snail1-S/D	162
Tabla M.M.5 Secuencias de oligonucleótidos usados para Snail1-T177A y Snail1-S246A	163

Tabla M.M.6 Líneas celulares utilizadas durante este trabajo y algunas de sus características	168
Tabla M.M.7 Condiciones en las que las células fueron sembradas en placas para ser transfectadas o infectadas	170
Tabla M.M.8 Condiciones para la transfección con PEI	170
Tabla M.M.9 Concentración de medio de acuerdo con la superficie de la placa	172
Tabla M.M.10 Reactivos utilizados para preparar los geles de acrilamida	178
Tabla M.M.11 Lista de los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo	180
Tabla M.M.12 Anticuerpos y diluciones utilizadas para Inmunofluorescencia	185
Tabla M.M.13 Oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR semicuantitativa y cuantitativa	187
Tabla M.M.14 Oligonucleótidos utilizados para amplificar los promotores por PCR cuantitativa	189

NOTAS AL LECTOR

El *snail1* expresado ectópicamente en este trabajo es el de ratón (*mmsnail1*).

En general, los *GENES* aparecen en mayúsculas y el cursiva y las Proteínas/proteínas aparecen en minúsculas.

ABREVIATURAS

AGC: cAMP-dependent protein kinase (PKA), protein kinaseG, protein kinase C (PKC)

AKT: activated kinase murine thymoma

Amp: ampicilina

AP1/2: adaptor protein complex 1/2

APC: Adenomatous Polyposis Coll

BAD: Bcl2 associated agonist of cell death

bHLH: basic Helix-loop-Helix

BMP: Bone Morphogenetic Protein

bp: base pair

BSA: Bovine Serum Albumin

βTRCP: β-Transducin repeat-containing protein

CBP: CREB binding protein

CDH1: E-cadherin gene

cDNA: complementary DNA

ChIP: Chromatin IP

CIP: Calf intestine phosphatase

CMV: cytomegalovirus

CREB: cAMP responsive element binding protein

CRM1: Chromosome region maintenance 1

CSK: cytoskeletal buffer

CSC: Cancer Stem Cell

CtBP: C-terminal binding protein

DIC: Differential Interference Contrast

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DNA: deoxyribonucleic acid

DNMT3A: DNA metyltrasferase

DTT: Ditiotretitol

eNOS: Endothelial Nitric Oxide Synthase

E-box: Ephrussi box-like motif

EDTA: Etilediaminotetraacetat sodico

EGF: Epidermal Growth Factor

EGR: Epidermal Growth Factor Receptor

EMT: Epithelial-to Mesenchymal Transition

ER: Estrogen receptor

ErbB2: v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

ERK: Extracellular-Regulated Kinase

EzH2: Enhancer of zeste homolog 2

ETS: Avian erythroblastosis virus E26 (v-ets) oncogene homolog-1

FBS: Fetal Bovine Serum

FSP-1: fibroblast-specific protein-1

FTS: fused toes homolog

Fbxl14: F-box and leucine-rich repeat protein 14

FoxO: forkhead box O1

FGF: Fibroblast Growth Factor

FN1: Fibronectin gene

Glut4: Glucose transporter 4

GSK3β: Glycogen Synthase Kinase-3 β

GST: Glutathione- S-Transferase

H3/H4: Histone 3/4

HA: Haemagglutinin

HDAC: Histone Deacetilase

HEK: Human Embryonic Kidney

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HIF: Hypoxia Inducible Factor

HM: Hydrophobic Motif

HP1: Heterochromatin binding Protein

HPRT: Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase

Id: Inhibitor of differentiation

IF: Immunofluorescence

IGF: Insuline Growth Factor

IgG: Immunoglobulin G
IκB: Inhibitor of nuclear factor kappa B
IKK: IκB kinase
IL: Interleukin
ILK: Integrin Linked Kinase
IMPDH: inosine monophosphate dehydrogenase
IP: Immunoprecipitation
IPTG: β-D-isopropyl-thiogalactopyranosid
IRES: Internal Ribosome Entry Site
JAK: Janus kinase
kDa: kiloDalton
KO: Knock Out
KRAB: Krueppel-associated box
LEF-1: Lymphoid enhancer-binding factor
LOXL2: Lysyl Oxidase-Like 2
LRP: low density lipoprotein-related protein 1
MAPK: Mitogen-Activated Protein kinase
MCS: Migrating cancer stem cells
MDCK: Madin Darby Canine Kidney
MDM2: mouse double minute 2
MEC: Matrix extracellular
MET: Mesenchymal-to-Epithelial Transition
miRNA: microRNA
MMTV: Mouse mammary tumor virus
MMP: Matrix metalloproteinase
mRNA: messenger RNA
MSK1: mitogen- and stress-activated protein kinase
MUC-1: Mucin-1
MyoD: myogenic differentiation 1
NES: Nuclear export signal
NFκB: Nuclear factor kappa B
NLS: Nuclear Localization Signal
NFAT: nuclear factor of activated T-cells
PAK1: p21-activated kinase
PBS: Phosphate Buffered Saline
PDGF: platelet-derived growth factor
PDK1: phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate [PtdIns-(3,4,5)P₃]-dependent protein kinase 1
PH domain: pleckstrin homology
PHLPP: PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase
PI3K: Phosphoinositide-3 Kinase
PKA: cAMP protein kinase
PP2A: protein *phosphatase* 2A

PRC2: Polycomb complex 2
PRMT: protein arginine methyltransferase
PTEN: Phosphatase and tensin homolog
PyrK: Pyruvate Kinase
PyVmT: polyoma middle T antigen
Rac: ras-related
Rb: retinoblastoma
RhoB: Ras homolog gene family, member B
RNA: Ribonucleic acid
RT-PCR: Reverse-Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
RTK: Receptor Tyrosin Kinase
SCS: stationary stem cell
SDS: Dodecyl sodium sulphate
SETDB1: SET domain, bifurcated 1
SHIP: inositol polyphosphate-5-phosphatase
shRNA: short hairpin RNA
SIP1: Smad Interacting Protein 1
siRNA: short interference RNA
SNAG: Sna/Gfi
Sp1: specificity protein 1
TCF: T-cell factor
TCFP2: Transcription factor CP2-like protein
TGFβ: Transforming growth factor beta
TNFα: Tumor Necrosis Factor alpha
mTOR: mechanistic target of rapamycin
TSC2: tuberous sclerosis 2
TSS: Transcription Start Site
UTR: Untranslated Region
VDR: Vitamin D Receptor
VEGF: Vascular endothelial growth factor
WB: western-blot
ZEB1/2: Zinc finger E-box binding homeobox 1/2
Zfh-1/2: Zinc-finger homeodomain-1/2
ZO-1: Zonula occludens
Wnt: wingless-type

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	15
I.1 ¿QUE ES EL CÁNCER? VISIÓN GENERAL	17
I.2 TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (EMT): CUANDO LAS CÉLULAS EPITELIALES DECIDEN CONVERTIRSE EN CÉLULAS MESENQUIMALES	19
I.2.1 Tipos de EMT	21
<i>EMT</i> tipo 1: <i>EMT</i> durante el desarrollo embrionario	22
<i>EMT</i> tipo 2: <i>EMT</i> asociada a la regeneración tisular y la fibrosis	23
<i>EMT</i> tipo 3: <i>EMT</i> asociada con la progresión tumoral y metástasis	25
<i>EMT</i> y Cancer Stem Cell	27
I.2.2 Regulación transcripcional de la EMT	28
Regulación transcripcional de la E-cadherina	30
I.2.3 Diferentes vías de señalización activan estímulos que desencadenan la EMT	32
I.3 EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SNAIL1	36
I.3.1 La superfamilia de los factores de transcripción Snail	36
I.3.2 El factor de transcripción Snail1	37
Regulación a nivel proteína	38
I.3.3 Funciones moleculares de Snail1	40
I.4 LA SERINA/TREONINA QUINASA AKT	43
I.4.1 La activación de Akt requiere la fosforilación de dos de sus residuos	44
I.4.2 La complejidad de la señalización vía Akt y su importancia en la fisiología y enfermedad humana	46

OBJETIVOS	51
RESULTADOS	53
R.1 SNAIL1 AUMENTA LA ACTIVACIÓN Y LA ACTIVIDAD DE AKT <i>IN VIVO</i>	55
R.1.1 Snail1 induce la fosforilación de Akt en células epiteliales	55
R.1.2 Snail1 aumenta la actividad quinasa de Akt <i>in vivo</i>	59
R.1.3 El aumento de la fosforilación de Akt en los residuos responsables de su activación, la T308 y la S473, es dependiente de la actividad PI3K	64
R.1.4 El aumento de la fosforilación de Akt en los residuos responsables de su activación, la T308 y la S473, no depende totalmente de la actividad represora de Snail1	65
R.2 AKT INTERACCIONA CON SNAIL1. LA INTERACCIÓN DE AMBAS PROTEÍNAS PROVOCA UN AUMENTO DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE AKT	70
R.2.1 Akt fosforila a Snail1 <i>in vitro</i>	70
R.2.2 Snail1 interacciona directamente con Akt1 <i>in vitro</i> . Esta interacción aumenta su actividad quinasa sin aumentar su nivel de fosforilación	77
R.3 AKT INTERACCIONA CON SNAIL1 <i>IN VIVO</i>. SNAIL1 NECESITA DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE AKT PARA REPRIMIR LA <i>CDH1</i>	81
R.3.1 Akt y Snail1 interaccionan en el núcleo de células epiteliales tumorales	81
R.3.2 Akt se une a la región (-178/+92) del promotor de la <i>CDH1</i> , la misma región en la que se une Snail1	85
R.3.3 Snail1 necesita de la actividad kinasa de Akt para reprimir el promotor de la <i>CDH1</i>	88
R.3.4 Ni la fosforilación en la S10, ni en la S28 de la histona H3 son el resultado de la interacción entre Akt y Snail1 en el promotor de la <i>CDH1</i>	91
R.4. AKT2, PERO NO AKT1, INTERACCIONA CON SNAIL1. ROLES DISTINTOS PARA LAS ISOFORMAS AKT1 Y AKT2 EN LOS CAMBIOS MOLECULARES INDUCIDOS POR SNAIL1 EN LAS CÉLULAS HT-29 M6	97

R.4.1 Akt2 interacciona con Snail1 en el promotor de la E-cadherina	97
R.4.2 Akt1 y Akt2 cooperan con Snail1 en la regulación de la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales en las células RWP1. Sin embargo, en células HT-29 M6 las dos isoformas juegan papeles distintos: Akt1 es pro-epitelial y Akt2 pro-mesenquimal	103

DISCUSIÓN	115
------------------	------------

D.1 LA CONTRIBUCIÓN DE CADA ISOFORMA DE AKT EN LOS CAMBIOS DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LA <i>EMT</i> INDUCIDOS POR SNAIL1 DEPENDE DEL SISTEMA CELULAR ANALIZADO	117
D.2 LA INTERACCIÓN DE SNAIL1 CON AKT INCREMENTA SU ACTIVIDAD QUINASA <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	139
D.3 MODELO PROPUESTO	149

CONCLUSIONES	151
---------------------	------------

MATERIALES Y MÉTODOS	155
-----------------------------	------------

M.M.1 CONSTRUCCIONES DE CDNA Y SU PREPARACIÓN	157
M.M.1.1 Preparación de las construcciones	157
Obtención del inserto a partir de RNA total	157
Obtención del inserto por subclonaje	157
Obtención de inserto por PCR	158
M.M.1.2 Preparación de los vectores	158
Vectores de expresión en procariontes	159
Vectores de expresión en eucariotas	160
M.M.2 Purificación de proteínas recombinantes en E.coli	165
M.M.2.1 Inducción, purificación y elución de proteínas recombinantes	165

Inducción	165
Solubilización con TX-100 1%	165
Solubilización con N-Laurilsarcosine (Sarkosyl)	166
Purificación con Glutathion-Sepharose 4B	166
Comprobación de la eficiencia de la purificación	167
M.M.3 LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS	168
M.M. 3.1 Clones estables	169
M.M.4 TRANSFECCIÓN/INFECCIÓN	170
Transfección	170
Infección	171
M.M.5 Tratamientos	172
M.M.6 Extracción y análisis de proteínas	173
M.M.6.1 Extracción de proteínas	173
M.M.6.1.1 Purificación de la quinasa Akt1 de células 293T HEK	173
M.M.6.1.2 Extracción total de proteínas	175
Extracción en condiciones desnaturalizantes con el tampón de lisis	
1% SDS	175
Extracción total de proteínas en condiciones no desnaturalizantes	175
M.M.6.1.3 Fraccionamiento subcelular	176
Separación de núcleo y citosol	176
Purificación de cromatina	177
M.M.6.2 Análisis de proteínas por western-blot	178
M.M.7 Ensayos de interacción entre proteínas	181
M.M.7.1 <i>Pull-down</i>	181
M.M.7.2 Coinmunoprecipitación	181

M.M.8 Ensayos de fosforilación <i>in Vitro</i>	182
M.M.8.1 Ensayo de actividad sobre un péptido sustrato o crosstide	182
M.M.8.2 Ensayo de fosforilación sobre proteína sustrato	183
M.M.9 Inmunofluorescencia	184
Permeabilización 0.3% Tritón X-100	184
Tratamiento con el tampón CSK	185
M.M.10 Ensayos reporter de actividad transcripcional	186
Vectores utilizados	186
M.M.11 RT-PCR	187
M.M.12 Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)	188
<hr/>	
REFERENCIAS	191
<hr/>	
ANEXO	217
<hr/>	

INTRODUCCIÓN

Estudiando lo pasado, se aprende lo nuevo

Proverbio japonés

I.1 ¿QUÉ ES EL CÁNCER? Visión general.

Se define como cáncer al conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de células, las cuales invaden y dañan tejidos u órganos provocando finalmente la muerte del individuo. Los tumores son monoclonales, un concepto que ya fue propuesto por el alemán *Theodor Boveri* a principios del siglo XX, a la vista de la similitud entre los tumores primarios y sus metástasis. El proceso de formación de un tumor a partir de una célula implica necesariamente la acumulación sucesiva de alteraciones en los genes, lo que caracteriza al cáncer como una enfermedad clonal, que se alcanza después de muchas etapas las cuáles envuelven cambios dinámicos genéticos y epigenéticos en el genoma [1].

El cáncer es el resultado de mutaciones en genes que regulan la proliferación y la homeostasis. Entre ellos se encuentran los oncogenes y los genes supresores de tumores. Alteraciones en éstos provocan de una manera directa la aparición de cáncer ya que producen la pérdida de control de procesos básicos celulares, como por ejemplo el ciclo de división celular (pérdida de la función de un gen supresor) o la proliferación descontrolada (ganancia de la función de un oncogen). También existen alteraciones en genes que provocan cáncer de una manera indirecta, son los llamados *caretakers* (codifican proteínas que reparan el DNA) y los *landscaper* (alteraciones en células del estroma) [2].

El cáncer engloba un conjunto de enfermedades de diferente origen y con diferente apariencia. Años de investigación han permitido resumir el amplio espectro de alteraciones genéticas que dirigen una transformación progresiva desde una célula normal a una altamente maligna cómo la manifestación de siete alteraciones en la fisiología de la célula (**Figura I.1**). Inicialmente fueron seis las propuestas por Hannahan y Weinberg: autosuficiencia en producción de señales de crecimiento (proliferación en ausencia de señales), insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, resistencia a la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida y capacidades invasivas y metastásicas. La séptima característica alterada en la fisiología de la célula fue propuesta por Schreiber y

colegas [3, 4] y se refiere a la capacidad de las células tumorales de evadir el control del sistema inmune [5].



Figura I.1 Modelo propuesto para el conjunto de capacidades funcionales adquiridas por la mayoría e incluso, quizás todos los tumores humanos. Figura adaptada de [1].

Existen unos 200 tipos diferentes de células en nuestro organismo. Si bien, en un principio cualquiera de ellos puede potencialmente originar un tumor, en realidad el 90% de los tumores son generados por células epiteliales. Una célula epitelial normal presenta un fenotipo diferenciado polarizado con uniones intercelulares bien formadas, que restringen la movilidad y por lo tanto mantienen la integridad del tejido. Durante la progresión de un tumor epitelial las células tumorales aún diferenciadas alteran su genoma continuamente lo que le confiere a la célula algún tipo de ventaja en el crecimiento. En etapas posteriores, las células continúan cambiando su genoma y exhiben un fenotipo desdiferenciado acompañado frecuentemente de una baja expresión de marcadores epiteliales, lo que conlleva una pérdida de uniones intercelulares y de polaridad epitelial. A menudo estos cambios van acompañados de un incremento de la expresión de marcadores mesenquimales, así como de la movilidad de la célula, lo que le otorga mayor capacidad invasiva. Este proceso en el que la célula cambia su fenotipo diferenciado epitelial por un fenotipo mesenquimal es conocido como Transición Epitelio-Mesénquima (*EMT: Epithelial to mesenchymal transition* [6-8]). En 1980 Greenburg y Hay definieron la *EMT* como un programa celular que permite la transformación de una célula epitelial en una mesenquimal [8]. Subsiguientes estudios sobre *EMT* cambiaron el término transformación por transición.

I.2 Transición Epitelio-Mesénquima (EMT): Cuando las células epiteliales deciden convertirse en células mesenquimales.

Las células epiteliales y las mesenquimales difieren en varias características funcionales y fenotípicas. Las células epiteliales forman capas de células contiguas mediante estructuras de membrana especializadas como las uniones estrechas (*tight junctions*), las uniones adherentes (*adherens junctions*), los desmosomas y las uniones gap. Poseen polarización apicobasal, que se manifiesta mediante la distribución localizada de las moléculas de adhesión (cadherinas y ciertas integrinas), la organización polarizada del citoesqueleto y la presencia de una membrana basal o lámina basal. Las células epiteliales en condiciones normales ni se desenganchan ni migran, aunque tienen cierta capacidad motriz dentro de la capa epitelial [6]. En cultivo, las células epiteliales crecen en *clusters* de células que mantienen las adhesiones con las células vecinas. Presentan marcadores epiteliales como E-cadherina, desmoplaquina y citoqueratina.

En contraste, las células mesenquimales no forman capas organizadas, no poseen la misma polaridad apicobasolateral, ni la misma organización del citoesqueleto que las células epiteliales. Las adhesiones con las células mesenquimales vecinas son menos fuertes y no están asociadas a una lámina basal, lo que les permite una mayor capacidad migratoria. En cultivo, las células mesenquimales tienen forma de huso, con una morfología similar a los fibroblastos y tienden a ser motrices. Presentan expresión de marcadores mesenquimales como N-cadherina, filamentos intermedios (vimentina) y componentes de la matriz extracelular (MEC) como fibronectina [6, 9].

Por lo tanto, los tejidos mesenquimales son tejidos menos organizados y en muchos casos juegan un papel de soporte o de relleno, mientras que los tejidos epiteliales presentan una organización más compacta responsable de recubrir las diferentes cavidades del organismo y comportarse como una barrera que entre otras funciones protege, secreta y absorbe sustancias. Aunque el mantenimiento de la morfología epitelial es necesario para realizar las diferentes funciones celulares, numerosas observaciones demostraron cómo células epiteliales diferenciadas podían cambiar su fenotipo a través de la activación del programa *EMT*. Por lo tanto,

la *EMT* permite la conversión de células epiteliales en mesenquimales [10]. La **figura I.2** muestra los aspectos celulares que provoca este cambio en el fenotipo celular. Éstos se pueden englobar en tres grupos [11]: cambios morfológicos, cambios en los marcadores de diferenciación y cambios en la movilidad celular.

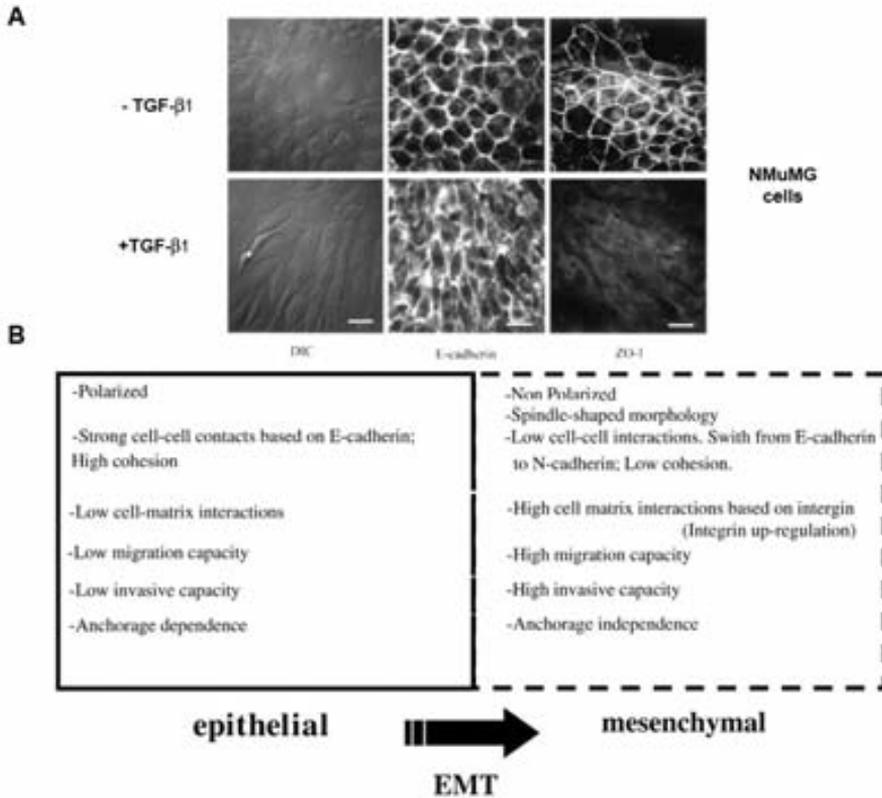


Figura I.2 Características de la EMT [12, 13]. **A** Imágenes obtenidas mediante DIC (Differential interference contrast) de la *EMT* producida por TGF- β 1 en células de epitelio mamario NMuMG. Se pueden observar cambios en la morfología celular y la alteración en marcadores epiteliales como E-cadherina y ZO-1. **B** La tabla resume las principales características que se modifican durante la *EMT*.

Así pues, se define como *EMT* al proceso biológico que permite que las células cambien de un fenotipo polarizado y epitelial a uno altamente motriz y fibroblastoide. Durante la *EMT* se producen alteraciones en la adhesión célula-célula, en las interacciones célula-sustrato, en la degradación de la matriz extracelular y en la reorganización del citoesqueleto [14]. La completa *EMT* se alcanza cuando tiene

lugar la degradación de la membrana basal y la formación de una célula mesenquimal que puede migrar.

Por lo tanto, la *EMT* engloba un amplio espectro de cambios moleculares, intercelulares e intracelulares. No siempre se pueden observar todos ellos durante una transición, por lo que en muchas ocasiones no se habla de una *EMT* completa sino de una *EMT-like* o *EMT* parcial. La adquisición de la habilidad de migrar e invadir la matriz extracelular como célula individual se considera una marca funcional del programa *EMT* [15].

I.2.1 Tipos de *EMT*.

La *EMT* se puede clasificar en tres subtipos diferentes dependiendo del contexto celular donde tienen lugar y del fenotipo de la célula resultante. Entre los tres subtipos existen diferencias funcionales las cuáles generan distintas consecuencias (figura I.3).

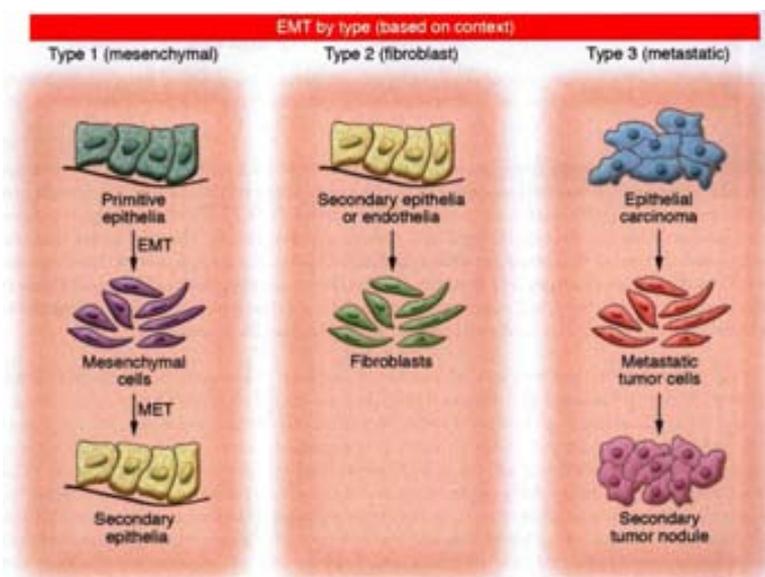


Figura I.3 Tres tipos de *EMT* [16]. **Tipo 1** se observa durante el desarrollo embrionario cuando las células epiteliales primarias padecen una transición a células mesenquimales produciendo el primer mesénquima el cual induce mediante el proceso contrario a la *EMT*, la *MET* (mesenchymal epithelial transition), un epitelio secundario. **Tipo 2** se observa cuando las células epiteliales adultas y/o células endoteliales, rellenan los espacios intersticiales con fibroblastos residentes o inducidos por inflamación. **Tipo 3** es parte del proceso de metástasis mediante el cual células epiteliales del tumor abandonan el tumor primario, migrando a un nuevo lugar generando un tumor secundario.

EMT tipo 1: EMT durante el desarrollo embrionario.

Este tipo de *EMT* tiene lugar durante la implantación del embrión en el útero, durante la gastrulación y durante la formación de la cresta neural en amniotas. Durante la implantación embrionaria ciertas células del área extraembrionaria padecen una *EMT* para infiltrarse en el endometrio y anclarse a la placenta [17]. En el mismo embrión la primera *EMT* ocurre durante la gastrulación y conlleva la formación de la tercera capa embrionaria, el mesodermo.

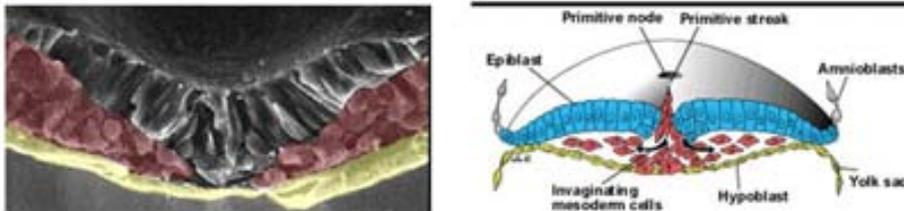


Figura I.4 Representación esquemática de EMT tipo 1. Las células con capacidad migratoria que derivan del epiblasto dan lugar al mesodermo y endodermo. Las células que restan en el epiblasto formarán el ectodermo. (http://www.med.unc.edu/embryo_images)

Como se muestra en la **figura I.4**, la inducción del mesodermo empieza en un área específica del ectodermo primitivo, la línea primitiva. El epiblasto (única capa epitelial en el embrión en el estadio de blástula, azul en la figura) se invagina. Este proceso se caracteriza por cambios drásticos en ciertas células epiteliales como la constricción de los compartimentos apicales, redistribución de los orgánulos y protusión de los compartimentos basales. Cuando estas células están listas para ingresar, la membrana basal se rompe localmente. En este punto, las células pierden las uniones fuertes entre ellas y se mantienen unidas mediante contactos focales. Seguidamente sufren una diferenciación mesenquimal y migran para dar lugar al mesodermo y al endodermo. La nueva habilidad de migrar marca la completa *EMT* durante la gastrulación [18], [19].

Otro ejemplo de *EMT* de tipo 1 durante la embriogénesis ocurre en la generación de la cresta neural (**figura I.5**). Ésta se compone de células precursoras con habilidad de migrar a distancias extraordinariamente lejanas del embrión [20]. Al igual que ocurre en la gastrulación, las células que provienen del neuroectodermo experimentan una *EMT*, pierden las uniones célula-célula e invaden la membrana basal para migrar lejos del tubo neural diferenciándose en tejido óseo, músculo liso,

neuronas periféricas, glia y melanocitos [20-22]. La *EMT* es un proceso transitorio y reversible ya que estas células mesenquimales reversionan a un fenotipo epitelial a través de un proceso opuesto a la *EMT*, la *MET* (*mesenchymal-epithelial transition*) como ocurre en la formación de los epitelios renal y ovárico [23].

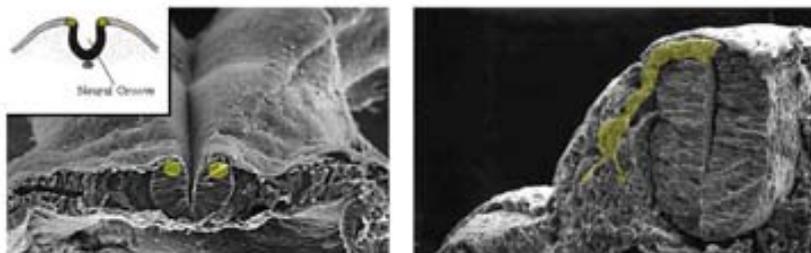


Figura 1.5 Formación y delaminación de las células de la cresta neural. A. Las células del borde del pliegue neural se muestran en amarillo, son las que formarán la cresta neural. **B** En amarillo se muestra la migración de las células de la cresta neural. (http://www.med.unc.edu/embryo_images)

El programa *EMT* tiene lugar en fases subsiguientes de la embriogénesis durante la formación de la válvula cardíaca, la fusión palatal y la formación del sistema nervioso periférico [24], evidenciando su importante papel durante el desarrollo embrionario.

***EMT* tipo 2: *EMT* asociada a la regeneración tisular y la fibrosis.**

La *EMT* de tipo 2, a diferencia de la de tipo 1, tiene lugar en el tejido adulto. En respuesta a señales inflamatorias o daño tisular, las células epiteliales experimentan una *EMT* produciendo fibroblastos que permiten realizar el proceso fibrótico en los órganos dañados [25]. Estos fibroblastos liberan una gran variedad de señales inflamatorias, como el TGF- β [26] y componentes de MEC (matriz extracelular) como colágenos, lamininas y elastina (**figura 1.6**)

La mayoría de las pruebas provienen de estudios en ratones portadores de genes reporteros controlados por promotores epiteliales. El comportamiento de estos reporteros evidenció que las células epiteliales, vía *EMT*, eran precursoras de fibroblastos que participaban en la fibrosis [27]. Los fibroblastos no son especialmente abundantes en los riñones pero cuando se produce daño tisular, el 36% de los fibroblastos provienen de *EMT* locales, entre el 14-15% provienen de la médula ósea y el resto por proliferación local [25, 28, 29]. También existen

evidencias de que la *EMT* contribuye a la fibrosis en pulmón [30], [31], [32] y en hígado [25] .

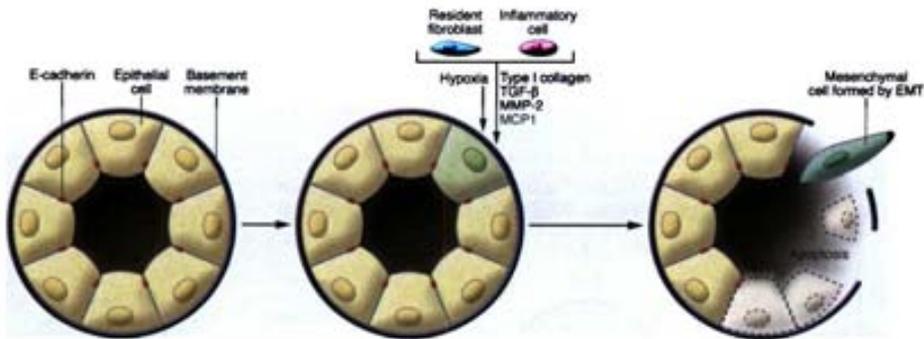


Figura I.6 EMT y fibrosis [10]. La *EMT* de tipo 2 está asociada a la inflamación y a la generación de moléculas por parte de células inflamatorias y, a fibroblastos activados residentes (miofibroblastos). Estas moléculas causan la disrupción de la capa epitelial por degradación de la membrana basal. Las células epiteliales pierden su polaridad y padecen una *EMT* o, mueren por apoptosis.

Durante el proceso de curación de heridas (*Wound Healing*), algunas células alrededor de la herida, gracias a la *EMT*, restauran la arquitectura original del tejido [33]. Por ejemplo, después de daño en la piel, los queratinocitos epidérmicos a lo largo de los límites de la herida sufren un proceso similar a la *EMT* antes de migrar al lugar del daño [33], [34]. Estos queratinocitos en los bordes de la herida pierden sus contactos célula-célula, célula-sustrato, inician la secreción de enzimas que degradan la matriz y reorganizan el citoesqueleto, lo que les permite invadir el tejido conectivo subyacente y migrar hasta la herida, participando en la re-epitelización del tejido.

La mayoría de los mecanismos que gobiernan la curación de heridas guardan analogías con el proceso de invasión tumoral que ocurre durante la primera fase de la metástasis por ello, ciertos autores, como se recoge en [34], han denominado a los tumores como "heridas que no curan".

EMT tipo 3: EMT asociada con la progresión tumoral y metástasis.

La excesiva proliferación de células epiteliales y la angiogénesis son marcadores de la iniciación y crecimiento de un carcinoma primario [1]. La adquisición de capacidad invasiva se manifiesta inicialmente por la degradación de la membrana basal, lo que permite la diseminación metastásica con fatales consecuencias para la vida humana. La activación del programa *EMT* se ha propuesto como mecanismo crítico para la adquisición del fenotipo maligno por células epiteliales cancerosas [35]. Estas células que padecen la *EMT* se encuentran en el frente invasivo de tumores primarios, expresan marcadores mesenquimales y son capaces de intravasarse, de ser transportadas a través de la circulación, de extravasarse, y de formar micrometástasis o macrometástasis (figura I.7).

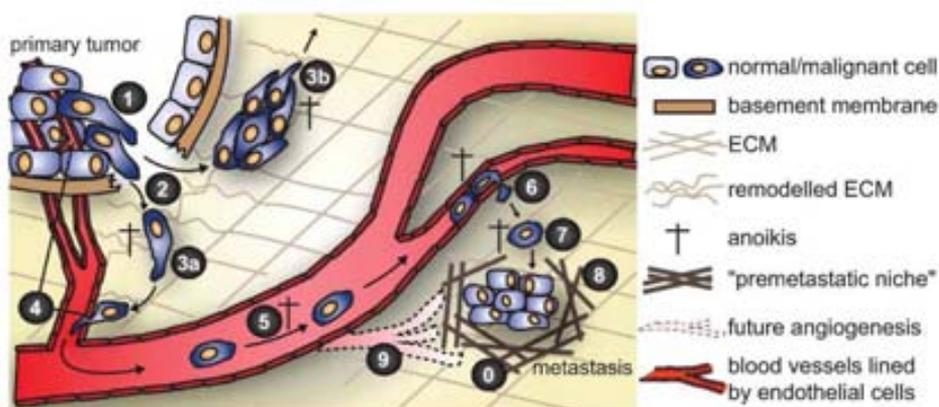


Figura I.7 Contribución de la EMT a la progresión de un tumor [36]. La progresión desde un epitelio normal a un carcinoma invasivo pasa por muchos estadios. 1) Células epiteliales del tumor primario padecen *EMT* y adquieren propiedades invasivas. 2) Degradación de la membrana basal y cambios en la composición de la MEC que facilitan la invasión. 3) Las células tumorales invaden el tejido subyacente individualmente [37] (3a) o colectivamente [38] (3b). 4) las células entran en los vasos del tumor o cercanos al tumor. 5) Las células tumorales son transportadas por la circulación llegando a capilares donde se produce la extravasación (6). 7) las células tumorales pueden permanecer latentes durante años. 8) Algunas veces, algunas células diseminadas crecen formando un tumor secundario requiriendo una *MET* y angiogénesis (9). Las células fuera del tumor pueden padecer anóikis en diferentes estadios de la cascada (se indica por una cruz). No todos los pasos ocurren necesariamente de una manera lineal por ejemplo, tumores premalignos pueden vascularizarse en el lugar de formación del tumor primario ya que, las células tumorales no están sometidas a tanto estrés alargándose así el tiempo de la inducción metastásica.

Aunque hoy en día, observaciones tanto *in vitro* como *in vivo* demuestran el papel de la *EMT* en los primeros pasos de la cascada metastásica [39, 40], durante muchos años fue difícil relacionarla cómo un mecanismo potencial en la progresión de un carcinoma. Dos de las principales razones fueron que la *EMT* no se puede seguir ni en el espacio ni en el tiempo [35], y porque las metástasis son similares histológicamente a los tumores primarios [41]. La similitud histológica entre las metástasis y los tumores primarios puede interpretarse como una *EMT* reversible, la cual permitiría en primera instancia la migración y diseminación hacia diferentes órganos; una vez allí, la células que han padecido una *EMT* activarían el programa opuesto, la *MET*, el cual les permitiría establecer colonias secundarias retomando la morfología epitelial, adquiriendo de nuevo la habilidad de crecer y proliferar [42], [43], [37].

La hipótesis de que las células de un tumor pasan a través de una *EMT* parcial se refuerza por el hecho de encontrar, durante la progresión del tumor, células que expresan tanto marcadores epiteliales como marcadores mesenquimales, lo que hace aparecer células con fenotipos intermedios (**figura I.8**)

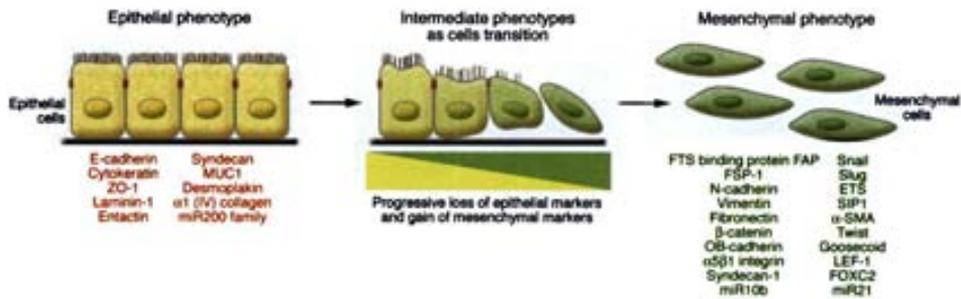


Figura I.8 Durante la progresión de un tumor existe gran heterogeneidad tanto morfológica como molecular [10]. En la figura aparecen los marcadores epiteliales (en rojo) y los mesenquimales (verde) utilizados para describir la *EMT*.

EMT y Cancer Stem Cell.

Estudios recientes en tejidos neoplásicos han evidenciado la existencia de células cancerosas con propiedades *stem cell*, las llamadas *cancer stem cell* (CSC) células con capacidad de renovarse y de establecer nuevos tumores [44]. Las CSC se descubrieron inicialmente en el sistema hematopoyético [45]. Actualmente se ha detectado la existencia de CSC en tumores sólidos de mama [46] , colon [47], [48] y cerebro [49].

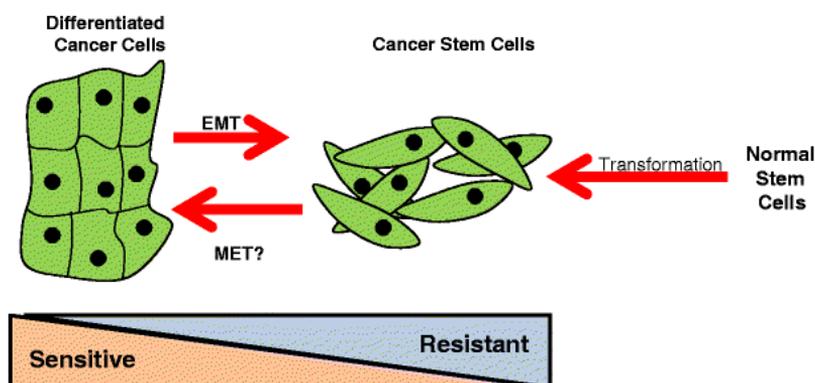


Figura I.9 La transformación de stem cells normales o la inducción del programa *EMT* en células diferenciadas tumorales podría generar CSC [50].

El programa de *EMT* se relaciona con el perfil descrito por varios autores para las *stem cells*, ya que la detección de fenotipos intermedios durante la progresión de un tumor [10], [21] concuerda con un perfil típico de *stem cell* [50]. Además, recientes investigaciones en tejido mamario han demostrado que el programa *EMT* dota a las células epiteliales normales y a las células transformadas de propiedades características de *stem cell*, como la capacidad de autorrenovarse (generación de mamosferas) y la de iniciar tumores (**figura I.9**) [50]. Incluso, *stem cells* normales y transformadas de epitelio mamario que muestran los marcadores de superficie de CSC muestran múltiples características relacionadas con una transición mesenquimal como la expresión de marcadores mesenquimales como vimentina y fibronectina, e incremento de la expresión de varios de los factores de transcripción que inducen la *EMT*. De acuerdo con los datos encontrados en células epiteliales de mama, la

diferenciación de células *stem cell* embrionarias humanas también esta asociada a todos los cambios que ocurren durante la *EMT* [51].

Algunos estudios sugieren que las CSC pueden dividirse en dos tipos: las estacionarias (*SCS*) y las migradoras (*MCS*) [52]. Las *SCS* permanecerían activas en el epitelio para reparar lesiones y persistirían en áreas diferenciadas durante la progresión de un tumor, pero no podrían migrar. Sin embargo, las *MCS* derivarían de las *SCS* a través de la adquisición de una *EMT* transitoria. Como consecuencia podrían migrar y al conservar sus habilidades de *stem cell* podrían formar metástasis. Esta relación entre *EMT* y *stem cell* indica que la *EMT* puede facilitar la generación de células tumorales con características mesenquimales necesarias para la diseminación y, con las propiedades de autorrenovación necesarias para la iniciación de tumores secundarios (**figura I.9**) [53].

Así pues, la inducción de la *EMT* en células epiteliales normales y tumorales de mama y de colon genera células *stem-like-cell*, lo que sugiere un papel activo de la *EMT* generando CSC en estos tumores [50].

I.2.2 Regulación transcripcional de la *EMT*.

Un número elevado de procesos moleculares cooperan en la iniciación y en la finalización de la *EMT*. Entre ellos se encuentran: (1) la activación de factores de transcripción, (2) la expresión de proteínas específicas de superficie, (3) la reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto, (4) la producción de enzimas que degradan la MEC y (5) los cambios en la expresión de miRNAs [10]. En la **figura I.10** se muestran la mayoría de los marcadores responsables de estos cambios durante la *EMT* [54].

Un paso clave en la *EMT* es la reducción de la adhesión célula-célula mediante la represión transcripcional de las cadherinas componentes de las uniones adherentes, ocludina y claudina componentes de las uniones estrechas y desmoplaquina componente de los *desmosomas* [54].

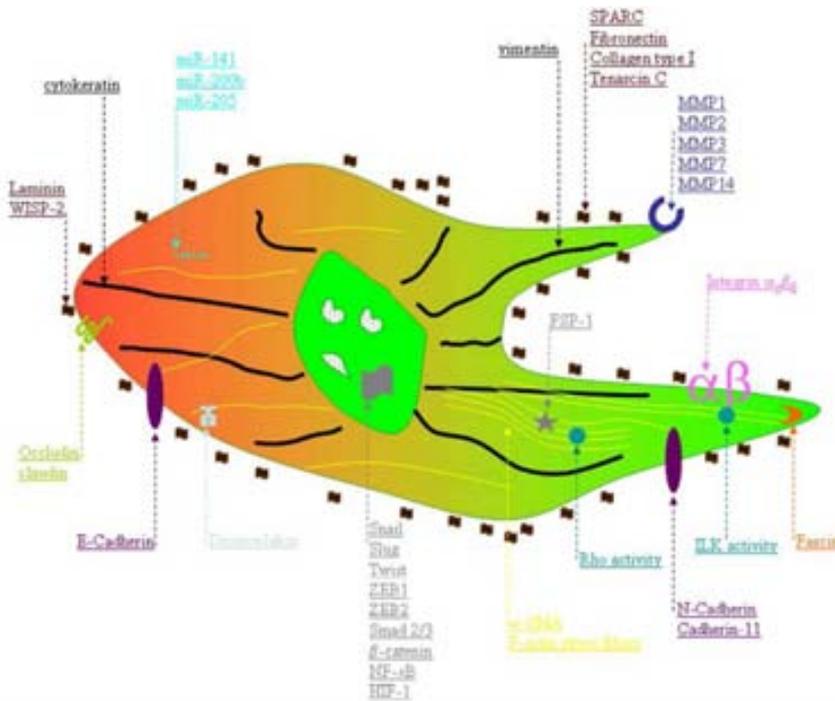


Figura 1.10 Representación esquemática de los marcadores de la EMT [54]. Los factores que aumentan su expresión como cambios en el citoesqueleto y aparición de marcadores mesenquimales se representan en el lado verde de la célula, y los marcadores reprimidos se representan en el lado rojo de la célula.

La β -catenina, proteína de la familia armadillo, forma parte de las uniones adherentes. Cuando éstas se deshacen transloca al núcleo donde funciona como cofactor de los miembros de la familia de factores de transcripción Tcf [55], [56] (T-cell factor)/Lef, los cuáles activan la transcripción de genes que potencian la proliferación celular como c-myc [57]. Los filamentos de F-actina del citoesqueleto son reemplazados por una red de fibras de estrés regulada por Rho-GTPasa donde se unen componentes de la MEC incluyendo integrinas $\alpha_5\beta_1$, fascina e ILK [58], [59], [60]. Estos cambios son suficientes para que las células puedan separarse, pierdan la polaridad apico-basal y adquieran un fenotipo en forma de huso, dichos cambios facilitan la migración de la célula [23], [21]. La expresión de los filamentos intermedios también cambia durante la EMT con la sustitución de la citoqueratina de las células epiteliales [61] por la vimentina típica de células mesenquimales [62]. Las

metaloproteasas como las MMP-1,-2,-3,-7 y -14 aumentan frecuentemente durante la *EMT* participando, seguramente, en la pérdida de las uniones célula-célula y en la degradación de la membrana basal [63, 64]. La composición de la MEC también cambia apareciendo proteínas más intersticiales como colágeno de tipo I, fibronectina y tenascina [65].

Otro mecanismo característico de las células que han experimentado una *EMT* es la capacidad de sobrevivir en ausencia de los componentes normales de la MEC. Varios de los factores transcripcionales que regulan la *EMT* inhiben la apoptosis mediante la activación de vías como las MAPK y la PI3K. Estos factores proporcionan ventajas selectivas las cuáles son esenciales para que las células invasivas se diseminen y formen metástasis [66-68].

Regulación transcripcional de la E-cadherina.

Una marca característica de la *EMT* es la inactivación de la E-cadherina [35], [69]. La E-cadherina es el principal componente de las uniones adherentes. Se expresa tempranamente en células embrionarias durante la fase de mórula donde su papel es indispensable para la compactación celular [70]. La importancia de su función se pone de manifiesto en ratones *knockout* de E-cadherina. Estos ratones mueren en estadios muy tempranos del desarrollo [71]. También se expresa posteriormente al desarrollo embrionario, donde su expresión y su función es esencial para la inducción y el mantenimiento de la polaridad celular [72]. Esta capacidad de la E-cadherina de mantener la adhesión entre las células es lo que le otorga la capacidad de actuar como gen supresor de tumores. Además, la alteración de la expresión de la E-cadherina es suficiente para desencadenar una *EMT* [69], [73] y en algunos sistemas es necesaria su represión para que el tumor sea invasivo [74], [75]. Por el contrario, forzando la expresión de la E-cadherina en ciertos carcinomas invasivos se inhibe la capacidad de invadir y de hacer metástasis; inversamente, el bloqueo de la función de la E-cadherina en tumores no invasivos activa su capacidad metastásica [76]. En una gran variedad de cánceres humanos, la pérdida de la E-cadherina se relaciona con peor pronóstico, progresión tumoral y metástasis [77], [78], lo que implica que su regulación es clave en la diseminación de un tumor.

Durante la progresión tumoral E-cadherina puede ser inactivada funcionalmente o silenciada mediante diferentes mecanismos [79]. Además del control post-transcripcional [80], existen mutaciones somáticas (frecuentes en cáncer de mama lobular) y represión del gen de la E-cadherina (*CDH1*) mediante hipermetilación y deacetilación del promotor o/y por la unión de represores transcripcionales [79, 81, 82] (figura I.11).

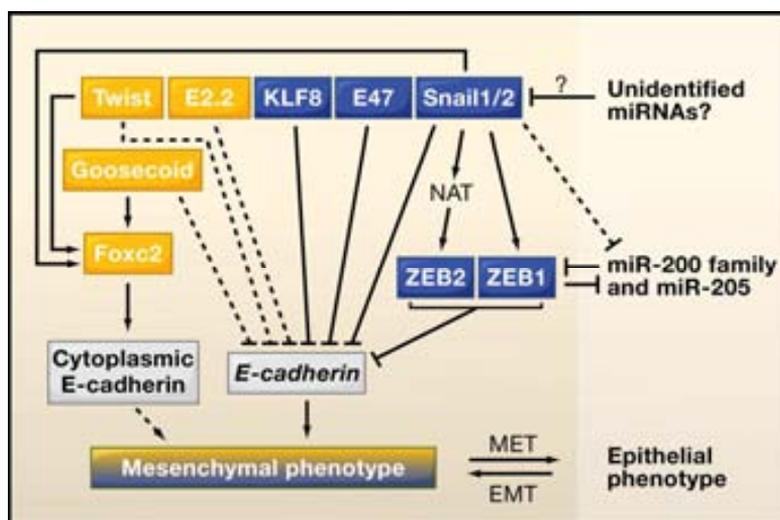


Figura I.11 Esquema representativo de la regulación de la expresión de la E-cadherina durante la *EMT* [83].

Mediante el análisis sobre el promotor proximal de la E-cadherina de ratón se identificaron las cajas E, secuencias cortas de seis nucleótidos (-CACCTG- o -CAGGTG-), las cuales determinan la expresión específica en células epiteliales. La inactivación de estas secuencias activa la transcripción de la E-cadherina en células mesenquimales, lo que indica la existencia de represores que silencian la expresión de esta proteína en células no epiteliales [84]. Los primeros represores identificados fueron los factores de transcripción con dominios *Zinc fingers* Snail1 (Snail)/ y Snail2 (Slug) [85-87] y los factores de transcripción Zeb1 "*Zinc finger E-box binding homeobox*" (Δ EF1 o ZFH1A) [88] y Zeb2 (SIP1 "*Smad interacting protein*"/ZFH1B) [89] todos capaces de unirse a las cajas E del promotor de la E-cadherina. Otros represores potentes incluyen los factores de transcripción *basic helix-loop-helix* E12/E47 (TCF3) [90] y Twist [91]. Estos represores reprimen activamente la E-

cadherina mediante el reclutamiento de corepresores o, como en el caso de Twist, activando la expresión de otros represores de la E-cadherina.

Estos factores de transcripción también actúan durante el desarrollo embrionario [92-95]. Además, la sobreexpresión de estos factores en células epiteliales no sólo resulta en la represión de la E-cadherina sino en la reprogramación de la célula a un estado mesenquimal. Durante la *EMT* estos represores también reprimen otras moléculas de las uniones adherentes [6] e inducen características mesenquimales de una manera coordinada [86, 96]. La expresión de Snail1 induce la expresión de fibronectina o de vitronectina [97]. En el caso de Twist, este regulador de la *EMT* induce la expresión de la quinasa Akt2, un efector de PI3K y un regulador importante de las vías de supervivencia durante la *EMT* [98].

Recientemente se han identificado *small non-coding* RNA, llamados microRNAs o miRNAs, como reguladores de la *EMT* los cuales inhiben la expresión génica a nivel post-transcripcional disminuyendo la estabilidad de mRNAs diana mediante la unión a su extremo 3' UTR. Esta inhibición de la traducción se acompaña de una reducción en la estabilidad de los mRNAs diana. Concretamente las familias de los miR-200 y miR205 controlan la expresión de Zeb1 y de Zeb2 por lo tanto indirectamente controlan la expresión de la E-cadherina [99, 100].

1.2.3 Diferentes vías de señalización activan estímulos que desencadenan la *EMT*.

El microambiente de un tumor compuesto por factores solubles y componentes de la MEC juega un papel importante en la inducción de la *EMT* y la metástasis. Además, la interacción de las células tumorales con el microambiente local induce la secreción autocrina o paracrina de factores de crecimiento, citoquinas y componentes de la MEC, que pueden desencadenar el programa molecular de la *EMT* y evidenciar su dinamismo [14, 101, 102].

Durante los últimos años se han asociado un gran número de vías de señalización y factores de crecimiento con la *EMT* como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) vía JAK quinasa [103], el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) vía ERK/MAPK [104-107] y el factor de crecimiento hepático (HGF) [107, 108]. La

figura I.12 muestra las vías de señalización más representativas involucradas en la *EMT* y sus interrelaciones, de una manera resumida.

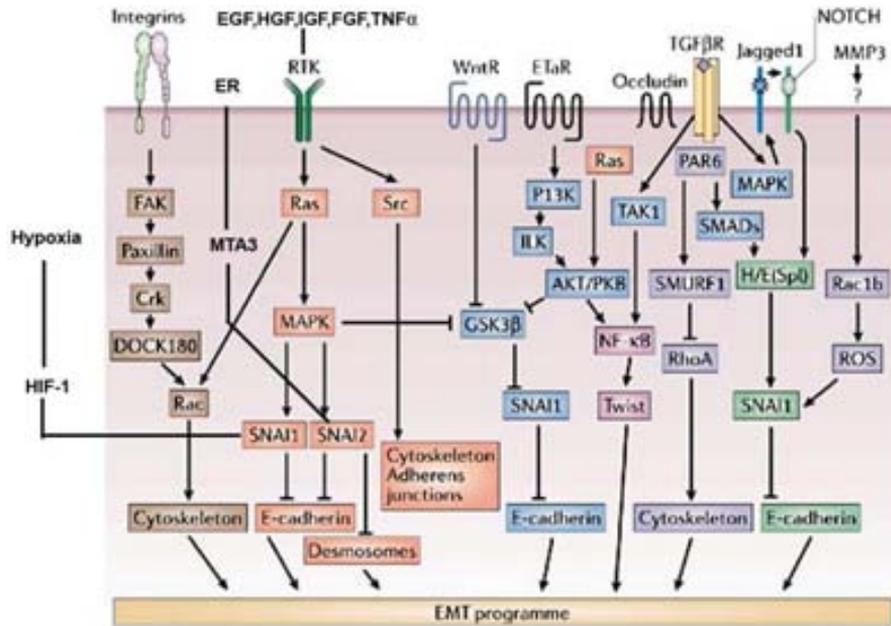


Figura I.12 Red molecular representativa que regula la *EMT* [6].

La vía **Wnt/β-catenina** está íntimamente relacionada con la *EMT* [109]. Cuando Wnt se une a los receptores Frizzled y LRP5/6 inactiva GSK3β, lo que resulta en la estabilización y acumulación nuclear de β-catenina, que activa la transcripción de genes como c-myc, ciclina D y survivina [110]. Además, la translocación nuclear de β-catenina activa la expresión de Slug promoviendo la *EMT*. Como se explica en el apartado **I.3**, Wnt al suprimir la actividad de GSK3β, unida al complejo de degradación, estabiliza a otro regulador central de la *EMT*, Snail1 [111, 112].

TGF-β es otro potente inductor de la *EMT*. Contribuye a la *EMT* tanto en el desarrollo embrionario como durante la progresión tumoral [113]. Las señales activadas por este factor inhiben proteínas epiteliales como E-cadherina, ZO-1 y queratinas. Además, también activan la expresión de proteínas mesenquimales como la fibronectina y la vimentina. TGF-β actúa a través de las proteínas Smad, de la vía de ERK y de la vía PI3K [102, 114]. También coopera con numerosas quinasas como RAS, MAPK, p38 MAPK en la activación de la *EMT* [115].

La disociación de las uniones célula-célula durante la *EMT* obliga a las células a regular las uniones con la MEC a través de las **integrinas**. Se han observado conexiones entre diferentes vías que activan la *EMT* y las integrinas. Por ejemplo, la *EMT* inducida por TGF- β requiere de la señalización vía integrina β_1 . Estudios recientes han evidenciado una interrelación entre E-cadherina e integrinas que coordina el cambio entre ellas durante la *EMT*. La represión de la E-cadherina activa la GTPasa Rap1 la cual regula la activación citoplasmática de las integrinas necesaria para la activación de las adhesiones focales [116]. De igual manera, a través de la activación de la ILK, las integrinas pueden causar la represión de la E-cadherina [117].

Los ligandos de la **vía Hh**, Sonic (Shh), Desert (Dhh) y Indian (IHH) en vertebrados y Hh en *Drosophila*, son proteínas secretadas que sufren modificaciones post-traduccionales para ser activas completamente. Los efectores más significativos de esta vía son los factores de transcripción Gli1-3 (*zinc fingers proteins*). Aunque no se muestra en la figura, esta vía también está implicada en la inducción de la *EMT*. En células epidérmicas de ratón o de riñón inmortalizadas, Gli1 induce la rápida expresión de Snail1 promoviendo la *EMT* [118]. El bloqueo de esta vía en cáncer de páncreas bloquea la invasión inhibiendo la *EMT* [119].

Otra de las vías que parece estar implicada en la inducción de la *EMT* es la activada por **Notch**. Notch después de ser activado transloca al núcleo y activa la transcripción génica mediante la asociación con MAM y p300/CBP. Se observó que la vía de Notch también contribuía a la *EMT* durante la formación de la válvula cardíaca en el desarrollo [120]. La sobreexpresión de Jagged1 (ligando) y de Notch1 induce la expresión de Slug y correlaciona con peor pronóstico en varios cánceres humanos [121]. La expresión de Slug es esencial para la *EMT* inducida por Notch, la cual se caracteriza por represión de la E-cadherina, acumulación nuclear de β -catenina y resistencia a la anoikis. Además, Notch activa dos mecanismos distintos que actúan sinérgicamente controlando la expresión de Snail1. En primer lugar, Notch activa directamente la expresión de Snail1 uniendo su dominio intracelular al promotor de Snail1. Además, potencia al factor HIF- α reclutándolo al promotor de la lisina oxidasa LOX activándola, lo cual se traduce en una estabilización a nivel de proteína de Snail1 [122]. Por lo tanto, la vía de señalización activada por Notch

participa en la *EMT* inducida por **hipoxia**, para aumentar la movilidad y la invasividad de las células tumorales.

NF-κB es otro importante regulador de la *EMT*. En modelos de cáncer de mama, NF-κB es importante para la protección contra la apoptosis, la inducción y mantenimiento de la *EMT* y para la metástasis [123]. Existen datos que sugieren que la inducción de la *EMT* tanto por Ras como por TGF-β y parte de la activación génica específica de la *EMT* es mediada por la actividad transcripcional dependiente de NF-κB [124]. Entre los genes activados por NF-κB se encuentran los represores de la E-cadherina Snail1 y Twist [14, 125, 126].

Estudios recientes evidencian la cooperación entre las vías estimuladas por TGF-β, Notch, Wnt y NF-κB en la inducción de la *EMT* [113, 127].

Además, de estos estímulos extrínsecos existen otros intrínsecos como por ejemplo mutaciones en moléculas transductoras de señales. Existe la idea de que aunque haya factores como el TGF-β que son capaces de inducir la *EMT* en células normales epiteliales, estos factores necesitarían de un ambiente genético concreto para mantener activado el programa génico de la *EMT*. Así, el receptor de TGF-β se encuentra mutado en muchos cánceres humanos [128]. Por lo tanto, el *background* genético que presenta una célula juega un papel importante dentro de los mecanismos que regulan la *EMT*.

Por lo tanto, la *EMT* es un proceso dinámico que abarca muchos factores extrínsecos e intrínsecos. La complejidad de las vías transductoras es tan amplia que es preferible hablar de red reguladora de la *EMT*.

I.3 El factor de transcripción Snail1.

Como se puede observar en la **figura 1.12** la mayoría de las vías que regulan la *EMT* convergen en los factores de transcripción de la superfamilia Snail.

I.3.1 La superfamilia de los factores de transcripción Snail.

Los genes snail codifican factores de transcripción con un dominio de unión al DNA del tipo dedos de zinc [129]. Todos los miembros de la superfamilia Snail presentan una estructura conservada. Se componen de una región C-terminal que contiene de cuatro a seis dedos de zinc del tipo C₂H₂ [130] y una región N-terminal bastante divergente. El tercer y cuarto dedo de zinc muestra una secuencia consenso para todos los miembros de la superfamilia Snail. Si se comparan las secuencias correspondientes a la región del segundo y quinto dedo de zinc la superfamilia Snail se puede dividir en dos grupos independientes pero relacionados: la familia Snail y la familia Scratch (**figura 1.13**). A su vez, en los animales vertebrados, la familia Snail1 se divide en dos subfamilias: Snail1 (Snail) y Snail2 (Slug).

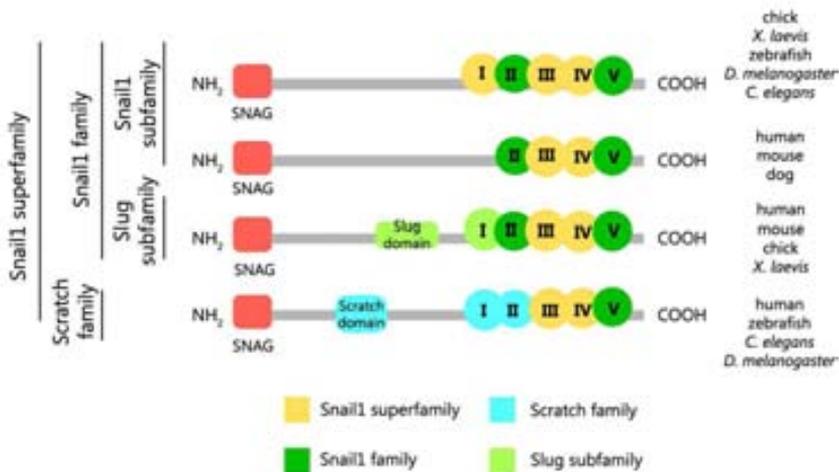


Figura 1.13 La superfamilia Snail1 adaptada de [131]. En amarillo se muestran los dominios específicos que definen la superfamilia de Snail encontrados en vertebrados. El color verde oscuro muestra la familia Snail, el azul la familia Scratch y el verde claro la subfamilia Slug. El dominio SNAG y el tercer y cuarto dedo de zinc está conservado en todas los vertebrados (en *D. melanogaster* y *C.elegans* en lugar del dominio SNAG tienen un dominio de unión a CtBP). La familia Scratch se identifica por el dominio Scratch y el primer dedo de zinc. La subfamilia Slug se identifica por el dominio Slug y por la secuencia del primer dedo de zinc. En mamíferos la proteína Snail1 ha perdido el primer dedo de zinc.

La aparición de estas dos familias sería consecuencia de la duplicación de un putativo gen snail al inicio de la aparición de los metazoos. Subsecuentes duplicaciones independientes en protóstomos y deuteróstomos parece haber originado la situación actual [131, 132].

Recientemente se ha descrito en vertebrados un tercer miembro de la familia Snail, el llamado Snail3 (Smuc) [133]. Éste diverge de los otros miembros en el dominio N-terminal pero sus dominios y residuos lo identifican claramente como un miembro de la familia Snail. De los tres miembros en vertebrados, los funcionalmente equivalentes Snail1 y Snail2 intervienen en la *EMT*. De hecho, todos los eventos relacionados con *EMT* que tienen lugar durante el desarrollo embrionario y, también en la fibrosis y el cáncer están asociados a la activación de los genes snail [97].

I.3.2 El factor de transcripción Snail1.

Snail1 fue el primer represor descrito de la superfamilia Snail. Se identificó en *Drosophila* como un factor de transcripción esencial para la formación del mesodermo [134]. Snail1 tiene un papel central en la morfogénesis [85, 135]. Desde insectos hasta mamíferos, Snail1 es necesario para la formación del mesodermo y de la cresta neural. La ausencia de Snail1 en embriones de ratón causa la muerte en estadios tempranos del desarrollo por no completar la gastrulación por una deficiente *EMT* [136]. La *EMT* inducida por Snail1 convierte las células epiteliales en células mesenquimales con propiedades migratorias que contribuyen a la formación de varios tejidos durante el desarrollo embrionario y en la adquisición de propiedades invasivas en tumores epiteliales [97]. La expresión de Snail1 reprime la E-cadherina e induce una completa *EMT* en células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) y en líneas celulares de cáncer de mama [85, 86]. En el mismo sentido, la inducción de la *EMT* correlaciona con la inducción de Snail1 [96, 137]. Snail1 se expresa en las células invasivas en tumores de piel de ratones [86], en las biopsias de pacientes con carcinoma de mama [138], cáncer gástrico [139] y carcinomas hepáticos [140]. Además, se expresa en las células del estroma que forman parte del microambiente del tumor [141], aparece como un marcador temprano del fenotipo maligno y se comporta como un factor de pronóstico [138]. Por lo tanto, Snail1

juega un papel fundamental durante la *EMT* que tiene lugar en el desarrollo embrionario [134], en la metástasis y recientemente en la fibrosis [142].

Regulación a nivel proteína.

Snail1 es una proteína de 264 aminoácidos compuesta por dos dominios diferenciados que interactúan el uno con el otro [143]: el dominio N-terminal (1-151) y el dominio C-terminal (152-264) (**figura I.14**).

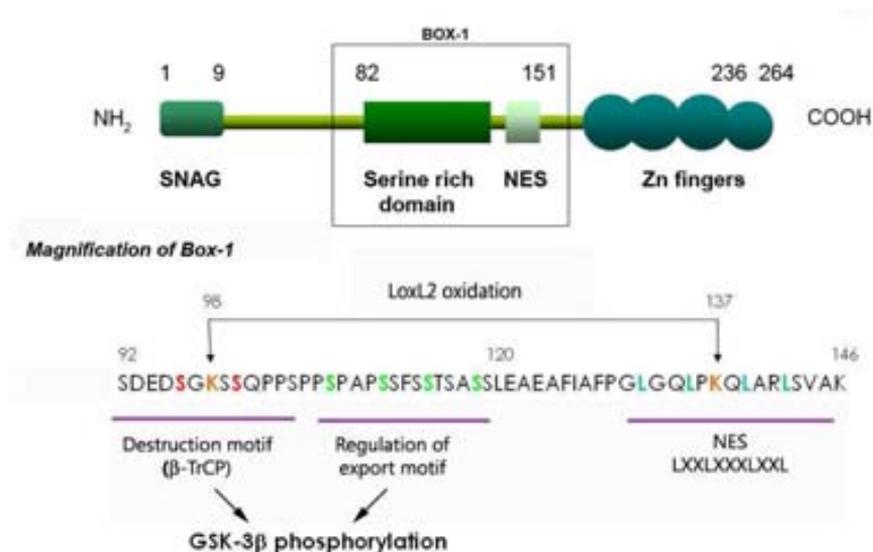


Figura I.14 Esquema de la estructura de Snail1 en mamíferos. La región N-terminal comprende los aminoácidos 1-151 y contiene el dominio SNAG necesario para la actividad represora de Snail1. En esta región también se encuentra el dominio rico en serinas involucrado en la regulación de la localización y estabilidad de la proteína y una secuencia de exporte nuclear (NES). En la región C-terminal encontramos los cuatro dedos de zinc. Los elementos reguladores de la Box-1 se magnifican detallando las fosforilaciones de GSK3β y la supuesta oxidación de la LOXL2.

El dominio C-terminal contiene cuatro dedos de zinc del tipo C_2H_2 y funciona como dominio de unión al DNA. Los dedos se estructuran por dos cadenas en lamina-β seguidas de una α-hélice, la parte aminoterminal de la cual se une al surco mayor del DNA. Las dos cisteínas e histidinas coordinan la unión con el átomo de zinc. El último dedo de zinc no contiene la secuencia conservada C_2H_2 presente en los otros dedos de zinc [143]. En el dominio N-terminal se encuentra el dominio SNAG (Snail/Gfi) [144]. Este dominio está conservado en todos los genes snail de vertebrados y es necesario para la actividad represora de Snail1 [85].

La alineación del dominio N-terminal de diferentes homólogos de Snail1 mostró, a excepción del dominio SNAG, que la secuencia más conservada era la comprendida entre los aminoácidos 82-151. En este subdominio se encuentra una señal de exporte nuclear (NES) precedida de una secuencia rica en serinas.

La mayoría de datos muestran una correlación inversa entre la expresión de la E-cadherina y la de Snail1 [145]. Aún así, en ciertas líneas celulares tumorales ambos mRNA pueden coexistir [146]. Este dato planteó la posibilidad de que existiera una regulación post-transcripcional de Snail1. Se observó que la fosforilación del motivo rico en serinas hacía menos eficiente a Snail1 como represor, ya que la fosforilación de esta secuencia hacía accesible la NES (secuencia rica en leucinas) al transportador nuclear CRM1 facilitando el exporte de Snail1 fuera del núcleo [143]. Hoy en día se sabe que la quinasa responsable de las fosforilaciones en la secuencia rica en serinas de Snail1 es la GSK3 β [147]. GSK3 β fosforila a Snail1 en dos motivos dentro de la secuencia rica en serinas (**figura I.14**). Uno de los motivos se encuentra cerca de la NES, la fosforilación en cuatro serinas de esta región controla la localización subcelular de Snail1 provocando la salida de Snail1 del núcleo. El otro motivo coincide con una caja de destrucción reconocida por la ubiquitin ligasa β -Trcp, la fosforilación de éste en dos serinas provoca la ubiquitinización y posterior degradación vía proteosoma de Snail1. Recientemente, los mismos autores que describieron la regulación dual (tanto a nivel proteína como a nivel transcripcional [125]) de Snail1 por GSK3 β , han descrito la existencia de una *small C-terminal domain phosphatase* (SCP), la cual regula la defosforilación y por lo tanto la estabilidad de Snail1 mediante interacción directa en el núcleo [148]. Un trabajo publicado hace poco por nuestro grupo demuestra como existe un control de la estabilidad proteica de Snail1 independiente de fosforilación y por tanto independiente de GSK3 β . Este nuevo mecanismo de regulación de la estabilidad de Snail1, relevante durante la *EMT* inducida por hipoxia, requiere la actividad de la ubiquitin ligasa Fblx14 la cual promueve la ubiquitización y degradación a través del proteosoma de Snail1 [149].

Las lisinas K98 y K137 son importantes para la función represora y la estabilidad de Snail1. Se ha descrito que la oxidación de estas lisinas por la lysil-oxidase-like-2 (LOXL2) provoca cambios en la conformación de Snail1 que enmascaran la secuencia

de fosforilación por GSK3 β y por lo tanto estabiliza a Snail1 [150]. Además estas lisinas junto a la lisina K146 son importantes para la estabilidad de Snail1 controlada por Fbxl14 [149].

El dominio C-terminal no sólo es importante para la localización celular de Snail1 (unión al DNA) sino también por ser fosforilado por la quinasa Pak-1 en la S246. Dicha fosforilación retiene a Snail1 en el núcleo y por lo tanto favorece su actividad [151]. Igualmente, se han descrito nuevas fosforilaciones en el dominio N-terminal de Snail1 que también afectan a la estabilidad y a la funcionalidad de este factor de transcripción como la fosforilación de la S11 y de la S92 [152].

Recientemente, también se han descrito otros mecanismos de regulación post-transcripcional de Snail1 independiente del mecanismo de control por GSK3 β . Es el caso de YP1, un nuevo inductor de la *EMT*, el cual induciría la expresión de Snail1 mediante la activación de la traducción CAP-independiente del mRNA de dicho factor de transcripción [153] y, la estabilización de Snail1 mediada por TNF α /NF κ B y COP9 signalosoma 2 durante la inflamación [154].

I.3.3 Funciones moleculares de Snail1.

A través de experimentos de transfección con diferentes promotores, se identificó la secuencia consenso de unión al DNA de los diferentes genes snail como la secuencia de seis nucleótidos –CAGGTG– [129]. Este motivo se llama caja E (*E-box*) y es idéntico al que se unen los factores de transcripción del tipo bHLH, y al que se encuentra en el promotor de la E-cadherina. Mediante su unión a las cajas E, Snail1 actúa como represor transcripcional. Los efectos represores de Snail1 requieren tanto el dominio C-terminal de unión al DNA como el dominio SNAG presente en el N-terminal.

Existen varias evidencias de que Snail1 bloquea la expresión de la E-cadherina mediante unión directa (reclutando complejos represores a las cajas E presentes en su promotor (*CDH1*)) e indirectamente activando la expresión de otros represores como Zeb1 y Zeb2 [155, 156]. Como muestra la **figura I.15** existen tres cajas E en el promotor *CDH1*. Las tres controlan la expresión de la E-cadherina [79].

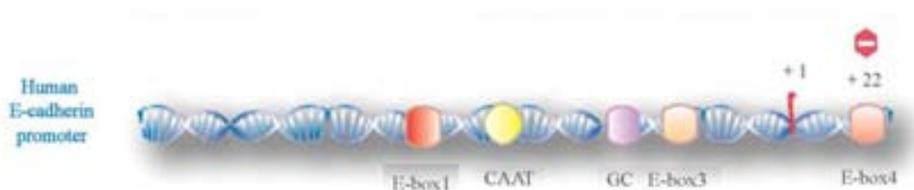


Figura I.15 Representación esquemática del promotor proximal de la E-cadherina humano [79]. Se muestran las tres *E-boxes*. La *E-box 2* no aparece porque no se conserva comparando el promotor humano con el promotor de la E-cadherina en ratón donde se describió por primera vez este promotor [157].

La expresión de Snail1 se asocia con una disminución en la acetilación de la H3 y la H4 del promotor *CDH1*. Esto es debido al reclutamiento de HDAC1 y HDAC2 al promotor mediante la interacción con el dominio SNAG de Snail1. Este reclutamiento puede depender de mSin3A [158, 159]. Otro mecanismo mediante el cual Snail1 puede reprimir la E-cadherina es mediante la interacción con AJUBA y el reclutamiento de la metiltransferasa PRMT5 [160]. Nuestro grupo ha descrito como Snail1 recluta otro complejo represor mediante la interacción con Suz12, el *Polycomb complex 2* (PRC2) [161] provocando la trimetilación de la K27 de la H3 (marca represora). Este sistema de represión no sólo tiene lugar en el promotor de *CDH1* sino en otros promotores regulados por Snail1 como *PTEN* y *MUC1* [161].

Aunque E-cadherina se considera un represor del fenotipo mesenquimal, y la disrupción de las uniones permite la activación de muchas vías que inducen los cambios moleculares y fenotípicos observados durante la *EMT* (MAPK [162], RhoA [163], ILK [164] y NFκB [165, 166]) la pérdida de la E-cadherina no es suficiente para activar totalmente el programa mesenquimal, lo que indica que se requieren señales adicionales. La transfección de la E-cadherina en células que expresan Snail1 no bloquea la represión de Snail1 sobre otros componentes de las uniones, lo que demuestra que Snail1 reprime las proteínas que forman las *tight junctions* independientemente de la E-cadherina [167]. Así, Snail1 reprime directamente la expresión de proteínas presentes en las uniones intercelulares como claudinas y ocludinas [168]. Otros genes epiteliales reprimidos por Snail1 son: la desmoplaquina, el receptor de Vitamina D, muc1 y la citoqueratina 18 [86, 155, 169]. En todos los casos la represión depende de las cajas E presentes en los promotores

correspondientes. Además, la expresión de Snail1 produce un cambio en el patrón de expresión de la p120-catenina apareciendo la isoforma más típica de fibroblastos [167, 170].

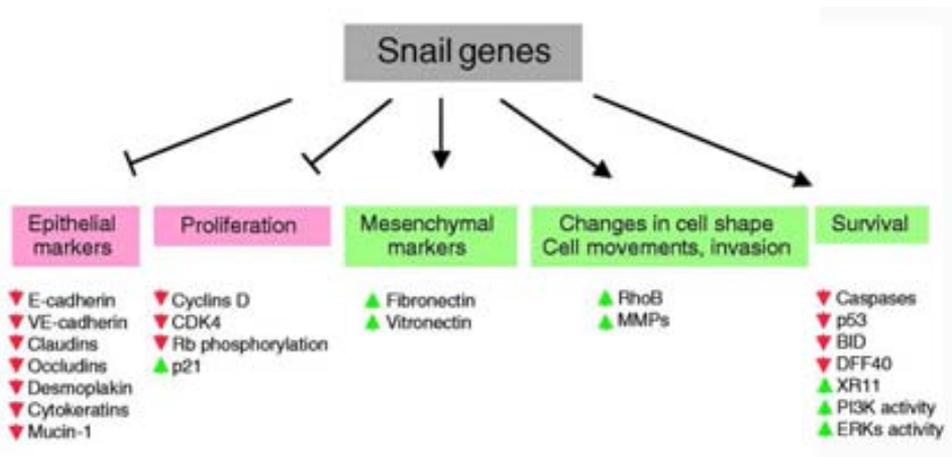


Figura 1.16 Genes regulados por Snail1 [97]. La expresión de Snail1 induce la pérdida de marcadores epiteliales y la ganancia de marcadores mesenquimales. Además, induce cambios en la morfología y en la adquisición de movilidad y capacidad invasiva. También regula la proliferación y la muerte celular. No todos son regulados directamente por Snail1.

Aunque Snail1 se define como represor transcripcional, su expresión activa varios genes mesenquimales entre los cuales se encuentran: proteínas de la MEC como la Fibronectina [86, 155], las MMP-1,-2 y -7 [171, 172], proteínas del citoesqueleto como la vimentina [16] y factores de transcripción como LEF-1 y Zeb1 [155]. Además, la expresión de Snail1 está implicada en la activación de las vías ERK y PI3K [67], en la regulación de la proliferación celular mediante la represión de la ciclina D2 y la activación de p27/Cip1 y, en la evasión a la apoptosis reprimiendo p53, caspasas y Pten [173, 174].

Así que, teniendo en cuenta las funciones moleculares descritas de Snail1 (**figura 1.16**) y el hecho de que tanto Snail1 como los demás genes de la familia Snail se expresan en todos los procesos estudiados en los que ocurre la *EMT* [132] pueden ser definidos como claros reguladores de la transición epitelio mesénquima (*EMT*).

I.4 La serina/treonina quinasa Akt.

La serina/treonina quinasa Akt/PKB es un regulador central de muchos procesos celulares tanto en células normales como en células tumorales. Akt controla la proliferación celular, el crecimiento, el metabolismo, la diferenciación, la migración, la angiogénesis y la supervivencia [175, 176].

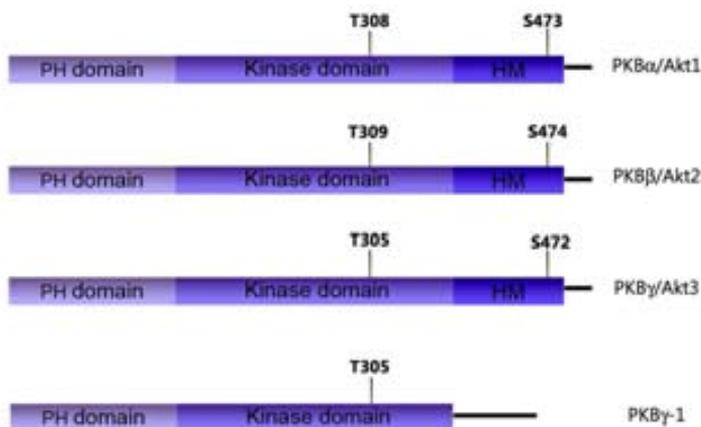


Figura I.17 Representación de las diferentes isoformas de Akt [177]. En la figura se muestran el dominio PH, el dominio catalítico (Kinase domain) y el dominio regulador C-terminal (HM). También se muestran los residuos responsables de la activación de Akt para cada isoforma.

Akt pertenece a la subfamilia de las AGC quinastas, la cual está formada por 518 miembros en humanos [178]. Akt es el homólogo celular de v-Akt (proteína codificada en el genoma del virus Akt8 aislado de un linfoma-T de ratón. c-Akt y v-Akt fueron clonadas por primera vez en 1991 por tres grupos independientes [179-181]. La subfamilia de las quinastas Akt en mamíferos está compuesta por tres isoformas: Akt1/PKB α , Akt2/PKB β y Akt3/PKB γ [181, 182]. Cada isoforma es producto de un gen diferente y comparten una estructura altamente conservada (> 80%) la cual se compone de tres dominios funcionales: un dominio N-terminal *pleckstrin homology* (PH), un dominio catalítico quinasa central en el cual se encuentra uno de los residuos responsables de la activación de Akt (**figura I.17**), y un dominio regulador C-terminal en el que se encuentra el segundo residuo que participa en la activación de Akt. Éste se localiza dentro de un motivo hidrofóbico (HM FxxF(S/T)Y [177]. Todas las isoformas a excepción de la variante de ratón y humano (PKB γ -1)

contienen este motivo hidrofóbico regulador [183]. La familia Akt se conserva evolutivamente desde *C. elegans* hasta el humano (excepto en levaduras). Entre *C. elegans* y el humano existe un 60% de identidad en la secuencia aminoacídica. Entre ratón y humano más del 95%. Tanto el dominio quinasa como el dominio HM se conservan entre los diferentes miembros de las AGC quinasa, todos ellos mediadores de las respuestas inducidas por insulina y factores de crecimiento. Curiosamente, el dominio PH esencial para la unión a $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ no existe en el ortólogo de Akt en *S. cerevisiae* (Sch9) [184, 185].

En cuanto a la distribución tisular tanto Akt1 como Akt2 se expresan ubicuamente mientras que Akt3 no se detecta en muchos de los tejidos donde las otras isoformas son abundantes. Akt2 se expresa predominantemente en tejidos dependientes de insulina como el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado. Akt3 presenta relativa abundancia en el cerebro y los testículos [177]. Trabajos recientes con ratones deficientes en alguna de las isoformas o varias han revelado funciones específicas de cada isoforma, y alguna redundancia funcional [186]. El ratón deficiente en Akt1 muestra una elevada mortalidad neonatal y retraso en el crecimiento [187]. El ratón deficiente en Akt2 es insulina-resistente y muestra un síndrome similar a la diabetes de tipo II [188]. El ratón deficiente en Akt3 se caracteriza por una reducción del 25% en el tamaño y peso del cerebro [189]. La inactivación simultánea de las diferentes isoformas provoca un fenotipo más severo resultando en la muerte del ratón antes del nacimiento, concretamente en el estadio E12 [190]. Los datos extraídos del análisis del fenotipo de estos ratones revela la necesidad de mantener cierta actividad de Akt en las células para un correcto crecimiento, metabolismo y diferenciación.

I.4.1 La activación de Akt requiere la fosforilación de dos de sus residuos.

La activación completa de Akt es un proceso que requiere varias etapas. Un elemento clave es la activación de la PI3K [191]. La PI3K puede ser activada mediante un gran número de factores (PDGF, insulina, EGF, bFGF, IGF-1, etc), que actúan sobre receptores tirosina quinasa [182], receptores acoplados a proteína G y sobre la activación de la señalización vía integrinas [192]. La PI3K una vez activada genera el $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ (molécula mensajera) a partir de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$. El dominio PH de Akt

se une a este segundo mensajero lo que permite la translocación de Akt citosólica a la membrana plasmática y su subsiguiente activación. Recientemente se ha descrito como la ubiquitinización de Akt en las lisinas K8 y K14 por TRAF6 contribuye a la translocación de Akt a la membrana y a su activación [69].

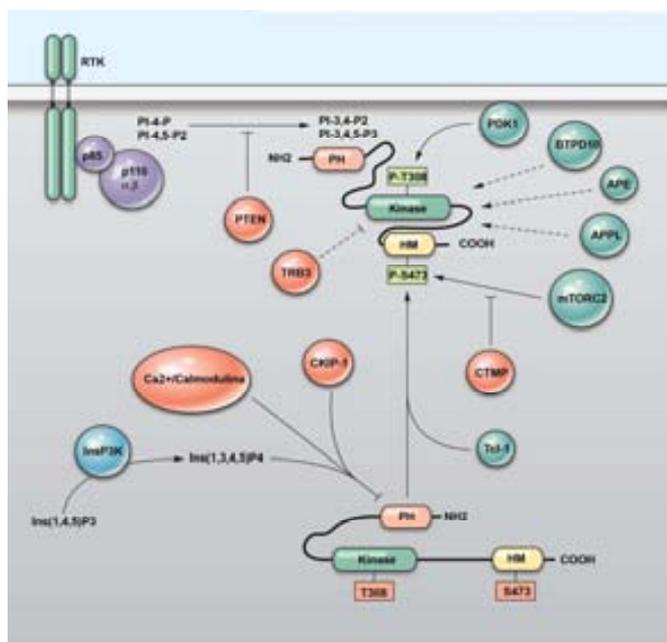


Figura 1.18 Esquema representativo de la regulación de la activación de Akt por la PI3K (p85/p110) y por interacción directa con diversas proteínas. (adaptado de [192]).

La activación de Akt requiere la fosforilación en la T308 y en la S473 (para Akt1). La T308 se encuentra en el T-loop del dominio quinasa y la S473 en el motivo hidrofóbico. La fosforilación en ambos residuos es necesaria y suficiente para la completa activación de Akt [193]. Ambas fosforilaciones dependen de PI3K. La quinasa responsable de la fosforilación en la T308 es PDK1 [194]. PDK1, que también contiene un dominio PH, tras la producción de PIP₃ colocaliza con Akt en la membrana plasmática y la fosforila. Han sido muchas las quinasas candidatas de la fosforilación de la S473. Entre las propuestas se encuentran: MAPKAP-K2, ILK1, PKCβ1, DNA-PK, ATM y la propia Akt [195-197], siendo TORC2 la quinasa responsable de la fosforilación en la S473, más aceptada [198]. Una vez activada en la membrana plasmática, Akt transloca al citosol y al núcleo donde fosforila a sus proteínas sustrato [199, 200].

Se han descrito varias fosfatasa responsables de la regulación negativa de Akt. Entre las que actúan *upstream* se encuentra Pten [201] que defosforila tanto PtdIns(3,4,5)P₃ como PtdIns(4,5)P₂; y SHIP [202] responsable de la defosforilación de PtdIns(3,4,5)P₃ para generar PtdIns(4,5)P₂. Además, se han descrito dos fosfatas directas de Akt: la PP2A y la PHLPP α las cuales defosforilan la T308 y la S473 respectivamente [203-205].

El mecanismo de activación dependiente de PI3K es común para las tres isoformas, pero los datos fisiológicos que demuestran la no redundancia de función entre ellas sugieren mecanismos adicionales de activación.

Investigaciones recientes demuestran como varias proteínas mediante la interacción directa con Akt modulan su actividad de una manera positiva o negativa [206]. Algunas de estas proteínas que interaccionan con Akt contienen actividad enzimática como PDK1 [207], SETDB1 (H3 metiltransferasa) [208] y fosfatasas específicas de Akt como PHLPP y PP2A [204]. Otras proteínas que también interaccionan con Akt no tienen actividad enzimática, lo que sugiere que sus interacciones con una o más regiones de Akt afecta la actividad quinasa de Akt, la aproximan a algún componente regulador de Akt o bien cambian su localización celular. En la **figura I.18** se muestran algunas de estas proteínas (para más detalle ver **figura R. 20**). Algunas de estas proteínas interaccionan específicamente con una de las isoformas de Akt [209].

I.4.2 La complejidad de la señalización vía Akt y su importancia en la fisiología y enfermedad humana.

El primer residuo fosforilado por Akt fue identificado en la serina 9 de la GSK3 β [210]. Diversos experimentos con péptidos que contenían variantes de esta secuencia definieron el motivo mínimo reconocido y fosforilado por Akt como R-X-R-X-X-S/T-B, donde X representa cualquier aminoácido y B aminoácidos hidrofóbicos. La mayoría de los sustratos identificados tanto *in vitro* como *in vivo* de Akt contienen este motivo, pero es posible que existan secuencias no conocidas todavía, o interacciones macromoleculares en las células que pudieran permitir a Akt fosforilar otros motivos. En la **tabla I.1** se listan algunos de los sustratos descritos para Akt.

Target	Human sites	Regulatory Effect
FOXO1	T24, S256, S319	Inhibit
FOXO3A	T32, S253, S315	Inhibit
FOXO4	T32, S197, S262	Inhibit
TSC2	S939, T1462	Inhibit
GSK3 α/β	S21/S9	Inhibit
RAF1	S259	Inhibit
PRAS40	T246	Inhibit
AS160	S588, T642	Inhibit
BAD	S136	Inhibit
WNK1	T60	?
MDM2	S166, S186	Activate
Chk1	S280	Inhibit
eNOS	S1177	Activate
ASK1	S83	Inhibit
IKK α	T23	Activate
p21CIP1	T145	Inhibit
p27KIP1	T157	Inhibit
Casp9	S196	Inhibit

Tabla I.1 Sustratos identificados in vivo de Akt [175].

Como se deduce de la **tabla I.1** y de la gran variedad de sustratos que fosforila Akt, esta quinasa activa la supervivencia de las células bloqueando la acción de proteínas proapoptóticas como Bad [211] e inactivando la transcripción dependiente de FOXO [212] (implicado en apoptosis, metabolismo y parada del ciclo celular). Además, actúa indirectamente sobre p53 activando la ubiquitin ligasa MDM2 (HDM2 en humanos) [213] que desencadena su degradación. Akt también colabora activando las vías de supervivencia inhibiendo la actividad de la caspasa-9 [214] y GSK3 β [210]. Es posible que pueda interactuar con otras vías. En algunas condiciones Akt puede activar la supervivencia vía NF κ B o a través de la inhibición de JNK/p38 [215].

Otra de las funciones biológicas de Akt es la de regular la captación de nutrientes y el metabolismo celular. Akt regula la captación de glucosa en respuesta a la insulina. Mediante la inhibición de Rab-GAP AS160, permite la translocación del transportador Glut4 [216]. La inhibición de GSK3 β por Akt estimula la síntesis de glucógeno. Además, la activación de HIF α induce la expresión de Glut1. Además, los efectos de Akt no sólo son sobre el metabolismo de la glucosa; se ha sugerido que

Akt puede regular la expresión en la superficie celular de otros transportadores de nutrientes [217].

El control del metabolismo y la activación indirecta de mTORC1 por inhibición de TSC2 hace que Akt también controle el crecimiento celular [218].

Además, Akt puede estimular también la proliferación celular a través de muchas proteínas que controlan el ciclo como p27 [219] y p21 [220].

Akt juega también un papel importante en la angiogénesis, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, con efectos tanto en las células endoteliales como en las células que producen señales angiogénicas, en células normales y en las células tumorales. En las células endoteliales, Akt es activado mediante el VEGF [221]. Además, Akt fosforila eNOS [222] y activa la producción del factor inducible por hipoxia HIF α y HIF2 α [223]. Finalmente, Akt1, la isoforma más abundante en las células endoteliales, es necesaria para la correcta migración de estas células [224].

Recientemente se le ha asignado un papel a Akt en el control de la migración celular, invasión de la matriz extracelular y metástasis. En estos procesos celulares tiene relevancia la no redundancia de funciones entre las diferentes isoformas, las cuales dependen del sistema celular que se esté analizando [225]. Recientemente la activación de Akt aparece como una característica importante de la *EMT* [226]. La primera demostración de Akt induciendo la *EMT* no se obtuvo hasta el 2003 [227]. La *EMT* inducida por Akt comporta la pérdida de las uniones célula-célula, cambios morfológicos, pérdida de polarización apicobasolateral, inducción de movilidad celular, disminución en la adhesión célula-MEC y cambios en la producción y distribución de proteínas específicas como en el caso de la desmoplaquina la cual se internaliza y la inducción de vimentina. Akt también induce la producción de metaloproteasas y la invasión celular. La activación de Akt produce una represión fuerte de la E-cadherina lo que permite a la célula permanecer en un estado mesenquimal durante la fase de crecimiento del tumor. La represión de la E-cadherina está asociada a la activación del factor de transcripción Snail1 [125, 227], y a la regulación negativa de la familia miR-200 activando la expresión de otro represor de la E-cadherina, Zeb1 [228]. Además, la inhibición de Akt provoca el fenómeno contrario a la *EMT*, la *MET* restaurándose los niveles de E-cadherina [229].

Muchas de las vías que inducen la *EMT* (**apartado I.2.3**) transducen sus señales, al menos en parte, a través de Akt como es el caso del TGF- β [230, 231]. HGF aumenta la invasión celular a través de la vía PI3K/Akt en melanomas [225]. Akt también juega un papel importante en la metástasis producida por la hiperactivación de receptores tirosina quinasa como erbB2/HER2 y IGF-IR [232-234]. Akt es requerida para la *EMT* inducida por Hipoxia [235] y por ILK [60]. Además, Wnt es capaz de activar directamente a Akt que a su vez inhibiría GSK3 β produciendo acumulación nuclear de β -catenina y Snail1, por lo que se ha sugerido que Akt podría intervenir en la *EMT* inducida por Wnt/Dishevelled [236, 237]. Datos recientes indican que la expresión de Notch en queratinocitos humanos y cáncer de cervix induce una *EMT* dependiente de PI3K/Akt [238].

Por lo tanto Akt aparece como un regulador importante de la fisiología celular ya que controla muchos procesos celulares. Varios de ellos fueron propuestos por Hanahan y Weinberg como mecanismos característicos del cáncer (**Figura I.1**) como descontrol en la proliferación y el crecimiento, resistencia a la apoptosis, angiogénesis sostenida y capacidad invasiva y metastásica. De hecho, la vía PI3K/Akt está alterada en una gran variedad de cánceres humanos mostrando un papel importante tanto en la génesis como en la progresión de un tumor [239]. Además, la vía PI3K/Akt es una característica central en la *EMT* la cual junto con la regulación del crecimiento celular, proliferación, metabolismo, angiogénesis, supervivencia y migración convierten a Akt como una quinasa necesaria en la mayoría de los eventos que tienen lugar en la metástasis.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis fue describir si Akt y Snail1 estaban relacionados directamente dentro del contexto de la *EMT*. Para estudiar esta hipótesis nos centramos en:

- 1) La caracterización del mecanismo mediante el cual Snail1 activa a Akt examinando si es dependiente o no de su actividad transcripcional.
- 2) La relevancia de la relación entre Snail1 y Akt dentro de la *EMT* analizando la contribución de Akt a los cambios moleculares inducidos por Snail1.

RESULTADOS

Sólo hay un modo seguro de dar una vez en el clavo, y es dar ciento en la herradura. Algunos tienen la buena estrella de dar en el clavo la primera vez. Hay que perseverar en el intento.

Proverbio ruso

R.1 Snail1 aumenta la activación y la actividad de Akt in vivo.

R.1.1 Snail1 induce la fosforilación de Akt en células epiteliales.

Datos previos descritos por diferentes grupos muestran cómo células que expresan Snail1 exhiben mayor actividad de la vía PI3K/Akt [67, 240] lo que sugiere una correlación entre la expresión de Snail1 y la activación de Akt. Se decidió comprobarlo mediante la preparación de extractos totales de diferentes líneas celulares epiteliales que expresaban el plásmido pcDNA-Snail1-HA de forma estable (células Snail1) y el análisis, mediante *western-blot*, de los niveles de fosforilación de los residuos responsables de la activación de Akt (P-T308 y P-S473) [194], [241], [242]. Las señales obtenidas se compararon con aquellas presentadas por las mismas células pero transfectadas establemente con el vector vacío pcDNA (células control).

Se decidió analizar los niveles de P-T308 y de P-S473 en diferentes clones estables que habían sido crecidos en medio con suero (control positivo de la activación de Akt), y compararlos con los de los clones que previamente a la extracción habían sido privados de suero durante 12 h. Como Akt se activa por factores de crecimiento, las células crecidas en presencia de suero mostraron mayor fosforilación en estos dos residuos que las células crecidas sin suero (ver **figura R.1 A** comparar fosfo-símbolo de carril 1 con el carril 3 y la del carril 2 con la del carril 4).

Como se puede observar en la **figura R.1 A**, las líneas celulares que expresaban establemente Snail1, aunque mostraron los mismos niveles de Akt total que las líneas celulares control, presentaron mayor señal de fosfo-Akt. Para las líneas RWP1 y MDCK se analizó la fosforilación en la S473. Como muestra la **figura R.1 A**, Snail1 indujo un incremento en la señal P-S473 en ambas condiciones de crecimiento (0%, 10%FBS), siendo más evidente en la condición de activación basal (0% FBS) de la quinasa (carril 1 y 2 en ambas líneas).

También se determinaron los niveles de P-Akt en la línea celular SW480. En este caso se analizaron los dos residuos. Como se observa en la figura R.1 A, la expresión de Snail1 indujo la fosforilación en la T308 y en la S473 en ambas condiciones de crecimiento.

Además, se analizó si la presencia de Snail1 prevenía la inactivación o mantenía los niveles de fosforilación de Akt. La **figura R.1 B** muestra la señal de P-Akt en células RWP1 a diferentes tiempos después de eliminar el suero del medio. Obsérvese que a tiempo 0 las células Snail1 mostraron mayor señal de P-Akt que las células control. 8 horas después de la eliminación del suero, la señal de P-Akt en las células control disminuyó, sin embargo en las células Snail1 se mantuvo como cuando estaban a tiempo 0. Después de 24 h sin suero la señal de P-Akt en ambos clones prácticamente desapareció. Por lo tanto, ambos resultados indican que Snail1 es capaz de inducir o aumentar el estado de fosforilación de Akt lo que hace que los niveles de P-Akt se mantengan altos por más tiempo.

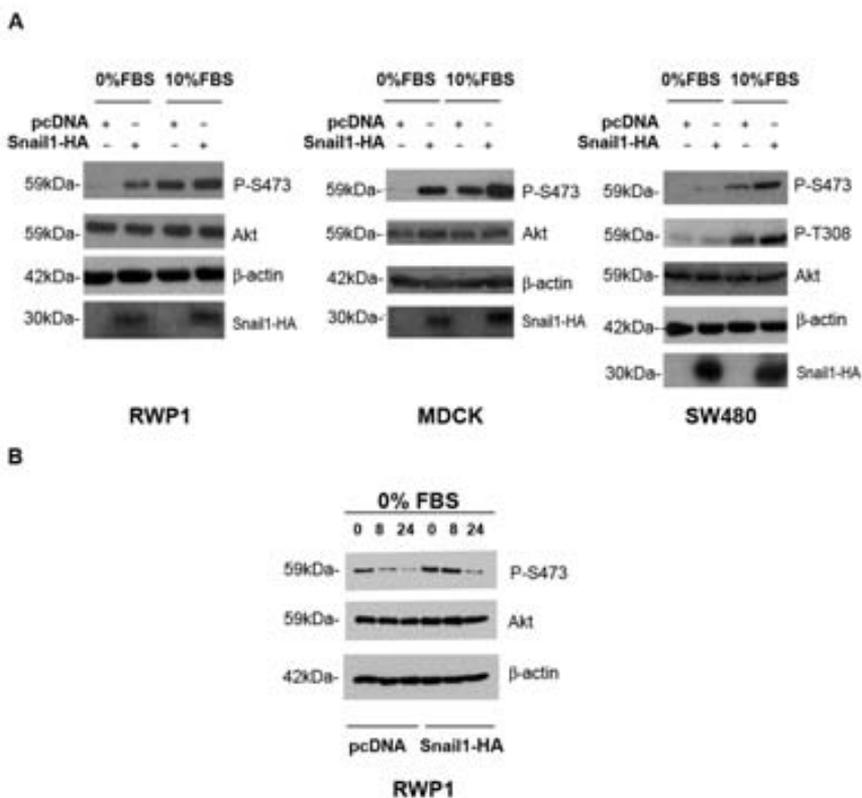


Figura R.1 Snail1 induce fosforilación de Akt endógena. **A** Extractos totales (SDS 1%) de células control y Snail1 RWP1, MDCK y SW480 crecidas 36 h con suero en el medio (condición 10% FBS) y 24 h con suero más 12 h sin suero (condición 0%FBS) se cargaron en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (M.M.6.1.2). Se analizaron mediante *western-blot* los niveles de P-S473 y P-T308, Akt y como control de carga se utilizó la β -actina. El anticuerpo específico de anti-HA se utilizó para detectar los niveles de Snail1-HA. **B** Extractos totales (SDS 1%) de células RWP1, que fueron crecidas durante 24 h en medio rico en suero. Seguidamente, se les retiro el suero durante 8 h y 24 h y se analizaron los niveles de P-S473 mediante *western-blot*.

Para corroborar este resultado se analizó, mediante inmunofluorescencia, la distribución de P-Akt en la línea celular RWP1 Snail1 comparándola con la de la línea celular RWP1 control. Las células se crecieron en condiciones basales de activación y tras estimulación durante 5 min y 30 min con IGF-1. A la vez se determinaron los niveles de P-Akt por *western-blot* en las mismas condiciones.

Como se muestra en las imágenes obtenidas por microscopía confocal, tanto en condiciones de activación basal como tras 5 min de estimulación con IGF-1, las células RWP1 Snail1 presentaron señales de fluorescencia de P-S473 mayores (**figura R.2** primer y segundo panel). En cambio, después de 30 min de estimulación con IGF-1, no se detectaron diferencias en la señal de P-S473 entre ambas líneas celulares (último panel de la figura).

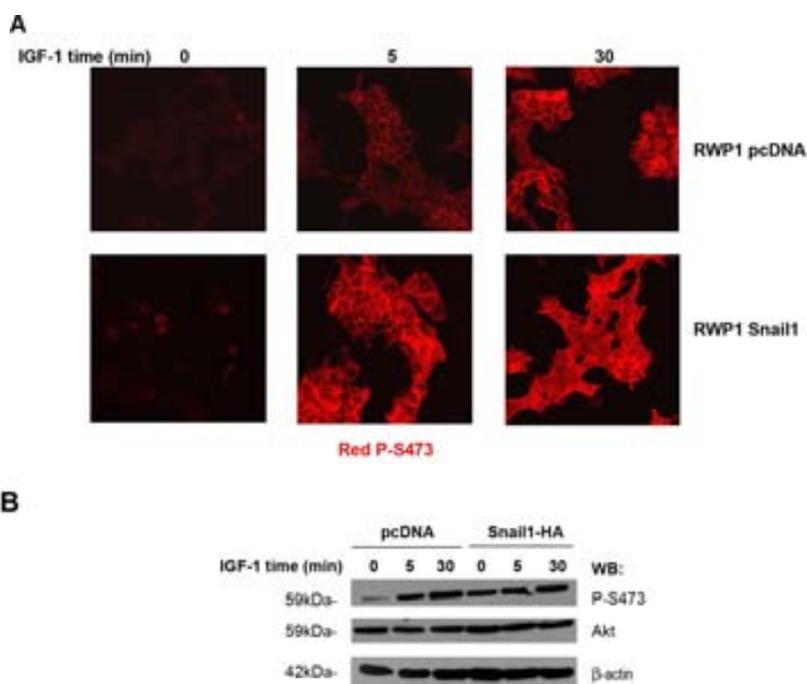


Figura R.2 Snail1 induce la fosforilación de Akt en condiciones basales y tras 5 min de estimulación con IGF-1. **A** Inmunofluorescencia (M.M.9) de los niveles de P-S473 en células RWP1 que expresan establemente Snail1-HA comparadas con células RWP1 control. Las células crecieron durante 24 h en medio con suero, seguidamente se retiró el suero durante 12 h y se estimuló 5 min (panel del medio) o 30 min con IGF-1 (último panel). El primer panel representa el nivel de activación basal de Akt. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo contra conejo conjugado con el fluorocromo rojo Alexa 555. La detección y la captura de imágenes se realizó por microscopía confocal. **B** *western-blot* de los niveles de P-S473 en las mismas condiciones y con las mismas líneas celulares que la inmunofluorescencia.

Se obtuvieron los mismos resultados en el análisis de los niveles de P-S473 por *western-blot* (**figura R.2 B**). Los niveles de P-S473 fueron mayores en las células que expresaban Snail1 a tiempo 0, y después de 5 min de estimulación con IGF-1 que las células control (compárese carril 1 y carril 2 de las células control con el carril 1 y 2 de las células Snail1). Como lo observado por inmunofluorescencia, después de 30 min de estimulación con IGF-1 no se detectaron diferencias en los niveles de P-S473 entre células Snail1 y células control (compárese carril 3 de cada tipo celular).

Se quiso caracterizar en qué compartimento subcelular tenía lugar el aumento de fosforilación de Akt por Snail1. Para resolver esta cuestión se realizó un fraccionamiento subcelular de células RWP1 crecidas en condiciones con suero (10% FBS) o deprivadas (12 h 0% FBS) separando núcleos de citosoles. Con el fin de aumentar la señal nuclear de Akt, se cargaron volúmenes iguales de cada compartimento (no se tuvo en cuenta la relación proteica real entre los compartimentos). Seguidamente, se analizaron los niveles de fosforilación de los residuos responsables de la activación de Akt, la T308 y la S473 mediante *western-blot*.

Como se observa en la **figura R.3**, las células que fueron crecidas en presencia de suero en el medio presentaron una fosforilación de Akt mayor (más P-Akt) que las células deprivadas, lo que sirvió de control positivo de la señal de fosforilación. Este incremento se detectó tanto en las células control como en las células Snail1. Al comparar la señal de P-Akt en las células Snail1 con la de las células control, esta fue mayor en las células que expresaban Snail1. Este incremento se detectó en ambas condiciones de crecimiento y en ambos compartimentos celulares. Por lo tanto, Snail1 es capaz de inducir la fosforilación de Akt en el citosol y en el núcleo de células RWP1 tanto en condiciones de activación basal (0% FBS) como tras estimulación con suero (10% FBS). Como muestra la figura, este efecto se detectó mejor analizando la fosforilación de la S473.

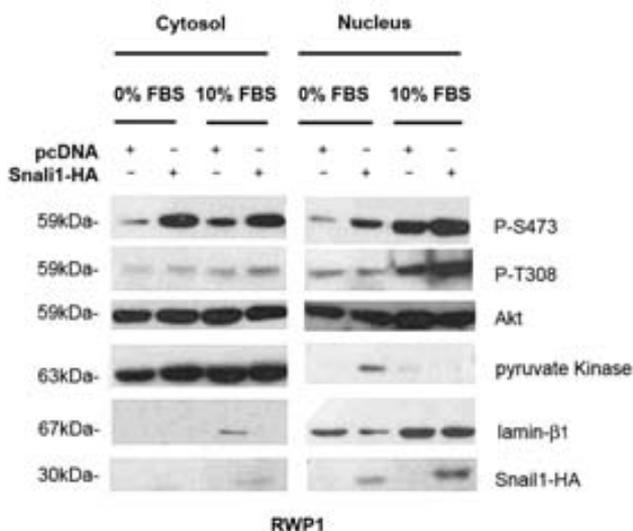


Figura R.3 Snail1 aumenta el estado de fosforilación de Akt, tanto en el citosol, como en el núcleo de células RWP1. Fraccionamiento subcelular de células RWP1 control y Snail1 crecidas en condiciones de activación basal de Akt (0%FBS) como en condiciones de activación por suero (10%FBS) en el que se separaron la fracción nuclear de la fracción citosólica. Se analizaron los niveles de fosforilación, en la T308 y la S473, con los fosfoanticuerpos específicos respectivos. El anticuerpo anti-Akt se utilizó para normalizar la proteína total. El marcador nuclear (lamin-β1) y el citosólico (Piruvato quinasa), se utilizaron tanto para normalizar las diferentes condiciones como para corroborar la ausencia de contaminación entre compartimentos.

R.1.2 Snail1 aumenta la actividad quinasa de Akt *in vivo*.

Teniendo en cuenta que el análisis de los niveles de fosforilación de los residuos responsables de la activación de Akt (T308 y S473) es una manera directa pero no proporcional de medir su actividad quinasa, se analizaron sustratos de Akt *in vivo*, para comprobar si este aumento en la fosforilación de Akt correlacionaba con un aumento en su actividad.

Uno de los sustratos descritos de Akt son las IKKs. Estas quinasas son las responsables de la activación, por la vía clásica, del factor de transcripción NFκB [243]. Se ha descrito que Akt puede activar la vía NFκB mediante la fosforilación y consiguiente activación de la quinasa IKKα en la T23 [244]. Además, existen datos que demuestran la relación de activación entre Akt, Snail1 y el factor de

transcripción NFκB [125]. Por ello se quiso analizar si el aumento en la fosforilación de Akt en células que expresaban Snail1 correlacionaba con un aumento en la actividad NFκB.

Como se puede observar en las figuras anteriores, el efecto de Snail1 sobre la fosforilación de Akt fue más evidente en situación de activación basal de la quinasa (0% FBS). Por esto, y para descartar fosforilaciones en las IKKs por activación de otras vías estimuladas por factores de crecimiento, se analizó la fosforilación de las IKKs en células RWP1 deprivadas de suero durante 12 h después de haber crecido 24 h en medio de cultivo con suero.

Como muestra la **figura R.4 A** las células Snail1 presentaron más actividad IKK, detectada por el incremento de la fosforilación de los residuos responsables de su activación (Ser177 y Ser181 para IKKβ, y Ser176 y Ser180 para IKKα). Para comprobar si este aumento en la actividad de las IKKs correlacionaba con una mayor actividad transcripcional dependiente de NFκB, células RWP1 control y Snail1 fueron transfectadas con un plásmido reporter de la actividad NFκB, llamado NF3 (**figura R.4 B; M.M.10**). Como se observa en la figura, las células Snail1 presentaron mayor actividad transcripcional dependiente de NF κB que las células control. Este resultado ha sido reproducido por otros miembros del laboratorio en otros sistemas [245].

Alternativamente para comprobar si el incremento de fosforilación de Akt por Snail1 correlacionaba con un aumento en su actividad, se analizó un sustrato directo de Akt, FoxO1 [246]. Existen tres motivos de fosforilación en FoxO por Akt: la T24, la S256 y la S319 (en el caso de FoxO1). La fosforilación de los tres es secuencial, y provoca la salida de estos factores del núcleo impidiendo así que realicen su actividad transcripcional.

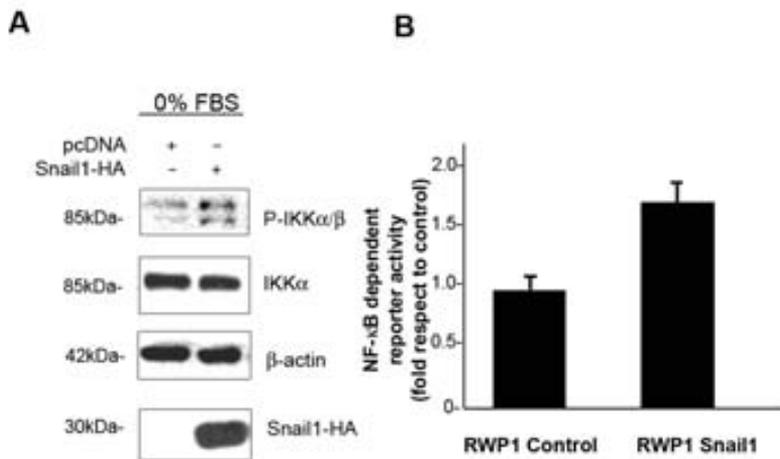


Figura R.4 Células que expresan Snail1, presentan mayor actividad NFκB. **A** Extractos totales (SDS 1%) de células RWP1 Snail1 y control crecidas en medio sin suero. Los niveles de P-IKK fueron analizados por *western-blot* con el anticuerpo específico anti-P-IKKα/β (Ser176/Ser180). Los niveles totales de IKK fueron analizados con el anticuerpo específico anti-IKKα. Como control de carga, se utilizó la β-actina. Con el anti-HA se analizaron los niveles de Snail1-HA. **B** Representación gráfica de la actividad transcripcional dependiente de NFκB mediante el reporter NF3 (M.M.10), usando la renilla como control interno, en los clones estables, RWP1 control y RWP1 Snail1.

Para analizar los niveles de P-FoxO en las células que expresaban Snail1 se utilizó un anticuerpo específico contra uno de los aminoácidos fosforilados por Akt en FoxO1, la S256. Por la misma razón explicada en el experimento que se muestra en la **figura R.4**, se crecieron células RWP1 en medio de cultivo con suero durante 24 h, más 12 h con medio sin suero. Se cargó en un gel de poliacrilamida la misma cantidad de extractos totales proteicos de células RWP1 Snail1 y de células RWP1 control.

Como se muestra en la **figura R.5 A** los niveles de P-FoxO1 fueron mayores en las células que expresaban Snail1 que en las células control. Como consecuencia de su fosforilación por Akt, FoxO1 es translocado al citosol [247]. Para corroborar que una mayor fosforilación de FoxO1 correlacionaba con un mayor exporte nuclear, se realizó un fraccionamiento subcelular de células RWP1 Snail1 y control separando la fracción citosólica de la fracción nuclear. Utilizando el anticuerpo específico contra FoxO1 total (**figura R.5 B**), se observó en las células Snail1 una desaparición de FoxO1 del núcleo probablemente consecuencia de un mayor exporte (obsérvese que

en las células control, FoxO1 apareció en ambos compartimentos, véase carril 1 y 3, en cambio, FoxO1 sólo apareció en el compartimiento citosólico en las células RWP1 Snail1, véase carril 2 y 4).

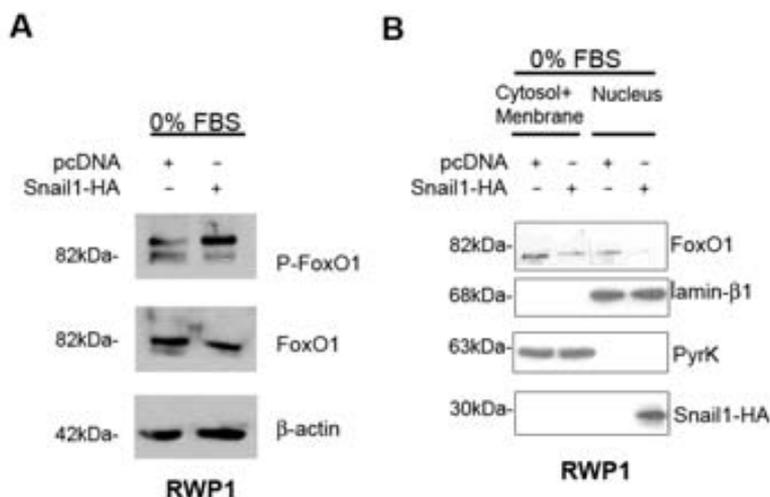


Figura R.5 Células que expresan Snail1, presentan mayores niveles de P-FoxO1. A Extractos totales de células RWP1 crecidas 24 h en presencia de suero y 12 h sin suero en el medio. Los niveles de P-FoxO1 se analizaron por *western-blot* con el anticuerpo específico P-FoxO1Ser256. Los niveles totales de FoxO1 se analizaron con el anticuerpo específico anti-FoxO1. Como control de carga se utilizó la β -actina. Con el anti-HA se muestran los niveles de Snail1-HA. **B** Fraccionamiento subcelular de células RWP1 crecidas bajo las mismas condiciones, en el que se separó la fracción nuclear de la fracción citosólica. El marcador nuclear (lamin- β 1) y el citosólico (Piruvato quinasa), se utilizaron tanto para normalizar las diferentes condiciones como para corroborar la ausencia de contaminación entre compartimentos.

Una vez en el citosol, FoxO1 es degradado vía proteosoma por ubiquitinización de la proteína. Tal ubiquitinización requiere de la previa fosforilación de FoxO1 por Akt [248], [249]. En **figura R.5 A** se observa cómo las células Snail1 presentaron menos proteína FoxO1 total que las células control. Este resultado junto con la mayor fosforilación y el mayor exporte nuclear de FoxO1 en las células Snail1, demuestra que el aumento de fosforilación de Akt por Snail1 se traduce en un aumento en su actividad [247].

Por último, para corroborar que Snail1 aumentaba la actividad quinasa de Akt *in vivo*, células HEK 293 fueron transfectadas transitoriamente con GST-Akt1 en

presencia del plásmido que expresaba Snail1 (pcDNA-Snail1-HA) o el plásmido vacío, pcDNA. La expresión ectópica de las proteínas se mantuvo 48 h.

Durante las 48 h de expresión, las células fueron deprivadas de suero durante 12 h y seguidamente fueron estimuladas o no con IGF-1. Las diferentes GST-Akt1 se purificaron y se midieron sus respectivas actividades quinasa, realizando ensayos quinasa sobre el péptido que contiene la secuencia de GSK3 β fosforilada por Akt (*crostide*) (**M.M.8.1**). Como se puede observar en la **figura R.6 A** Akt1 coexpresada con Snail1 presentó mayor actividad quinasa que Akt1 coexpresada con el vector vacío. Este aumento de actividad de Akt1 por Snail1 *in vivo* fue independiente del estado previo de activación de Akt1. Nótese que, en la condición de activación basal de la quinasa, (tiempo 0 en la **figura R.6.A**) la actividad detectada en presencia de Snail1 fue prácticamente igual que la actividad detectada por la Akt1 cotransfectada con el vector vacío y estimulada con IGF-1 durante 5 min. Por lo tanto, la coexpresión de Snail1 activa Akt1 como lo hace la estimulación de las células control 5 min con IGF-1.

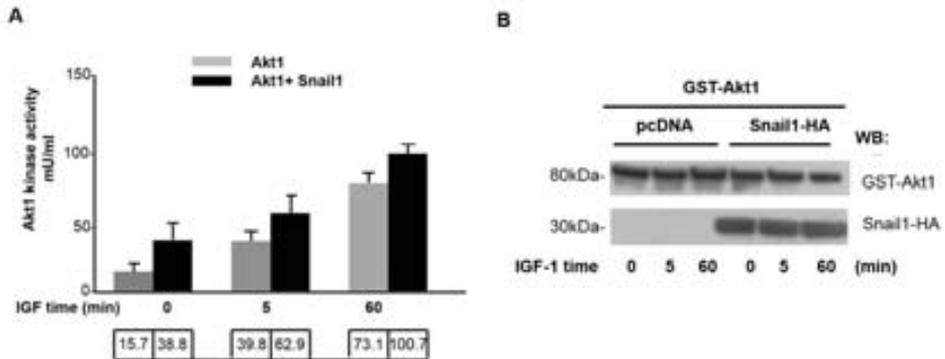


Figura R.6 La coexpresión de Snail1 aumenta la actividad de Akt1. **A** Ensayo quinasa *in vitro* sobre crosstide en el que se midieron las actividades de GST-Akt1 coexpresada con Snail1-HA o con el vector vacío, pcDNA, en células HEK 293 crecidas bajo diferentes condiciones de activación: en condiciones basales de actividad (0% FBS) o en condiciones de activación mediante estimulación con IGF-1 durante 5 min o 1 h. **B** *western-blot*, en el que se muestran las cantidades de GST-Akt1 purificada que fueron utilizadas para los ensayos quinasa. También se muestran los niveles de pcDNA-Snail1-HA transfectados en cada condición.

En el panel **B** de la **figura R.6** se puede observar que cantidades similares de Akt1 fueron purificadas en cada condición, lo que indica que las diferencias en las

actividades detectadas no eran consecuencia de diferentes cantidades de Akt1 purificadas.

R.1.3 El aumento de la fosforilación de Akt en los residuos responsables de su activación, la T308 y la S473, es dependiente de la actividad PI3K.

Como se ha explicado en la introducción (I.4.2), la activación de Akt depende de la actividad de la quinasa dependiente de fosfatidil-inositol-trifosfato (PtdIns 3, 4,5 P3 o PIP3), la PI3K. En un intento de caracterizar el mecanismo por el cual Snail1 induce la fosforilación de Akt, y su consiguiente aumento en la actividad quinasa, células RWP1 fueron tratadas en presencia o ausencia del inhibidor específico de la PI3K, LY294002.

Se analizó la señal P-S473 después de tratar con el inhibidor a diferentes tiempos. Como era de esperar, los niveles iniciales de P-Akt (P-S473) en las células fueron mayores que los de las células control (comparar carril 0 entre ambas líneas celulares de la figura R.7). Como se puede observar, después de 30 min de tratamiento con el inhibidor la señal de P-Akt desapareció completamente.

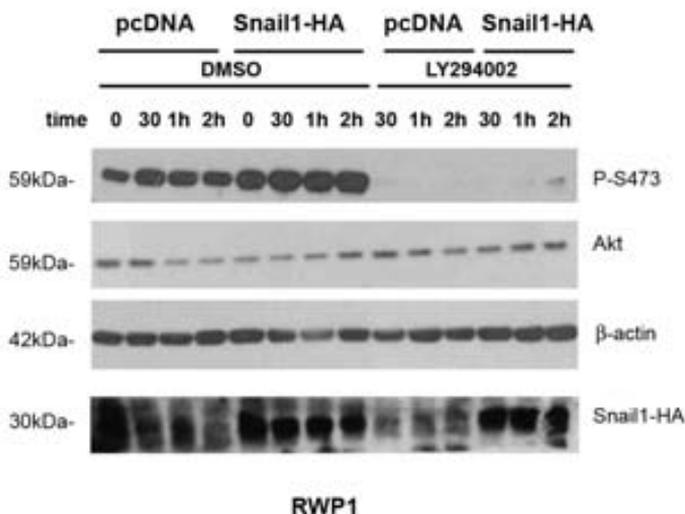


Figura R.7 La fosforilación de Akt inducida por Snail1 es dependiente de la actividad PI3K. Células RWP1 fueron crecidas en medio con suero durante 48 h. 1 h antes de introducir el inhibidor se retiró el suero del medio. Se introdujo el inhibidor a una concentración final de 25 μM y se tomaron muestras a diferentes tiempos. Como control de la acción del inhibidor se utilizó el DMSO a la misma concentración final. Se hicieron extractos totales y se analizaron los niveles de P-S473 a cada tiempo, normalizando la cantidad total de Akt con el anticuerpo Akt total. Como control de carga se utilizó la β-actina.

Como el aumento de la fosforilación de Akt inducida por Snail1 no ocurre en células tratadas con el inhibidor de la PI3K, podemos concluir que Snail1 requiere la actividad previa de PI3K para aumentar o prolongar la fosforilación de Akt.

R.1.4 El aumento de la fosforilación de Akt en los residuos responsables de su activación, la T308 y la S473, no depende totalmente de la actividad represora de Snail1.

Como se ha explicado en la introducción, Snail1 es un factor de transcripción cuya función principal es la de reprimir genes. En nuestro laboratorio existe un mutante de Snail1, Snail1-P2A, que presenta una mutación puntual de la Prolina en posición 2 a una Alanina. Dicha mutación, localizada en el dominio SNAG (dominio responsable de la actividad represora [84]) impide al mutante reclutar la maquinaria necesaria para reprimir genes [160]. Como se muestra en la **figura R.8 A**, este mutante de Snail1 es incapaz de reprimir la expresión de la E-cadherina.

Para comprobar si la actividad represora de Snail1 era necesaria para la activación de Akt por Snail1, se planteó analizar si el mutante no represor Snail1-P2A era capaz de inducir la fosforilación de Akt y de aumentar su actividad. Para ello, se analizaron los niveles de P-Akt en células RWP1 que expresaban establemente este mutante no represor de Snail1, comparándolos con células control y células Snail1.

Al igual que el experimento de la figura R.1, células RWP1 que expresaban establemente Snail1-P2A fueron crecidas durante 36 h en condiciones de activación por suero. Para analizar la activación basal, las células se crecieron durante 24 h en presencia de suero, retirándoles el suero durante 12 h más. Como se observa en la **figura R.8 B**, de manera similar a las células que expresaban Snail1-WT, las células que expresaban el mutante no represor de Snail1, presentaron niveles más altos de P-S473 que las células control, en ambas condiciones de crecimiento. Este efecto, como en el caso de Snail1, fue más evidente en situación de activación basal de la quinasa. Por tanto, al igual que la proteína WT, Snail1-P2A también induce la fosforilación de Akt en el residuo S473 lo que sugiere que el aumento de fosforilación de Akt por Snail1 en la S473 es independiente de su actividad represora.

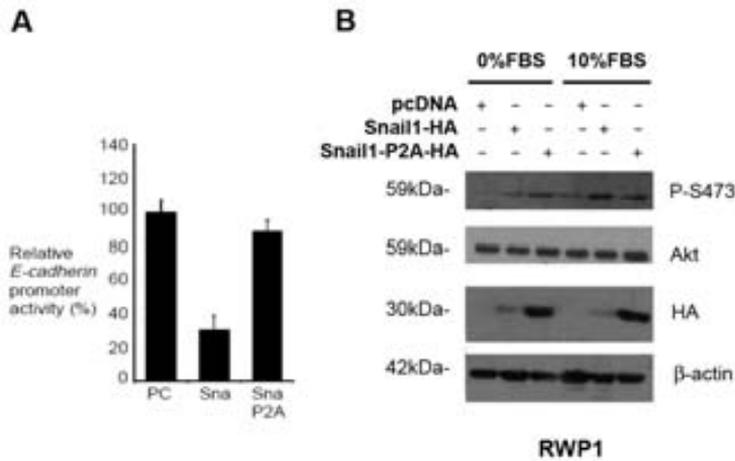


Figura R.8 El mutante no represor de Snail1, Snail1-P2A también induce la fosforilación de Akt. **A.** Gráfica extraída de [84], en la que se observa que el mutante Snail1-P2A no es capaz de reprimir la *CDH1*. **B** *western-blot* en el que se analizaron los niveles de P-S473 y de P-T308 a partir de extractos totales de células RWP1 que expresan establemente Snail1-P2A-HA, comparándolos con extractos totales de células RWP1 que expresaban establemente Snail1 y células control. Como control de carga se utilizó la β -actina.

El experimento se reprodujo analizando si Snail1-P2A era capaz de aumentar la activación de Akt, tanto en el citosol como en el núcleo al igual que la proteína WT. Para ello, se hizo un fraccionamiento subcelular de células RWP1 Snail1-P2A, comparándolo con células RWP1 Snail1 o control.

Como muestra la **figura R.9** el mutante no represor se comportó como el Snail1 WT incrementando la señal de P-Akt tanto en el citosol como en el núcleo. El incremento de la señal de la S473 de Akt se pudo observar en el citosol en ambas condiciones de crecimiento, pero en el núcleo sólo se apreció en condiciones de activación basal de la quinasa, como ya ocurrió en la mayoría de los experimentos.

Aunque los resultados sugirieron que el efecto activador de Snail1 sobre la activación de Akt era independiente de su actividad represora, los niveles de expresión de ambas proteínas (señal HA de la figura R.8 y R.9) no fueron comparables por lo que el experimento se repitió utilizando cantidades similares de las proteínas WT y mutante, y analizando la actividad quinasa de Akt sobre el *crossside*.

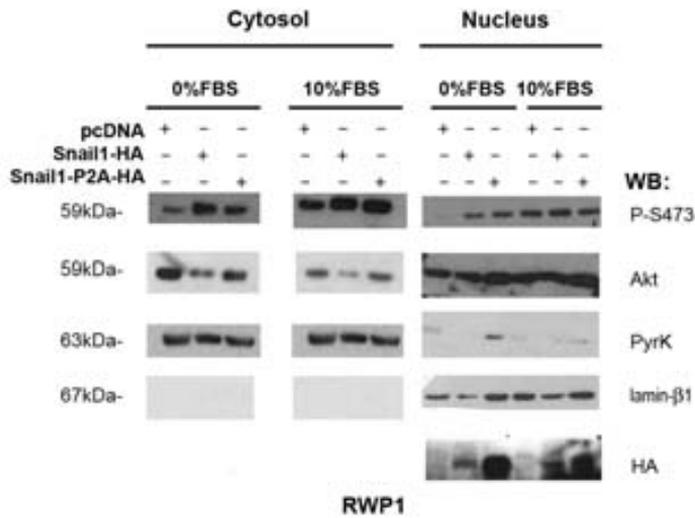


Figura R.9 El mutante no represor de Snail1, Snail1-P2A, también induce la fosforilación de Akt en la S473 tanto en el citosol como en el núcleo. La figura describe el resultado obtenido mediante el fraccionamiento subcelular de células RWP1 control, Snail1-HA y Snail1-P2A-HA crecidas tanto en condiciones de activación basal de Akt, sin suero, como en condiciones de activación por suero, en el que se separaron la fracción nuclear de la fracción citosólica. Se analizaron los niveles de fosforilación, en la T308 y la S473, con los fosfo-anticuerpos específicos respectivos. El anticuerpo anti-Akt se utilizó para normalizar la proteína total. El marcador nuclear (lamin-β1) y el citosólico (Piruvato quinasa), se utilizaron tanto para normalizar las diferentes condiciones como para corroborar la ausencia de contaminación entre compartimentos.

Células HEK 293 se transfectaron transitoriamente con GST-Akt1, en presencia de Snail1-P2A, Snail1 o el vector vacío, en condiciones de activación basal y tras estimulación con IGF-1 (**ver figura R.10 A**). En todas las condiciones, el mutante no represor de Snail1 fue capaz de incrementar la actividad quinasa de Akt1, aunque en menor medida que la proteína WT. Se realizó un análisis estadístico de tres experimentos utilizando el programa SPSS version 17. Las medias se compararon mediante ANOVA y Prueba T. El análisis indicó diferencias significativas ($p < 0,05$ o $*/**$) entre las actividades medidas de las quinasas coexpresadas con el vector vacío y las quinasas coexpresadas con Snail1 o el mutante Snail1-P2A en todas las condiciones estudiadas. Sin embargo, el análisis estadístico sólo mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las actividades de las quinasas coexpresadas con Snail1 y las coexpresadas con el mutante Snail1-P2A tras estimular 60 min con IGF-1. Como se muestra en el panel inferior de la **figura R.10 A**, transfectando transitoriamente

los plásmidos se consiguieron niveles similares de expresión de Snail1-P2A y Snail1-WT. También se muestra la cantidad de GST-Akt1 purificada en cada condición para normalizar la actividad medida en el ensayo.

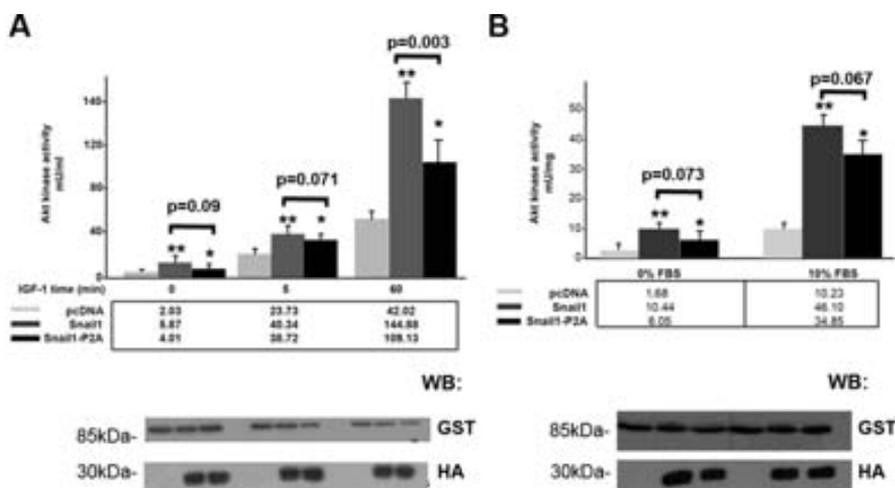


Figura R.10 Snail1-P2A aumenta la actividad quinasa de Akt1 in vivo. **A** Ensayo quinasa *in vitro* sobre *crossstide* en el que se midieron las actividades de GST-Akt1 coexpresada con Snail1-P2A-HA, con Snail1 o el vector vacío, pcDNA, en células HEK 293 crecidas en condiciones basales de actividad (0% FBS) y en condiciones de activación mediante estimulación con IGF-1 durante 5 min o 1 h. La gráfica muestra la media de tres mediciones de actividad de quinasa de un mismo lisado y los valores “p” obtenidos mediante ANOVA siendo (*) $p < 0,05$ y (**) $p < 0,01$. El panel inferior corresponde a un *western-blot* donde se observa la cantidad de quinasa purificada en cada condición y la expresión de Snail1 y Snail1-P2A. **B** Ensayo quinasa *in vitro* sobre *crossstide* en el que se midieron las actividades de GST-Akt1 coexpresada con Snail1-P2A-HA, con Snail1 o el vector vacío, pcDNA, en células RWP1 crecidas en condiciones basales de actividad y con suero en el medio. La gráfica muestra la media de tres mediciones de actividad de quinasa de un mismo lisado y los valores p obtenidos siendo (*) $p < 0,05$ y (**) $p < 0,01$. En el panel inferior se muestra la cantidad de quinasa purificada para condición, y la expresión de Snail1 y Snail1-P2A.

El experimento se repitió transfectando transitoriamente los diferentes plásmidos en células RWP1 WT en condiciones de activación basal (0 % FBS) y en presencia de un 10% de FBS en el medio. Como se observa en la **figura R. 10 B**, las quinasas purificadas de células que habían sido transfectadas con Snail1 o Snail1-P2A mostraron mayor actividad, que aquellas purificadas de células control en ambas condiciones. Aunque se obtuvieron diferencias entre las actividades medidas de las quinasas coexpresadas con Snail1-WT y con el mutante, éstas no fueron significativas ($p > 0,05$). Como se observa en la figura se obtuvieron niveles comparables de Snail1-WT y del mutante (**figura R.10 B WB**).

Con los datos obtenidos se puede concluir que el mutante no represor de Snail1, el Snail1-P2A es capaz de aumentar la actividad quinasa de Akt1 de manera similar a Snail1-WT, en todas las condiciones de crecimiento probadas, a excepción de la condición de 60 min de estimulación con IGF-1. Estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual Snail1 incrementa la fosforilación y la actividad quinasa de Akt1 es en parte independiente de su actividad represora, por lo que debe existir otro mecanismo responsable del efecto de Snail1 sobre la activación de Akt.

RESUMEN

Los resultados de este capítulo demuestran un efecto inductor de Snail1 sobre el estado de fosforilación de los residuos responsables de la activación de Akt, con el consecuente aumento en su actividad. Este incremento depende de la actividad PI3K, y es independiente del estado previo de activación de Akt. Se sugiere la existencia de dos mecanismos por los cuales Snail1 actúa como un cofactor positivo de Akt: uno dependiente de su actividad represora y uno independiente de su actividad transcripcional.

R.2 Akt interacciona con Snail1. La interacción de ambas proteínas provoca un aumento de la actividad quinasa de Akt.

R.2.1 Akt fosforila a Snail1 in vitro.

Con el objetivo de encontrar cuál era el mecanismo alternativo mediante el cual Snail1 aumentaba la actividad de Akt, se quiso comprobar si había una relación directa entre ambas proteínas. En primer lugar, nos planteamos si el mismo Snail1 podía ser un sustrato de Akt. Aunque un ensayo de fosforilación por simulación computacional (<http://scansite.mit.edu/>) reveló que Snail1 no contiene el motivo específico de fosforilación descrito para Akt (I.4.2), no se descartó esta hipótesis y se comprobó si Akt era capaz de fosforilar Snail1 *in vitro*.

Se realizaron ensayos quinasa *in vitro* con proteínas recombinantes de los diferentes mutantes de Snail1 (figura R.11), que ya existían en nuestro laboratorio para comprobar si Snail1 era fosforilado por Akt y, en caso de que así fuera, poder delimitar el dominio de Snail1 en el cual existía el residuo modificado.

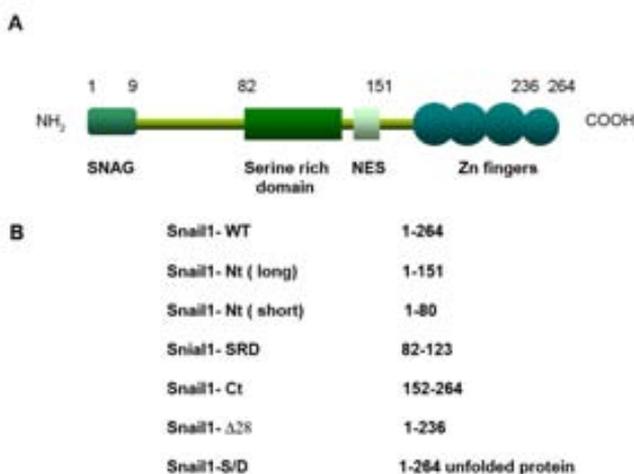


Figura R.11 Representación esquemática de la estructura primaria de Snail1 y los diferentes mutantes utilizados en los ensayos quinasa in vitro **A** Representación esquemática de la proteína Snail1 donde se resaltan diferentes dominios, el dominio N-terminal que comprende el dominio SNAG entre los aminoácidos 1-9, el dominio rico en serinas entre los aminoácidos 90-120, la NES (secuencia de exporte nuclear) entre los aminoácidos 126-146 y el dominio C-terminal que contiene los dedos de zinc entre los aminoácidos 151-264. **B** Esquema detallado de las diferentes construcciones de Snail1 utilizadas en los ensayos quinasa *in vitro*. Se muestra la nomenclatura utilizada (columna izquierda) y la región de aminoácidos que contienen (columna derecha).

En un primer ensayo se analizó la actividad de Akt sobre tres construcciones de Snail1: la forma *wild type* (Snail1-WT) y los mutantes Snail1-Ct y Snail1-SRD (dominio en el cual se han descrito diferentes modificaciones que regulan la localización y la estabilidad de Snail1 (I.3.2). En estos ensayos se utilizó la quinasa Akt1 obtenida como se explica en el apartado M.M.6.1.1. Como control positivo de la actividad quinasa de Akt se utilizó la proteína GST-Bad. Bad es fosforilado en un único residuo por Akt, la serina 136 [211], [250].

Como se puede observar en la **figura R.12 A**, la proteína Snail1-WT se detectó fosforilada por Akt de manera similar al dominio Snail1-Ct (comparar carril Snail1-WT con carril Snail1-Ct). Por tanto, ambas proteínas son fosforiladas por Akt en el mismo grado lo que sugiere que el posible residuo candidato se localiza entre los aminoácidos 151-264. También, se observa (primer carril y último carril de la **figura R.12 A** marcados con un círculo rojo), que Akt no fosforiló ni el dominio rico en serinas ni la GST, usada como control negativo.

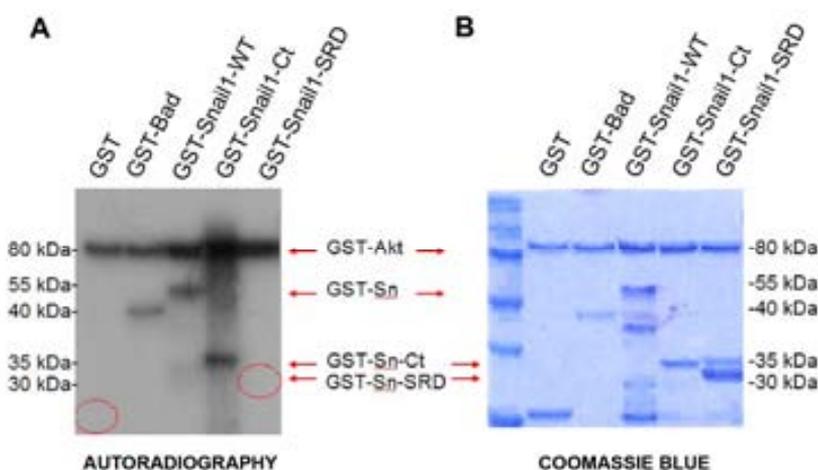
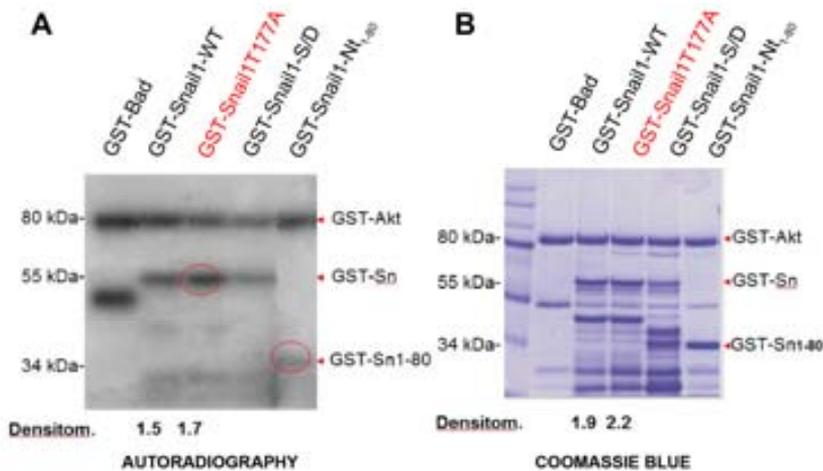


Figura R.12 Akt1 fosforila Snail1-WT y Snail1-Ct in vitro pero no el dominio rico en serinas. **A** Ensayo quinasa *in vitro* en el que por cada condición se fosforilaron 8 pmoles de cada proteína con la quinasa Akt1 durante 30 min a 30°C en presencia de $[\gamma^{32}]$ ATP. Las reacciones se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% para obtener una buena separación de las proteínas. Seguidamente, el gel se secó y se expuso un film toda la noche a -80°C para visualizar la radioactividad. Como control positivo de la actividad de Akt1 se introdujo la proteína GST-Bad. Como todas las proteínas contenían el fragmento GST fusionado, se introdujo la GST para descartar fosforilaciones en esta parte de la proteína de fusión. Los círculos en la figura indican ausencia de radioactividad. **B** El gel se tiñó con el colorante proteico Coomassie blue para visualizar las proteínas y así asegurar que había la misma cantidad de proteína sustrato. La figura muestra la tinción *Coomassie blue* del gel del mismo ensayo.

El ensayo “in silico” predijo la treonina 177 como mejor residuo candidato para ser fosforilado por esta quinasa (ver **figura R.13 C**). Este residuo se encuentra en el dominio C-terminal de Snail1 por lo que se generó el mutante puntual Snail1-T177A, en el que se reemplazó la treonina por una alanina (aminoácido que no puede ser fosforilado). Como se puede observar en la **figura R.13 A**, Akt1 fosforiló el mutante puntual T177A (círculo rojo carril 3) descartándolo así como el residuo modificado por Akt1.

Nuestro grupo ha propuesto un modelo de conformación para Snail1 derivado de ensayos *pull-down* en el que se demuestra que la parte N-terminal de Snail1 interacciona con la parte C-terminal [142]. De acuerdo con dicho modelo, cuando las serinas del dominio SRD están fosforiladas o mutadas a ácidos aspárticos, esta interacción se pierde por lo que la proteína presentaría una conformación más “abierta”. Para comprobar si la conformación “abierta” de Snail1 facilitaba la fosforilación por Akt se utilizó el mutante Snail1-S/D el cual mimetiza dicha conformación, ya que las serinas han sido sustituidas por ácidos aspárticos (aminoácidos que mimetizan la fosforilación). Al comparar el carril 2 y carril 4 de la **figura R.13 A**, teniendo en cuenta que hubo menos proteína Snail1-S/D que Snail1-WT; (**figura R.13 B (Coomassie)**), ambas proteínas fueron fosforiladas de forma similar por Akt1, lo que indica que la conformación abierta de Snail1 no facilita su fosforilación por Akt1.

Para verificar que el residuo modificado por Akt en Snail1 se encontraba en el dominio C-terminal de la proteína, se probó la última región N-terminal que faltaba por analizar, el mutante Snail1-Nt₁₋₈₀ que contiene los 80 primeros aminoácidos (último carril de la **figura R.13 A y B**). Teniendo en cuenta la cantidad de proteína introducida en el ensayo, apenas se detectó fosforilación en la región N-terminal. Con estos datos, podemos concluir que la región C-terminal de Snail1 es donde tiene lugar la fosforilación por Akt.



C

Akt Kinase			Gene Card AKT1	
Site	Score	Percentile	Sequence	SA
T177	<u>0.5957</u>	0.985 %	<u>KMHIRSHTLPCVCTI</u>	0.412

Figura R.13 Akt1 fosforila el mutante puntual de Snail1, Snail1-T177A.y el mutante Snail1-S/D (proteína abierta), pero no el mutante Snail1-Nt. **A** Ensayo quinasa *in vitro* en el que por cada condición se fosforilaron 8 pmoles de cada proteína con la quinasa Akt1 durante 30 min a 30°C en presencia de [γ^{32}]ATP. Las reacciones se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% para conseguir una buena separación de las diferentes proteínas. Seguidamente, el gel se secó y se expuso un film toda la noche a -80°C, para visualizar la radioactividad. Como control positivo de la actividad de Akt1 se introdujo la proteína GST-Bad. **B** El gel se tiñó con colorante proteico *Coomassie* para visualizar las proteínas y así asegurar que había la misma cantidad de proteína sustrato. La figura muestra la tinción *Coomassie blue* del gel del mismo ensayo. **C** Puntuación de 0.5957 del residuo T177 de Snail1 en el ensayo de fosforilación por simulación computacional.

Una vez delimitada la fosforilación en el dominio C-terminal de Snail1, se probó el mutante Snail1- Δ 28 al cual le faltan los 28 últimos aminoácidos, que corresponden al último dedo de zinc. Como controles adicionales se utilizaron la construcción Snail1-S/D y la construcción entera del dominio N-terminal, el Snail1-N₁₋₁₅₁ que corresponde a la región 1-80 más el dominio SRD. Como se puede observar en la **figura R.14 A** se obtuvieron los mismos resultados que en ensayos quinasa anteriores. El Snail1-WT, Snail1-S/D y el Snail1-Ct fueron fosforilados en la misma proporción por Akt1 (carriles 2, 3 y 6) mientras que el Snail-Nt₁₋₁₅₁, (carril 4) se fosforiló de forma residual.

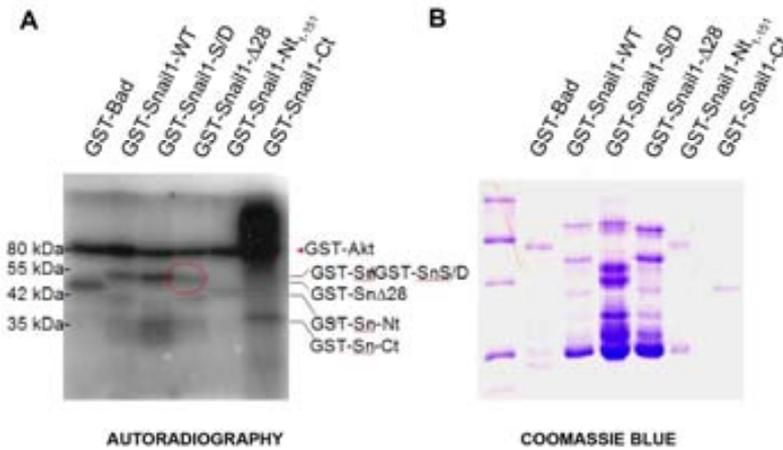


Figura R.14 Akt1 fosforila principalmente el dominio C-terminal de Snail1. **A** Ensayo quinasa *in vitro* en el que por cada condición se fosforilaron 8 pmoles de cada proteína con la quinasa Akt1 durante 30 min a 30°C en presencia de [γ^{32}]ATP. Las reacciones se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% para conseguir una buena separación de las diferentes proteínas. Seguidamente, el gel se secó y se expuso un film toda la noche a -80°C, para visualizar la radioactividad. Como control positivo de la actividad de Akt1 se introdujo la proteína GST-Bad. **B** El gel se tiñó con colorante proteico Coomassie para visualizar las proteínas y así asegurar que había la misma cantidad de proteína sustrato. La figura muestra la tinción *Coomassie blue* del gel del mismo ensayo.

En el caso de la fosforilación del mutante Snail- Δ 28, comparándola con la fosforilación detectada en Snail1-WT, ésta disminuyó drásticamente (carril 2 y 4 de la **figura R.14 A**). Estos resultados se resumen mejor en la gráfica representada en la **figura R.15**.

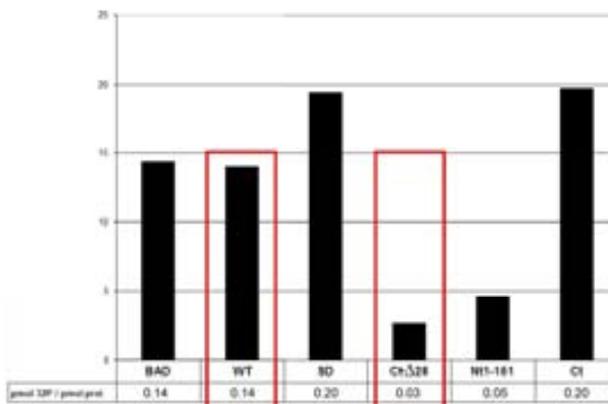


Figura R.15 Comparación del grado de fosforilación de las formas mutadas de Snail1. Resultado de la cantidad de [γ^{32}]ATP incorporado por pmol de proteína del ensayo de la **figura R.14**. Las bandas del gel teñido con colorante proteico Coomassie blue se cortaron y se contó la radioactividad incorporada en un contador de centelleo.

Sabiendo que el posible residuo candidato a ser fosforilado se encontraba en los 28 últimos aminoácidos, se realizó una nueva mutación puntual sobre la serina 246 generando el mutante Snail1-S246A. Esta serina se ha descrito como residuo diana de la quinasa Pak1 [150] cuya función está regulada por Akt [251]. A su vez, Pak1 sirve de *scaffold protein* para la activación de Akt por PDK1 [252], [253]. El hecho de que en las células existan muchas acciones redundantes y que se hayan descrito sustratos comunes para Pak1 y para Akt [254], hizo que se comprobara si el residuo 246 de Snail1 podía ser fosforilado por Akt1. Como muestra la **figura R.16** este mutante puntual también fue fosforilado por Akt1, lo que indica que la serina 246 no es el residuo diana de Akt1 en Snail1.

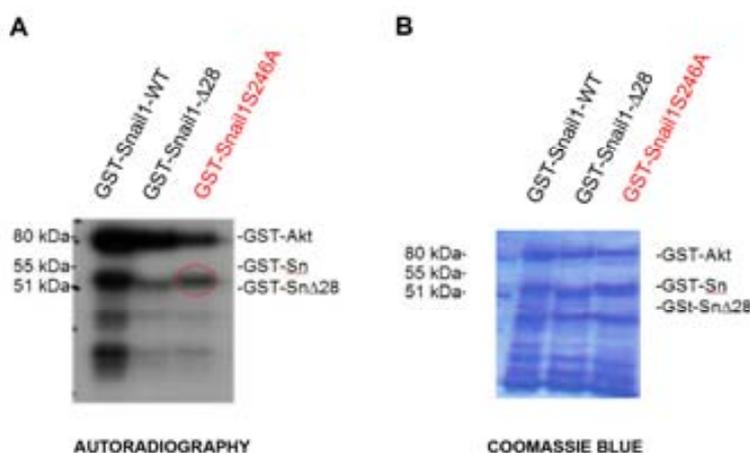


Figura R.16 Akt1 fosforila el mutante puntual Snail1-S246A. **A** Ensayo quinasa *in vitro* en el que por cada condición se fosforilaron 8 pmoles de cada proteína con la quinasa Akt1 durante 30 min a 30°C en presencia de [γ^{32}]ATP. Las reacciones se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% para conseguir una buena separación de las diferentes proteínas. Seguidamente, el gel se secó y se expuso un film toda la noche a -80°C, para visualizar la radioactividad. **B** El gel se tiñó con colorante proteico *Coomassie* para visualizar las proteínas y así asegurar que había la misma cantidad de proteína sustrato. La figura muestra la tinción *Coomassie blue* del gel del mismo ensayo.

Para muchas quinasas, se han descrito dominios de reconocimiento y de interacción con su sustrato, llamados *docking sites*, diferentes de la secuencia fosfoaceptora [255], [256], [257]. Hasta ahora no se ha descrito ningún *docking site* para Akt, pero no se puede descartar que los últimos 28 aminoácidos de Snail1 se comporten como *docking site* hecho que impediría que el mutante Snail1- Δ 28

interaccionara con Akt1 y, por tanto que fuera fosforilado. Esto indicaría, que el residuo fosforilado por Akt1 en Snail1 se encontraría dentro del dominio C-terminal pero fuera de los 28 aminoácidos y también que Akt tendría un *docking site* para Snail1.

Para descartar esta hipótesis y comprobar si Akt y Snail1 podían interactuar, se realizaron ensayos *pull-down*. Extractos proteicos de células RWP1 se incubaron con la proteína GST-Snail1-WT y con el mutante GST-Snail1-Δ28 y se analizó mediante *western-blot*, la presencia de Akt endógena. Como muestra la **figura R.17** ambas proteínas interaccionaron con Akt. Además el mutante Snail1-Δ28 interaccionó con una afinidad similar a la de Snail1-WT, lo que indica que los últimos 28 aminoácidos de Snail1 no son necesarios para la interacción con Akt1. A partir de este resultado, podemos concluir que la falta de detección de radioactividad en este mutante en los ensayos quinasa (**figura R.14 y R.15**) es debida a que el residuo modificado por Akt1 en Snail1 se localiza en los últimos 28 aminoácidos.

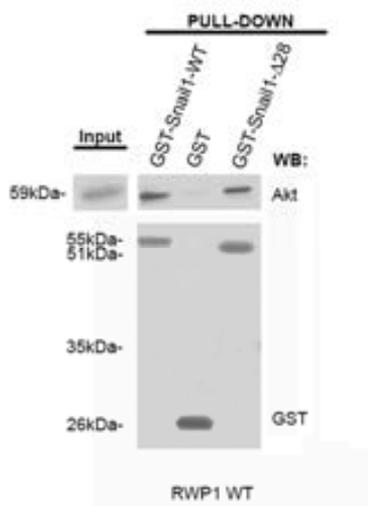


Figura R. 17 El mutante Snail1-Δ28 interacciona con Akt1 con una afinidad similar a la de Snail1-WT. A *pull-down* en el que por cada condición se incubaron 12 pmol de proteínas recombinantes con 500 μg de extractos totales de células RWP1. Se cargó un 2% de los extractos como input. Como control negativo se utilizó la proteína GST. Los complejos purificados con *Glutathion-Sepharose 4B* se analizaron por *western blot* con el anticuerpo anti-Akt total. Las membranas se volvieron a incubar con el anticuerpo anti-GST para asegurar que había la misma cantidad de proteína purificada.

R.2.2 Snail1 interacciona directamente con Akt1 in vitro. Esta interacción aumenta su actividad quinasa sin aumentar su nivel de fosforilación.

Se han descrito una gran variedad de proteínas que mediante su interacción con Akt actúan como moduladores de su actividad más que de sustratos [206]. En la **figura R.18** se detallan gran parte de estos cofactores de Akt y el efecto que tienen sobre su actividad.

BINDING PARTNER	EFFECT ON BINDING	EFFECT ON AKT ACTIVITY
α-Actinin 4	Essential role in Akt translocation and activation	Positive
Androgen Receptor (AR)	Forms complex with Akt and Mdm2 which results in AR degradation	N/A
APE	Associates with the kinase domain of Akt	Positive
APPL1	Associates with the kinase domain of Akt	Positive
Brk	Binds to Akt and limits its activity	Negative
cdc25A	Forms complex with Akt and Raf1 to promote cell survival	Positive
cdc37	Binds to Akt and prevents its degradation	Positive
CTMP	Binds to the hydrophobic motif of Akt and prevents Akt activation	Negative
eNOS	Phosphorylation of eNOS at Ser113 and Ser614 disrupts binding to Akt	N/A
Ft1	Binds to Akt and increases kinase activity	Positive
GRB10	Binds to the PH domain of Akt and potentiates its activation	Positive
HSP27	Formation of Akt/HSP27 complex necessary for Akt activation in neutrophils	Positive
ILK	Phosphorylation of ILK is required for association with Akt and phosphorylation of Ser473	Positive
IRAK2	Associates with Akt and promotes NF-κB activity	N/A
JIP1v	Interaction with PH domain of Akt1 inhibits JNK activation	N/A
p21Cip1	Binds to Akt2 and causes accumulation of p21Cip1 in the nucleus and cell cycle exit	N/A
Periplakin	Binds to the PH domain of Akt and regulates intracellular localization	N/A
PIKE-A	Binds to Akt and stimulates kinase activity	Positive
PP2C A	Binds to and dephosphorylates Akt	Negative
POSH	Akt2 binding with POSH downregulates MLK3-JNK activation	N/A
Prohibitin 2	Binds to the C-terminus of Akt	N/A
Raf1	Akt binds to and phosphorylates Raf1, resulting in decreased Raf1 activity	N/A
Smad3	Insulin-induced Akt and Smad3 association blocks Smad3 phosphorylation and nuclear translocation; TGF-β blocks PKB/Smad3 association	N/A
TCL1	Binds to the PH domain of Akt, forming oligomers, leading to increased Akt activity	Positive
TRB3	Insulin-mediated association with Akt blocks Akt activation	Negative

Figura R.18 Listado de diferentes proteínas que interactúan con Akt y modulan su actividad. <http://www.cellsignaling>

Una vez comprobado que Snail1 y Akt interactuaban (**figura R.17**) se planteó la hipótesis de si Snail1 podría actuar como un cofactor directo de Akt, aumentando su actividad a través de su interacción directa. Para ello, se realizaron ensayos quinasa en los cuáles Akt1 fusionada con GST, purificada de células HEK 293 tratadas con IGF-1 durante 5 min, fue preincubada con la proteína de fusión GST-Snail1, así como con varios mutantes de Snail1. Como control se preincubó la quinasa con la

GST sola. Seguidamente, se midió la actividad de Akt1 mediante la detección de la radiactividad incorporada por el *crossside*.

Como se observa en la **figura R.19 A** sólo el dominio C-terminal de Snail1, el que contiene el dominio de unión al DNA, fue capaz de aumentar la actividad quinasa de Akt1. Nótese, que cuando este dominio fue bloqueado por unión al DNA (en este caso con el promotor *CDH1*), Snail1 ya no pudo incrementar la actividad quinasa de Akt1 (**figura R.19 A**, tercera condición). Este resultado verificó que esta región, aminoácidos 152-264, es importante para la activación de la quinasa. De todas formas, la activación observada con el mutante Snail1-Ct fue menor que con la proteína WT. Como se puede observar, la GST sola no mostró ningún efecto sobre la actividad. Lo mismo sucedió con el mutante de Snail1 que mimetiza la conformación “abierta”, el Snail1-S/D. En la **figura R.19 B** se muestran las medias comparadas de las diferentes mediciones realizadas de la actividad de Akt preincubada con Snail1-Ct y Snail1-WT. En los dos casos las diferencias entre la actividad de la quinasa preincubada con GST y la preincubada con Snail1-WT y Snail1-Ct fueron significativas ($p < 0,05$).

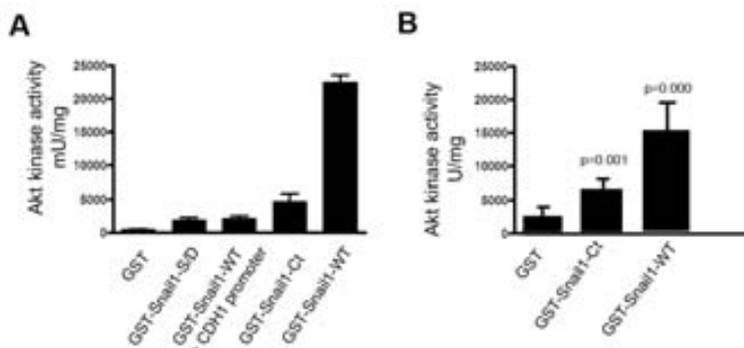


Figura R.19 Snail1-WT incrementa la actividad quinasa de Akt1. **A** Ensayo quinasa *in vitro* en el que se preincubó Akt1 (expresada y purificada de células HEK 293 deprivadas de suero durante 12 h y tratadas 5 min con IGF-1), con 1 μ g de la proteína GST-Snail1-WT durante 10 min a 30°C. Las reacciones se realizaron en presencia de $[\gamma^{32}]$ ATP, durante 30 min a 30°C y 30 μ M de *crossside* se utilizaron como sustrato. Se detuvo la reacción y se prosiguió a contar la radioactividad incorporada por el sustrato en cada condición. Como control, se preincubó la quinasa con la GST sola. En la gráfica se representa la media de tres mediciones de la quinasa procedente de un lisado. **B.** Ensayos quinasa *in vitro* en el que se preincubó Akt1 con 1 μ g del mutante de Snail1, GST-Snail1-Ct y con Snail1-WT durante 10 min a 30°C. Después de 30 min a 30°C, las reacciones se detuvieron y se midió la cantidad de radioactividad incorporada por el sustrato. En la gráfica se muestran las medias de 4 experimentos, cada uno realizado por triplicado y el valor *p* obtenido mediante la prueba T (programa SPSS).

Para explicar como Snail1 podía incrementar la actividad de Akt1 *in vitro* se plantearon dos ideas: o bien la interacción con Snail1 producía un incremento o acumulación de Akt1 fosforilado en la T308 y en la S473, o la interacción de Snail1 con Akt1 incrementaba su actividad, manteniendo una conformación activa de la quinasa sin incrementar el estado de fosforilación de los residuos responsables de su activación.

Para discernir entre las dos hipótesis, se procedió a realizar ensayos quinasa *in vitro* en presencia de ATP no marcado radioactivamente. Seguidamente, se analizó el nivel de fosforilación de la T308 y la S473 por *western-blot* de la GST-Akt preincubada con GST-Snail1. Dicha señal se comparó con la de la GST-Akt preincubada con la GST sola como control negativo.

Como muestra la **figura R.20**, cuando se compararon las señales obtenidas por los fosfo-anticuerpos, éstas fueron iguales preincubando con GST-Snail1-WT como con la GST sola. Por tanto, el aumento *in vitro* de la actividad de Akt1 por interacción con Snail1 no es consecuencia de un aumento en la fosforilación de los residuos responsables de su activación, la T308 y la S473.

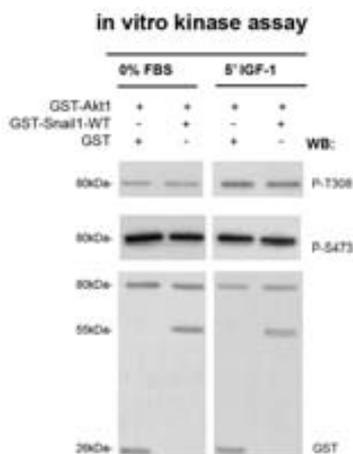


Figura R.20 El incremento *in vitro* de la actividad quinasa de Akt1 por Snail1, no es debido a una mayor fosforilación de los residuos responsables de su activación, al menos para el caso de la T308. A Ensayo quinasa *in vitro* en el que GST-Akt1 purificada, de células HEK 293, bajo diferentes condiciones de activación (en condiciones basales de actividad (0% FBS) y en condiciones de activación mediante estimulación con IGF-1) fueron preincubadas con GST-Snail1-WT durante 10 min a 30°C. Seguidamente se realizó el ensayo quinasa en presencia de ATP no marcado radioactivamente. Las reacciones, se pararon después de 30 min a 30°C. Las direntes condiciones se dividieron en tres y se cargaron en un

gel de poliacrilamida al 10% para conseguir una buena separación de las diferentes proteínas. Se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizaron los residuos T308 y S473 con anticuerpos anti-P-T308 y anti-P-S473. Como control de la presencia de cantidades iguales de todas las proteínas se usó el anticuerpo anti-GST.

RESUMEN

Los resultados de este capítulo evidencian un mecanismo mediante el cual Snail1 aumentaría la actividad quinasa de Akt1 por interacción directa. Se ha demostrado que esta interacción aumenta la actividad quinasa de Akt1 *in vitro*. Al no aumentar la fosforilación de los residuos responsables de la activación de Akt parecería que la interacción con Snail1 facilitaría una conformación más activa de la quinasa. También se muestra como Snail1 es un sustrato de Akt1 *in vitro*. Probablemente, el residuo fosforilado se encuentra entre los últimos 28 aminoácidos, descartando la serina 246.

R.3 Akt interacciona con Snail1 *in vivo*. Snail1 necesita de la actividad quinasa de Akt para reprimir la CDH1.

R.3.1 Akt y Snail1 interactúan en el núcleo de células epiteliales tumorales.

Para comprobar que el aumento de actividad de Akt por interacción con Snail1 tenía lugar *in vivo* se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación (**M.M.7.2**).

Células RWP1 WT fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido que expresaba Snail1-HA o el vector vacío pcDNA. Después de 48 h de expresión se lisaron las células (**M.M.6.1.2** extracción de proteínas en condiciones no desnaturalizantes). Durante toda la noche se incubó una cantidad de estos extractos con el anticuerpo HA que reconocía el *tag* del Snail1 ectópico. Seguidamente se analizaron por *western-blot* con el anticuerpo anti-Akt los complejos que coimmunoprecipitaron con Snail1-HA. Como se observa en la **figura R.21 A**, la quinasa Akt endógena se encontró formando parte de los complejos inmunoprecipitados con Snail1-HA.

Como se ha demostrado en el apartado **R.1**, el mutante no represor de Snail1, el Snail1-P2A, también es capaz de activar Akt. Si la hipótesis de la activación de Akt por interacción con Snail1 es cierta, deberíamos encontrar que este mutante también es capaz de interactuar con Akt. Como muestra la **figura R.21 A**, el mutante Snail1-P2A también inmunoprecipitó con Akt.

Estos resultados muestran que ambas proteínas pueden interactuar con Akt *in vivo* lo que refuerza la existencia de un mecanismo de activación de Akt por interacción con Snail1.

Como se ha explicado en la introducción, Akt contiene tres dominios diferenciados: el dominio PH, el dominio quinasa donde se encuentra la T308 y un dominio C-terminal que contiene un motivo hidrofóbico donde se encuentra la S473. Sabiendo que el dominio PH funciona tanto como dominio de unión a fosfoinosítidos como dominio modulador de la unión a proteínas [258], se quiso examinar si la interacción entre Snail1/ Akt o Snail1-P2A/ Akt estaba mediada por este dominio. Con este propósito células HEK 293 fueron cotransfectadas con los plásmidos que expresaban Snail1 o Snail1-P2A y con los plásmidos GST-Akt1 que

expresaban la forma WT o la forma mutada a la cual le faltaban los aminoácidos del 1-117 (Akt1- Δ PH). Seguidamente se incubaron 500 μ g de cada condición con *Glutathion-Sepharose 4B* y se analizaron los complejos purificados por *western-blot* con el anticuerpo anti-HA que reconocía el Snail1 y Snail1-P2A ectópico. La **figura R.21 B** muestra que tanto Snail1 (carril 1 y 3) como el mutante Snail1-P2A (carril 2 y 4) interaccionaron con ambas formas de Akt1. Como controles se utilizaron líneas celulares transfectadas con el vector que expresaba GST y líneas celulares transfectadas con el vector vacío pcDNA.

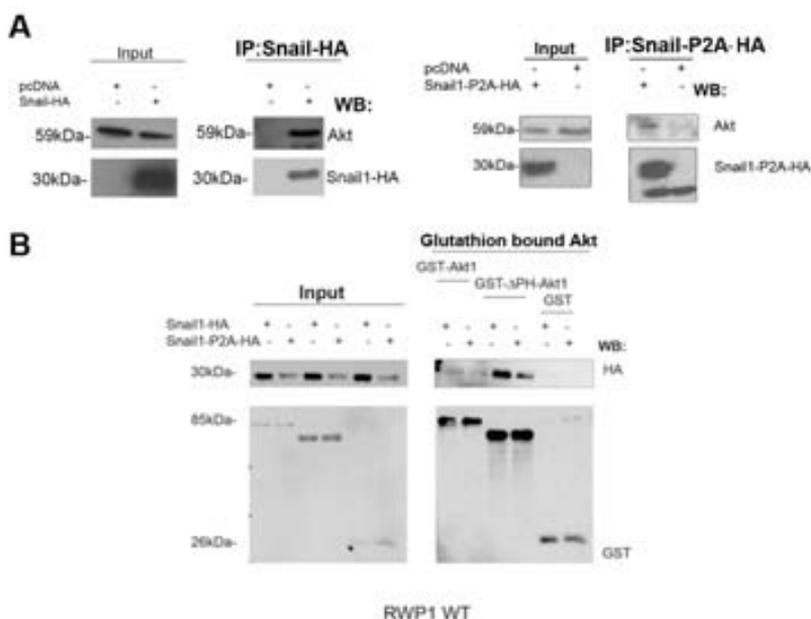


Figura R.21 Snail1 y Snail1-P2A inmunoprecipitan con Akt en células RWP1. El dominio PH de Akt no participa en la interacción. **A** Ensayo de coimmunoprecipitación en el que células RWP1 fueron transfectadas con el plásmido que expresaba Snail1-HA, Snail1-P2A-HA o con el vector vacío pcDNA. La expresión se mantuvo 48 h en presencia de 10% de suero. 500 μ g de extractos totales de estas células fueron incubados con el anticuerpo anti-HA. Los inmunocomplejos se analizaron por *western-blot*. Un 5% de input fue utilizado como control de carga. **B** Ensayo *pull-down* en el que células RWP1 WT fueron transfectadas con los plásmidos que expresaban GST-Akt1, GST- Δ PH-Akt1 o GST como control. A su vez, estas células se cotransfectaron con los plásmidos que expresaban Snail1-HA, Snail1-P2A-HA o con el vector vacío pcDNA. La expresión se mantuvo 48 h en presencia de 10% de suero. Se utilizaron 500 μ g de extractos totales de estas células. Los complejos purificados con *Glutathion-Sepharose 4B* se analizaron por *western blot* con el anticuerpo anti-HA. Las membranas se volvieron a incubar con el anticuerpo anti-GST para asegurar que había la misma cantidad de proteína purificada.

Se quiso estudiar en que compartimento celular tenía lugar la interacción de Snail1/ Akt. Akt tiene una distribución citosólica y nuclear pero Snail1 se localiza mayoritariamente en el núcleo, por lo que era probable que la unión entre ambas proteínas ocurriera en el compartimento nuclear.

Para verificar esta hipótesis se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación transfectando células RWP1 WT con el plásmido que expresaba el mutante de Snail1, el Snail1-S/A. Este mutante muestra una distribución totalmente nuclear ya que tiene el dominio rico en serinas, dominio responsable del transporte nuclear de Snail1, mutado a alaninas (**I.3.2.1**). Como control se utilizó la misma línea pero transflectada con el vector vacío pcDNA.

Como muestra la **figura R.22 A**, este mutante se detectó formando parte del complejo inmunoprecipitado con Akt, confirmando que la interacción entre ambas proteínas puede tener lugar en el núcleo.

Para descartar completamente que la interacción Snail1/ Akt tuviera lugar en el citosol se realizó un fraccionamiento subcelular de células RWP1 que fueron transflectadas con Snail1-HA o con el vector vacío pcDNA, separando núcleo de citosol. La misma cantidad de extractos proteicos de cada compartimento se incubó con el anticuerpo anti-HA que reconoce el Snail1 ectópico. Como muestra la **figura R.22 B** cuando se comparó el carril 1, que corresponde al complejo inmunoprecipitado del compartimento citosólico, con el carril 2, que corresponde al compartimento nuclear, la señal de Akt precipitada con Snail1 fue mayor en el compartimento nuclear. Nótese que aunque hubo más cantidad de Snail1 inmunoprecipitado en el núcleo, esperable ya que es una proteína mayoritariamente nuclear, también se partió de menos señal de Akt que en el citosol (mirar el % de input cargado en el gel) lo que indica que Snail1 interacciona mayoritariamente con el Akt nuclear.

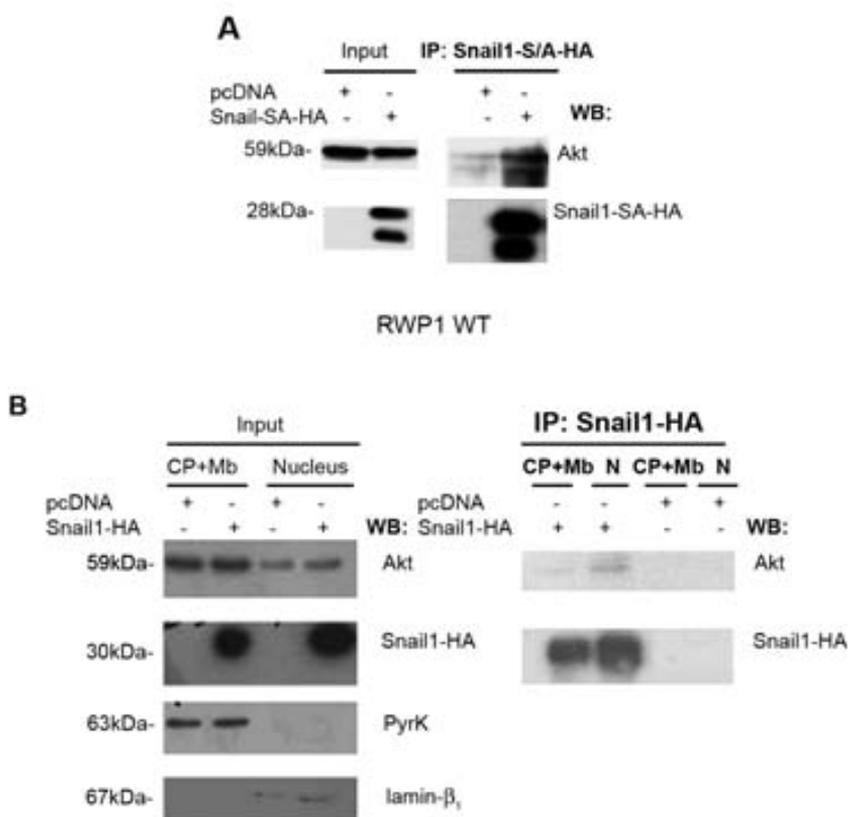


Figura R.22 Snail1 interacta mayoritariamente con el Akt nuclear. **A** Ensayo de coimmunoprecipitación en el que células RWP1 fueron transfectadas con el plásmido que expresaba Snail1-S/A-HA o con el vector vacío pcDNA. La expresión se mantuvo 48 h en presencia de 10% de suero. 500 µg de extractos totales de estas células fueron incubados con el anticuerpo anti-HA. Los inmunocomplejos se analizaron por *western-blot*. Se utilizó un 5% de input como control de carga **B** Ensayo de coimmunoprecipitación en el que células RWP1 fueron transfectadas con el plásmido que expresaba Snail1-HA o con el vector vacío pcDNA. Se realizó un fraccionamiento subcelular separando el compartimento nuclear de la fracción citosólica y membrana. 500µg de cada fracción se incubaron con el anticuerpo anti-HA. Los inmunocomplejos se analizaron por *western-blot* Se utilizó un 5% de input como control de carga.

Para comprobar que la unión entre ambas proteínas no era consecuencia de la sobreexpresión de Snail1, se realizó la coimmunoprecipitación de las proteínas endógenas utilizando extractos nucleares (**M.M.6.1.3**) de dos líneas celulares que expresaban niveles altos de Snail1 endógenos las MiaPaca2 y las SW620. Éstos se incubaron toda la noche con el anticuerpo específico anti-Akt. Seguidamente los complejos purificados se analizaron por *western-blot* con el anticuerpo anti-Snail1 generado en nuestro laboratorio (**Tabla M.M.11**). Como se muestra en la **figura**

R.23, Snail1 se detectó formando parte del complejo precipitado con Akt en ambas líneas celulares.

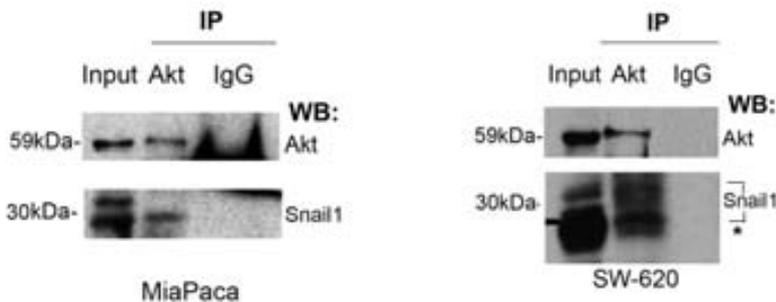


Figura R.23 Snail1 y Akt endógeno co-inmunoprecipitan en el núcleo de células MiaPaca y SW620. Ensayo de coimmunoprecipitación en el que se incubaron 500 μ g de extractos nucleares de células MiaPaca2 y de células SW620, con el anticuerpo específico anti-Akt. Los inmunocomplejos se analizaron por *western-blot* con el anticuerpo anti-Snail1 generado en nuestro laboratorio. Se utilizó un 5% de input como control de carga. (*) Dependiendo de la resolución del gel y del anticuerpo utilizado se observan varias formas de Snail1 que pueden corresponder diferentes modificaciones de la proteína con distintos pesos moleculares [142]

Teniendo en cuenta todos los resultados mostrados se puede concluir que ambas proteínas interactúan *in vivo* y que dicha interacción ocurre en el núcleo de células tumorales.

R.3.2 Akt se une a la región (-178/+92) del promotor de la CDH1, la misma región en la que se une Snail1.

Una vez determinado el compartimento donde tenía lugar la interacción Snail1/Akt y sabiendo que la función de Snail1 descrita hasta ahora es la de regular la expresión génica mediante su unión al DNA, se planteó si la interacción podía tener lugar sobre algún promotor regulado por Snail1. Aunque Akt es una quinasa que, entre otras funciones, regula la actividad de factores de transcripción [246, 259, 260] y de proteínas que modifican directamente la cromatina [260-262], no existe ninguna evidencia de la unión de Akt al DNA. Con el propósito de comprobar si Akt y Snail1 podían colocalizar a nivel de cromatina se estudió mediante inmunofluorescencia la distribución de Akt y de Snail1 en células HT-29 M6 Snail1 tratadas, antes de ser fijadas, con el tampón CSK (**M.M.9**). Este tampón permite

eliminar aquellas proteínas que no estén unidas a estructuras subcelulares como el citoesqueleto o el DNA.

Como muestra la **figura R.24** después del tratamiento, se detectó señal de Akt y de Snail1 en la fracción rica en cromatina de estas células. Al superponerse las señales (ver **merge** de la figura) Akt y Snail1 colocalizaron. En la parte inferior de la figura se muestra la señal de Akt activa, P-S473. Como se observa en el **merge**, Snail1 colocalizó también a nivel de la cromatina con Akt activa, indicando que Akt y Snail1 pueden interactuar a nivel del DNA y que Akt en estos complejos puede estar activa.

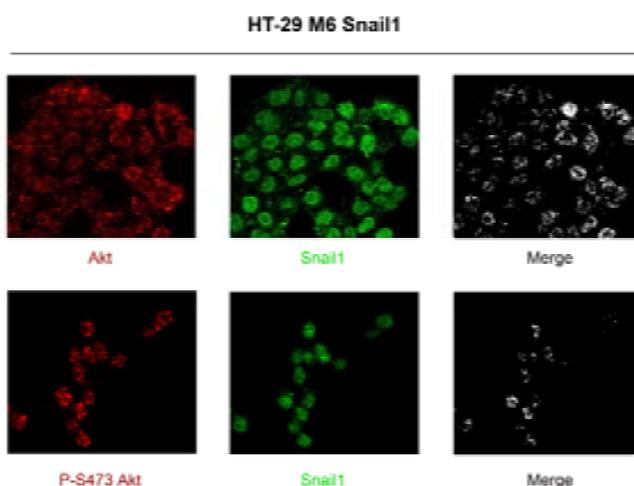


Figura R.24 Snail1 y Akt colocalizan en células HT-29 M6. Inmunofluorescencia de Akt total, de Akt-P-S473 y de Snail1 en células HT-29 M6 que expresan establemente Snail1-HA. Las células fueron tratadas con el *buffer* CSK antes de ser fijadas. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo conjugado con el fluorocromo rojo Alexa 555 para la señal de Akt y de P-S473. Para la señal de Snail1 se utilizó un anticuerpo conjugado con el fluorocromo verde Alexa 488. La superposición de las señales roja y verde se representa en color blanco (*Merge*) en la figura. La detección y la captura de imágenes se realizaron por microscopía confocal.

Como se ha explicado en la introducción, la principal diana de Snail1 durante la *EMT* es el gen de la *CDH1*. Datos previos relacionan, aunque indirectamente, Akt con la represión de este gen durante la *EMT* [226]. Este hecho junto con los datos obtenidos mediante inmunofluorescencia (**figura R.24**) llevaron al planteamiento de si la interacción Snail1/ Akt pudiera tener lugar en el promotor *CDH1* y, en caso de que así fuera, su posible funcionalidad.

Para averiguar si Snail1 y Akt interaccionaban sobre el promotor *CDH1*, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (**M.M.12**) los cuales permiten comprobar si una proteína se une *in vivo* a un promotor en concreto. Extractos enriquecidos en núcleos de células HT-29 M6 y RWP1 fueron incubados con el anticuerpo específico anti-Akt. Se estudió la presencia de Akt en la misma región del promotor *CDH1* previamente descrita como región a la cual se une Snail1(-178/+92) [84],[160]. La cantidad del DNA de interés coprecipitado con Akt y la coprecipitada inespecíficamente fue analizada por PCR cuantitativa. La **figura R.25** muestra como el DNA analizado se detectó en los inmunoprecipitados de Akt y no en las condiciones sin anticuerpo, en ambas líneas celulares indicando que Akt se une a la misma región del promotor *CDH1* que Snail1. Sorprendentemente, la presencia de Akt en el promotor *CDH1* fue independiente de la presencia de Snail1 ya que en las células control también se encontró Akt unido en el promotor *CDH1* obteniéndose porcentajes de input similares a los obtenidos en la línea que expresaba establemente Snail1.

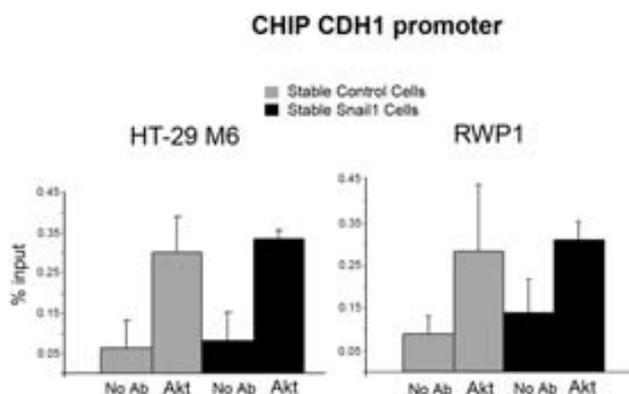


Figura R.25 Akt se une a la región -178/+92 del promotor de la *CDH1* independientemente de la presencia de Snail1. ChIP (**M.M.12**) en el que se analizó la presencia de Akt sobre el promotor *CDH1* en las líneas celulares HT-29 M6 y RWP1 control y). Snail1. Akt fue inmunoprecipitado de cromatinas provenientes de estas líneas celulares con el anticuerpo anti-Akt total. La región -178/+92 del promotor *CDH1* se amplificó por PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos. Como control negativo se utilizó la cantidad de DNA inmunoprecipitada en ausencia de anticuerpo (No Ab). Los resultados que se muestran en la gráfica representan el porcentaje de input inmunoprecipitado en cada caso (cantidad de promotor inmunoprecipitada respecto a la cantidad de DNA inicial). En la gráfica se representa la media de al menos tres experimentos.

R.3.3 Snail1 necesita de la actividad kinasa de Akt para reprimir el promotor de la *CDH1*.

Para estudiar la posible funcionalidad de la interacción Snail1/ Akt en el promotor de la *CDH1* se decidió comprobar si la actividad quinasa de Akt era necesaria para la represión de la E-cadherina por Snail1. Células RWP1 fueron transfectadas transitoriamente con el mutante de Akt1, Akt-K179M. Este mutante recibe el nombre de *kinase dead* ya que tiene mutado el sitio de unión al ATP y por lo tanto no puede fosforilar proteínas sustrato. Se cotransfectaron los plásmidos de Snail1-HA o el vector vacío pcDNA junto con el plásmido pGL3 que contiene el fragmento -178/+92 del promotor de la E-cadherina regulando la actividad del gen de la luciferasa (**M.M.10**) lo que permite detectar su actividad.

Como muestra la **figura R.26**, Snail1 reprimió el promotor *CDH1* de una manera dosis dependiente. Sin embargo, en presencia del mutante de Akt catalíticamente inactivo, la represión de la E-cadherina por Snail1 se vió comprometida aunque no totalmente ya que en el último punto donde hubo más expresión de Snail1 si se detectó represión. Por lo tanto, Snail1 necesita de la actividad quinasa de Akt para poder reprimir el promotor de la E-cadherina, especialmente cuando se expresa a bajas cantidades. Nótese que inicialmente en el punto donde no hay Snail1, la expresión del mutante de Akt incrementa la actividad basal del promotor *CDH1*; esto podría ser como consecuencia de que las células RWP1 WT presentan niveles endógenos de Snail1.

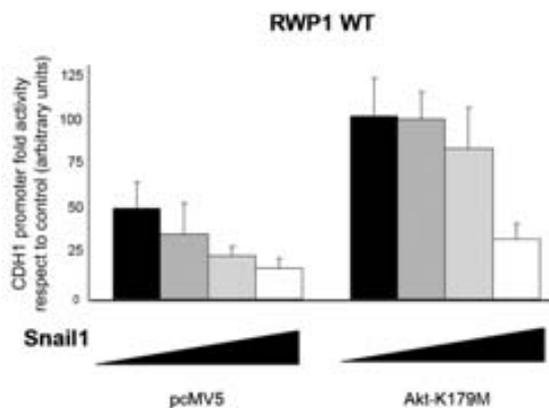


Figura R.26 Snail1 necesita de la actividad quinasa de Akt para reprimir el promotor de la E-cadherina. Células RWP1 WT fueron transfectadas transitoriamente con 100 ng del plásmido pGL3 (-178/+92 del promotor de la E-cadherina) o el plásmido pGL3 vacío. Simultáneamente se transfectaron el mutante Akt-K179M o el vector vacío pcMV5 con cantidades crecientes de Snail1-HA o pcDNA 0, 0.1, 1, 10 ng. La actividad de los promotores se examinó mediante ensayos *reporters*. Los valores se muestran referidos al valor inicial o control de cada condición. En la gráfica se representa la media de al menos tres experimentos.

Teniendo en cuenta que nuestro interés se centraba en encontrar la función biológica de la interacción Snail1/ Akt en el promotor de la E-cadherina, comprobamos si el mutante *kinase dead* de Akt podía interaccionar con Snail1. Para ello células RWP1 fueron cotransfectadas con el mutante Akt-K179M en presencia del plásmido Snail1-HA o del vector vacío pcDNA. Después de 48 h de expresión se prepararon extractos totales (M.M.6.1.2). Una cantidad de éstos se incubaron con el anticuerpo anti-Snail1. Como muestra la **figura R.27** en los complejos precipitados con Snail1 se detectó el mutante de Akt por lo que esta mutación puntual no impide que la interacción Snail1/ Akt tenga lugar.

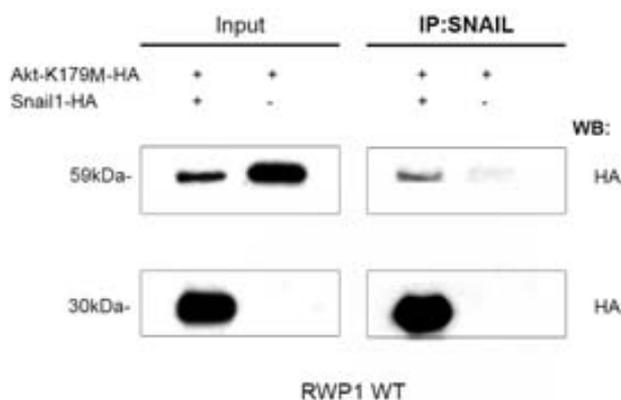


Figura R.27 El mutante de Akt kinase dead interacciona con Snail1. Ensayo de co-inmunoprecipitación en el que células RWP1 fueron cotransfectadas con plásmido que expresa el mutante de Akt, Akt-K179M-HA y con el plásmido que expresa Snail1-HA o con el vector vacío pcDNA. La expresión se mantuvo 48 h en presencia de 10% de suero. 500 µg de extractos fueron incubados con el anticuerpo anti-Snail1 preparado en nuestro laboratorio. Los inmunocomplejos se analizaron por *western-blot* con el anticuerpo anti-HA. Se utilizó un 5% de input como control de carga.

Se quiso examinar si el impedimento de la represión de la E-cadherina por Snail1 por falta de la actividad quinasa de Akt se traducía a nivel mRNA y proteína. Para ello células RWP1 WT fueron cotransfectadas con Snail1-HA o pcDNA y con

Akt-K179M o el vector vacío pcMV5. Después de 48 h de expresión se analizaron los niveles de mRNA de la E-cadherina con oligonucleótidos específicos y los niveles de proteína por *western-blot*. Como muestra la **figura R.28 A**, la expresión de Snail1 produjo la disminución de los niveles de mRNA de la E-cadherina (comparar carril 1, células control, con carril 3, células Snail1). Esta disminución se vió bloqueada por la coexpresión del mutante de Akt catalíticamente inactivo. Las células Snail1 coexpresadas con el mutante de Akt presentaron niveles de mRNA de E-cadherina comparables a los de las células control (comparar carril 1 con carril 4). En la **figura R.28 B** se muestra el mismo resultado pero a nivel proteína para todas las condiciones, a excepción de la expresión del mutante de Akt en las células control. En esta condición aunque los niveles de mRNA no se alteraron, a nivel proteína éstas células presentaron menos E-cadherina que las células control (comparar carril 1 con carril 2 del **panel B** de la figura). Nótese que la expresión de este mutante no altera los niveles de Snail1 (**I.4.3**) (señal HA **panel B**) por lo que se puede concluir que Akt como quinasa coopera directamente en la represión de la E-cadherina por Snail1.

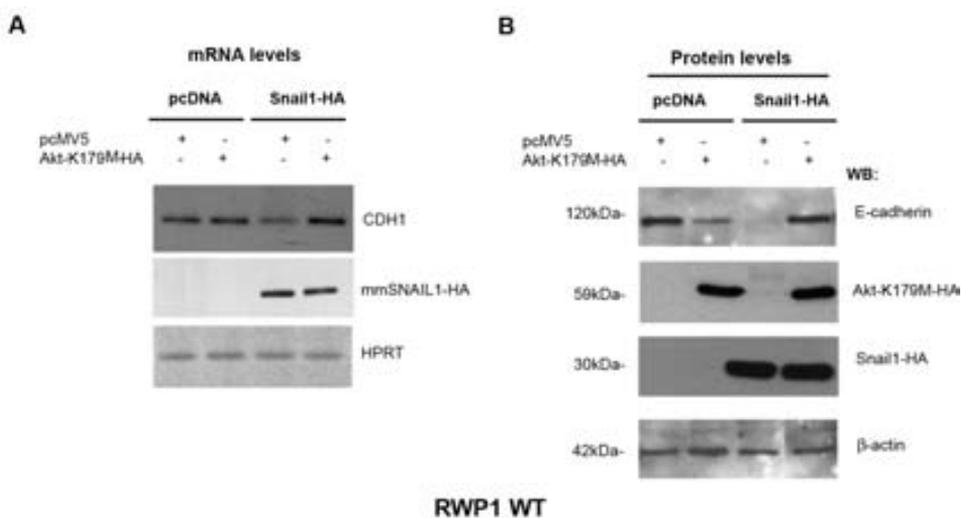


Figura R.28 Snail1 requiere la actividad quinasa de Akt para reprimir la E-cadherina. A Se extrajo el RNA de células RWP1 WT transfectadas con Snail1-HA o el vector vacío pcDNA y con el mutante Akt-K179M o el vector vacío pcMV5. Se analizaron por PCR semicuantitativa los niveles de mRNA de la E-cadherina y del Snail1-HA expresado ectópicamente con oligonucleótidos específicos. El gen HPRT se amplificó como control. **B** *western-blot* de extractos totales de células RWP1 WT transfectadas con Snail1-HA o el vector vacío pcDNA y con el mutante Akt-K179M o el vector vacío pcMV5. Los niveles de E-cadherina se analizaron con el anticuerpo anti-E-cadherina y los de Snail1-HA con el anticuerpo anti-HA (Roche). Como control de carga se utilizó la β -actina.

R.3.4 Ni la fosforilación en la S10, ni en la S28 de la histona H3 son el resultado de la interacción entre Akt y Snail1 en el promotor de la CDH1.

Con el fin de averiguar cuál podía ser el resultado de la interacción Snail1/ Akt en el promotor de la E-cadherina y sabiendo que Snail1 necesitaba de la actividad quinasa de Akt, se quiso analizar si Akt podría estar modificando algún residuo de alguna histona presente en dicho promotor.

El primer residuo identificado que podía ser fosforilado *in vitro* en una histona fue la serina 10 de la histona H3 [263]. Han sido muchas las quinasas descritas cómo las responsables de la fosforilación de la S10 de la H3 *in vitro*. En mamíferos la quinasa Aurora B sería la principal causante de esta fosforilación *in vivo* [264]. Además PKA [265], Rsk2 [266], Msk1[267] y IKK α [268] también fosforilan la S10 de H3 *in vivo*. Akt también ha sido descrita como quinasa candidata para fosforilar la S10 de la H3 [269] por lo que se decidió comprobar si Akt podía fosforilar la H3 *in vitro*.

Se realizó un ensayo quinasa en el cual la Histona H3 (**M.M.8**) fue incubada con Akt y [γ^{32}]ATP durante 30 min a 30°C. Como muestra la autorradiografía de la radioactividad incorporada por la H3 (**figura R.31 A**) Akt fue capaz de fosforilar la H3 *in vitro*. Seguidamente se quiso comprobar si el residuo modificado por Akt en H3 podría ser la S10. Se realizó el mismo ensayo quinasa pero con ATP no marcado radioactivamente. Se cargó la reacción en un gel y se analizó la presencia de la P-S10 por *western-blot* con el anticuerpo anti-P-S10-H3. Como muestra la **figura R.31 B**, Akt fosforiló la H3 en la S10. En este mismo ensayo, se introdujo una condición en la que se preincubó Akt con la proteína de fusión GST-Snail1. Como se observa en el **carril 3 del panel B**, la incubación de Akt con Snail1 aumentó la actividad quinasa de Akt sobre la S10 de la H3 lo que indica que o bien en presencia de Snail1, Akt es más activa o bien la H3 se convierte en mejor sustrato para Akt (ver **resultados R.2** en los que la preincubación de Akt con Snail1 aumenta su actividad quinasa). El resultado de un segundo ensayo quinasa con ATP no marcado radioactivamente se analizó por espectrometría de masas en busca de el/los residuo/s modificados por Akt. En la **figura R.29 C** se muestran los resultados que se obtuvieron. Estos indicaron que Akt fosforiló a la H3 al menos en la S10, la S28 y la T46, siendo este

último el residuo más fosforilado (nótese que este residuo se encuentra dentro del motivo específico de fosforilación de Akt, recuadro lila de la **figura R.29 C**).

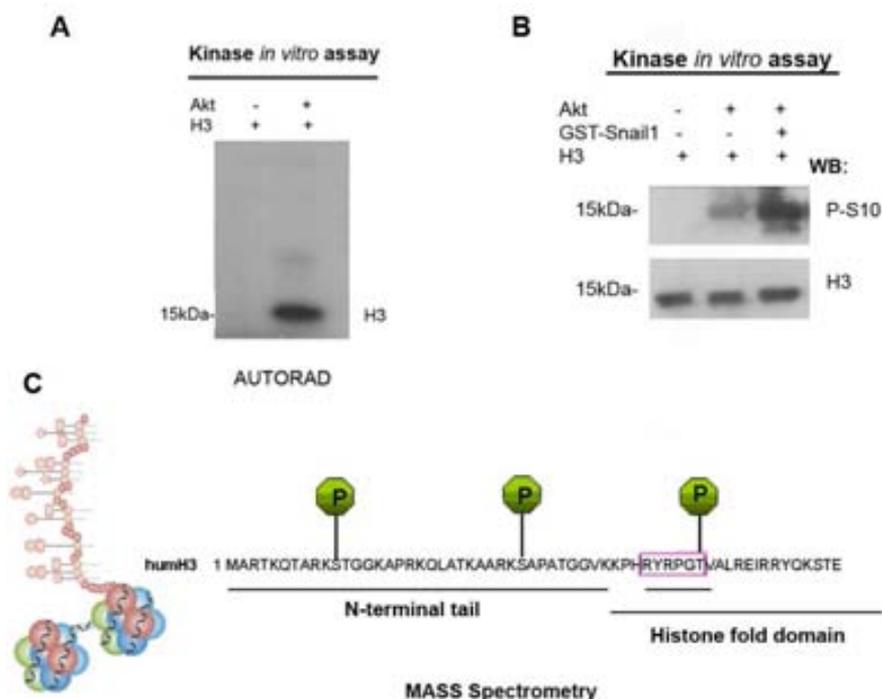


Figura R.29 Akt fosforila la histona H3 in vitro. **A** Ensayo quinasa *in vitro* en el que se incubaron 3µg de proteína recombinante H3 con 1 µg de quinasa recombinante Akt1. El ensayo se realizó durante 30 min a 30°C en presencia de [γ^{32}]ATP. Las reacciones se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% para conseguir una buena separación de las diferentes proteínas. Seguidamente se secó y se expuso un film toda la noche a -80°C, para visualizar la radioactividad. **B** Ensayo quinasa *in vitro* en presencia de ATP no marcado radioactivamente en el que se analizó la señal P-S10 por *western-blot* después de fosforilar la histona H3 con Akt1 preincubada o no con la proteína de fusión GST-Snail1. El anticuerpo anti-H3 fue utilizado para normalizar la cantidad total de histona H3 introducida en cada condición. **C** Resultado del análisis por espectrometría de masas de los residuos fosforilados por Akt1 en la histona H3. A la izquierda se muestra una figura modelo del dominio globular y la cola de la H3.

Una vez determinado que Akt podía fosforilar *in vitro* la H3 en estos tres residuos, se examinó mediante ensayos ChIP si alguno de ellos aparecía fosforilado en el promotor de la E-cadherina como consecuencia de un aumento de actividad de Akt por interacción con Snail1 en el promotor. En el momento que se realizaron estos experimentos sólo existían anticuerpos comerciales para la P-S10 y la P-S28, por lo que la P-T46 pudo ser analizada.

Como muestra la **figura R. 30**, mediante inmunofluorescencia se confirmó que, si en la preparación existían células mitóticas prácticamente la totalidad de la señal de P-S10 y de P-S28 (la cual se comporta como la P-S10) se acumuló en ellas lo que corrobora datos previos que indican que estas señales son mayoritariamente señales mitóticas [270], [271]. El resto de células mostraron baja tinción. Con el fin de disminuir la presencia de células mitóticas en el ensayo y aumentar la señal de células en interfase, se decidió analizar la distribución de estas señales en células crecidas sin suero durante 48 h. Como muestra la **figura R.30**, en estas condiciones se pudo detectar mayor señal de P-S10 y P-S28 en células no mitóticas por lo que se decidió realizar los ensayos ChIP con cromatina procedente de células HT-29 M6 y RWP1 control y Snail1 crecidas en ausencia de suero.

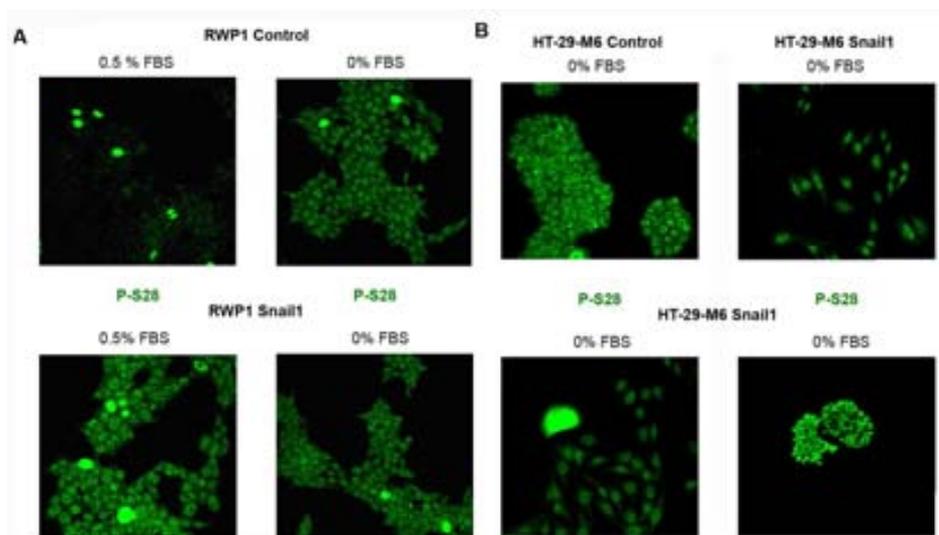


Figura R.30 La P-S28 es una marca principalmente mitótica tanto en células HT-29 M6 como en células RWP1 control y Snail1. **A** inmunofluorescencia en presencia de 0,5% FBS y en ausencia de suero de la señal de la P-S28 en células RWP1 control (panel superior) y Snail1 (panel inferior). La señal verde se obtuvo con el anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexa 488. **B** Inmunofluorescencia en ausencia de suero de células HT-29 M6 control y Snail1 (panel superior). En el panel inferior se muestra aumentada la señal cromosómica de P-S28 en células HT-29 M6 Snail1. La señal de P-S28 se muestra en verde. Los mismos resultados se obtuvieron para la señal de la P-S10 aunque no se muestran en la figura.

A la vez que se analizó la presencia de la P-S10 y de la P-S28 en el promotor de la E-cadherina en células control y Snail1, también se determinó su presencia en el promotor de la Fibronectina. Esto sirvió como control ya que al ser éste un promotor

activado por Snail1, la marca epigenética que se encontrara debería ser diferente a la que se encontrara en el promotor reprimido de la E-cadherina.

Cromatina procedente de células HT-29 M6 y RWP1 control y Snail1 crecidas 48 h sin suero fue incubada con el anticuerpo P-S10. En el DNA precipitado se analizó la presencia de los promotores de E-cadherina y de Fibronectina amplificando el fragmento de interés por PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos. Como muestra la **figura R.31 A**, en las células HT-29 M6 (panel **A izquierda**) no se detectó presencia de esta señal en el promotor *CDH1* ni en células control ni en células Snail1. En células RWP1 (panel **A derecha**) fue posible detectar un ligero aumento de la señal P-S10 en el promotor de la *CDH1* en las células RWP1 Snail1 respecto a las células control, aún así este se consideró poco significativo evaluando el porcentaje de input inmunoprecipitado. Además, el objetivo era encontrar la señal como consecuencia de la interacción Snail1/ Akt por lo que no esperaríamos encontrar la misma señal en las células control que en las células Snail1.

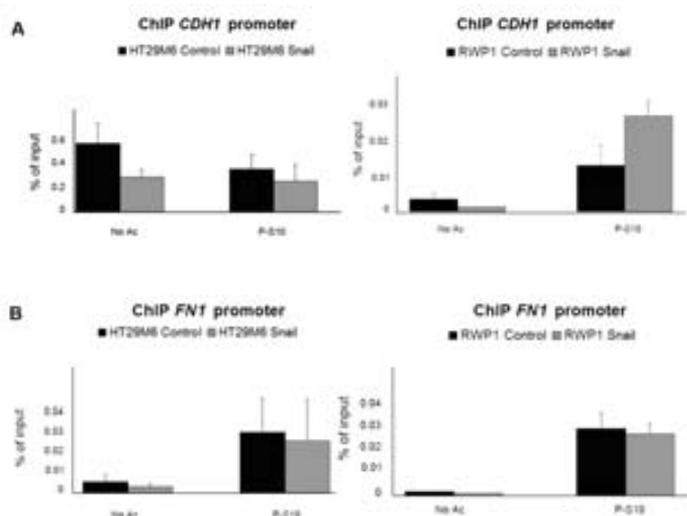


Figura R.31 La P-S10 no es consecuencia de la interacción Snail1/Akt en el promotor de la E-cadherina. A, B ChIP en el que se analizó la presencia de P-S10 sobre el promotor *CDH1* y *FN1* en las líneas celulares HT-29 M6 y RWP1 control y Snail1 crecidas 48 h sin suero. P-S10 fue inmunoprecipitado de cromatinas provenientes de estas líneas celulares con el anticuerpo anti-P-S10. La región -178/+92 del promotor *CDH1* se amplificó por PCR-cuantitativa con oligonucleótidos específicos. El panel B muestra los resultados obtenidos para la región -375/-320 del promotor *FN1*. Como control negativo se utilizó la cantidad de DNA inmunoprecipitada sin presencia de anticuerpo (No Ac). Los resultados que se muestran en la gráfica representan el porcentaje de input inmunoprecipitado en cada caso (cantidad de promotor inmunoprecipitada respecto a la cantidad de DNA inicial).

En cuanto a la presencia de esta marca en el promotor de la *FN1*, **panel B** de la figura, la P-S10 apareció tanto en las células control como en las células Snail1 y en ambas líneas celulares por lo que no parecía una marca característica de promotores controlados por Snail1.

También se determinó la presencia de la P-S28 en el promotor *CDH1* y *FN1* de cromatinas HT-29 M6 y RWP1 control y Snail1. Cromatinas de células HT-29 M6 y RWP1 control y Snail1 crecidas durante 48 h sin suero, fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-P-S28. Como muestra la **figura R.32 panel C y D izquierda** en las células HT-29 M6 no se detectó señal específica en ninguno de los promotores analizados. En células RWP1, tampoco la P-S28 parecía consecuencia de la interacción Snail1/ Akt en el promotor de la E-cadherina ya que no se detectó esta marca en las células Snail1. En el caso del promotor de la Fibronectina si se detectó la señal en las células Snail1 pero teniendo en cuenta el porcentaje de input inmunoprecipitado, no se consideró significativo.

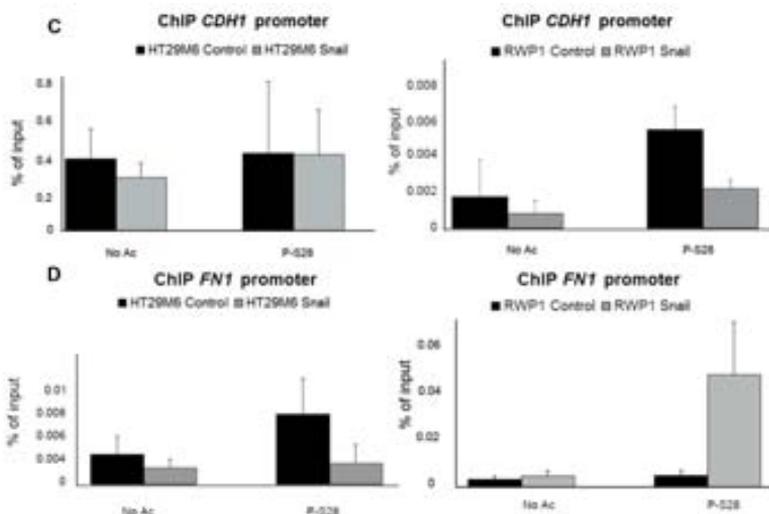


Figura R.32 La P-S28 tampoco es consecuencia de la interacción Snail1/Akt en el promotor de la E-cadherina. C, D ChIP en el que se analizó la presencia de P-S28 sobre el promotor *CDH1* y *FN1* en las líneas celulares HT-29 M6 y RWP1 control y Snail1 crecidas 48 h sin suero. P-S28 fue inmunoprecipitado de cromatinas provenientes de estas líneas celulares con el anticuerpo anti-P-S28. La región -178/+92 del promotor *CDH1* se amplificó por PCR-cuantitativa con oligonucleótidos específicos. El panel D muestra los resultados obtenidos para la región -375/-320 del promotor *FN1*. Como control negativo se utilizó la cantidad de DNA inmunoprecipitada sin presencia de anticuerpo (No Ac). Los resultados que se muestran en la gráfica representan el porcentaje de input inmunoprecipitado en cada caso (cantidad de promotor inmunoprecipitada respecto a la cantidad de DNA inicial).

RESUMEN

En este capítulo se ha demostrado que Snail1 interacciona mayoritariamente con el Akt nuclear y que esta interacción puede darse a nivel del promotor de la *CDH1*. El reclutamiento de Akt al promotor *CDH1* es independiente de la presencia de Snail1. También se demuestra que la actividad quinasa de Akt es necesaria para la represión de la E-cadherina por Snail1 en células RWP1. Se descartan la fosforilación en la S10 y en la S28 de la histona H3 como resultado de la interacción Snail1/ Akt en el promotor de la E-cadherina y como marcas epigenéticas de genes regulados por Snail1.

R.4. Akt2, pero no Akt1, interacciona con Snail1. Roles distintos para las isoformas Akt1 y Akt2 en los cambios moleculares inducidos por Snail1 en las células HT-29 M6.

R.4.1 Akt2 interacciona con Snail1 en el promotor de la E-cadherina.

Akt se encontraba unida al promotor de la E-cadherina en igual proporción en células control y en células Snail1. Como se ha mencionado en la introducción (1.4.2) recientemente se han descrito funciones opuestas para Akt1 y Akt2 en cuanto a la regulación de la movilidad celular y aparición de metástasis [272] que depende principalmente del tipo celular estudiado. Teniendo en cuenta estos datos se quiso comprobar cuál era la isoforma de Akt que interaccionaba con Snail1 y, en consecuencia, cuál era la isoforma de Akt que aparecía unida al promotor de la E-cadherina en células control y células Snail1. Los sistemas celulares en los que se centró el estudio fueron células RWP1 y células HT-29 M6. La expresión de Akt3 es mayoritaria en el sistema nervioso, por lo que ésta isoforma fue inicialmente descartada.

Se ha propuesto que la localización de las isoformas de Akt puede actuar como mecanismo de regulación de la selectividad de su función [273]. Como primera aproximación, para poder estudiar qué isoforma de Akt era la que interaccionaba con Snail1 se analizó por inmunofluorescencia la distribución de Akt1 y de Akt2 en células RWP1 y en células HT29-M6, control y Snail1. Las células antes de ser fijadas fueron tratadas con el tampón CSK. Como muestra la **figura R.33**, las células que expresaban de una manera estable Snail1 (panel inferior) presentaron más Akt1 en el núcleo que las células control (panel superior). Esto ocurrió en la línea celular RWP1. En las células HT29-M6 la expresión de Snail1 mostró una distribución nuclear de Akt1 diferente que en las células control. Como se observa, Akt1 en las células HT29-M6 control se concentró en los nucléolos. Sin embargo en las células Snail1, Akt1 presentó una distribución más punteada por todo el núcleo. En cuanto a Akt2, la expresión de Snail1 no alteró la distribución nuclear de esta isoforma de Akt en las células RWP1 sin embargo, en las células HT29-M6 en las que las células control presentaron una distribución nuclear de Akt2 excluida de los nucleolos, la expresión de Snail1 provocó una distribución nuclear homogénea de Akt2. Este resultado

indica que Snail1 moviliza o cambia la distribución nuclear de ambas isoformas de Akt.

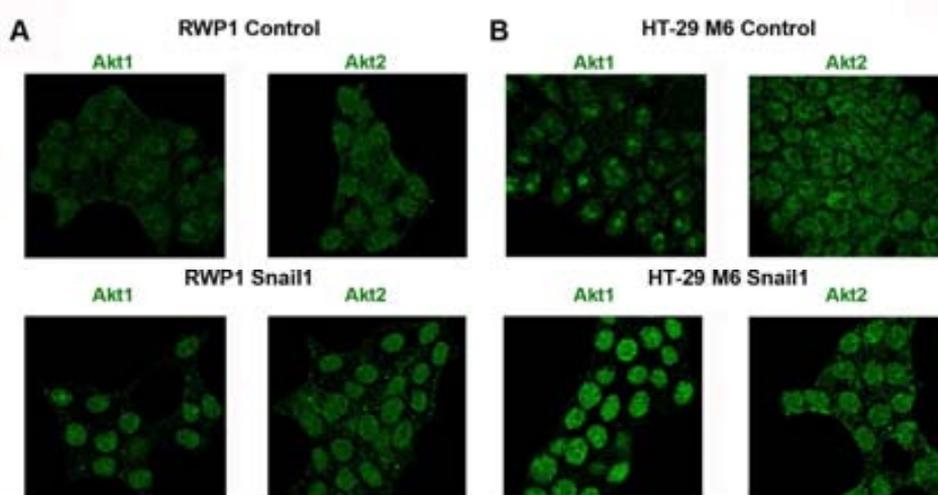


Figura R.33 Células que expresan Snail1 presentan más Akt1 y Akt2 nuclear. A Inmunofluorescencia de Akt1 y Akt2 en células RWP1 control y Snail1 tratadas con el tampón CSK antes de ser fijadas. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo contra *rabbit* conjugado con el fluorocromo verde Alexa 488. **B** Inmunofluorescencia de Akt1 y Akt2 en células HT29-M6 control y Snail1 tratadas con el *tampón* CSK antes de ser fijadas. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo contra *rabbit* conjugado con el fluorocromo verde Alexa 488.

Para corroborar el resultado obtenido por inmunofluorescencia se realizó un fraccionamiento subcelular (**M.M.6.1.3**) en el que se separó la cromatina del resto de compartimentos subcelulares en células RWP1 y HT-29 M6, control y Snail1. La distribución de Akt1 y de Akt2 se analizó por *western-blot*. Como muestra la **figura R.34**, las células HT29 M6 (A) y las células RWP1 (B) transfectada con Snail1 mostraron una mayor proporción de Akt1 y de Akt2 en la fracción cromatídica (comparar carril 2 con el 4 dentro de cada línea celular). Obsérvese, que esta fracción apareció limpia de contaminación de las otras fracciones (en la figura ver marcadores de los diferentes compartimentos). Estos datos junto con los obtenidos por inmunofluorescencia sugieren una acción de Snail1 sobre ambas isoformas de Akt movilizándolas a la fracción cromatídica.

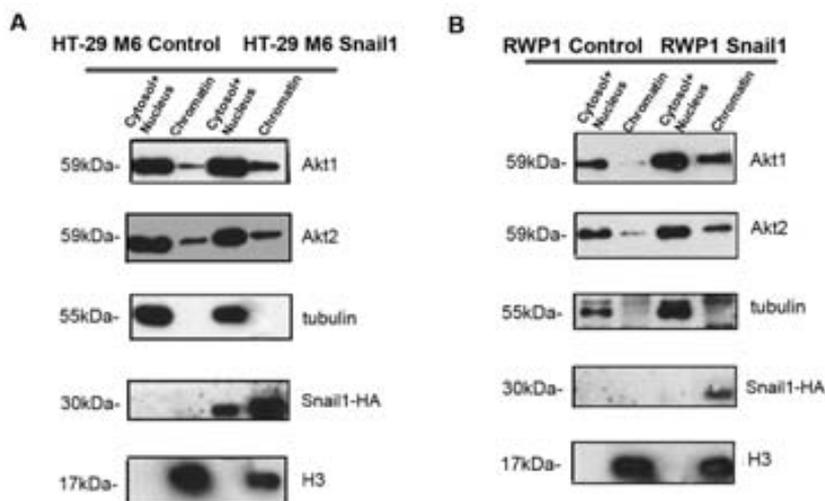


Figura R. 34 Las células que expresan Snail1 presentan más Akt1 y Akt2 en la fracción cromatídica que las células control. **A, B** Subfraccionamiento celular (**M.M.6.1.3**) de células RWP1 y HT-29 M6 control y Snail1. Se separaron citosol y núcleo de cromatina. Se cargó un volumen igual para cada compartimento en un gel de poliacrilamida. Se analizó por *Western-blot* la distribución de Akt1 y Akt2 con los anticuerpos específicos rabbit anti-Akt1 y anti-Akt2 (cell signaling). El marcador de cromatina (histona H3) y el citosólico (α -tubulina), se utilizaron para normalizar las diferentes condiciones como para corroborar, la ausencia de contaminación entre compartimentos.

Con los resultados que se muestran en las **figuras R.33 y R.34** podemos suponer que Snail1 puede interactuar tanto con Akt1 como con Akt2. Esto fue confirmado por ensayos de coimmunoprecipitación en el caso de las células RWP1, pero en el caso de células MiaPaca2 y células SW620 (sistemas que expresan niveles altos de Snail1 endógeno) se obtuvo un resultado diferente.

Células RWP1 WT fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido que expresaba Snail1-HA o con el vector vacío pcDNA. Después de 48 h de expresión se lisaron las células (**M.M.6.1.2 tampón IP**). Una cantidad de estos lisados fue incubada con el anticuerpo anti-HA que reconocía el Snail1-HA expresado ectópicamente. En los inmunocomplejos obtenidos se analizó la presencia de Akt1 y de Akt2 por *western-blot*.

Como muestra la **figura R.35 A**, tanto Akt1 como Akt2 coimmunoprecipitaron con Snail1-HA en estas células, aunque la interacción fue mayor con Akt2 (comparar porcentaje de input, carril 2, de ambas isoformas con la señal de la IP, carril 3). En cambio, cuando se quiso comprobar la coimmunoprecipitación Snail1/ Akt1 y Snail1/ Akt2 con las proteínas endógenas (**panel B**) mediante extractos enriquecidos en

habíamos comprobado la presencia de Akt (**figura R. 25**). La cromatina de células RWP1 y de células HT-29 M6 control y Snail1 fue incubada con los anticuerpos específicos Akt1 y Akt2. Como control negativo se incubó la misma cantidad de cromatina en ausencia de anticuerpo. El DNA inmunoprecipitado fue amplificado por PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos de la región de interés -178/+92 en *CDH1* (**figura R.36 A**) y por PCR semicuantitativa (**figura R.36 B**).

El fragmento del promotor *CDH1* analizado apareció en la fracción inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-Akt1 en las células control. Sin embargo, en las células que expresaban Snail1 el fragmento del promotor *CDH1* apareció en la fracción inmunoprecipitada con el anticuerpo específico para Akt2. Por lo tanto, en las células control la isoforma que apareció unida en la región estudiada fue la isoforma Akt1; en cambio, en presencia de Snail1, la isoforma que se reclutó al promotor *CDH1* fue la isoforma Akt2. Este resultado indica que Snail1 provoca un cambio de isoforma de Akt en el promotor de la E-cadherina. El **panel B** muestra el análisis de la cromatina por PCR semicuantitativa confirmando el resultado ya que se observó más producto de PCR de la región estudiada en las células control, en el DNA inmunoprecipitado con Akt1 y en las células Snail1, en el DNA inmunoprecipitado con Akt2.

Por lo tanto, se puede concluir que la isoforma de Akt que interacciona con Snail1 a nivel del promotor de la *CDH1* es la isoforma Akt2. Como se puede observar, las diferencias de unión de ambas isoformas al promotor *CDH1* fueron más marcadas en las células HT-29 M6 que en las células RWP1. Esto podía ser explicado porque las células RWP1 control, a diferencia de las HT-29 M6, presentan expresión basal de Snail1 endógeno. Así pues, es posible que en las células RWP1 control ya exista Snail1 unido al promotor de la E-cadherina e interaccionando con la isoforma Akt2.

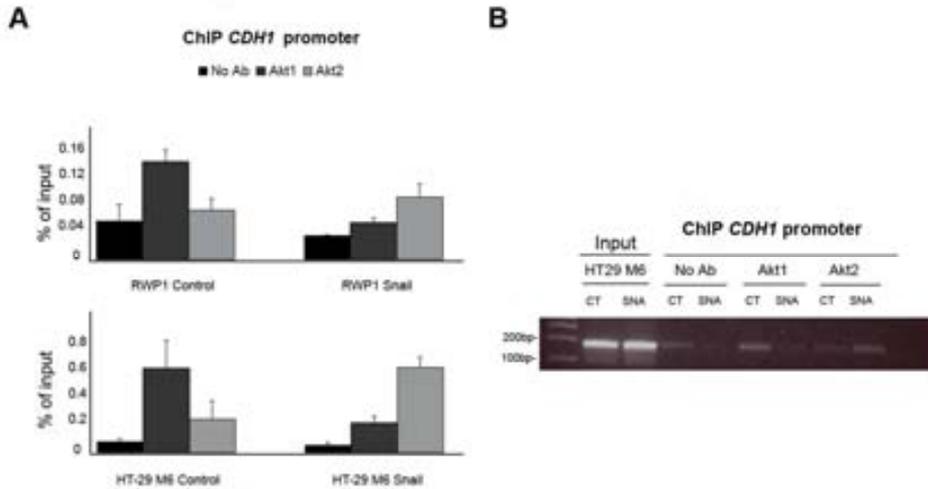


Figura R.36 Snail1 provoca un cambio de isoforma de Akt en el promotor de la E-cadherina en células RWP1 y HT-29 M6 A. ChIP en el que se analizó la presencia de Akt1 y Akt2 en el promotor *CDH1* en las líneas celulares HT-29 M6 y RWP1 control y Snail1. Akt1 fue inmunoprecipitado de cromatinas procedentes de estas líneas celulares con el anticuerpo anti-Akt1 total y Akt2 fue inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-Akt2 total. La región -178/+92 del promotor *CDH1* se amplificó por PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos. Como control negativo se utilizó la cantidad de DNA inmunoprecipitada sin presencia de anticuerpo (No Ab). Los resultados que se muestran en la gráfica representan la media de los porcentajes de input inmunoprecipitados en cada caso (cantidad de promotor inmunoprecipitado respecto a la cantidad de DNA inicial) de al menos tres experimentos. **B** Mismo ChIP donde la región del promotor *CDH1* fue analizada por PCR semicuantitativa.

Se quiso estudiar si el reclutamiento de la isoforma Akt2 al promotor de la E-cadherina en las células Snail1 era un mecanismo específico de este promotor o existía también a nivel de otros promotores regulados por Snail1, como el de *FNI* (el cual es activado por Snail1 [245], [85], [154]) o el de *PTEN* (el cual es reprimido por Snail1 [173]).

La región del promotor *FNI* a la que se une *in vivo* Snail1 es la -36/+265 [245]. Para estudiar si Akt se unía al promotor de la Fibronectina se utilizaron dos parejas de oligonucleótidos (**Tabla M.M.14**). Como se observa en la **figura R.37**, ninguna de las dos isoformas de Akt se detectó en el promotor de la Fibronectina ya que no se observó unión específica. En la gráfica se representa el resultado obtenido con los oligonucleótidos que amplifican la región -375/-320. Aunque no se muestran, los mismos resultados negativos se obtuvieron para la región -37/+116.

Se analizó la presencia de Akt1 o de Akt2 en el promotor de *PTEN* en células RWP1 control y Snail1. La región estudiada fue -370/-135 donde se unía Snail1 [173]. Como se muestra en la **figura R.37 C** la secuencia de *PTEN* estudiada tampoco se detectó en la fracción precipitada ni con Akt1 y ni con Akt2 en ambas líneas celulares.

Por lo tanto en este punto podíamos concluir que Snail1 interacciona con Akt2, que esta interacción puede tener lugar en el promotor *CDH1* pero no en otros promotores reprimidos como *PTEN* o activados como *FN1*.

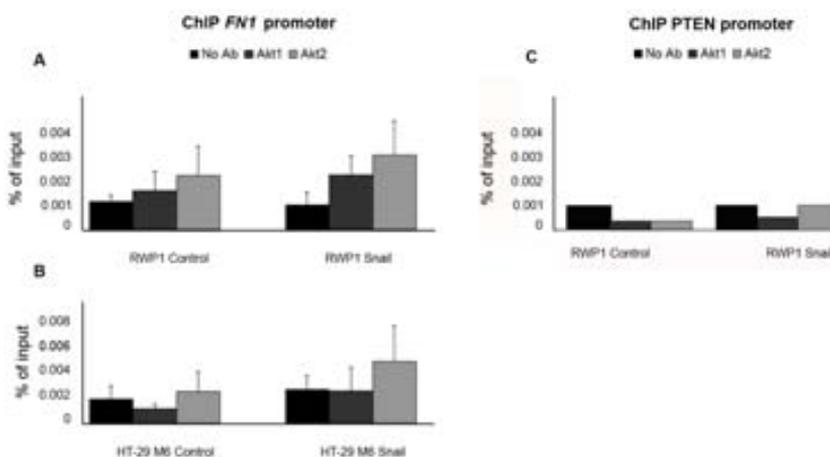


Figura R.37 Ni Akt1 ni Akt2 son reclutadas al promotor de la Fibronectina. ChIP en el que se analizó la presencia de Akt1 y Akt2 sobre el promotor FN1 en las líneas celulares RWP1 (A) y HT29 M6 control y Snail1 (B). Akt1 fue inmunoprecipitado de cromatinas provenientes de estas líneas celulares con el anticuerpo anti-Akt1 y Akt2 fue inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-Akt2. La región -375/-320 del promotor *FN1* se amplificó por PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos. Como control negativo se utilizó la cantidad de DNA inmunoprecipitada sin presencia de anticuerpo (No Ab). Los resultados que se muestran en la gráfica representan la media de los porcentajes de input inmunoprecipitados en cada caso (cantidad de promotor inmunoprecipitada respecto a la cantidad de DNA inicial) de al menos tres experimentos. El panel C muestra el ChIP sobre el promotor de *PTEN* efectuado de la misma forma que en A y B.

R.4.2 Akt1 y Akt2 cooperan con Snail1 en la regulación de la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales en las células RWP1. Sin embargo, en células HT-29 M6 las dos isoformas juegan papeles distintos: Akt1 es pro-epitelial y Akt2 pro-mesenquimal.

Con el objetivo de encontrar la funcionalidad de la interacción Snail1/ Akt2 en el promotor de la E-cadherina y de identificar cual de las dos isoformas cooperaba con Snail1, se trató de estudiar el papel que jugaban Akt1 y Akt2 en la expresión de

diferentes genes regulados por Snail1, como la E-cadherina y la Fibronectina. Teniendo en cuenta que el mutante *kinase dead* podría ser no específico por la similitud de secuencia entre las diferentes isoformas, se planteó determinar la función de cada isoforma mediante el uso de *shRNA* específicos para Akt1 y para Akt2. Células RWP1 control y Snail1 fueron infectadas con vectores lentivirales que codificaban *shRNA* para Akt1 y para Akt2 (**M.M.4**). Se interfirió cada isoforma por separado. Se confirmó que la interferencia de ambas isoformas era estable al menos dos semanas (no se muestra el dato).

En la **figura R.38 A** se muestran los niveles de interferencia de Akt1 y de Akt2, después de 48 h de ser infectadas. Los shAkt1 y shAkt2 redujeron la expresión de Akt1 y de Akt2 respectivamente (en las células control comparar carril 1 donde se infectó el shRNA control, con los carriles 2 (sh Akt1) y 3 (shAkt2) y en las células Snail1 el carril 4 con el 5 y el 6). Los shRNA fueron específicos ya que cada shRNA no afectó los niveles de la otra isoforma. Además de analizarse por *western-blot* los niveles de Akt1 y de Akt2 se analizaron los niveles de Snail1-HA ya que al interferir de Akt pueden alterarse los niveles del factor de transcripción [146]. Como muestra la **figura R.38**, los niveles de Snail1 sólo se vieron afectados y, sólo muy ligeramente, por la interferencia de la isoforma Akt1 (compárese los niveles de Snail1 en la condición shAkt1 con la condición shcontrol).

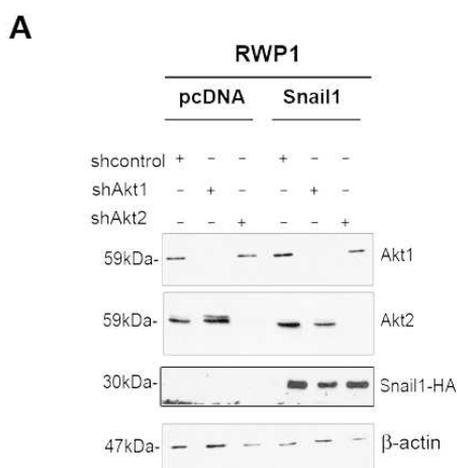


Figura R.38 Western-blot mostrando la interferencia de Akt1 y Akt2. Células RWP1 control y Snail1 fueron infectadas con un shRNA irrelevante o con una mezcla de cinco shRNA específicos para Akt1 o para Akt2 (**M.M.4**). Se cargó una muestra de extractos totales (SDS 1%) de estas células, en un gel de poliacrilamida y se analizó Akt1 y Akt2 por *western-blot* con sus anticuerpos específicos. La β-actina fue utilizada como control de carga.

Se extrajo el RNA de estas células infectadas y se analizaron los mRNA de E-cadherina, y Fibronectina por PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos (**M.M.11**). En la **figura R.39** se muestran los niveles de mRNA de estos genes en las células RWP1 Snail1, comparándolos con los niveles detectados en las células control shcontrol.

Se puede observar como células que expresaban de manera estable Snail1 e infectadas con el shcontrol mostraron menos mRNA de E-cadherina (gráfico izquierda) que las células control indicando que el shcontrol no interfiere en la función represora de Snail1. Sin embargo en ausencia de Akt1 y de Akt2, las células Snail1 presentaron los mismos niveles de mRNA de E-cadherina que las células control shAkt1 y shAkt2 sugiriendo que ambas isoformas son necesarias en la represión de la E-cadherina por Snail1.

En cuanto a la Fibronectina (gráfico derecha), los resultados por PCR cuantitativa mostraron como Snail1 activó la expresión de este gen. En cambio, cuando se interfirió tanto Akt1 como Akt2 la activación de Fibronectina por Snail1 no fue tan eficiente evidenciando que para este gen también existe una cooperación entre Snail1 y Akt aunque no sería consecuencia de la presencia de ambas proteínas en el promotor *FN1* (ver **figura R.37**).

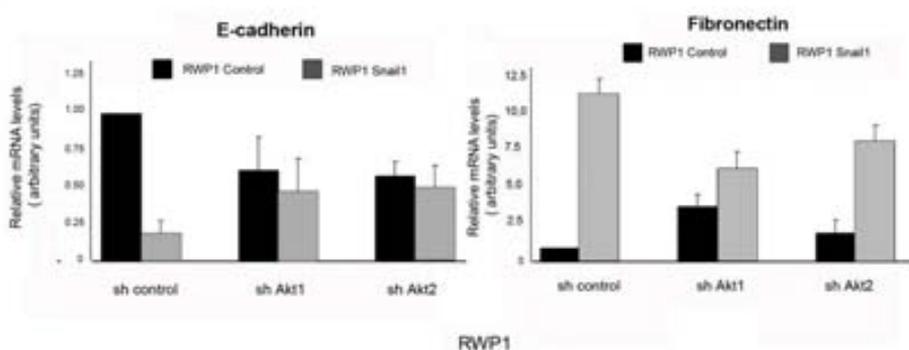


Figura R.39 La interferencia tanto de Akt1 como de Akt2 impide la represión de la E-cadherina y la completa activación de la Fibronectina por Snail1. PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de E-cadherina (izquierda) y de Fibronectina (derecha) en clones RWP1 Snail1 y control después de infectarlos con shcontrol o con shAkt1 o con shAkt2. Los oligonucleótidos utilizados para cada mRNA se detallan en **M.M.11**. Pumilio fue utilizado como control interno. Los valores están referidos a los valores obtenidos para los mRNAs en las células control o Snail1 interferidas con el shRNA irrelevante.

Teniendo en cuenta que la interferencia de Akt1 reducía ligeramente los niveles de Snail1, no se podía descartar que ésta fuera la causa de menos eficiencia en la represión de la E-cadherina y en la activación de la Fibronectina por Snail1 en las células shAkt1. En cambio, la interferencia de Akt2 no alteraba los niveles de Snail1 (ver **figura R.38**), por lo que podría intervenir directamente en la función represora de Snail1 sobre la E-cadherina y para la función activadora de Snail1 sobre la Fibronectina.

Se procedió a estudiar otro sistema celular, las HT-29 M6. Esta línea celular a diferencia de la línea RWP1, no expresan Snail1 endógeno y muestran claramente una *EMT* por expresión ectópica de Snail1. Además, y como muestra la **figura R.36**, el cambio de isoforma a nivel del promotor de la E-cadherina por Snail1 es más evidente.

Se infectaron células HT-29 M6 con los shRNA de Akt1 y de Akt2. Como muestra la **figura R.40** después de 48 h de ser infectadas, los shAkt1 y shAkt2 redujeron la expresión de Akt1 y de Akt2 respectivamente y el shcontrol no afectó la expresión de estas quinasas. Al igual que en las células RWP1, la interferencia de Akt1 pero no la de Akt2 disminuyó los niveles de Snail1.

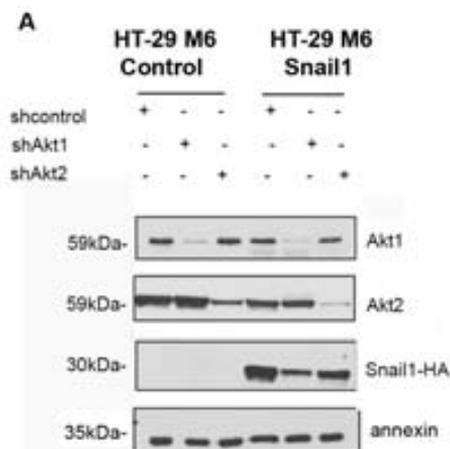


Figura R.40 Western-blot mostrando la interferencia de Akt1 y Akt2. Células HT-29 M6 control y Snail1 fueron infectadas con un shRNA irrelevante o con una mezcla de cinco shRNA específicos para Akt1 o para Akt2 (**M.M.4**). Se cargó una muestra de extractos totales (SDS 1%) de estas células, en un gel de acrilamida y se analizó Akt1 y Akt2 por *western-blot* con sus anticuerpos específicos. La annexina (RWP1) fue utilizada como control de carga.

Se analizaron por PCR cuantitativa los niveles de mRNA de E-cadherina, Fibronectina y Lef1 (gen activado también por Snail1 [154] durante la *EMT*) de células HT-29 M6 Snail1 infectadas con los shAkt1 y shAkt2 comparándolos con los de las células control sh control.

Como muestra la **figura R.41 A**, la interferencia de ambas isoformas no tuvo ningún efecto sobre la expresión de estos marcadores en las células control. En el caso de las células Snail1, solo la expresión de este factor de transcripción provocó una reducción de la expresión de la E-cadherina y una activación de la Fibronectina y Lef-1. Cuando se compararon los niveles de mRNA de estos marcadores en las células Snail1 shcontrol con los de las células Snail1 donde se interfirió la isoforma Akt1, la interferencia de Akt1 aumentó aún más la represión de la E-cadherina (**panel A gráfico arriba izquierda**), la activación de Fibronectina (**panel A gráfico abajo izquierda**) y la activación de Lef-1 (**panel A gráfico arriba derecha**). Además, estos cambios se mostraron a nivel de proteína (**figura R.41 B** comparar carril 3 con el 4 en todas las señales). En consecuencia, en estas células la reducción de Akt1 incrementa los cambios en la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales producidos por Snail1 asociados al fenómeno *EMT*. Nótese que estos efectos tuvieron lugar aún existiendo menos niveles de Snail1 (ver **figura R.40**). Estos resultados sugieren un papel pro-epitelial para Akt1 en la línea celular HT29 M6 Snail1.

La interferencia de la isoforma Akt2 en las células Snail1 redujo los niveles de mRNA de Lef-1 hasta un 50% cuando se compararon con las células Snail1 infectadas con el shcontrol, lo mismo se detectó a nivel proteína. En cambio, la interferencia de Akt2 no tuvo ningún efecto sobre la represión de la E-cadherina ni sobre la activación de la Fibronectina por Snail1.

Por lo tanto, la contribución de Akt2 no es tan clara como la de Akt1. En primer lugar, su interferencia sólo afecta a la activación de Lef-1 por Snail1 lo que sugiere que la expresión de Akt2 es necesaria para la activación de este marcador mesenquimal por Snail1.

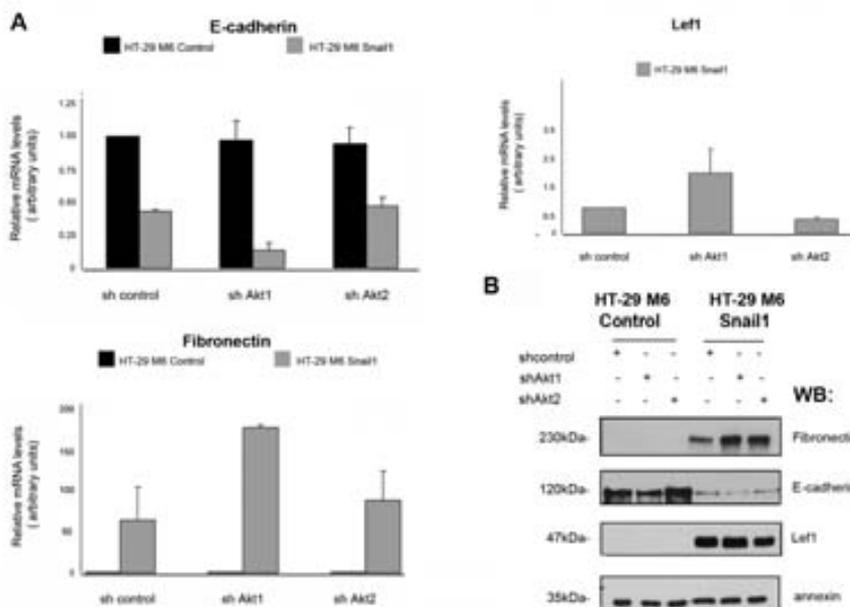


Figura R.41 La interferencia de Akt1 incrementa los cambios moleculares provocados por Snail1 en células HT-29 M6 **A.** PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de E-cadherina (izquierda arriba) de Fibronectina (izquierda a bajo) y de Lef-1 (derecha arriba) en clones HT-29 M6 Snail1 y control después de infectarlos con shcontrol o con shAkt1 o con shAkt2. En la gráfica se representan la media de al menos tres experimentos. Pumilio fue utilizado como control interno. Los valores están referidos a los valores obtenidos para los mRNAs en las células control o Snail1 interferidas con el shRNA irrelevante. **B.** Extractos totales (SDS 1%) de estas células fueron cargados en un gel y los niveles de Fibronectina, E-cadherina y Lef1 fueron analizados con sus respectivos anticuerpos específicos. Annexin-AII fue utilizada como control de carga.

Estos resultados sugieren que no hay redundancia de función entre Akt1 y Akt2 ya que no se obtuvieron los mismos efectos al interferirlas. Para acabar de comprobarlo, se analizó si en los efectos observados al interferir Akt1 participa o no Akt2. Para ello, células HT-29 M6 Snail1 fueron infectadas con una mezcla de lentivirus que codifican para shRNA Akt1 y shRNA Akt2.

La interferencia de Akt1 y de Akt1+Akt2 fue confirmada por *western-blot*. Cuando se compararon los carriles 3 y 6 de la **figura R.42 panel B**, se observó que la interferencia de ambas isoformas a la vez fue similar en las dos líneas celulares. Se procedió a analizar mediante PCR cuantitativa los niveles de mRNA de E-cadherina, Fibronectina y Lef-1. Como se observa en la figura, la interferencia de Akt2 bloqueó el incremento en la expresión de Fibronectina (**figura R.42** abajo izquierda) y de Lef-1 (**figura R.42** arriba derecha) como consecuencia de la reducción de Akt1 lo que

sugiere que Akt2 participa en el aumento de expresión de estos marcadores mesenquimales por interferencia de Akt1. Así que, Akt2 presenta un papel promesenchimal en este escenario. A la vez, este resultado demuestra que las dos isoformas tienen funciones diferentes pero evidencia una interregulación entre ellas. Inesperablemente, la reducción de Akt2 incrementó el efecto represor de la E-cadherina (**figura R.42** arriba izquierda) como consecuencia de la reducción de Akt1 indicando que, la interferencia de ambas isoformas a la vez provoca una mayor represión de la E-cadherina en células Snail1.

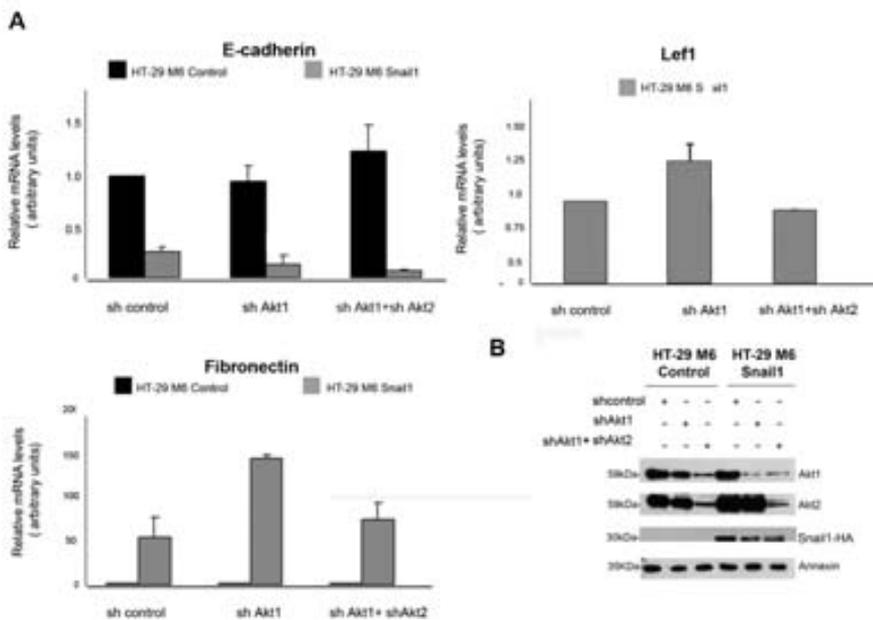


Figura R.42 La expresión de Akt2 es necesaria para la activación de marcadores mesenquimales como consecuencia de la interferencia de Akt1. La interferencia de las dos isoformas causa una mayor represión de la E-cadherina. **A** PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de E-cadherina (izquierda arriba) de Fibronectina (izquierda a bajo) y de Lef-1 (derecha arriba) en clones HT-29 M6 Snail1 y control después de infectarlos con shcontrol o con shAkt1 o simultáneamente con el shAkt1 y shAkt2. Los oligonucleótidos utilizados para cada mRNA se detallan en **M.M.11**. En la gráfica se representan las medias de al menos tres experimentos. Pumilio fue utilizado como control interno. Los valores están referidos a los valores obtenidos para los mRNAs en las células control o Snail1 interferidas con el shRNA irrelevante. **B**. Extractos totales (SDS 1%) de estas células fueron cargados en un gel poliacrilamida y los niveles de Akt1, Akt2 y Snail1-HA fueron analizados con sus respectivos anticuerpos específicos. Annexina fue utilizada como control de carga.

Este aumento en la represión de la E-cadherina puede ser debido a la expresión de otro represor de este gen como Zeb1 (**I.2.2.1**). Snail1 induce la expresión de

Zeb1 [154], [274], el cual también se une a las cajas E presentes en el promotor *CDH1* [87, 275] y lo reprime. Se examinaron los niveles de Zeb1 en las células HT-29 M6 Snail1 donde las isoformas fueron interferidas separadamente.

Como muestra la **figura R.43 A y B** Snail1 indujo la expresión de Zeb1 tanto a nivel mRNA como a nivel proteína. La interferencia de la isoforma Akt2, no alteró la activación de Zeb1 por Snail1. Sin embargo, la interferencia de la isoforma Akt1 en estas células aumentó hasta 4 veces la expresión de Zeb1 y esto correlacionó con un aumento a nivel proteína. Por tanto, la mayor represión de la E-cadherina que se detecta al interferir Akt1 puede ser consecuencia de un aumento en la expresión del factor de transcripción Zeb1.

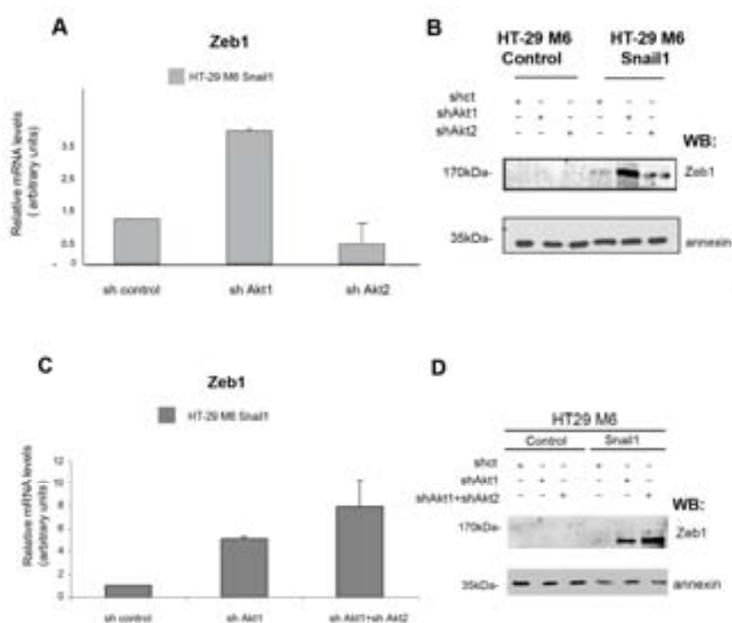


Figura R.43 La interferencia de Akt1 y de ambas isoformas a la vez, aumenta la expresión de Zeb1. **A** PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de Zeb1 en clones HT-29 M6 Snail1 y control después de infectarlos con shcontrol (shct) o con shAkt1 o el shAkt2. Los oligonucleótidos utilizados para el mRNA de Zeb1 se detallan en (M.M.11). En la gráfica se representan las medias de al menos tres experimentos. Pumilio fue utilizado como control interno. Los valores están referidos a los valores obtenidos para el mRNA de Zeb1 en las células Snail1 interferidas con el shRNA irrelevante. **B** Extractos totales (SDS 1%) de estas células fueron cargados en un gel y se analizaron los niveles de Zeb1 por *western-blot*. Annexin-AII fue utilizada como control de carga. **C** Se muestran los niveles de mRNA de Zeb1 en clones HT-29 M6 Snail1 y control después de infectarlos con shcontrol o con shAkt1 o la suma de shAkt1 y shAkt2. **D** Extractos totales (SDS 1%) de células HT29 M6 fueron cargados en un gel y los niveles de Zeb1 por *western-blot*. Annexin-AII fue utilizada como control de carga.

Para averiguar si Akt2 era requerida en la activación de Zeb1 cuando se interfería Akt1, los niveles de mRNA y proteína de Zeb1 fueron analizados en células HT-29 M6 Snail1 donde habían sido interferidas tanto Akt1 como Akt2. Como muestra la gráfica **C** la interferencia de ambas isoformas incrementó aún más la expresión de Zeb1 y esto correlacionó con un incremento en los niveles de proteína (panel **D**) sugiriendo que, la interferencia de ambas isoformas tiene un efecto sinérgico sobre la activación de Zeb-1.

Este resultado impidió saber si Akt coopera con Snail1 en la represión de la E-cadherina, ya que la represión de la E-cadherina en ausencia de Akt1 o de las dos isoformas Akt1+Akt2 en células HT-29 M6 que expresaban establemente Snail1, probablemente, está controlada por Zeb1.

Para asegurar que los efectos observados eran consecuencia de Akt1 y de Akt2, se analizaron los niveles de Akt3 mediante *western-blot* en las mismas células donde previamente habíamos interferido las otras isoformas. Como se observa en la **figura R.44**, no se detectó expresión de Akt3 lo que sugiere que esta isoforma de Akt no interviene en la regulación de genes por Snail1.

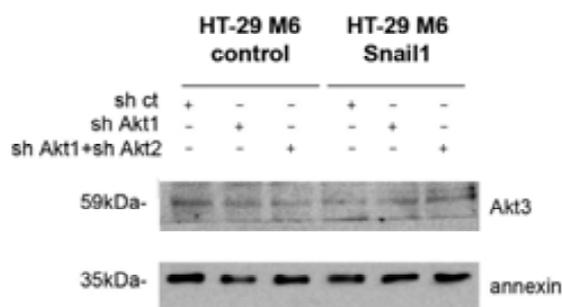


Figura R.44 La interferencia de Akt1 o de Akt1 y Akt2 conjuntamente no afecta a la expresión de Akt3. Extractos totales (SDS 1%) de células HT-29 M6 Snail1 y control infectadas con shcontrol (sh ct) o con shAkt1 o el shAkt2. Se analizaron por *western-blot* los niveles de Akt3 con el anticuerpo *rabbit* anti-Akt3 (*Cell signaling*). La annexina fue utilizada como control de carga.

Previamente (**figura R.28**) se han mostrado datos que indican que la actividad quinasas de Akt es necesaria para la represión de la E-cadherina por Snail1. Se comprobó como afectaba la interferencia de las isoformas a la activación global de Akt analizando los niveles de P-S473 en células HT-29 M6 infectadas con shAkt1 y

shAkt2 por separado (**figura R.45 izquierda**) y conjuntamente (**figura R.45 derecha**).

Como muestra la **figura R.45** la única señal de fosfo-Akt que se detectó fue en las células Snail1. La señal de P-S473 se normalizó con la señal de Akt total. Aunque los niveles de Akt total disminuyeron marcadamente cuando se interfirió Akt1, esta disminución apenas afectó los niveles de P-S473 (panel izquierdo comparar carril 5 y 6 células Snail1). En el caso de la señal de P-S473 en las células donde fue interferido Akt2 la disminución fue nula, al igual que la disminución de la señal de Akt total. Esto indica que la isoforma más abundante en estas células es Akt1. Sólo se detectó una clara disminución de la P-S473 cuando ambas proteínas fueron interferidas a la vez (panel derecho carril 6). Por lo tanto e inesperadamente, después de interferir las isoformas, la activación total de Akt apenas se ve afectada

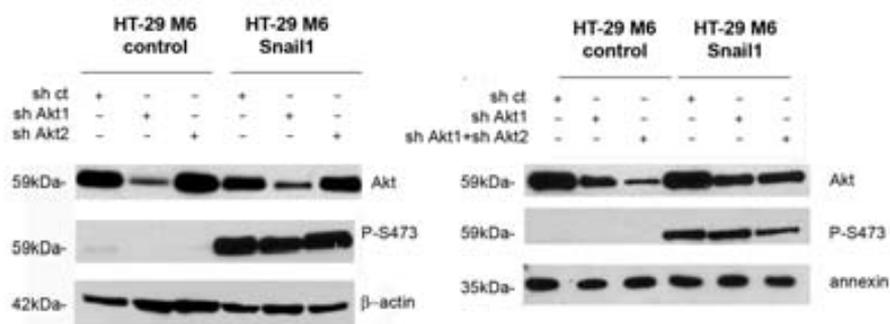


Figura R.45 La interferencia de Akt apenas disminuye los niveles de Akt activa. Extractos totales (SDS 1%) de células HT-29 M6 Snail1 y control infectadas con shcontrol (shct) con shAkt1 o el shAkt2 o ambos a la vez. Se analizaron por *western-blot* los niveles de P-S473 y los niveles de Akt total. La β-actina y la annexin-AII fueron utilizados como control de carga.

Este dato planteó la cuestión de cual era la isoforma responsable de mantener la activación de Akt después de interferir Akt1 o Akt2 o las dos. No se puede descartar que haya una relación entre Akt1 y Akt2 en la que cuando una es interferida la otra se hiperactive ya sea por interacción directa con Snail1 o por otras vías. Incluso podría ser que los efectos observados no dependan de la expresión ni de la activación de Akt sino del balance entre Akt1 y Akt2. Por tanto, los datos obtenidos por los shRNA deben ser considerados con cautela ya que no se puede asumir que los resultados obtenidos al interferir una isoforma sean consecuencia directa de la actividad residual o falta de actividad de la isoforma interferida ya que

podrían ser consecuencia de la activación o participación de la isoforma de Akt no interferida o ambas acciones a la vez. Además, el hecho de que al interferir Akt1 y Akt2 se active otro represor de la E-cadherina (Zeb1) evidencia la complejidad del sistema ya que otras vías se ven afectadas.

RESUMEN

En este capítulo se ha demostrado como Snail1 moviliza tanto Akt1 como Akt2 a la fracción cromatídica de células RWP1 y células HT-29 M6. Aún así, la isoforma que interacciona con Snail1 sería Akt2. Snail1 provoca un cambio de isoforma en el promotor de la *CDH1*, siendo Akt1 la isoforma presente en las células control y Akt2 la isoforma presente en las células Snail1. En cuanto al papel de cada isoforma en la regulación de los cambios moleculares producidos por Snail1, depende de la línea celular estudiada. En células RWP1 tanto Akt1 (indirectamente) como Akt2 (directamente) cooperan en la represión de la E-cadherina y en la activación de la Fibronectina por Snail1. En células HT-29 M6, la interferencia de Akt1 provoca una mayor expresión de marcadores mesenquimales que depende de Akt2 y la interferencia de Akt1 y de ambas isoformas conjuntamente provoca una mayor expresión del factor de transcripción Zeb1 que resulta en una mayor represión de la E-cadherina.

DISCUSIÓN

***No estoy de acuerdo con lo que usted dice, pero me pelearía para que usted
pudiera decirlo***

François Marie Arouet (Voltaire)

D.1 La contribución de cada isoforma de Akt a los cambios de expresión de marcadores de la EMT inducidos por Snail1 depende del sistema celular analizado

La vía de señalización PI3K/ Akt ha sido identificada como un regulador clave de varios procesos celulares asociados al cáncer como la supervivencia, la proliferación, el crecimiento, el metabolismo, la angiogénesis y la metástasis. Recientemente se ha descrito como esta vía está alterada en gran variedad de cánceres humanos [239] de tal manera que se han detectado aumentos en la expresión e hiperactivación de Akt en cánceres de estómago, mama, próstata, colon, ovario así como en tumores cerebrales. La detección de Akt hiperactiva ha sido asociada con mal pronóstico y alta probabilidad de producir metástasis distales en pacientes con cáncer de mama [276]. Además, estudios basados en la secuenciación del genoma de cánceres humanos han identificado mutaciones de las diferentes isoformas de Akt [277], mutaciones oncogénicas en la subunidad catalítica de la PI3K [278] y mutaciones en fosfatasa de Akt como Pten [279], todas ellas resultando en la hiperactivación de la señalización a través de Akt, un aumento en la fosforilación de sus sustratos y, en consecuencia, inducción de la transformación celular, dando lugar a la tumorigénesis [280, 281].

A pesar de los numerosos estudios que han evidenciado la importancia de Akt en el cáncer y otras patologías, queda todavía por resolver la contribución de cada isoforma de Akt en los procesos biológicos regulados por ellas. Hasta hace relativamente poco y como consecuencia de la alta similitud de secuencias, se asumió que las tres isoformas actuaban de una manera redundante. En este sentido, las tres isoformas poseen la habilidad de transformar células *in vitro* [282]. Sin embargo, tanto estudios de delección genética en ratones como el uso de siRNAs, para el análisis en cultivos celulares, han revelado que a pesar de la alta similitud entre las diferentes isoformas, cada una exhibe funciones específicas. Por ejemplo, estudios recientes muestran como la movilidad celular y la metástasis son reguladas dependiendo del tipo celular, de una manera opuesta por las distintas isoformas de Akt [283, 284].

Diferentes grupos apuntan a Akt como un regulador central de varios procesos que controlan la migración invasiva incluyendo la reorganización del citoesqueleto

de actina, las uniones intercelulares, la movilidad celular y la degradación de la matriz extracelular. En este sentido, datos recogidos principalmente mediante la sobreexpresión de mutantes de Akt activados reflejan cómo Akt1 es capaz de potenciar la capacidad motriz de fibroblastos mediante la fosforilación de Girdin, proteína de unión a actina que promueve la formación de fibras de estrés y lamelipodios [285]. La señalización mediada por Akt1 también incrementa la actividad de MMP2 en células epiteliales mamarias de ratón provocando un aumento en la capacidad invasiva [286]. Igualmente, Akt1 promueve la movilidad celular y la producción de MMP9 vía NFκB en células de fibrosarcoma [287]. También se ha descrito que la expresión de un mutante de Akt1 constitutivamente activo induce la *EMT* en carcinoma de células escamosas [227]. Además, tanto Akt1 como Akt2 promueven la invasión de células procedentes de cáncer de páncreas humano incrementando la expresión del receptor de IGF-1 [288]. Por tanto, en un amplio rango de tipos celulares la señalización vía Akt está asociada con un aumento en la movilidad celular y en la invasión.

Sin embargo, en contraste con los datos mencionados anteriormente, varios estudios han demostrado un papel antimigratorio de Akt1 en líneas celulares procedentes de epitelio mamario humano. Tres estudios independientes revelaron que la sobreexpresión de Akt1 inhibía la capacidad invasiva y migratoria de varias líneas celulares derivadas de cáncer de mama, mientras que el uso de siRNA aumentaba dicha migración [234, 259, 289] (**figura D.1**). Estudios realizados en el laboratorio del Dr. Toker demuestran que el efecto inhibitorio de Akt1 en la capacidad invasiva migradora está mediado por la degradación del factor de transcripción NFAT, cuyos genes dianas están relacionados con la movilidad [290-292]. Los estudios realizados por el laboratorio de la Dra. Brugge describen cómo Akt1 inhibe la movilidad de células MCF10A que sobreexpresan IGF-IR atenuando la actividad de ERK/MAPK [234]. También muestran cómo la inhibición de Akt1 induce la *EMT* en las mismas células; sin embargo, la inhibición de ERK no impide dicha inducción, sugiriendo un efector o vía alternativa para los sorprendentes efectos del bloqueo de Akt1 sobre la *EMT*. De forma interesante, la *EMT* inducida por interferencia de Akt1 es revertida por la reducción de Akt2.

Otro mecanismo mediante el cual Akt1 podría inhibir la migración es mediante su efecto sobre el supresor de tumores TSC2. Estudios realizados por el laboratorio de la Dra. Bissell reflejan cómo la sobreexpresión de Akt1 inhibe la actividad de Rho-GTPasa y la invasión de células procedentes de cáncer de mama conjuntamente con un aumento en la fosforilación y en la degradación de TSC2 [289].

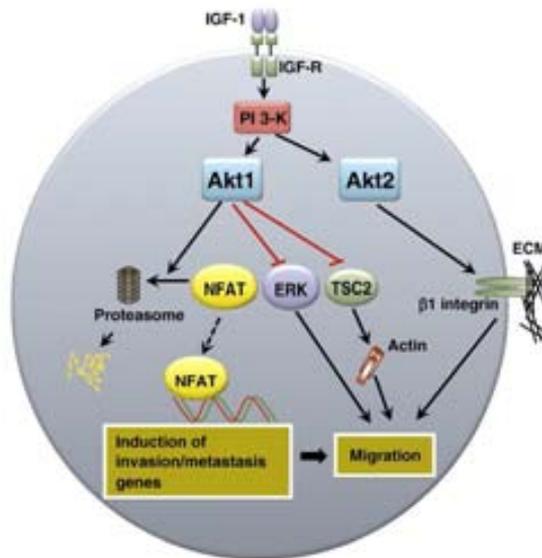


Figura D.1 Mecanismos mediados por Akt responsables de la migración de carcinomas [272]. Las células procedentes de carcinoma de mama responden a IGF-1 activando la PI3K y a su vez activando Akt1 y Akt2. Akt1 funciona como supresor de la migración mediante varios mecanismos redundantes, incluyendo la degradación de NFAT y suprimiendo la actividad de ERK y TSC2. Akt2 funciona de forma opuesta, promoviendo la migración en parte aumentando la expresión de β_1 integrinas y a través de otros mecanismos todavía no descritos [273].

Todos los resultados comentados anteriormente han sido obtenidos a partir de experimentos en líneas celulares. Últimamente, trabajos realizados en modelos animales han caracterizado aún mejor el papel de cada isoforma de Akt en el control de la génesis, la invasión y la metástasis del cáncer de mama. Muller y colegas cruzaron un modelo de ratón de cáncer de mama, el PyVmT (*polyomavirus middle T antigen*) el cual expresaba un mutante del PyVmT no acoplado a la PI3K, con ratones que expresaban un transgen codificante de Akt1 activa [293]; ambas proteínas estaban bajo el control del promotor específico de epitelio mamario MMTV. La

sobreexpresión de Akt1 aceleró la tumorigénesis mamaria proporcionando una señal antiapoptótica. Sin embargo, estos ratones no presentaron el fenotipo altamente metastásico que mostraban los ratones portadores del PyVmT WT [294]. En siguientes estudios, el mismo grupo describió cómo el modelo animal de tumorigénesis mamaria obtenido al cruzar ratones portadores del receptor tirosina quinasa ErbB2 y de Akt1 activa, ambos expresándose en el epitelio mamario del ratón, aceleraba la aparición de tumores pero suprimía la capacidad invasiva y, por lo tanto la aparición de metástasis en los tejidos subyacentes [295].

En contraste con los estudios realizados mediante la sobreexpresión de Akt1, los resultados obtenidos mediante el uso de ratones deficientes para Akt1 no han proporcionado datos consistentes. Así, mientras en un estudio muestran cómo la interferencia de Akt1 aumenta el potencial metastático e invasivo de tumores mamarios por expresión de ErbB2 [232], en otro estudio observan cómo la deficiencia de Akt1 reduce la aparición de metástasis sugiriendo un papel pro-invasivo de Akt1 [233]. Una explicación plausible para estos diferentes resultados podría ser los diferentes *backgrounds* genéticos de los ratones y de los tejidos subyacentes utilizados.

Contrariamente a los datos obtenidos con Akt1, Akt2 se caracteriza cómo la isoforma de Akt que favorecería la migración y la invasión de células procedentes de cáncer de mama. Akt2, pero no Akt1 ni Akt3, aumenta la expresión de β_1 -integrinas y promueve la adhesión y la invasión de las células cancerosas mamarias *in vitro* así cómo metástasis *in vivo* [273]. Igualmente, los estudios realizados por el laboratorio de la Dra. Brugge evidencian cómo Akt2 promueve la migración de células MCF10A que sobreexpresan IGF-IR *in vitro* y en cultivos 3D [234]. En un estudio diferente se describe cómo el aumento de expresión de Akt2 por el factor de transcripción Twist promueve invasión y migración de células procedentes de cáncer de mama [97]. Asimismo, la elevada expresión de Akt2 correlaciona con agresividad y mal pronóstico [296] jugando un papel crítico en el establecimiento de metástasis durante la progresión del cáncer de colon [297].

De todas estas observaciones se puede deducir que, tanto *in vitro* como *in vivo* Akt1 y Akt2 presentan funciones distintas en el control de la invasión y de la migración. Estas funciones parecen depender de la técnica utilizada y del

background genético. Lo que no está claro hoy en día son los mecanismos responsables de esta distinción en la función de ambas isoformas. Además, se han obtenido resultados opuestos en otros sistemas celulares como fibroblastos donde el uso de shRNA ha mostrado que, en contraste a los resultados obtenidos en cáncer de mama, Akt1 potencia la migración de estas células *in vitro* mientras Akt2 la retarda [220].

En nuestro modelo estudiamos el papel de Akt1 y de Akt2 en la *EMT* inducida por el factor de transcripción Snail1 en células epiteliales tumorales procedentes de cáncer de páncreas (RWP1) y de colon (HT29-M6). Para ello se ha analizado la contribución de cada isoforma en la represión del marcador epitelial E-cadherina y en la activación de los marcadores mesenquimales Fibronectina y Lef-1, inducidos por la expresión estable de Snail1. Al igual que lo detectado por varios grupos, se han obtenido diferentes resultados dependiendo del sistema celular utilizado. Así en el caso de las células RWP1 Snail1, la interferencia de ambas isoformas mediante el uso de shRNA específicos para cada una (**figura R.38**) impide la represión de E-cadherina y disminuye la activación de Fibronectina por Snail1 (**figura R.39**). Estos resultados indican que en este sistema celular, la reducción individual tanto de Akt1 como de Akt2 suprime el efecto observado en estos marcadores por la expresión de Snail1. Por tanto, en las células RWP1, ambas isoformas presentan funciones redundantes aunque no podemos descartar que sean consecuencia de mecanismos diferentes. En este sentido, la interferencia de Akt1 disminuye ligeramente los niveles proteicos de Snail1, probablemente vía GSK3 β [146]. Ésta podría ser la causa de que la función represora y activadora de Snail1 sea menos eficiente aunque no se pueden descartar otros mecanismos. Sin embargo, en el caso de Akt2, su interferencia no altera los niveles de Snail1 sugiriendo que ambas proteínas cooperan en la inducción de los cambios moleculares asociados a la *EMT*.

Los datos obtenidos en la línea celular HT29-M6 Snail1 reflejan un resultado diferente. Al igual que los estudios realizados por el laboratorio de la Dra. Brugge, la interferencia de Akt1 aumenta los cambios en la expresión de los marcadores de *EMT*, en nuestro caso, inducidos por Snail1. Después de reducir la expresión de Akt1 las células HT29-M6 Snail1 presentan aún mayor represión de la E-cadherina y mayor activación de la Fibronectina y de Lef-1 (**figura R.41**) sugiriendo un papel

pro-epitelial de Akt1 en este sistema. Nótese que este efecto tiene lugar aún cuando los niveles de Snail1 son menores que los de las células Snail1 infectadas con el shRNA irrelevante (**figura R.40**). Los cambios se observan tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína. La interferencia de Akt2, sin embargo, no muestra ningún efecto sobre la represión de la E-cadherina ni sobre la activación de la Fibronectina provocada por Snail1; en cambio, sí impide la activación de Lef-1, indicando que la expresión de Akt2 es necesaria para la activación de este factor. Estos datos reflejan cómo ambas isoformas poseen funciones diferentes en células HT29-M6 después de padecer una *EMT* por expresión de Snail1. La interferencia en las células HT29-M6 control no tiene ningún efecto sobre los marcadores analizados, por lo que podemos decir que son cambios inducidos por la expresión de Snail1.

Los estudios realizados por el laboratorio de la Dra. Brugge demuestran cómo el incremento en la migración y en la invasividad como consecuencia de la reducción de Akt1 en células MCF10A, Akt2 juega un papel distinto pero no opuesto. Concretamente muestran cómo la interferencia de Akt2 por sí sola no tiene ningún efecto sobre la migración y la invasividad, sin embargo, su reducción suprime la estimulación en la capacidad migratoria y en la *EMT* de estas células inducida por la reducción de Akt1. De acuerdo con estos datos, en nuestro modelo, cuando interferimos ambas isoformas simultáneamente (**figura R.42**), Akt2 suprime el incremento de activación de los marcadores mesenquimales observado por interferencia de Akt1. Por el contrario, la interferencia de Akt2 potencia aún más la represión de la E-cadherina por Snail1 observada por interferencia de Akt1. En los resultados obtenidos por el laboratorio de Brugge, la interferencia de Akt1 induce la *EMT* en las células MCF10A después de ser estimuladas con factores de crecimiento como el IGF-1 y/o el EGF. Esta inducción la asocian a la activación de ERK. Sin embargo, la inhibición de ERK en estas células no restaura la expresión de los marcadores epiteliales ni disminuye significativamente la activación de marcadores mesenquimales. Estos resultados son consistentes con trabajos previos que muestran que aunque el tratamiento con un inhibidor de ERK es capaz de prevenir la invasión y el desarrollo de la *EMT* [298] el tratamiento después del establecimiento de la *EMT* no lo es [299]. Los mismos autores sugieren que el fallo en revertir completamente la *EMT* puede ser causado por cambios irreversibles inducidos

después de interferir Akt1. Estos autores analizaron GSK3 β como posible candidato, pero no encontraron cambios en su actividad después de interferir Akt1. Teniendo en cuenta que la *EMT* inducida por Ras y FosER induce un loop autocrino de TGF β que estabiliza el fenotipo mesenquimal [300, 301], estos autores sugieren que la *EMT* inducida por la interferencia de Akt1 podría desencadenar la producción de un factor soluble similar.

En nuestro estudio, hemos identificado a Zeb-1 como un factor responsable del mantenimiento de la represión de la E-cadherina después de interferir Akt1. Así mostramos cómo células HT29-M6 Snail1 en las que se ha interferido Akt1 presentan una activación de hasta cuatro veces del factor de transcripción Zeb-1 tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína (**figura R.43**). Además, aunque la interferencia de Akt2 sola no provoca ningún cambio en la expresión de Zeb1, la interferencia de ambas isoformas conjuntamente provoca una mayor activación de este represor de la E-cadherina, acentuando y manteniendo así la represión de este marcador epitelial iniciada por Snail1.

Nuestro grupo ha descrito cómo Snail1 induce la expresión de Zeb1 [136, 154] y ésta depende de la actividad ERK [302]. Igualmente en el mismo trabajo se muestra cómo la inhibición de la vía PI3K también activa Zeb1 ([302] figura RII.10) sustentando el resultado obtenido mediante la interferencia de Akt1. Por tanto, estos datos son consistentes con los resultados mostrados por el laboratorio de la Dra. Brugge.

Hace relativamente poco se ha descrito cómo la familia de los microRNAs miR-200 tienen como diana el 3' UTR de los mRNA que codifican para los factores de transcripción *helix-loop-helix* Zeb1 y Zeb2, inhibiéndolos postranscripcionalmente previniendo así la *EMT* [98, 99]. Estudios aún más recientes han detallado cómo las diferentes isoformas de Akt regulan de manera distinta, la abundancia de la familia de los miR-200 en fibroblastos de pulmón y células epiteliales de riñón de ratón [228]. En la **figura D.2** se muestra el modelo propuesto al respecto por Tschlis y colaboradores.

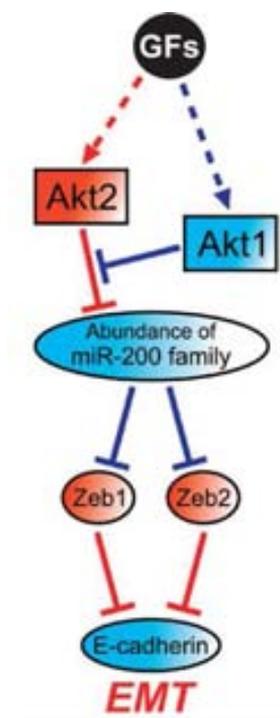


Figura D.2 Modelo propuesto por Tschlis y colaboradores [228]. El balance entre Akt1 y Akt2 regula los microRNAs que controlan la *EMT*. El color rojo indica un papel positivo y el color azul un papel negativo en el desarrollo de la *EMT*.

Nuestros resultados son consistentes, en parte, con los obtenidos por el grupo de Tschlis. Las discrepancias se encuentran cuando interferimos la isoforma Akt2 sola y ambas isoformas simultáneamente. En el trabajo de Tschlis, cuando expresan Akt2, en ausencia de Akt1 y Akt3, disminuyen los niveles de los miR-200 y por tanto aumentan los niveles de Zeb1/2. En cambio en nuestro modelo la interferencia de Akt2 sola no tiene ningún efecto sobre la expresión de Zeb1 inducida por Snail1. Además, en el mismo trabajo se muestra cómo al interferir ambas isoformas se atenúan los efectos sobre la expresión de Zeb1/2 inducidos por la interferencia de Akt1, evidenciando así una interregulación entre ambas isoformas (**figura D.2**). En nuestro caso, la interferencia de ambas isoformas simultáneamente, no sólo no revierte la activación de Zeb1 presentada por la interferencia de Akt1, sino que la potencia. Por tanto en las células HT29-M6 bajo las condiciones de previa interferencia de Akt1, el papel de Akt2 sobre Zeb1 sería el mismo que Akt1, aunque probablemente actuaría por un mecanismo diferente de los descritos hasta ahora. De alguna manera, la interferencia de Akt1 provocaría que Akt2 se convirtiera

también en un represor de Zeb1 en células con una *EMT* ya establecida, como las HT29-M6 Snail1 impidiendo que se cumpla por completo el modelo presentado por Tschlis y colaboradores. Quizás, la ausencia de la isoforma más abundante de Akt en estas células provoque la compensación de algunas de las funciones de Akt1 por Akt2 como la de inhibir a Zeb1. Esto sugiere otro nivel de regulación del factor Zeb1, y pone de manifiesto la compleja red que controla la *EMT*. En nuestro caso, podría ser que en las células HT-29-M6 Snail1, Akt1 estuviera activando directamente la familia de los miR-200; lo que no está claro es como actuaría Akt2.

En el modelo propuesto por Tschlis se sugiere que la abundancia relativa de las isoformas Akt1 y Akt2 sería el factor clave que controlaría la expresión de los microRNAs, así que cuando la ratio Akt1:Akt2 disminuye, las células presentan mayor capacidad invasiva, mayor formación de metástasis y cambios asociados a la *EMT* (mayor represión de la E-cadherina y activación de Zeb1/2). Estos cambios son revertidos cuando se interfiere Akt2, hecho que sería comparable a la disminución de la activación que vemos de los marcadores mesenquimales Fibronectina y Lef-1 (no analizados por Tschlis) cuando interferimos ambas isoformas simultáneamente. En cambio, no sería así para el caso de la represión de E-cadherina, donde, aunque detectamos que una ratio entre Akt1 y Akt2 menor aumenta la expresión de Zeb-1 y la represión de E-cadherina, este efecto no se revierte cuando se interfiere Akt2. Una explicación a estas diferencias podría recaer en que las células utilizadas por el grupo de Tschlis contienen cantidades similares de ambas isoformas. Sin embargo, en las células HT29-M6 (y en RWP1 aunque las diferencias de los mRNAs de cada isoforma no son tan grandes), Akt1 es la isoforma abundante (**figura R.45** la señal de Akt total después de interferir cada isoforma nos revela este dato). Este dato sustenta que la ratio Akt1:Akt2 puede contribuir a la función específica de cada isoforma de Akt en la *EMT*.

En el trabajo realizado por el Dr. Tschlis y colaboradores describen como Akt3 no participa en la regulación de los microRNAs de la familia miR-200. Ya que en la línea celular HT29-M6 Snail1 hemos obtenidos resultados diferentes a los obtenidos por el Dr. Tschlis para Akt1 y Akt2, nos planteamos si en nuestro sistema podría estar interviniendo la otra isoforma de Akt, Akt3. Akt3 presenta un papel clave en melanomas [303, 304]. Además, Akt3 está sobreexpresada en cánceres de mama

negativos para ER y en cáncer de próstata insensibles a andrógenos sugiriendo que Akt3 contribuye a la agresividad de los cánceres que no responden a hormonas [305]. Nos planteamos si la interferencia de Akt1 o/y Akt2 podía alterar la expresión de Akt3, de tal manera que pudiera compensar la falta de alguna de las otras isoformas. Sin embargo, no hemos detectado expresión de Akt3 en las líneas celulares analizadas descartando así que participe en los cambios observados (**figura R.44**). También se ha comprobado cómo se ve afectada la activación de Akt después de interferir cada isoforma por separado o conjuntamente. Comparando la señal de fosforilación de Akt en las células control con la de las células Snail1 se puede observar cómo la expresión estable de Snail1 provoca una gran activación de Akt. Sin embargo, e inesperadamente, después de interferir cada isoforma, la actividad de Akt total apenas se ve afectada (**figura R.45**). Este resultado impide definir concretamente el papel que juega cada isoforma en este modelo celular y, en consecuencia, saber cuál es la isoforma responsable de los cambios observados en los marcadores epiteliales y mesenquimales estudiados.

De los datos obtenidos por el uso de shRNA específicos para cada isoforma de Akt, surgen muchas preguntas, entre ellas: (1) ¿después de reducir los niveles de Akt1 (isoforma más abundante en estas células), cuál es la isoforma responsable de mantener la activación de Akt? Podría ser que la cantidad de Akt1 residual se hiperactivara o se indujera la actividad de Akt2. (2) ¿Existe una interregulación entre las diferentes isoformas de Akt? Así en nuestro modelo, el efecto sobre la activación de marcadores mesenquimales como consecuencia de interferir Akt1 depende de Akt2. ¿Es este un efecto directo de Akt2 activando estos marcadores, que está inhibido por Akt1? Un posible experimento que contribuiría a aclarar esta cuestión consistiría en sobreexpresar Akt2 una vez interferida Akt1. Además, (3) ¿el efecto observado podría ser dependiente de la actividad y de la abundancia relativa de cada isoforma? Existen sistemas fisiológicos que regulan la actividad de Akt1 y Akt2 por ejemplo mediante la regulación de sus fosfatasas específicas [306]. En conclusión, estos datos evidencian la necesidad del uso de un sistema *Knockout* para cada isoforma con la finalidad de poder caracterizar la participación específica de Akt1 y Akt2 en la *EMT* inducida por Snail1.

En definitiva, nuestros datos ponen de manifiesto la diferente contribución de Akt1 y Akt2 dependiendo de la línea celular analizada. Mientras en las células RWP1 ambas isoformas presentan funciones solapadas en cuanto a la regulación de los marcadores de la *EMT* por expresión de Snail1, en las células HT29-M6 Snail1, Akt1 tiene un comportamiento pro-epitelial y Akt2 pro-epitelial o pro-mesenquimal dependiendo del escenario y del marcador estudiado. Las dos líneas celulares tienen importantes diferencias. Mientras que las RWP1 control presentan expresión basal de Snail1 endógeno, las HT29 M6 control no. Seguramente, esta característica molecular junto con el diferente *background* genético de cada línea son las responsables de las diferencias fenotípicas que presentan ambas líneas después de la expresión estable de Snail1. De tal manera que las células HT29-M6 Snail1 presentan un fenotipo marcadamente mesenquimal mientras que las RWP1 Snail1 un fenotipo intermedio. En definitiva, las diferencias detectadas entre las funciones de las isoformas de Akt en ambas líneas celulares estudiadas son consistentes con los resultados obtenidos por otros grupos, que señalan cómo el papel de cada isoforma puede depender del *background* genético del sistema estudiado cómo de la abundancia relativa de cada isoforma de Akt en cada tipo celular.

Desde hace tiempo se sabe que existen diferencias en la activación de las diferentes isoformas de Akt dependiendo del tejido estudiado [307, 308] pero, ¿qué induce estas diferencias? Una idea que emerge de los diferentes estudios es la posibilidad de que las isoformas de Akt interaccionen con diferentes proteínas, sustrato o no, de tal manera que participen también en la especificidad de su función y de su activación ya sea (1) cambiando la localización subcelular o (2) permitiéndoles acceder a diferentes sustratos.

Aunque la compartimentalización de las diferentes isoformas no ha sido suficientemente caracterizada, experimentos con líneas procedentes de cáncer de mama crecidas en colágeno IV han mostrado cómo Akt1 es predominantemente nuclear mientras, Akt2 se localiza principalmente en la parte basal de la célula próxima a la matriz extracelular [273]. El mismo trabajo asocia esta diferente distribución con la diferente contribución de cada isoforma a la migración y potencial metastásico de las células. Por lo tanto, es muy probable que las diferencias en la distribución subcelular de las isoformas de Akt limite la

accesibilidad a diferentes sustratos, causando así la especificidad de funciones observadas en diferentes tipos celulares. En nuestras condiciones, la expresión estable de Snail1 moviliza o cambia la distribución nuclear de ambas isoformas incrementando su presencia en la fracción rica en cromatina (**figura R.33 y R.34**).

Hemos mostrado mediante varias técnicas cómo Akt puede formar parte del mismo complejo que Snail1. Experimentos de coimmunoprecipitación sobrexpresando Snail1 en células RWP1, así como coimmunoprecipitando las dos proteínas endógenas en células MiaPaca2 y SW620 (**Figura R.21, R.23**), revelan que ambas proteínas pueden interactuar, directa o indirectamente, *in vivo*. Además, nuestras aproximaciones han permitido localizar dicha interacción en la fracción nuclear de células RWP1, MiaPaca2 y SW620 (**Figura R.22, R.23**), dato confirmado por el estudio de la distribución de Akt y Snail1 en células HT29-M6 mediante inmunofluorescencia (**Figura R.24**). En este trabajo, no se ha hecho un estudio profundo de los dominios de Akt y de Snail1 que participan en esta interacción, aún así, nuestros datos sugieren que el dominio PH de Akt no tiene un papel en la interacción con Snail1 (**Figura R.21**). Además, hemos visto que el mutante Snail1-P2A interactúa con Akt con la misma afinidad que la proteína WT por lo que el dominio SNAG, tampoco parece implicado en esta interacción.

En fibroblastos, la vía Rac/Pak es una de las rutas implicadas con que Akt1 y Akt2 median sus fenotipos opuestos en cuanto a la migración. En dos trabajos se demuestra cómo la región que une el dominio PH con el dominio quinasa, *linker region*, es la responsable de la distinción en la contribución de ambas isoformas a la migración ya que permite que Akt1, y no Akt2, localice en el borde de la membrana plásmica, incrementando así la activación de Rac y, en consecuencia, activando la migración [220, 309]. No sólo las diferencias entre el dominio PH y la *linker region* podrían ser las responsables de la interacción con proteínas diversas y de la compartimentalización de las isoformas de Akt ya que otro estudio indica cómo el dominio C-terminal de Akt es el responsable de la distinta actuación de Akt1 y Akt2 sobre CREB [310]. Por lo tanto, es muy probable que la interacción diferencial de las isoformas de Akt con varias proteínas [311] defina su función, y module su especificidad por sustratos.

Los resultados obtenidos por fraccionamiento subcelular (**figura R.34**) indican que Snail1 moviliza tanto Akt1 como Akt2 a la fracción rica en cromatina. Teniendo en cuenta los datos mencionados anteriormente, y una vez comprobado que Snail1 interacciona con Akt, podemos pensar que quizás esta interacción localice a Akt en la cromatina de las células, permitiendo que regule o que coopere con Snail1 en el control de la expresión de algún gen regulado por Snail1. Los datos obtenidos por coimmunoprecipitación de cromatina reflejan que Akt se encuentra en la misma región del promotor de la E-cadherina a la cual se une Snail1 región (-178/+92, **figura R.25**). Curiosamente, teniendo en cuenta que Akt también aparece en el promotor de la E-cadherina en las células control, podemos decir que la presencia de Akt en el promotor *CDH1* es independiente de la presencia de Snail1. Sin embargo, experimentos de coimmunoprecipitación en células MiaPaca2 y SW620 (**figura R.35**) demuestran cómo la isoforma de Akt que interacciona con Snail1, en células epiteliales tumorales muy invasivas, es Akt2. Considerando este resultado, se quiso comprobar cuál era la isoforma de Akt que aparecía en el promotor de la E-cadherina en presencia de Snail1. Mediante ensayos de coimmunoprecipitación de cromatina hemos comprobado que la isoforma que colocaliza con Snail1 en el promotor *CDH1* es Akt2 (**figura R.36**). Por lo tanto ya no diríamos que la presencia de Akt en el promotor de la E-cadherina es independiente de Snail1 sino que Snail1 provoca un cambio de isoforma sobre el mismo promotor cambiando Akt1 por Akt2 tanto en células RWP1 Snail1 como HT29-M6 Snail1. Además hemos demostrado que este reclutamiento de la isoforma Akt2 por Snail1 no ocurre en otros promotores reprimidos por Snail1, como el de *PTEN*, ni en promotores activados por Snail1 como el de *FN1* (**figura R.37**). En definitiva, estos resultados indican que en células epiteliales Akt2 y no Akt1 interacciona con Snail1, y que dicha interacción puede tener lugar en el promotor de la E-cadherina.

No hay datos previos que muestren Akt unida a la cromatina. Las únicas evidencias de Akt como modificador de la expresión génica a nivel de cromatina son indirectamente a través de otras proteínas, tanto activadoras [261] como represoras [208]. Por tanto, podría ser que la unión de Akt1 al promotor *CDH1* sea a través de alguna de esas proteínas. Sin embargo, en el caso de Akt2, es muy probable que su

unión al promotor de E-cadherina sea a través de otro factor que, por los resultados obtenidos, podría ser el mismo Snail1.

Una vez comprobado que Snail1 y Akt pueden interactuar y que dicha interacción puede tener lugar en el promotor de la E-cadherina, lo siguiente fue investigar la relevancia funcional de esta interacción. El uso del mutante de Akt1 catalíticamente inactivo Akt1-K179M ha permitido observar que la actividad quinasa de Akt es necesaria para la represión de la E-cadherina por Snail1. Así, los ensayos *reporter* muestran cómo Snail1 es capaz de reprimir, pero en menor grado, el promotor *CDH1* en ausencia de la actividad quinasa de Akt (**figura R.26**). En cambio, el resultado obtenido por el análisis de los niveles de mRNA y de proteína (**figura R.28**) confirma que la actividad quinasa de Akt participa en la represión de la E-cadherina por Snail1. Este mutante, no altera los niveles de Snail1, lo que sugiere que el efecto observado es consecuencia de la participación directa de la actividad quinasa de Akt en la represión de la E-cadherina por Snail1. Es importante resaltar la controversia del uso de "dominantes negativos" porque aunque serían específicos de cada isoforma, no puede descartarse que bloqueen la activación global de Akt y por tanto que actúen como dominantes negativos de todas las isoformas de la proteína. Se ha mostrado cómo este mutante interactúa con Snail1 (**figura R.27**) lo que indica que los efectos observados no son consecuencia de que ambas proteínas no puedan interactuar, sino de la falta de actividad quinasa de Akt. Además, este dato sugiere que la actividad quinasa de Akt no es necesaria para la interacción con Snail1.

El siguiente paso fue averiguar qué podría estar haciendo Akt en el promotor de la E-cadherina. Hasta ahora, lo que sabemos es que su actividad quinasa es necesaria para la represión de este gen por Snail1. En consecuencia, nos planteamos si Akt podría estar modificando algún residuo de las histonas presentes en el promotor *CDH1*.

Existen modificaciones post-traduccionales en las histonas que regulan la expresión génica. El conjunto de estas modificaciones se conoce como *Histone code* [312]. Las modificaciones de las histonas de los nucleosomas incluyen entre otras, acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, sumolizaciones y ubiquitinaciones. La mayoría de dichas modificaciones, tienen lugar en el extremo o "cola" N-terminal de

éstas proteínas. Estas modificaciones pueden alterar la interacción DNA-histonas y esto, afectar a la estructura de la cromatina. A la vez, dichas modificaciones covalentes de las histonas intervienen en procesos de transcripción, replicación, reparación del DNA y también en la progresión del ciclo celular ya que permiten el reclutamiento de proteínas que participan en dichos procesos.

Un ensayo de fosforilación por simulación computacional reveló que sólo la H3 contenía el motivo de fosforilación descrito para Akt, por lo que comprobamos si Akt era capaz de fosforilar la H3 *in vitro*. Nuestros resultados evidencian cómo Akt fosforila la H3 *in vitro* (**figura R.29**). Asimismo, mediante el análisis de las modificaciones en la H3 por espectrometría de masas después de haber sido fosforilada por Akt, hemos confirmado la S10 e identificado al menos dos residuos más fosforilados por Akt en H3, la T46 (que presenta el motivo específico de fosforilación para Akt) y la S28. Además, la P-S10 ha sido comprobada mediante su detección con un anticuerpo específico de la P-S10 en un ensayo Akt quinasa *in vitro*.

El siguiente paso en nuestra investigación fue comprobar si alguna de estas modificaciones estaba presente en el promotor de la E-cadherina cuando las células expresaban Snail1. Cuando se realizaron estos ensayos sólo existían anticuerpos comerciales para la P-S10 y la P-S28, por lo que la P-T46 no se pudo estudiar. Recientemente un estudio ha identificado la fosforilación de la T46 cómo una marca característica de células apoptóticas [313].

Para poder reducir la señal mitótica de la P-S10 y la P-S28 (**figura R.30**) los experimentos de coimmunoprecipitación de cromatina se hicieron creciendo las células 48 h sin suero, de forma que se disminuía la presencia de células mitóticas en los cultivos aumentando así la señal de las células en interfase. Los resultados obtenidos descartan tanto la P-S10 como la P-S28 cómo consecuencia de la presencia de Akt en el promotor de la E-cadherina (**figura R.31, R.32**). Tampoco se detecta ninguna de las dos modificaciones en el promotor de *FN1*. En definitiva, ninguna de las dos marcas parece estar asociada a promotores regulados por Snail1.

Recientemente Sabbattini y colaboradores han descrito cómo la doble marca H3K9me3/P-S10 causada por Aurora B se incrementa en genes reprimidos durante la diferenciación de células *stem cell* mesenquimales [314], aportando así el primer dato de la existencia de esta doble marca fuera de la mitosis. En las "colas" de las

histonas existen varios motivos conservados en que una lisina es seguida inmediatamente de una serina. Varios estudios indican la posible existencia de un nuevo mecanismo de regulación en estos motivos mediante el cual la fosforilación de la serina regula la metilación de la lisina. Una consecuencia surgida de la descripción de este mecanismo de regulación es la necesidad del uso de anticuerpos que reconozcan la doble marca, ya que los anticuerpos que reconocen una de ellas pueden dar resultados falsos, puesto que la modificación de uno de los dos residuos puede interferir en la detección del otro [315]. En este sentido, en el estudio realizado por Sabbattini y colaboradores se muestra cómo el análisis de la P-S10 y la K9me3 por separado no permite detectar diferencias entre células no diferenciadas y células diferenciadas. Considerando que tanto la dimetilación de la lisina 9 como la trimetilación de la lisina 27 son marcas que aparecen en el promotor de la E-cadherina cuando éste es reprimido por Snail1, sería aconsejable repetir los experimentos con los anticuerpos que reconocen las dobles marcas (H3K9me2/P-S10 o H3K27me3/P-S28) para poder descartarlas completamente. Según los resultados obtenidos por Sabbattini y colaboradores que demuestran cómo esta marca es característica de genes reprimidos en células diferenciadas mesenquimales [314], no esperaríamos encontrar la doble marca en células epiteliales tumorales que han padecido una *EMT*, ya que este proceso hace que presenten un fenotipo intermedio. Estudios realizados por nuestro grupo detallan cómo durante el proceso de diferenciación de una célula mesenquimal, Snail1 se expresa y reprime la E-cadherina con la consecuente aparición de la marca K27me3 [160]. Quizás sería interesante comprobar si en el proceso de diferenciación de células mesenquimales, durante el cual se expresa Snail1, existe la misma colaboración a nivel del promotor *CDH1* con Akt y si su consecuencia sería la doble marca.

Por tanto, queda por resolver la función de Akt en el promotor de la E-cadherina en células epiteliales tumorales cuando se induce una *EMT* por expresión de Snail1. Otra posibilidad podría ser que Akt activara alguno de los represores que son reclutados por Snail1 en la represión de la E-cadherina. Como se ha explicado en la introducción, tanto nuestro grupo como el de Amparo Cano ha evidenciado cómo Snail1 reprime la E-cadherina reclutando el PRC2 [160] y las HDAC 1/2 [157]. Se ha descrito que Akt es capaz de fosforilar e inhibir a un componente del PRC2,

EZH2, una metiltransferasa que interviene en la trimetilación de la lisina 27 de la H3 [262]. Curiosamente, dicho componente del PRC2 está implicado en la progresión tumoral y metástasis en varios tipos de cáncer incluyendo el cáncer de mama [316, 317]. Como se ha mencionado al principio de esta discusión, los datos publicados describen cómo Akt1 inhibe la progresión y la metástasis del cáncer de mama [234], por lo que parece más plausible que este efecto de Akt inhibiendo a este componente del PRC2 sea realizado por Akt1 y no por Akt2. En dicho trabajo no discriminan entre las dos isoformas de Akt. Para comprobar esta hipótesis, se debería analizar cuál de las dos isoformas de Akt es la que fosforila a EZH2. Si fueran las dos quizás se debería examinar si ambas tienen efectos opuestos, al igual que ocurre en fibroblastos [220]. En éstos, aunque tanto Akt1 como Akt2 interactúan con Pak1, la coexpresión de Akt1, la activa y la coexpresión de Akt2, la inactiva. Uno de los mecanismos propuestos por los que Akt1 activa a Pak1 es la fosforilación de la S21 [251]. En el estudio realizado en fibroblastos se muestra cómo Akt2 es incapaz de fosforilar a Pak1. Podríamos pensar en una situación similar a nivel del promotor de la E-cadherina. Como hemos visto, la expresión de Snail1 provoca un cambio de isoforma en el promotor. Quizás la sustitución de Akt1 por Akt2 impida la fosforilación e inhibición de EZH2 y, por lo tanto, favorezca la trimetilación de la lisina 27 y la consecuente represión de la E-cadherina por Snail1.

Otro trabajo relaciona a Akt con la maquinaria epigenética reguladora mediante su interacción con la metiltransferasa específica de la lisina 9 de la histona H3 SETDB1 [208]. Esta proteína localiza predominantemente en regiones ricas en eucromatina y contribuye en la represión génica mediada por los *zinc fingers* KRAB mediante la unión de HP1 [318]. Aunque tanto Akt1 como Akt2 interactúan con SETDB1, Akt2 lo hace con mayor afinidad. Estudios recientes indican como SETDB1 y la DNA metiltransferasa DNMT3A interactúan directamente y localizan en promotores reprimidos en células tumorales [319]. En consecuencia, sería interesante ver si la metiltransferasa de la H3, SETDB1, participa en la represión de la E-cadherina por Snail1 y comprobar si la interacción Snail1/ Akt2 tiene algún efecto sobre la acción de dicha metiltransferasa.

En definitiva, los datos obtenidos en el **capítulo R.3** y **R.4** detallan un nuevo mecanismo mediante el cual Akt regula sucesos nucleares como la transcripción

génica durante la *EMT*. Este mecanismo ocurre a través de la interacción directa con el factor de transcripción Snail1. Hemos mostrado que Akt y Snail1 pueden interaccionar a nivel del promotor de la E-cadherina. Hemos comprobado también que la actividad quinasa de Akt es necesaria para la represión de la E-cadherina por Snail1. Hemos planteado la pregunta si la interacción de Snail1 con las diferentes isoformas de Akt podría regular la especificidad de función de cada una de ellas. En cuanto a la posibilidad de interaccionar con Snail1, hemos demostrado que la isoforma que interacciona mayoritariamente con Snail1 en los sistemas estudiados es Akt2. Hemos mostrado que esta interacción podría darse en el promotor de la E-cadherina. Podría ser que el reclutamiento de Akt2 al promotor de la E-cadherina sea el responsable del comportamiento mesenquimal de esta isoforma de Akt. En conclusión, estos datos sugieren que Snail1 forma parte de la lista de proteínas que al interaccionar con Akt participa en la contribución de cada isoforma de Akt en la *EMT*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por shRNA este mecanismo podría tener lugar en la línea celular RWP1 donde los resultados muestran un efecto directo cooperativo de Snail1 y Akt2 en la represión de la E-cadherina. Sin embargo, en las células HT29-M6 la regulación de la expresión de varios marcadores de la *EMT* parece más compleja. El papel de Akt2 en estas células sólo se pone de manifiesto mediante la previa interferencia de Akt1 evidenciando así una interregulación de ambas isoformas en las estas células.

Existen datos que sugieren cómo en la represión de la E-cadherina, los diferentes represores descritos actuarían de una manera jerárquica [80]. En este sentido Snail1 sería responsable de la represión inicial e inducción de la *EMT* y Zeb1, entre otros represores, sería el responsable del mantenimiento de la represión de E-cadherina y de la *EMT*. Teniendo en cuenta estos datos, la interferencia de Akt1 o el balance entre las dos isoformas de Akt en estas células podría considerarse cómo un marcador de cómo establecida está la *EMT* evidenciado por el incremento en los cambios moleculares que ocurren durante este proceso y por la activación de Zeb1.

Considerando la actuación jerárquica de los diferentes represores de la E-cadherina durante la *EMT*, es posible que el reclutamiento de Akt2 por Snail1 al promotor de la E-cadherina tuviera lugar al inducirse la *EMT*, es decir, cuando en el

control de la expresión de la E-cadherina, Snail1 es el represor más importante. Esto explicaría que no se detecte ningún efecto sobre la expresión de la E-cadherina cuando Akt2 es interferida en las células HT29-M6 Snail1, ya que en estas células la expresión de este marcador epitelial está controlada por Zeb1. En este caso, el efecto cooperativo de Akt2 y Snail1 en la represión de la E-cadherina en estas células sólo se detectaría siempre y cuando la *EMT* no estuviese establecida (Zeb1 represor más importante de la E-cadherina). Una manera de comprobar esta hipótesis sería interferir Akt2 en las células HT29-M6 control e inducir la expresión de Snail1 ya sea ectópicamente o endógenamente mediante algún factor que active la expresión de Snail1, como el TGF- β . Ahora bien, si esto fuera así, surge la pregunta de ¿por qué se detecta Akt2 en el promotor de la E-cadherina si su represión ya no está controlada por Snail1? Quizás esta interacción entre Akt2 y Snail1 es detectable por los altos niveles de Snail1 presentes en estas células después de su expresión estable, aunque no sea el principal represor de la E-cadherina.

De acuerdo con esta interregulación entre Akt1 y Akt2 en las células HT29-M6 Snail1, nuestro trabajo aporta nuevos datos sobre el complejo control de la *EMT*. Así, una vez interferida Akt1, Akt2 compensa la función represora sobre la E-cadherina de Akt1. Sabemos que Snail1 activa la expresión de Zeb1. Nuestros resultados muestran como Snail1 activa a Akt por interacción directa (discutido en el siguiente capítulo). El hecho de que Akt2 compense la función represora de Akt1 sobre la E-cadherina y que Snail1 sea capaz de activar mediante interacción directa a Akt2 plantea la cuestión de, si en estas condiciones, estaríamos delante de un nuevo mecanismo regulador de Snail1 sobre Zeb-1. Esta hipótesis implicaría que Snail1 regularía de manera dual a Zeb-1. Por un lado activaría su expresión [302] y por otro lado, la inhibiría a través de la activación de Akt2. Para comprobarlo, deberíamos confirmar que la interacción entre Akt2 y Snail1 continua teniendo lugar una vez interferida Akt1.

Los resultados obtenidos por shRNA en ambas líneas celulares muestran un efecto cooperativo entre Akt2 y Snail1 en la activación de genes mesenquimales aunque en las células HT29-M6 Snail1 sólo se detecta en condiciones de previa interferencia de Akt1. Este efecto no sería consecuencia del reclutamiento de Akt2 al

promotor de genes activados por Snail1, ya que cómo hemos comprobado, esto no ocurre. ¿De qué manera podrían cooperar? Resultados obtenidos en nuestro grupo sugieren cómo en el proceso de activación de genes mesenquimales por Snail1 intervienen al menos tres factores: NFκB, β-catenina y TFCEP2c [320]. Los datos muestran cómo Snail1 forma un complejo junto con NFκB y PARP-1 en el promotor de la Fibronectina y Lef1 que podría reclutar coactivadores promoviendo así la transcripción de dichos genes. Al mismo tiempo, β-catenina se une a estos promotores mesenquimales colaborando también en el control de su expresión. TFCEP2 colabora con NFκB y β-catenina mediante su unión a dichos promotores pero en diferentes regiones. En la literatura no sólo existen datos describiendo cómo la activación de la vía PI3K/Akt puede activar genes mesenquimales como la fibronectina [321] sino también cómo diferentes señales a través de la vía PI3K/Akt pueden activar los cofactores necesarios para la activación de genes mediada por Snail1 [125, 237, 322]. Quizás la interacción Akt2/ Snail1 permite una acción directa de esta quinasa sobre alguno de los cofactores activándolos o permitiendo una mejor colaboración con Snail1 en su papel como activador de genes mesenquimales.

Por último, y teniendo en cuenta los diferentes trabajos que detallan como Akt1 tiene un papel pro-epitelial en células tumorales epiteliales y pro-mesenquimal en fibroblastos, sería interesante comprobar si la isoforma de Akt que interacciona con Snail1 en fibroblastos es Akt1. Si fuera así estaríamos delante de un mecanismo de regulación génica por Akt1 o de Akt2 que dependería de la posibilidad de interaccionar o no con Snail1.

Los resultados obtenidos por ChIP de las células control en los que se observa Akt1 unida al promotor de la E-cadherina plantean la pregunta: ¿Qué puede estar haciendo Akt1 en estas células? Aunque el papel de Akt sobre la expresión de la E-cadherina en ausencia de Snail1 no ha sido estudiado profundamente en esta tesis, vale la pena discutir los resultados obtenidos teniendo en cuenta el papel de la E-cadherina en la diferenciación epitelial [323, 324] y los numerosos estudios que detallan cómo Akt interviene también en la diferenciación celular [325-327]. Estudios realizados sobre la diferenciación de queratinocitos revelan cómo las tres isoformas de Akt son importantes para dicho proceso, ya que las tres isoformas (aunque Akt1 en menor medida) son activadas en este contexto. En este sentido, la transfección de

un mutante de Akt constitutivamente activo aumenta la expresión de marcadores de diferenciación epidérmicos [328], y protege selectivamente a los queratinocitos diferenciados de la apoptosis. Otro estudio basado en la diferenciación de los osteoclastos señala cómo tanto Akt1 como Akt2 son esenciales para la diferenciación de estas células pero no para su supervivencia, evidenciando así un papel directo de Akt en el control de la diferenciación celular. Este efecto ocurre a través de las IKKs y de NFκB [329]. En el caso de la diferenciación de la glándula mamaria durante la gestación, Akt1 y Akt2 participan de manera diferente, si bien la supresión de Akt1 retrasa la diferenciación, la supresión de Akt2 la acelera [330]. Considerando el papel de Akt en la diferenciación celular, el grupo de Tschlis, analizan la contribución de cada isoforma de Akt en la diferenciación del epitelio mamario sugiere la idea de que el efecto que se observa cuando se interfiere Akt1 o Akt2 en células epiteliales en respuesta a señales oncogénicas, tiene que ver con la participación de ambas isoformas en la diferenciación epitelial. Así, el aumento de la invasividad y migración podría ser explicado por la supresión de Akt1, isoforma responsable de la correcta diferenciación del epitelio mamario. Al interferir Akt1, las células padecen una *EMT* que les permite aumentar su movilidad, y por tanto, poseer mayor capacidad invasiva y de migración. En consecuencia, este aumento de la invasividad está asociado al cambio del estado de diferenciación de las células (*EMT*). En definitiva, estos autores concluyen que la supresión de Akt1 aumenta la invasividad ya que promueve la selección de células tumorales indiferenciadas. Este efecto parece estar mediado por la supresión de la fosforilación de Stat5 en ratones Akt1-/-.

Teniendo en cuenta los datos mencionados anteriormente y los obtenidos en nuestro trabajo, en los que se detecta Akt1 unida al promotor de la E-cadherina (**figura R.36**), podría ser que Akt1 regulara directamente el promotor *CDH1*, ya sea modificando algún residuo presente en las "colas" de las histonas, o provocando cambios en los complejos activadores y/o represores unidos al promotor *CDH1*.

El promotor de E-cadherina humano contiene varios elementos reguladores incluyendo cajas CCAAT (-65), una región rica en GC (-30/-58) y las tres cajas E (**Figura I.15**). Las regiones proximales CCAAT y la región rica en GC son requeridas para la expresión basal de la E-cadherina y son reconocidas por los factores de

transcripción constitutivos AP2 y Sp1 además de proteínas de unión a CAAT [156]. Las cajas E, como ya se ha mencionado en la introducción, son reconocidas por represores. La unión de estos represores es capaz de superar los efectos positivos de los factores constitutivos que interaccionan con los elementos reguladores de la expresión basal de la E-cadherina [331]. Recientemente, se ha propuesto que dos cajas presentes en posición distal del promotor de la E-cadherina, reconocidas por p300, participan en la activación de la expresión de la E-cadherina en células epiteliales de mama [332].

Akt es capaz de fosforilar la acetiltransferasa p300 [261]. Esta fosforilación es crítica para la transactivación de p300, ya que estimula su actividad acetiltransferasa y la unión a factores de transcripción. Además, la fosforilación de p300 por Akt regula la interacción con MyoD, estabilizando así un complejo activador en los genes específicos del músculo desplazando complejos represores [333]. En nuestro sistema podría tener lugar un mecanismo similar. En una situación normal Akt podría mantener el estado de activación basal de la E-cadherina. Como muestran nuestros datos, la ausencia de actividad Akt disminuye los niveles proteicos de E-cadherina en células RWP1 control (**figura R.28**). Se sabe que la fosforilación de p300 por Akt ocurre en el núcleo; nuestros resultados abren la posibilidad de que pudiera ocurrir directamente en el promotor. Además, Akt podría contribuir a aumentar la expresión de la E-cadherina vía Sp1. El promotor de la E-cadherina presenta cinco lugares de unión del factor de transcripción Sp1. Existen varios trabajos que demuestran cómo Akt modula la expresión génica a través de este factor de transcripción. Sin embargo, estos estudios no están relacionados con la diferenciación epitelial sino con la angiogénesis y la invasión celular [334, 335]. Sea cual sea el mecanismo mediante el cual Akt regula la expresión de la E-cadherina, nuestros datos sugieren otra contribución de esta quinasa en la diferenciación epitelial.

D.2 La interacción de Snail1 con Akt incrementa su actividad quinasa *in vitro* e *in vivo*.

Las interacciones entre proteínas contribuyen de una manera importante en las comunicaciones intercelulares e intracelulares. Estas interacciones son responsables de la iniciación y la progresión de los procesos celulares. De tal manera, dichas uniones inducen cambios conformacionales que estabilizan, desestabilizan o alteran la actividad enzimática de sus interactores [336]. Las asociaciones entre proteínas también contribuyen a la formación de grandes complejos moleculares, permitiendo coordinar la respuesta de múltiples señales que llegan a la célula [337]. Además, algunas proteínas funcionan como andamio permitiendo la asociación de sus interactores con ciertas estructuras celulares, o facilitando el transporte entre los diferentes compartimentos subcelulares [338]. Para llevar a cabo estas funciones las proteínas interactúan o bien constitutivamente o bien dependiendo de señales.

Hace unos diez años se observó cómo Akt se activaba mediante la fosforilación mediada por la activación de PI3K. Este descubrimiento fue clave, ya que demostró una relación entre Akt y PI3K, una quinasa conocida por presentar un papel crítico en el control de la fisiología celular. Actualmente se ha demostrado cómo la actividad de su efector, Akt, está modulada mediante una compleja red de proteínas reguladoras y distintas vías de señalización [206, 339]. La complejidad de esta red aumenta aún más si tenemos en cuenta que existen tres isoformas de Akt en mamíferos, y que no todas las diferentes proteínas reguladoras de Akt interactúan con las tres isoformas [340, 341].

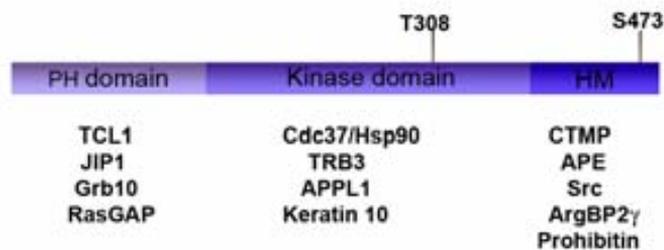


Figura D.3 Esquema de los dominios de Akt y algunas de las proteínas que interactúan y modulan su actividad [342]. Las proteínas que interactúan con Akt se muestran listadas bajo el dominio con el que interactúan. Para más detalle ver **figura R.18**.

Como se muestra en la **figura D.3**, las diversas proteínas descritas que interaccionan con Akt se pueden clasificar conforme al dominio por el que interaccionan con la quinasa. Algunas de estas proteínas contienen actividad enzimática como PDK1 [207], IMPDH [343], SETDB1 [208] y PHLPP [204]. Otras proteínas que interaccionan con Akt no presentan aparentemente actividad enzimática. Esta propiedad compartida sugiere que estas interacciones con una o más regiones de las diferentes isoformas de Akt modulan la actividad quinasa [260, 344, 345], el acceso a componentes reguladores [209, 346] o a sustratos de Akt [340, 347-349] y/o su localización subcelular [350]. Por tanto, las consecuencias de la interacción de estas proteínas con Akt son diversas. En consecuencia, la unión debe incrementar o disminuir la fosforilación o activación de Akt. Según los datos publicados, estos efectos sobre Akt dependen del tipo celular y de las condiciones experimentales utilizadas [351].

La importancia de estas proteínas que interaccionan con Akt ha sido mejor caracterizada en condiciones patológicas. Este es el caso de la sobreexpresión de Tcl1 en la leucemia prolimfocítica de células T, la cual contribuye a la patogénesis facilitando la activación de Akt y alterando su localización subcelular [352]. De manera opuesta, en otros tumores, se ha descrito como son reprimidos los mRNA de proteínas que al interaccionar con Akt la inhiben facilitando así la activación de esta quinasa. Este es el caso de CTMP [311] y CKIP-1 [353]. Este dato sugiere la existencia de mecanismos fisiológicos que regulan la activación de Akt alterando la abundancia de las proteínas que interaccionan con ella.

Así pues, se han descrito un gran número de proteínas que interaccionan directamente con Akt controlando su actividad. Además, como se ha mencionado anteriormente, algunas reclutan Akt a ciertas estructuras o compartimentos subcelulares, y otras sirven de andamio a Akt para regular su función y/o su activación. Teniendo en cuenta el número de proteínas que interaccionan con Akt, es altamente probable que las diferentes funciones de Akt en respuesta a diferentes señales se regulen mediante estas uniones proteína-proteína.

Nuestros resultados muestran cómo el factor de transcripción Snail1 puede formar parte de la lista de proteínas que mediante su interacción con Akt regulan su

actividad quinasa. Aunque en nuestro trabajo no hemos estudiado el dominio de Akt que interacciona con Snail1, los resultados obtenidos por *pull-down* descartan que el dominio PH de Akt participe en dicha interacción (**figura R.21**). Los datos correspondientes al **capítulo R.2** describen cómo la preincubación de Akt con Snail1 incrementa significativamente su actividad quinasa *in vitro* (**figura R.19**). Hemos demostrado que el dominio C-terminal de Snail1 que contiene los dedos de zinc, es necesario, aunque no suficiente, para el incremento de la actividad quinasa de Akt por Snail1. Hemos comprobado también que la previa unión de Snail1 al DNA impide el efecto de Snail1 sobre la actividad de Akt, confirmando así, la importancia del dominio de unión al DNA, el C-terminal, en la activación de Akt por Snail1. Teniendo en cuenta estos resultados, y basándonos en que este efecto de Snail1 sobre Akt es consecuencia de la interacción directa de ambas proteínas, podríamos esperar que el mutante de Snail1 C-terminal y Akt interaccionaran. Aunque en esta tesis no se han realizado ensayos de interacción directa entre ambas proteínas, resultados preliminares obtenidos mediante ensayos *pull-down* sugieren que en la interacción Snail1/ Akt interviene la región C-terminal, y que dicha interacción participa en el efecto de Snail1 sobre la actividad quinasa de Akt.

Los resultados obtenidos por ChIP muestran cómo Akt se detecta en el promotor de la E-cadherina, promotor reprimido por Snail1. Snail1 para reprimir genes requiere de la unión directa del dominio C-terminal al DNA. Los resultados obtenidos *in vitro* muestran cómo Snail1 precisa no estar unido al DNA para interaccionar y activar a Akt. Considerando estos datos, esperaríamos encontrar la interacción Snail1/ Akt no en promotores reprimidos por Snail1 sino en promotores activados ya que en éstos no se necesita la unión directa de Snail1 al promotor. Sin embargo, no hemos detectado presencia de Akt en un promotor activado por Snail1, el de la Fibronectina (**figura R.37**), pero si hemos confirmado que Akt es necesaria para la activación de este marcador mesenquimal por Snail1 (**figura R.39**). Esto plantea la posibilidad de que, aunque la interacción Snail1/Akt ocurra en el promotor de la E-cadherina, su activación por interacción con Snail1 tendría lugar una vez Snail1 hubiera realizado su función represora sobre este gen. En dicho momento el dominio C-terminal de Snail1, en parte responsable de la activación de Akt, quedaría libre y podría interaccionar con la quinasa. Se sabe que para que

Snail1 pueda activar genes mesenquimales es necesario que primero realice su función represora, podría ser que después de reprimir la E-cadherina, Snail1, todavía presente en este promotor, active a Akt y esto ayude a Snail1 a activar marcadores mesenquimales como la Fibronectina, Lef-1 y otro represor de la E-cadherina como Zeb-1. Esto explicaría porque en ausencia de Akt, Snail1 no puede ni reprimir la E-cadherina ni activar la Fibronectina al menos en las células RWP1.

Nuestros resultados indican cómo el incremento en la actividad quinasa de Akt por Snail1, no es consecuencia de un aumento en el estado de fosforilación de los residuos responsables de su activación, la T308 y la S473 (**figura R.20**). Teniendo en cuenta que la única quinasa presente en el ensayo es Akt, parecería que el mecanismo por el cual Snail1 aumenta la actividad quinasa de Akt *in vitro* es mediante la formación de una conformación más activa de Akt al interactuar con Snail1. Sin embargo, no podemos descartar que el hecho de no detectar un aumento en la fosforilación de los residuos responsables de la activación de Akt no sea consecuencia de la saturación de la fosfoseñal.

Los datos que describen el efecto de la interacción Snail1/ Akt en la actividad de la quinasa han sido realizados con Akt1. Teniendo en cuenta que los mecanismos de activación descritos para cada isoforma son iguales, y que la única diferencia radica en cual es la isoforma de Akt que interactúa con la proteína reguladora que se estudie, consideramos que los datos obtenidos con esta isoforma son extrapolables a cualquier isoforma de Akt que interactúe con Snail1. En el **capítulo R.3** se ha mostrado cómo en células epiteliales la isoforma de Akt que interactúa con Snail1 es Akt2 por tanto nuestro trabajo muestra como en este tipo celular un manera de regular la actividad de Akt2 sería mediante la interacción directa con Snail1.

Independientemente de este efecto de Snail1 sobre la actividad de Akt, hemos sugerido cómo Snail1 puede ser un sustrato de Akt. Mediante ensayos quinasa *in vitro* y la utilización de diferentes mutantes delecionados de Snail1 (**figura R.11**), hemos identificado los últimos 28 aminoácidos de Snail1 como la zona donde se localiza el residuo modificado *in vitro* por Akt (**figura R.14, R15**). Hemos confirmado este resultado descartando los últimos 28 aminoácidos de Snail1 como residuos importantes en la interacción con Akt (**figura R.17**). Hemos comprobado también cómo la conformación abierta de Snail1 no favorece la fosforilación de Snail1 por

Akt (**figura R.13, R.14**). Se han generado además dos mutantes puntuales de Snail1, el Snail1-T177A y el Snail1-S246A, los cuáles se han excluido como residuos diana de Akt en Snail1.

Teniendo en cuenta que la señal de fosforilación detectada en Snail1 en los diferentes ensayos quinasa es similar a la detectada en la proteína Bad, sustrato identificado *in vivo* por Akt, se puede pensar que esta fosforilación puede ocurrir *in vivo*. Sin embargo, considerando el resultado negativo obtenido por espectrometría de masas y que Snail1 no contiene el motivo específico fosforilado por Akt (RXRXXS/T), es poco probable que sea un sustrato de Akt *in vivo*. Además, las proteínas quinasas no suelen formar complejos estables con sus sustratos, y si demostrado que Snail1 y Akt forman parte del mismo complejo *in vivo* (**figuras R.21, R.22, R.23 y R.35**). Por todo esto, además del hecho que Snail1 es capaz de interaccionar con una forma de Akt catalíticamente inactiva (**figura R.27**), consideramos más probable que Snail1 sea un regulador de la actividad de Akt que un sustrato.

Los resultados descritos en el **capítulo R.1** verifican *in vivo* el incremento de actividad quinasa de Akt por Snail1 *in vitro*. Así, el análisis del nivel de fosforilación de los residuos responsables de la activación de Akt demuestra cómo Snail1 induce la fosforilación en estos residuos en líneas celulares epiteliales tumorales (**figura R.1**). Esta inducción ocurre tanto en ausencia de suero en el medio (0%FBS) como en presencia de suero (10% FBS). El análisis de la distribución de Akt activa (P-S473) mediante inmunofluorescencia corrobora los datos obtenidos por *western-blot* (**figura R.2**) e indica cómo Snail1 es capaz de incrementar la fosforilación de Akt en respuesta a IGF-1. Curiosamente, tras estimular 30 min con IGF-1 ya no se detectan diferencias en los niveles de fosforilación de Akt entre las células que expresan Snail1 y las células control. A través de experimentos de fraccionamiento subcelular hemos detectado cómo la inducción de la fosforilación de Akt por Snail1 tiene lugar tanto en el citosol como en el núcleo (**figura R.3**). Por tanto, a diferencia de lo que ocurría *in vitro*, Snail1 es capaz de aumentar la fosforilación de Akt *in vivo*. Estos resultados son consistentes con datos previos publicados en los que se describe cómo células MDCK, que expresan Snail1, poseen mayores niveles de Akt fosforilado en respuesta a señales de estrés como la ausencia de suero en el medio de

crecimiento y ante la estimulación de señales pro-apoptóticas como el TNF- α [67]. Nuestros resultados aportan nuevos datos sobre las condiciones en las que tiene lugar este incremento de fosforilación de Akt por Snail1.

Mediante el análisis del estado de fosforilación de algunos sustratos de Akt, hemos confirmado cómo el aumento de la fosforilación de Akt por Snail1 implica un aumento de su actividad quinasa *in vivo*. Hemos mostrado cómo células Snail1 que presentan niveles mayores de fosfo-Akt también presentan niveles mayores de P-IKK, lo cual correlaciona con mayor actividad transcripcional dependiente de NF κ B (**figura R.4**). Además, estas células presentan niveles más altos de P-FoxO que confirman un mayor exporte nuclear y degradación de FoxO (**figura R.5**). Aunque no se muestra en este trabajo, también se analizó otro sustrato de Akt, la quinasa GSK3 β . Dada la relación existente entre las tres proteínas [146], se pensó que quizás uno de los sentidos fisiológicos del incremento de fosforilación y de actividad de Akt por Snail1 fuera inhibir a GSK3 β estabilizando así a Snail1. Curiosamente, no se detectaron cambios en la fosforilación de este sustrato. Este resultado puede ser consecuencia de que el estado de fosforilación de GSK3 β en las células donde fue analizado (RWP1) era ya muy alto. Sin embargo, teniendo en cuenta que Snail1 y Akt interactúan, no se puede descartar que esta interacción, además de activar a Akt, defina los sustratos sobre los que actúa esta Akt activada.

Los resultados obtenidos mediante los ensayos quinasa de GST-Akt purificada de células HEK 293 coexpresada con Snail1, confirman que Snail1 es capaz de incrementar la actividad quinasa de Akt *in vivo* (**figura R.6**). Además, el hecho de que este incremento ocurra tanto en situación basal como tras estimulación con IGF-1 durante diferentes tiempos, indica que este aumento en la actividad quinasa de Akt es independiente del estado previo de fosforilación de la quinasa.

Intentando caracterizar el mecanismo por el cual Snail1 aumenta la fosforilación y la actividad quinasa de Akt hemos comprobado que es un mecanismo dependiente de PI3K (**figura R.7**). Este resultado es esperable (ver introducción **I.4**), ya que, la activación de Akt depende esencialmente de la actividad de PI3K. De hecho, a excepción de un trabajo en el que demuestran cómo PIKE-A interactúa con Akt y la activa de manera PI3K independiente [354], casi todas las proteínas que

interaccionan con Akt y modulan su actividad lo hacen de una manera PI3K dependiente [209, 260, 350, 355].

Resultados publicados por nuestro grupo [173] describen cómo Snail1 induce la fosforilación de Akt por inhibición de la fosfatasa Pten durante la apoptosis inducida por radiación γ . En el mismo trabajo se muestra cómo células MDCK después de ser irradiadas responden rápidamente con un aumento en los niveles de fosforilación de Akt, que se traduce en una mayor resistencia a la apoptosis. Para estudiar la relevancia de la represión de Pten por Snail1 en la resistencia a la apoptosis por radiación γ , Pten fue interferido. En este caso las células presentan una mayor resistencia a la apoptosis como es de esperar. Sin embargo, la protección que proporciona la interferencia de Pten a las células no es tan completa como la que proporciona la expresión de Snail1. Además, se muestra cómo los niveles de fosforilación de Akt en las células Snail1 antes de ser irradiadas ya son más altos. En consecuencia, estos resultados sugieren que Snail1 actúa sobre la activación de Akt por mecanismos diferentes, a parte de la represión que ejerce sobre Pten. De acuerdo con esto, Snail1 incrementa la resistencia a la apoptosis en células donde la expresión de Pten es indetectable. Además, la sobreexpresión de Pten provoca que los niveles de Akt decaigan después de irradiar las células. Sin embargo, aún sobreexpresando Pten, las células Snail1 presentan niveles mayores de fosfo-Akt que las respectivas células control. Los datos mostrados en esta tesis son consistentes con los publicados anteriormente por nuestro grupo los cuáles sugieren un mecanismo de activación de Akt por Snail1 independiente de su actividad transcripcional. En nuestro estudio, hemos demostrado cómo el mutante no represor de Snail1, el Snail1-P2A, aunque en menor medida, también aumenta la fosforilación de Akt (**figura R.8**). Al igual que ocurre con la proteína WT, este aumento se detecta tanto en el citosol como en el núcleo (**figura R.9**). El análisis de la actividad quinasa de Akt indica que este mutante no represor también es capaz de incrementar la actividad quinasa de Akt independientemente de su estado previo de activación. Teniendo en cuenta que en algunos experimentos la expresión de Snail1-P2A es mucho mayor que la del Snail1 (**figuras R.8, R.9**), no podemos descartar que el aumento que observamos en la fosforilación no sea consecuencia de una mayor expresión de la proteína. Sin embargo, en el análisis de la actividad

quinasa, donde se han transfectado transitoriamente Snail1 y Snail1-P2A, se obtienen expresiones similares de ambas proteínas, y se confirma que el mutante no represor Snail1-P2A es capaz de aumentar significativamente la actividad quinasa de Akt (**figura R.10**). Sin embargo, aunque los análisis estadísticos realizados indican que las diferencias en las actividades de Akt purificada en presencia de Snail1 WT y de Snail1-P2A no son significativas, en todos los ensayos realizados, las actividades detectadas de Akt en presencia del mutante no represor de Snail1 fueron menores que las detectadas en Akt purificada en presencia de la proteína WT. En consecuencia, no podemos descartar un mecanismo dependiente de la actividad represora de Snail1 como sería el mediado por la represión de alguna fosfatasa como Pten.

Los resultados relevantes obtenidos con este mutante no represor de Snail1 es la evidencia de un mecanismo mediante el cual Snail1 incrementa la fosforilación y la actividad quinasa de Akt independientemente de actividad represora. Teniendo en cuenta estos datos, los obtenidos en los ensayos quinasa *in vitro* en los que la preincubación de Snail1 incrementa la actividad quinasa de Akt, y la coimmunoprecipitación de ambas proteínas, proponemos como mecanismo alternativo el basado en la interacción directa con Snail1. Este mecanismo se confirma en los experimentos de purificación de GST-Akt, o *pull-down*, que muestran que tanto la proteína WT como el mutante Snail1-P2A interactúan con Akt (**figura R.21**). En consecuencia, el incremento de la actividad quinasa de Akt por Snail1 es la suma de diferentes mecanismos, entre los cuales podría estar la represión de algunas de las fosfatasas de Akt, como Pten, y una conformación más activa de Akt al interactuar con Snail1. Otra posibilidad es que la interacción con Snail1 bloquee el acceso de fosfatasas directas de Akt como PP2A o PHPPL y, por tanto, favorezca la acumulación de Akt activa prologando su actividad. De hecho, ya se ha descrito en diversos sistemas un mecanismo similar mediante el cual se regula la actividad de Akt impidiendo que PP2A acceda a la quinasa [203, 356]. Para comprobar si en nuestro caso este mecanismo también es el responsable, se podría analizar el efecto de Snail1 sobre la activación de Akt en presencia de algún inhibidor específico de estas fosfatasas, como el ácido okadaico, el cual inhibe selectivamente PP2A. Si en presencia de este inhibidor Snail1 continua

incrementando la fosforilación de Akt descartaríamos un mecanismo dependiente de la acción directa de Snail1 sobre PP2A. También podría ser que Snail1 interaccionara mejor con Akt activa, lo que favorecería esta acumulación de P-Akt en las células Snail1. Sin embargo, los datos indican cómo el incremento en la actividad quinasa de Akt por Snail1 tiene lugar independientemente del estado previo de activación de la quinasa. Aún así, el hecho de que el aumento en la fosforilación de Akt por Snail1 dependa de la actividad PI3K implica que para ver el efecto de Snail1 sobre Akt, es necesaria una activación basal de Akt. Experimentos de coimmunoprecipitación con mutantes de Akt como el T308A/S473A, que no puede ser fosforilado, aclararían esta cuestión.

Todos estos mecanismos basados en la interacción de Snail1 con Akt sólo serían aplicables al Akt nuclear. Snail1 incrementa la fosforilación de Akt tanto en el núcleo como en el citosol (**figura R.3**) sin embargo, sólo hemos detectado interacción de ambas proteínas en el compartimento nuclear. En consecuencia, parece más probable que el mecanismo de activación de Akt por Snail1 mediado por su actividad represora sea el responsable del incremento de fosforilación de Akt en el citosol.

Finalmente, no podemos descartar un efecto de Snail1 sobre algún activador por encima de Akt, como PI3K. Se ha descrito la existencia de una vía de señalización de PI3K autónoma en el núcleo [357]. Por tanto existe la posibilidad de que Akt se active en el núcleo. Sin embargo, esto dependería de la presencia nuclear de PDK1. Recientemente se ha descrito como esta *master* quinasa sufre cambios de localización celular [358]. En este mismo trabajo muestran cómo células Pten -/- presentan una mayor localización nuclear de PDK1. Sabiendo que Snail1 reprime Pten, sería interesante estudiar la localización de PDK1 en células que expresan Snail1 para poder analizar si éste es uno de los mecanismos que participa en la activación de Akt por Snail1.

De todos los mecanismos discutidos en este trabajo, el que muestra nuestros resultados es la activación de Akt por interacción directa con Snail1. Por tanto, nuestro estudio propone una nueva función de Snail1, no descrita anteriormente: la de cofactor directo de una proteína, en este caso de la quinasa Akt.

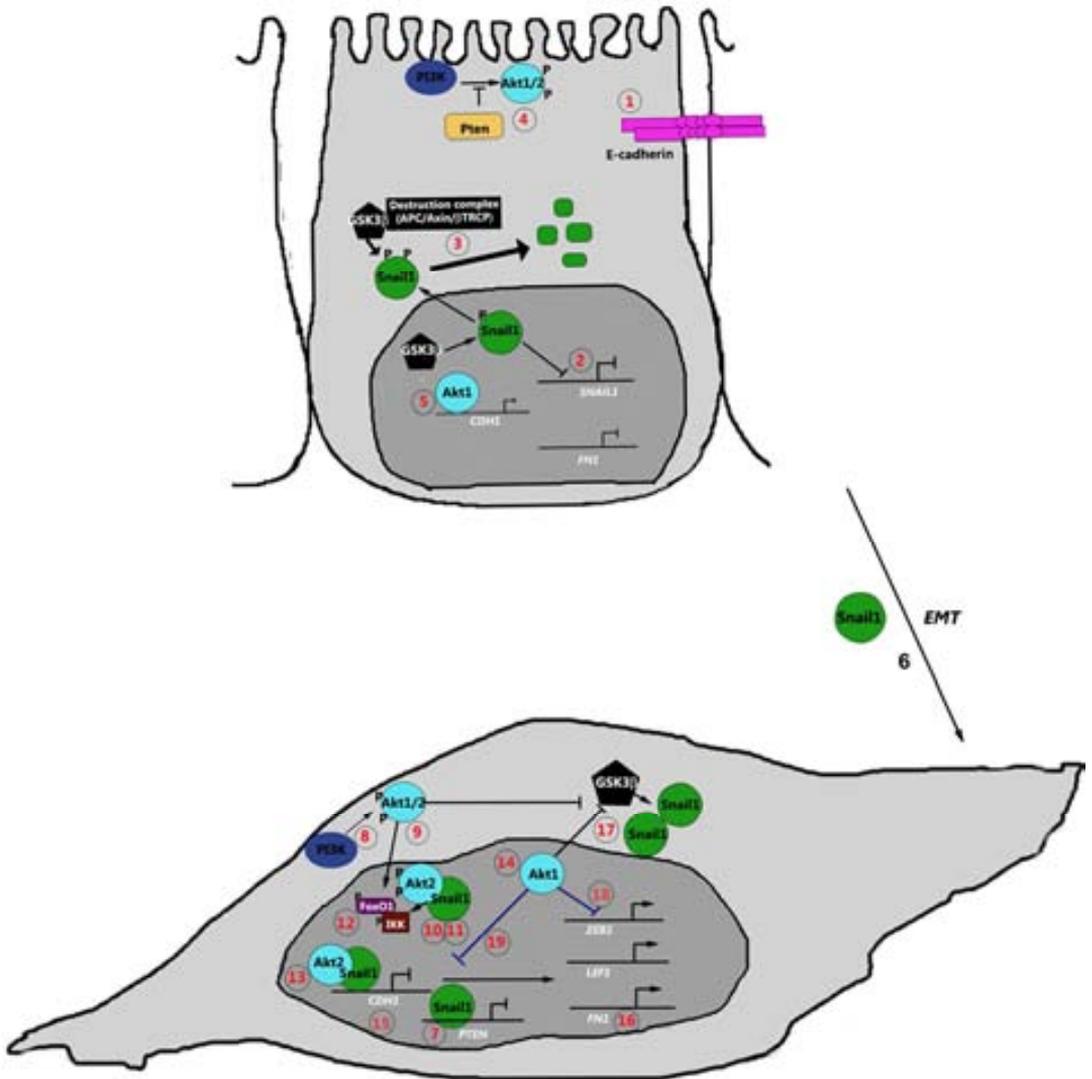


Figura D.4 Modelo propuesto que describe la relación directa entre Snail1 y Akt estudiada en este trabajo. (La descripción se comenta detalladamente en el texto).

D.3 Modelo propuesto

La progresión de un carcinoma está asociada a la pérdida de las características epiteliales y a la adquisición de propiedades mesenquimales e invasivas de las células tumorales. La pérdida de las uniones entre las células es el primer paso de la transición epitelio mesénquima (*EMT*). Durante este proceso tiene lugar la inactivación funcional de la E-cadherina. La represión de la E-cadherina por el factor de transcripción Snail1 es un paso esencial en la pérdida del fenotipo epitelial. La activación de Akt es una característica de muchos carcinomas humanos. Akt regula una gran variedad de procesos celulares incluyendo la *EMT*. En este trabajo describimos una relación directa entre Snail1 y Akt dentro del contexto de la *EMT*. Así pues, nuestros resultados muestran cómo Snail1 interacciona con Akt2. Dicha interacción incrementa la actividad quinasa de Akt2 la cual es necesaria para los cambios moleculares inducidos por la expresión de Snail1. De los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos el siguiente modelo (**figura D.4**).

En células epiteliales con uniones adherentes bien formadas (1), la expresión de Snail1 está reprimida (2) o la activación basal de GSK3 β es suficiente para exportar Snail1 del núcleo e inducir su degradación citosólica mediante el proteosoma siendo así muy corta la vida media de Snail1 (3). El funcionamiento de Pten bloquea o sólo permite una activación basal de Akt (4). Además, en estas células la isoforma de Akt, Akt1, esta presente en el promotor de la E-cadherina probablemente regulando la expresión basal de este marcador epitelial (5). Como se ha mencionado en la introducción, la mayoría de las señales que inducen *EMT* convergen en un incremento en la expresión de Snail1 (6). La expresión de Snail1 activa a Akt al menos mediante dos mecanismos. Uno dependiente de su actividad transcripcional, por ejemplo por inhibición de Pten (7) lo que implica un aumento general de la actividad PI3K (8), que incrementa la fosforilación y activación de cualquier isoforma de Akt tanto en el citosol (9) como en el núcleo (10) independientemente de su estado previo de activación. El otro mecanismo está asociado a la interacción directa entre ambas proteínas (11). Esta interacción induce la actividad quinasa de Akt, tiene lugar en el núcleo y con la isoforma Akt2. Este incremento de la actividad quinasa de

Akt por Snail1 se traduce en una mayor fosforilación de algunos de sus sustratos como FoxO1 e IKK α/β (12).

Nuestros datos muestran cómo la interacción entre Snail1 y Akt2 provoca su reclutamiento al promotor de la E-cadherina (13), desplazando a Akt1 (14) y cooperando así en la represión de dicho marcador epitelial (15). Aunque el mecanismo no ha sido descrito, nuestros datos reflejan cómo Akt2 es necesaria para la activación por Snail1 de genes mesenquimales como la Fibronectina (16). A su vez, Akt1 coopera también en los cambios moleculares inducidos por Snail1 seguramente controlando su estabilidad mediante la inhibición de GSK3 β (17). Este sería el esquema general en las células RWP1. En cambio, en las células HT29-M6 aunque Snail1 también promueve el reclutamiento de Akt2 (13) y el desplazamiento de Akt1 (14) en el promotor de la E-cadherina, los datos obtenidos muestran cómo Akt1 tiene un papel pro-epitelial ya que inhibe la represión de la E-cadherina, inhibiendo a Zeb1 (18) y bloquea la activación de genes mesenquimales por Akt2 y Snail1 (19).

CONCLUSIONES

1. La expresión estable de Snail1 en células epiteliales tumorales induce la fosforilación de Akt tanto en el citosol como en el núcleo. Este aumento en la fosforilación de Akt correlaciona con un aumento de la actividad quinasa *in vivo* sobre dos de sus sustratos: FoxO1 y IKK α/β .
2. La preincubación de Akt con la proteína recombinante GST-Snail1 incrementa la actividad de la quinasa *in vitro*. El dominio C terminal de Snail1 tiene un papel importante tanto en la interacción como en el incremento de la actividad de Akt.
3. Snail1 interacciona *in vivo* con Akt. Dicha interacción tiene lugar en el núcleo de células epiteliales tumorales. La isoforma de Akt que interacciona con Snail1 es Akt2.
4. Akt está unida al promotor de la E-cadherina independientemente de la presencia de Snail1. La expresión de Snail1 provoca un cambio de isoforma de Akt presente en el promotor de la E-cadherina. Así, Akt2 es la isoforma unida al promotor de la E-cadherina en presencia de Snail1 y Akt1 la isoforma unida al promotor en ausencia de Snail1. La actividad quinasa de Akt es necesaria para la represión de la E-cadherina por Snail1.
5. El papel de cada isoforma de Akt en los cambios moleculares inducidos por Snail1 es diferente según la línea celular estudiada. Así, Akt2 muestra un papel pro-mesenquimal en ambas líneas celulares analizadas. En las células RWP1 Snail1, Akt2 es necesaria para la represión de la E-cadherina y la activación de la Fibronectina por Snail1 sin embargo, en las células HT29-M6 Snail1 sólo es necesaria para la activación de genes mesenquimales. En cuanto al papel de Akt1, ésta presenta un papel pro-mesenquimal en las células RWP1 Snail1 siendo necesaria para estabilizarlo a nivel proteína y pro-epitelial en las células HT29-M6 Snail1 inhibiendo la expresión de Zeb1 y la activación de genes mesenquimales por Snail1/Akt2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Me lo contaron y lo olvidé; lo vi y lo entendí; lo hice y lo aprendí

Confucio

M.M.1 Construcciones de cDNA y su preparación.

Para expresar proteínas de fusión, tanto en procariotas como en eucariotas, lo primero que se hizo fue diseñar el plásmido o vector que contendría el cDNA de interés y se eligió el origen del cual provendría el inserto. Éste fue otro vector cDNA total de una línea celular.

M.M.1.1 Preparación de las construcciones

Obtención del inserto a partir de RNA total

Se escogió el sistema celular en el que la proteína de interés era abundante. Se localizó la secuencia a amplificar y se diseñaron los oligonucleótidos 5' y 3' teniendo en cuenta el vector aceptor del inserto. Para facilitar el clonaje se introdujeron secuencias dianas de enzimas de restricción que también se encontraban en el vector. En el oligonucleótido 5' se introdujo una secuencia *Kozak* (5'CCACC3') fusionada al final de la diana de restricción y precediendo el codón ATG de inicio, para mejorar la traducción. Se realizó una RT-PCR (**M.M.11**) para obtener el cDNA.

Obtención del inserto por subclonaje

Cuando la proteína que se quiso expresar ya estaba clonada en otro vector, se digirió con enzimas de digestión que liberaron la secuencia de la proteína o inserto con extremos compatibles a los lugares de restricción del vector de destino.

El vector con el inserto se digirió (2-3 μ g) en un volumen final de 20-50 μ l con los enzima/s (New England Biolabs) que se eligieron. La cantidad del enzima, el tampón utilizado, la temperatura y el tiempo de reacción fueron los específicos para cada enzima. La totalidad de la reacción se cargó en un gel de agarosa (0.5, 1, 2% dependiendo del tamaño del inserto) para separar la banda del vector de la del inserto. Se purificó la banda deseada con el *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham). Finalmente se eluyó en TE o H₂O estéril.

Obtención de inserto por PCR

Cuando el inserto se tuvo que extraer del vector de origen porque los extremos no eran compatibles o porque se quiso introducir algún cambio (delección, inserción, mutagénesis) se diseñaron los oligonucleótidos adecuados según el caso. Se partió de unos 150-300 ng de DNA molde y en un volumen total de 50 μ l, se añadieron el tampón y reactivos del kit de la polimerasa (existen diferentes tipos de polimerasa en nuestro caso se usó la *Pfx* (Invitrogen)). A la reacción de PCR se le añadió $MgCl_2$ 1.5 mM, 0.3 mM de una mezcla de dNTPs (Invitrogen) y 0.3 μ M de los oligonucleótidos diseñados. Las condiciones de PCR fueron: 95°C 3 min (heat shock), 95°C 15 seg, 50-68°C (dependiendo de la T_m de los oligonucleótidos) 30 seg, 68°C el tiempo fue diferente dependiendo de la extensión del inserto teniendo en cuenta la actividad de la polimerasa (1 min/1 Kb), repetición de los pasos 2,3 y 4 durante 25 ciclos y 68°C extensión final 2 min. Una vez realizada la PCR se purificó el fragmento a partir de un gel de agarosa.

M.M.1.2 Preparación de los vectores

Una vez preparado el inserto, el vector aceptor se linealizó con las mismas enzimas de restricción que las del inserto. Cuando se digirió con enzimas que generaron extremos cohesivos el vector se defosforiló para evitar recircularizaciones. El vector fue defosforilado mediante la *cal* *intestine phosphatase* (CIP) (New England Biolabs (NEB)) durante 1 h a 37°C. Posteriormente la fosfatasa se inactivó incubando 15 min a 70-75°C. El DNA se purificó con el Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Se eluyó con agua estéril o TE. Si se necesitó introducir algún nucleótido, se usó el fragmento *Klenow* (NEB) durante 15 min a temperatura ambiente.

Una vez obtenidos el inserto y el vector, éstos se cargaron en un gel de agarosa para comprobar la relación vector: inserto y si la medida era la correcta. Seguidamente se realizó la **ligación** con la T4 ligasa (New England Biolabs) siendo de 1 h a temperatura ambiente en el caso de haber usado enzimas cohesivos y toda la noche en el caso de haber usado enzimas romos. Es importante la relación vector: inserto para conseguir colonias positivas. Esta relación depende del tamaño de los

dos DNAs. Por norma general se ligaron en una relación molar 1:3 en el caso de extremos cohesivos y en una relación 1:10 en el caso de extremos romos.

En general el producto de la ligación se transformó en DH-5 α competentes generadas por el método de *Inoue* [359]. El proceso de transformación consistió en 30 min en hielo, seguidos de choque térmico a 42°C durante 90 seg y posterior recuperación a 37°C con 1 ml de LB. Se sembró el resultado en una placa de LB-agar con el antibiótico de selección conferido por el vector y se comprobaron si las colonias crecidas contenían el inserto. Para ello, se extrajo el DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina con el kit de *minipreps* de Promega. El DNA se digirió para comprobar que el vector realmente contenía el inserto y si la clonación se hizo con solo un enzima, comprobar que la dirección de inserción fue la adecuada. Seguidamente, para asegurar que el fragmento clonado contenía la secuencia correcta, se secuenció mediante el *dRhodamine terminator Cycle Sequencing kit* (Perkin Elmer) con oligonucleótidos próximos al lugar de interés (máximo 500 pb).

Los vectores pueden ser separados en dos grandes grupos: los que expresan la proteína en procariontes (tienen un promotor procarionte) o los que expresan el inserto en eucariotes (tienen un promotor eucariótico). Dentro de los vectores de expresión en eucariotes existen vectores de interferencia los cuáles expresan un *short hairpin* RNA. Este pre-RNA es procesado por la célula, convirtiendo el precursor (en forma de *hairpin*) en RNA *sense* y *antisense* de tal manera que simula un RNA interferente natural e impide la expresión de una proteína en concreto (**pLKO1**).

Vectores de expresión en procariontes

Con el objetivo de realizar los ensayos de fosforilación y los *pull-downs*, diferentes cDNAs procedentes de diferentes pcDNA3-Snail1 fueron clonados al vector pGEX-6P1 o 6P2 (Amersham) según se describe en [84], [142] con las dianas **BamHI/XhoI**. Este tipo de vector expresa la proteína fusionada a la *Glutathion-S-Transferase* (GST) en posición N-terminal. La expresión es inducible por IPTG. De esta manera, se pueden purificar las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad a la *Glutathion-Sepharose 4B*. También, se puede obtener el producto final sin GST

gracias a la secuencia de corte específica para la proteasa *PreScission* que contiene la etiqueta GST en el inicio de transcripción (ver **M.M.2.1**). Las diferentes construcciones utilizadas se detallan en la **figura R.11**.

Vectores de expresión en eucariotas

pcDNA3 -mmsnail1/pIRESneo-snail1-P2A-HA

mmsnail1 pcDNA y pIRES-neo fueron clonados previamente en nuestro laboratorio. El cDNA de mmsnail1 fue obtenido a partir de mRNA de fibroblastos NIH3T3 mediante RT-PCR con oligonucleótidos específicos cuya secuencia se obtuvo del archivo *GenBank* (NM_011427). El oligonucleótido *sense* (5') contenía la diana **BamHI** y una secuencia *Kozak* (5'CCACC 3') fusionada a la diana BamHI precediendo al codón ATG de inicio para mejorar la traducción. Al oligonucleótido antisense (3') se le añadió la diana **EcoRV** eliminando el codón stop y manteniendo la pauta de lectura con la primera tirosina (TTA) del péptido HA (Hemaglutinina). Los vectores receptores (pcDNA3/pIRESneo) contenían previamente la etiqueta HA clonada **EcoRV/NotI**.

El mutante mmsnail1-P2A se construyó en nuestro laboratorio por el Dr. Eduard Batlle a partir del pcDNA3-mmsnail1-HA usando el *Quickchange Site Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) como se describe en [84]. El clonaje en pIRESneo se realizó a partir del mmsnail1-P2A pcDNA3 usando **EcoICRI/NotI**. El vector pIRESneo fue digerido **EcoRV/NotI**. Los insertos, con HA, se liberan del vector digiriendo **BamHI/NotI**

cDNA	Oligonucleótido sense (5'-3')	Oligonucleótido antisense (5'-3')
mmsnail1	CCGGAT <u>CCACC</u> ATG CCGCGCT CCTCCTGG	CCGGATATCCGCGAGGGC CTCCGGAGCA
mmsnail1- P2A	GGCGGATCCACC <u>ACC</u> ATG <u>g</u> CGC GCTCCTCCTGG	CCAGGAAGGAGCGCG c CAT <u>GGTGGT</u> GGGATCCGCC

Tabla M.M.1 Secuencias de oligonucleótidos usados para Snail1 y para Snail1-P2A. La secuencia *Kozak* está subrayada, el codón de inicio en negrita y la mutación P2A en letra minúscula.

pcDNA3 mmsnail1N/C terminal

Las dos mitades de Snail1 se obtuvieron a partir del pcDNA3-Snail1 usando la diana BglIII presente a 455 pb del ATG de inicio. La mitad N-terminal (1-151) se mantuvo en el vector que fue religado. La mitad C-terminal (152-264) fue amplificada del cDNA entero con oligonucleótidos específicos, introduciendo una secuencia *Kozak* y un codón de inicio ATG en el extremo 5'. Este oligonucleótido hibrida en las 18 pb a partir de la diana BglIII utilizada para separar las dos mitades N y C.

pcDNA3mmsnail1-Δ28, pcDNA3mmsnail1-SRD, pcDNA3mmsnail1-Nt-1-82

La delección 237-264 (Snail1-Δ28) se consiguió mediante *high-fidelity PCR amplification* y oligonucleótidos específicos. El oligonucleótido 3' hibrida en la secuencia mmsnail1 evitando el último dedo de zinc (237-264). En el extremo 3' se añadió una diana EcoRV para poner la etiqueta HA en pauta. Se libera del vector digiriendo **BamHI/EcoRV** (sin HA) o **BamHI/NotI** (con HA).

cDNA	Oligonucleótido sense (5'-3')	Oligonucleótido antisense (5'-3')
mmsnail1- Δ28	CCGGAT <u>CCACC</u> ATG CCGCGCT CCTTCCTGG	CCGGATATCCGTATCTCTTCACATC

Tabla M.M.2 Secuencias de oligonucleótidos usados para Snail1-Δ28. La secuencia *Kozak* está subrayada, el codón de inicio en negrita.

El mutante SRD (*serine rich domain*), que comprende los aminoácidos 82-123, se obtuvo mediante oligonucleótidos específicos. El oligonucleótido 5' añadía una secuencia *Kozak*, una diana BglIII para su clonaje y un nuevo codón de inicio. El oligonucleótido antisense se diseñó para amplificar desde el final del dominio rico en serinas y añadía una diana PstI en el extremo 3'.

cDNA	Oligonucleótido sense (5'-3')	Oligonucleótido antisense (5'-3')
mmsnail1-SRD	GCAAT <u>AGATCT</u> TCCACCATGGAG AGCCCCAAGGC	CGTCTGCAGCTCCAGGGA GGAGGCCG

Tabla M.M.3 Secuencias de oligonucleótidos usados para Snail1-SRD. El codón de inicio se muestra en negrita. Subrayada se muestra la diana BglIII (oligo sense) y la diana PstI (oligo antisense).

El cDNA mmsnail1-Nt(1-82) se obtuvo a partir de pcDNA3-mmsnail1 mediante oligonucleótidos específicos. El sense fue el mismo que se detalla en la **tabla M.M.1** y el antisense el que se detalla en **tabla M.M.3** (sense).

Mutantes Serinas-Alaninas, Serinas-Aspárticos y mutantes puntuales

Los mutantes Snail1-S/A y Snail1-S/D se obtuvieron mediante síntesis dirigida con oligonucleótidos sintéticos correspondientes a la secuencia 90-120 (Sigma-Genosys). Los dominios resultantes se insertaron en un cDNA de Snail1 al que previamente se le había eliminado esta región. Los codones que codificaban para serinas se cambiaron a alaninas o aspárticos respectivamente. Las serinas mutadas se muestran en la **tabla M.M.4**. El cambio de serinas por alaninas produjo la aparición de una nueva diana NotI que se usó para localizar los mutantes. Aún así, todos los mutantes fueron secuenciados.

cDNA	Dominio rico en serinas
mmsnail1-S/A/D	SLSDEDSGK <u>SS</u> QPPSPSPAPSSFSSTASASS

Tabla M.M.4 Serinas mutadas en el mutante Snail1-S/A y Snail1-S/D. La serina subrayada, la S99, no se conserva en todos los homólogos en mamíferos.

Para la realización de los mutantes puntuales Snail1-T177A y Snail1-S246A, se partió del cDNA de pcDNA3-mmsnail1 y mediante mutagénesis dirigida con oligonucleótidos complementarios y específicos se amplificó todo el vector. Después de hacer la PCR, se digirió con DpnI para eliminar el vector parental ya que esta enzima digiere el DNA metilado. El nuevo vector generado no está metilado y por tanto no es digerido. Los mutantes se comprobaron por secuenciación.

cDNA	Oligonucleótido sense (5'-3')	Oligonucleótido antisense (5'-3')
mmsnail1-T177A	CGAAGCCAC G CGCTGCCTTGT	ACAAGGCAGCG C GTGGCTTCG
mmsnail1-S246A	CGAACCTTC G CCCGCATGTCC	GGACATGCGGG C GAAGGTTCC

Tabla M.M.5 Secuencias de oligonucleótidos usados para Snail1-T177A y Snail1-S246A
En negrita se muestran la base cambiada.

GST-Akt1, GST- Δ PH-Akt1

Estos plásmidos fueron cedidos por el Dr. José Miguel Lizcano. El vector **pEGB-T2** permite la expresión en eucariotas de la quinasa Akt1 fusionada a la Glutation-S-transferasa. El mutante Δ PH-Akt1 contiene una delección de los aminoácidos 1-117. El cDNA se libera digiriendo con **BamHI/KpnI**.

pcMV5-Akt-K179M-HA

Este vector fue cedido por el Dr. Lionel Larue. Este mutante puntual de Akt altera el sitio de unión al ATP anulando su actividad quinasa. El inserto se libera digiriendo con **EcoRI/BglII**. El vector es el pcMV5 de expresión en eucariotas.

Los tampones utilizados para estos procedimientos fueron

Luria-Bertani (LB)

10 g/ l triptona
5 g/ l extracto de levadura
10 g/ l NaCl

LB-agar

LB
1.5% agar (w/v)

Terrific Broth (TB)

12 g/ l triptona
24 g/ l extracto de levadura
720 mM K_2HPO_4
170 mM KH_2PO_4
4% glicerol

(para crecer vectores de bajo
número de copia como el pLKO)

Antibióticos (1000x)

Ampicilina: 150 mg/ ml (H_2O)
Cloramfenicol: 50 mg/ ml (EtOH)

TAE

40 mM Tris pH 7.6
9.4 mM ácido acético
1 mM EDTA

Sample buffer for DNA (10x)

16.7 mM Tris-HCl pH 7.5
83.3 mM EDTA
16.7 Ficoll 400
0.6% orange green

M.M.2 Purificación de proteínas recombinantes en *E.coli*.

Una vez subclonados los diferentes mutantes de Snail1 en el vector pGEX y comprobados, se retransformaron en una cepa de *E.coli* específicamente diseñada para la expresión de proteínas de mamífero BL-21 RIL, las cuáles contienen los tRNAs de los aminoácidos Arginina, Isoleucina y Leucina. Para seleccionar los vectores, los cultivos se crecieron en medio LB con ampicilina (para seleccionar el pGEX) y cloramfenicol (para seleccionar los plásmidos que codificaban los tRNAs) a 37°C y en agitación 220 rpm.

Se sembró en una placa de LB-agar+ Ampicilina+ Cloramfenicol, se creció toda la noche, se comprobó el DNA plasmídico y se guardó un *stock* con 30% de glicerol a -80°C.

M.M.2.1 Inducción, purificación y elución de proteínas recombinantes

Inducción

20 ml de cultivo LB+ Ampicilina+ Cloramfenicol de bacterias que contenían el plásmido de interés fue crecido toda la noche. 2 ml de este cultivo saturado fueron diluidos 1/100. La inducción se llevó a cabo cuando el cultivo llegó a fase exponencial ($Abs=0.6$ a $\lambda=600nm$) añadiendo IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Después de 2 h más creciendo, las células se recogieron por centrifugación (10 min a 4°C y 8000 rpm). A partir de este paso todo el proceso se mantuvo a 4°C para evitar la acción de las proteasas y la agregación de las proteínas recombinantes. El protocolo escogido para purificar cada proteína dependió de su solubilidad y de la tendencia a agregarse.

Solubilización con TX-100 1%

Es el protocolo utilizado para las proteínas solubles (**Snail1-Nt(1-82)**, **Snail1-Ct**, **Snail1-Δ28**, **Snail1-SRD**, **GST**). El pellet de células se resuspendió en 10 ml de PBS (*phosphate-buffered-saline*), se separó en fracciones de 0.5 ml y se sonicó 15 seg a una fuerza de 40% de sonicador. Se juntaron todas las fracciones en un solo tubo y se añadió 1% de Tritón X-100 final. Se agitó durante 30 min y se centrifugó 10 min a 10.000 rpm a 4°C.

Solubilización con N-Laurilsarcosine

Es el protocolo utilizado para las proteínas que tenían tendencia a agregarse (**Snail1-WT, Snail1-Nt(1-151), Snail1-S/D**). El pellet se resuspendió en 10 ml de STE con 100 µg/ml de lisozima y se incubó durante 15 min. El pellet se dividió en alícuotas de 0.5 ml y se sonicó. Todas las fracciones se juntaron en un tubo al cual se le añadió DTT a 5 mM final, N-Laurilsarcosine resuspendido en STE al 10% y Tritón X-100 al 1%. Se homogenizó con el vórtex durante 1 min y se centrifugó a 11.000 rpm 20 min a 4°C. En este momento, se le añadió Tritón X-100 al 2% final.

Purificación con Glutathion-Sepharose 4B

Para purificar la proteína de interés, se incubó el sobrenadante de la centrifugación 1 h a 4°C con 400 µl de *Glutathion-Sepharose-4B* (GE Healthcare) diluída al 50% con PBS (200 µl efectivos). Esta resina tiene unida covalentemente Glutathion y permite la unión específica de la GST. De esta manera, en un solo paso de cromatografía, la proteína de fusión con GST fue retenida, mientras que el resto de proteínas fueron descartadas.

Se lavó la resina con PBS de 5-10 veces para eliminar uniones inespecíficas y se eliminó el exceso de líquido seguido de la elución. Si se desea que la proteína mantenga la GST se tiene que eluir con GEB (*Glutathion Elution Buffer*). El Glutathion reducido que contiene el tampón compite con la Glutathion de la sefarosa por la unión a la GST, liberando así la proteína. Se añadieron 200 µl de GEB a la resina y se incubaron en agitación 10-20 min a temperatura ambiente (protocolo *Glutathion-Sepharose-4B*). Se centrifugó a 500 g y se recogió el sobrenadante que contenía la proteína. Se repitió el proceso y se comprobó en un gel de poliacrilamida teñido con *Coomassie Blue* si esta segunda fracción contenía proteína. La solución tiene que estar libre de Glutathion para los experimentos, por lo que el eluido se dializó contra el tampón de diálisis 16 h a 4°C. En el caso que se quiera la proteína sin la etiqueta GST, se cortó con 2 µl de *PreScission protease* en un volumen final de 200 µl de tampón de diálisis. Se dejó incubar de 4 a 16 h en agitación a 4°C. Se centrifugó a 500 g y se recogió el sobrenadante que contenía la proteína sin la GST.

Comprobación de la eficiencia de la purificación

Se cogieron muestras de cada paso durante todo el proceso. Estas muestras junto a una alícuota de la proteína final se cargaron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con *Coomassie Blue*. La concentración de la proteína se determinó cargando en el mismo gel un patrón conocido de BSA (albúmina de suero bovino). Se cuantificaron las bandas con un escáner GS-700 y se refirió cada valor a los patrones de BSA.

Los tampones utilizados para estos procedimientos fueron

Tampón diálisis

25 mM Tris pH 8.0
1 mM EDTA
120 mM NaCl
1 mM DTT

Tinción *Coomassie blue*

0.1% (w/v) Coomassie blue
20% (v/v) MetOH
10% (v/v) Glacial acetic acid

STE

10 mM Tris pH 8.0
100 mM NaCl
1 mM EDTA

PBS

136.9 mM NaCl
2.7 mM KCl
10.14 mM Na₂HPO₄
1.76 mM KH₂PO₄ pH 7.3

Tampón GEB

100 mM Tris-HCl pH 8
120 mM NaCl
10% glicerol
0.1% Triton X-100
5 mM DTT
(10 mM Glutation reducida)

M.M. 3 LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS

Todas las líneas celulares fueron crecidas en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Invitrogen). El medio fue suplementado con glucosa 4.5 g/ l, piruvato sódico (Life Technologies), glutamina 2 mM, penicilina 56 U/ ml, estreptomycin 56 µg/ l y 10% de suero fetal bovino (FBS; GIBCO). Las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda que contenía 5% CO₂ y 95% de aire.

Línea celular	Origen	Características
RWP1	Carcinoma ductal de páncreas humano	Morfología epitelial. Contactos intercelulares bien formados.
HT-29 M6	Adenocarcinoma humano de colon	Morfología epitelial. Altos niveles de E-cadherina. Forman colonias compactas
293T HEK	Línea embrionaria de riñón humano	Morfología fibroblastoide.
MDCK	Epitelio tubular renal de perro	Morfología epitelial. Forman colonias. Complejos de unión bien formados.
SW480	Adenocarcinoma humano de colon	Morfología intermedia. A baja confluencia presentan bajos niveles de E-cadherina, fenotipo que revierte a alta confluencia. APC mutado, alta actividad transcripcional de la vía β-catenina/TCF. K-ras oncogénico
Mia-Paca2	Adenocarcinoma ductal de páncreas	Fenotipo mesenquimal. Presentan altos niveles de Snail1.
SW620	Adenocarcinoma de colon	Proviene de metástasis en nódulo linfático. Fenotipo mesenquimal. Presentan altos niveles de Snail1.

Tabla M.M.6 Líneas celulares utilizadas durante este trabajo y algunas de sus características.

Las líneas celulares se crecieron en frascos de plástico tratado haciendo pases semanales. Cuando las células llegaron a confluencia fueron tripsinizadas (tripsina 1% Life Technologies) y se sembraron en placas para hacer el experimento o en frascos para su mantenimiento.

Se utilizó un número de células diferente dependiendo del experimento. Para determinarlo, se añadió *Trypan Blue* (Sigma) a una mezcla de células y con ayuda de una cámara de *Neubauer* y un microscopio óptico, se controló la integridad y la

supervivencia celular y se determinó el número de células/ ml. Se descartaron cultivos que presentaron tinciones positivas superiores al 5%.

Los *stocks* de las diversas líneas celulares se guardaron en nitrógeno líquido con un 10% DMSO como crioprotector.

M.M. 3.1 Clones estables

RWP1 Snail1/Snail1-P2A/control: los clones se obtuvieron después de la transfección estable con pcDNA-mmsnail1-HA o pIRESneo-mmsnail1-P2A-HA mediante el *kit Lipofectamine-Plus Reagent* (Invitrogen) en medio Optimem (Invitrogen). 48 h después de la transfección, las células fueron seleccionadas con G418 (500µg/ml) y los clones fueron aislados. Se analizó la expresión de los vectores mediante *western-blot* con el anticuerpo anti-HA.

HT-29 M6 Snail1/control: La línea HT-29 M6 fue seleccionada a partir de la línea parental HT-29 M6 con metrotexato a una concentración de 10^{-6} M, con un fenotipo mucosecretor [360]. Los clones estables HT-29 M6 mmsnail1 y control se obtuvieron en nuestro laboratorio como se describe en [84]. Los clones expresan mmSnail1 con el tag hemaglutinina (HA) bajo un promotor inducible que deja de ser funcional al añadir Doxiciclina (2 µg/ml) al medio de cultivo. Los clones controles contienen el vector vacío pUHD10-3. La expresión estable de Snail1 se consiguió añadiendo los antibióticos G418 (neomicina) a 500 µg/ ml y Higromicina (200 µg/ ml) en el medio. Estos clones presentan un fenotipo típico de *EMT* con baja expresión de E-cadherina y pérdida de la cohesión celular.

MDCK Snail1/control: clones obtenidos en nuestro laboratorio, descritos en [84], [154]. Se obtuvieron a partir de la transfección estable con el vector pIRES-neo mmsnail1HA. La expresión estable de Snail1 se mantuvo añadiendo G418, 500 µg/ ml al medio. Estos clones pierden totalmente la expresión de la E-cadherina y adquieren un fenotipo fibroblastoide. Los clones controles contienen el vector vacío pIRES.

SW480 Snail1/control: clones cedidos por el Dr. Alberto Muñoz (Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC, UAM). Descritos en [168].

M.M.4 Transfección/Infección.

Placa	Número de células sembradas
Placa de 6 pozos	2×10^5
100 mm Ø	1×10^6
150 mm Ø	5×10^6

Tabla M.M.7 Condiciones en las que las células fueron sembradas en placas para ser transfectadas o infectadas. Se sembró un número de células de tal manera que estas estuvieran al 80% de confluencia en el momento de la transfección o infección (normalmente 24 h después de la siembra). (Ø : diámetro)

Transfección

Las células fueron transfectadas o bien con el kit *Lipofectamine 2000* (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, o con PEI (polytlenimine polymer). En el caso de **Lipofectamina**, se utilizó una relación de 2 µl de reactivo/ µg de DNA plasmídico en un volumen final de medio Optimem (Invitrogen) indicado, dependiendo de la superficie de la placa. La mezcla se añadió a la placa con Optimem. A las 4 h se cambió el medio Optimem por medio DMEM y se dejó 24-48 h (si la proteína es tóxica o se expresa en grandes cantidades se recomienda detener la expresión a las 24 h). En el caso del **PEI**, en la **tabla M.M.8** se muestran los valores utilizados para cada componente de la mezcla de transfección la cual contenía NaCl 150 mM, DNA y por último el PEI 1 mg/ ml a pH 7.5. Esta mezcla se homogeneizó en un vórtex 10 seg y se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente. Gota a gota en espiral y a cierta altura la mezcla se añadió a las células en medio DMEM dejando la transfección 24 h-48 h. En el caso de dejar 48 h la transfección es recomendable cambiar el medio a las 24h.

Placa	DNA(cantidad máxima)	NaCl (volumen final µL)	PEI µL
6 pozos	2 µg	200	10
100 mm Ø	15 µg	1560	78
150 mm Ø	33 µg	3320	166

Tabla M.M.8 Condiciones para la transfección con PEI.

Infeción

Las células fueron infectadas con lentivirus portadores del plásmido pLKO.1-puro el cual llevaba como inserto shRNA para Akt1 y para Akt2. Estos fueron obtenidos de Sigma (números de referencia **shAkt1** TRCN0000039793, TRCN0000039794, TRCN0000039795, TRCN0000039796, TRCN0000039797 para **shAkt2** TRCN0000039968, TRCN0000039969, TRCN0000039970, TRCN0000039971, TRCN0000039972).

La línea celular utilizada para la producción de los virus fue HEK 293T. Se sembraron 1×10^6 de estas células en placas de 100 mm de diámetro (\emptyset). A las 48 h las células presentaron un 100% de confluencia. La mezcla de transfección contenía 50 % pLKOsh (una mezcla de 5 shRNA para Akt1 o para Akt2 o un shRNA irrelevante) y una mezcla de vectores para la producción de los virus que consistía en 10 % pCMV-VSV-G (*envelope protein*), un 30 % de pMDLg/pRRE y un 10 % de pRSV (los dos últimos para empaquetar los virus), NaCl y PEI. Después de 24 h, el medio se cambió con el fin de concentrar o aumentar la titulación del virus (ver **tabla M.M.9**). Después de 24 h más, se cambió el medio por medio fresco, el anterior se filtró y se le añadió *polybrene* 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (aumenta la eficiencia de la infección ya que actúa como *carrier*). Este medio filtrado, que contenía los virus, se añadió a las células que se querían infectar (Infección 1ª). A las 8 h, se cambió el medio de las células infectadas por medio fresco. Se realizó una segunda infección con los virus recogidos a las 48 h, durante 8 h (Infección 2ª) y se volvió a añadir medio fresco durante 16 h más a la células infectadas (las células productoras del virus se descartaron). Después de estas dos rondas de infección, se añadió medio fresco con puromicina 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para seleccionar las células que habían sido infectadas y se mantuvo durante 48 h (si las células están confluentes la puromicina es menos eficiente; en ese caso se tripsinizaron). A las 48 h de selección con puromicina se sembraron las células necesarias para el experimento sin selección. Para analizar la eficiencia de infección se incluyó una placa control la cual no fue infectada. Las células de esta placa no sobrevivieron a la selección con puromicina.

Placa con 293T HEK	Volumen de medio para concentrar
placa de 6 pozos	2 ml
100 mm Ø	5,5 ml
150 mm Ø	12 ml

Tabla M.M.9 Concentración de medio de acuerdo con la superficie de la placa

M.M.5 Tratamientos

Deprivación de suero (0% FBS) Para el análisis de la activación basal de Akt o previamente a la estimulación por IGF-1 o a la introducción de algún inhibidor, a las células después de ser crecidas durante 24-36 h con medio DMEM 10% FBS, se les retiró el medio y se les añadió el mismo volumen de medio DMEM pero sin suero el cual se mantuvo 8 h o 12 h más. Antes de añadir el medio se realizaron al menos dos lavados de medio sin suero o PBS para la eliminación total del suero en el medio.

IGF-1 Factor de crecimiento insulínico tipo 1 o *Insulin-like Growth Factor-I* (Sigma) de ratón expresado en *E.coli*. El IGF-1 de ratón y el humano comparten un 97 % de la secuencia. Es un potente factor de crecimiento mitótico que media la activación de Akt. Después de deprivar a las células de suero, se añadió IGF-1 a una concentración final de 20-50 ng/ ml durante 5, 30 o 60 min. En la condición control se añadió PBS-0.1% BSA.

LY-294002 Potente inhibidor permeable y específico de la PI3K [361] que impide la activación de Akt. Se utilizó a una concentración final de 50 µg/ ml durante 30 min como sugería la casa comercial (Biomol Laboratories). En la condición control se añadió DMSO.

M.M.6 Extracción y análisis de proteínas

M.M.6.1 Extracción de proteínas

Cuando las células llegaron a la confluencia adecuada o se acabó el proceso de transfección, éstas se lisaron para extraer las proteínas. El tipo de extracción dependió del experimento que se quiso realizar. Todas las extracciones se realizaron en hielo para evitar la degradación proteica y todos los tampones fueron complementados con un cóctel de inhibidores de proteasas y de fosfatasa. Como agente reductor se utilizó DTT a excepción del tampón lisis quinasa en el cual se utilizó β -mercaptoetanol.

Inhibidores de proteasas

10 μ g/ ml aprotinin

1 mM leupeptin

2 mM pepablock

10 μ g/ ml pepstatin

Inhibidores de fosfatasa

1 mM β -glycerol phosphate

10 mM sodium fluoride phosphatase (NaF)

2 mM sodium orthovanadate (NaOV)

M.M.6.1.1 Purificación de la quinasa Akt1 de células 293T HEK.

Para la expresión y purificación de la quinasa Akt1 se dividió un frasco T75 confluyente de células HEK 293T en cinco placas de 100 mm \varnothing . A la 24 h se transfectó el plásmido pEGB-GST-Akt1 (5 μ g) mediante el protocolo PEI. Se optimizó la relación μ g DNA/ μ L PEI siendo la mejor la relación 1 μ g DNA/ 10.5 μ L PEI (preparado a 1 mg/ ml en agua miliQ y tamponado a pH neutro con HCl). La mezcla de transfección se incubó 10 min en medio DMEM sin suero y se añadió gota a gota a las células. Se dejó expresar hasta 48 h. Las células se lisaron con el tampón lisis quinasa más un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma). Un volumen de estos lisados se incubó con 10:1 (v/v) de *Glutathion-sepharose-4B* (Pharmacia) durante 1 h a 4°C. La GST de la proteína transfectada (GST-Akt1) se unió específicamente a la sefarosa. Tras la incubación, se hicieron cuatro lavados con el mismo tampón lisis quinasa pero con un mayor contenido en sal, eliminando el sobrenadante mediante centrifugaciones de 1 min a 11000 rpm a temperatura ambiente. El último lavado se realizó con el tampón quinasa. Se eliminó el exceso de líquido de la resina y se añadió el mismo volumen de tampón de elución a cada alícuota suplementado con

sacarosa para conservar mejor la proteína. De cada placa se obtuvieron 5 alícuotas y se guardaron a -80°C hasta su uso.

En el caso de transfectar GST-Akt1 bajo diferentes condiciones, por ejemplo cotransfectando con Snail1-WT o Snail1-P2A, antes de incubar un volumen de lisado con la sefarosa, se cargaron 5 µl de cada condición en un gel y se analizaron los niveles de GST-Akt. Como resultado, se modificaron o no los volúmenes a incubar de cada lisado para purificar la misma cantidad de la quinasa en cada condición. Los lisados se guardaron a -20°C no más de 24 h. Independientemente del volumen escogido en cada condición, todas las incubaciones se hicieron en un volumen final de 200 µl de tampón de lisis quinasa.

Para saber el mínimo volumen de lisado a incubar para poder detectar actividad quinasa, se realizaron pruebas de diferentes tiempos de reacción con 25 µl de cada lisado. Una vez determinada la actividad de la quinasa purificada en ese volumen, se decidió aumentar el volumen o bien alargar el tiempo del ensayo quinasa. En cada ensayo, siempre hubo un control o blanco el cual fue una placa de células HEK 293T sin transfectar.

Los tampones utilizados para estos prodecimientos fueron

Tampón de lisis quinasa

- 50 Mm Tris-HCl pH 7.5
- 0.27 M Sacarosa
- 1 mM NaOV
- 1 mM EDTA
- 1 mM EGTA
- 10 mM Na B glycerophosphate
- 50 mM NaF
- 5 mM Sodium pyrophosphate
- 1% (by mass) Triton X-100

Justo antes de usarlo:

- 0.1% B-mercaptoetanol
- 1% Protease Inhibitor Cocktail cat# P8340 Sigma

Tampón lisis quinasa+NaCl

- Tampón lisis
- 0.5 M NaCl

Tampón de elución

- 50 mM Tris-HCl pH 8
- 0.27 M Sacarosa
- 0.1 mM EGTA
- 0.1% B-mercaptoetanol

Tampón quinasa

- 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- 0.1 mM EGTA
- 0.1% B-mercaptoetanol

M.M.6.1.2 Extracción total de proteínas

Extracción en condiciones desnaturizantes con el tampón de lisis 1% SDS

Este tampón se utilizó para extraer todo el contenido proteico de las células (proteínas solubles, nucleares y transmembrana). Después de crecer las células 48 h, se descartó el medio de cultivo original y las células se lavaron 2-3 veces con PBS frío. Se añadieron diferentes volúmenes según el tamaño de las placas siendo éste 200 µl para las placas de 6 pozos y 500 µl para las placas de 100 mm de diámetro. Las células se recogieron con una rasqueta y se homogeneizaron en el tampón de lisis con una jeringa de insulina (20 gauges) unas 20 veces. Las muestras se hirvieron 5 min a 95°C para desnaturizar tanto el DNA como las proteínas. Los extractos se centrifugaron 10 min a 20.000 g para comprobar que no había pellet lo que significaba que la extracción se había hecho correctamente. La concentración proteica se determinó mediante *Lowry*. La cuantificación se realizó por interpolación en una recta patrón de BSA.

Tampón de lisis SDS 1%

- 1% SDS
- 10 mM EDTA
- 50 mM Tris pH 8.0

Extracción total de proteínas en condiciones no desnaturizantes

Este tampón se utilizó para extraer las proteínas solubles citosólicas y nucleares de las células en condiciones nativas. Fue utilizado para los experimentos de inmunoprecipitación y *pull-down*. Después de crecer las células 48 h, el medio de cultivo original se descartó y las células se lavaron 2-3 veces con PBS frío. Se añadieron diferentes volúmenes según el tamaño de las placas. Las células se recogieron con una rasqueta, se resuspendieron en el tampón de lisis y se incubaron durante 30 min a 4°C en agitación. Seguidamente, el lisado se homogeneizó con una jeringa de insulina (20 gauges) unas 20 veces para asegurar la rotura de núcleos. La solución resultante se centrifugó 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se consideró como "lisado total en condiciones nativas". Los lisados se cuantificaron mediante el ensayo *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad) basado en el método *Bradford*. La cuantificación se realizó interpolando a una recta patrón de BSA.

Tampón de lisis IP/pull-down

50 mM Tris pH 7.6
 150 mM NaCl
 1% Tritón X-100
 0.5% NP-40/Nonidet
 1 mM MgCl₂
 1 mM EDTA
 1 mM EGTA

Cóctel inhibidores

1 mM Na-Vanadate pH10
 10 mM Na β glycerophosphate
 10 mM NaF
 5 mM Sodium pyrophosphate
 1m M Benzamidine
 0.2 mM PMSF

M.M.6.1.3 Fraccionamiento subcelular**Separación de núcleo y citosol (figuras R.3, R.5 B, R.9, R.22 B, R.23 R.35)**

Las células se lavaron dos veces con PBS y se recogieron en 500 µl de tampón A. Después de 10 min de incubación en hielo, se añadió al lisado 0.3 % de Tritón X-100 final y se mezcló en un vórtex durante 30 seg. Después de centrifugar 1 min a 11.000 rpm, el sobrenadante contenía el citosol y el pellet o precipitado la fracción nuclear.

A la fracción citosólica se le añadió 1.1 en volumen del lisado de tampón B y se incubó 30 min a 4°C en agitación. Seguidamente, se centrifugó a máximas rpm durante 30 min y se descartó el pellet.

La fracción nuclear se lavó 3 veces con el tampón A para evitar contaminación de citosol en el núcleo, y se resuspendió en 100 µl de tampón C. Los lisados se incubaron 30 min a 4°C en agitación y luego se centrifugaron a máximas rpm durante 15 min. El sobrenadante contenía la fracción nuclear. Cuando este tipo de extracción se utilizó para ensayos de inmunoprecipitación se diluyó 1/10 el tampón C en tampón A para disminuir la alta concentración de sales.

Los tampones utilizados para estos procedimientos fueron**Tampón A**

10 mM HEPES pH 7.8
1.5 mM MgCl₂
10 mM KCl
0.5 mM DTT

Tampón B

0.3 M HEPES pH 7.8
1.4 M KCl
30m M MgCl₂

Tampón C

20 mM HEPES pH 7.8
25% glycerol
0.42 M NaCl
1.5 mM MgCl₂
0.2 mM EDTA
0.5 mM DTT

Purificación de cromatina (figura R.34)

Las células se lavaron dos veces con PBS en hielo se recogieron y se centrifugaron 1 min a 2000 rpm a 4°C. El pellet se lavó con PBS para sacar restos de medio de cultivo que pudieran quedar. El pellet se resuspendió con 100-200 µl de tampón D+ 0.1% Tritón X-100. El lisado se incubó 8 min en hielo. Se centrifugó 5 min a máximas rpm a 4°C el sobrenadante contenía la fracción citosólica y el pellet los núcleos. La fracción citosólica se centrifugó a 20.000 g 5 min más para asegurar que no hubiera contaminación. La fracción nuclear se lavó 4 veces con el tampón D y se resuspendió en 50-100 µl de tampón E. El lisado se incubó 30 min a 4°C. Seguidamente, se centrifugó la fracción nuclear a máximas rpm obteniendo en el sobrenadante el nucleoplasma y en el pellet la cromatina. La cromatina se lavó tres veces con el tampón E, se resuspendió en tampón de carga 1X para proteínas y se sonicó a una fuerza 10 % durante 5 seg dos veces. Finalmente, la fracción rica en cromatina se hirvió 10 min a 70°C y se analizaron las proteínas asociadas por SDS-PAGE/*western-blot*.

Los tampones utilizados para estos prodecimientos fueron

Tampón D

10 mM HEPES pH 7.9
 10 mM KCl
 1.5 mM MgCl₂
 0.34 M Sucrosa
 10% glycerol
 1 mM DTT

Tampón E

0.1% Tritón X-100 PBS
 3 mM EDTA
 0.2 mM EGTA
 1mM DTT

M.M.6.2 Análisis de proteínas por *western-blot*

Para analizar las proteínas se utilizó la electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida (*sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrpophoresis* SDS-PAGE). Se prepararon geles de 1.5 mm de grosor con el sistema *Mini-Protean III* (Bio-Rad) con un porcentaje de acrilamida en la parte separadora del gel diferente dependiendo del tamaño de las proteínas a analizar (ver **tabla M.M.10**). La concentración de acrilamida en la parte apiladora fue del 4 %. A las muestras se les añadió tampón de carga, se hirvieron 4 min y se corrieron en el gel a voltaje constante en tampón TGS.

% polyacrylamide	Gel Separador			Gel apilador
	7.5	10	15	4
H₂O	5.5 ml	4.9 ml	3.6 ml	6 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml			
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8				2.5 ml
10% SDS	100 µl			
Acrylamide/bisacrylamide (37.5:1)	1.9 ml	2.5 ml	3.8 ml	1.4 ml
10%APS	40 µl			
TEMED	20 µl			

Tabla M.M 10 Reactivos utilizados para preparar los geles de acrilamida.

Si se quería analizar la pureza o la concentración de una purificación, los geles se tiñeron con *Coomassie Blue*. Si se trataba de un ensayo de interacción o para analizar la localización o los niveles de una proteína en un tipo celular, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.45 mm Protan) en una cubeta húmeda (Bio-Rad) llena de tampón de transferencia a 400 mA entre 1 h o 2 h, dependiendo del peso molecular de la proteína a analizar. La membrana se tiñó con *Ponceau* para comprobar que la transferencia se había realizado correctamente.

Las membranas se bloquearon con 3%-5% de leche desnatada en TBS-0.1% Tween durante 30 min-1 h. En el caso de detectar fosfo-señales el bloqueo se realizó con 3% BSA en TBS-0.1% Tween. El anticuerpo primario (ver tabla **M.M.11**) se añadió a una solución de bloqueo recién preparada y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Antes de incubar con el anticuerpo secundario se hicieron tres lavados con TBS-0.1% Tween (con leche o no) de 5-10 min cada uno. Seguidamente, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con la dilución recomendada de anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano (HRP). Después de lavar tres veces más (el último lavado siempre sin leche), la membrana se incubó con el sustrato de HRP, el luminol (*Enhanced ChemiLuminiscence ECL*, incubando con *PIERCE ECL Western Blotting substrate* durante 1 min o con *Supersignal West Dura Extended Duration substrate* durante 5 min). La luminiscencia se detectó con películas fotográficas (*Agfa-Curix autoradiographic Films*).

Los tampones utilizados para estos prodecimientos fueron

Ponceau	TGS	TBS
0.5% Ponceau (w/v)	25 mM Tris OH pH 8.3	25 mM Tris-HCl pH 7.5
1% Glacial acetic acid	192 mM glycine	137 mM NaCl
	5% SDS	
Tampón de transferencia	Tampón de carga para proteínas	
50 mM Tris-OH	60 mM Tris-HCl pH 6.8	
386 mM glycine	2% SDS	
0.1% SDS	5% β-mercaptoetanol blue	
	0.005% Bromophenol blue	
	5% glycerol	

Los anticuerpos utilizados en este trabajo fueron

Anticuerpo primario	Organismo	Dilución	Código	Casa comercial
β-actin	ratón	1:2000	AC-15	Sigma
annexin	conejo	1:2000	-	-
Pyruvate kinase	cabra	1:10000	AB1235	Chemican
lamin B₁	conejo	1:2000	ab16048	Abcam
E-cadherin	ratón	1:2500	610182	BD Tansduction
HA	rata	1:1000	1867431	Roche
	conejo	1:2000	H6908	Sigma
GST	cabra	1:2000	27-4577	Amersham
Akt total	conejo	1:1000	9272	Cell Signaling
P-S473	conejo	1:1000	9271	Cell Signaling
P-T308	conejo	1:1000	9275	Cell Signaling
Akt1	conejo	1:1000	2938	Cell Signaling
Akt2	conejo	1:1000	3063	Cell Signaling
Akt3	conejo	1:1000	3788	Cell Signaling
FoxO1 total	conejo	1:1000	9462	Cell Signaling
P-FoxO1	conejo	1:1000	9461	Cell Signaling
IKKα total	conejo	1:1000	2685	Cell Signaling
P-IKKα β	conejo	1:1000	2607	Cell Signaling
Zeb-1	cabra	1:100	E-20	Santa Cruz
Fibronectin1	conejo	1:2000	A0245	Dako
Lef1	conejo	1:2000	C12A5	Cell signaling
H3	ratón	1:1000	Ab1791	Abcam
P-S10	conejo	1:2000	04-817	Millipore
P-S28	conejo	1:1000	07-145	Upstate
Snail	ratón	1:25-50	EC3	Hecho en nuestro laboratorio [140]

Tabla M.M.11 Lista de los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo



M.M.7 Ensayos de interacción entre proteínas

M.M.7.1 *Pull-down* (figuras R.17, R.21 B)

Los experimentos de *pull-down* sirven para comprobar la interacción directa o indirecta entre una proteína recombinante utilizada como cebo con otras proteínas provenientes de extractos celulares o transfectadas. En este trabajo, los ensayos *pull-down* sirvieron para evaluar interacciones entre diferentes dominios de Snail1 y de Akt. En el caso de la **figura R.21 B** células RWP1 fueron transfectadas con GST-Akt1, GST- Δ PH-Akt1 o GST sola con Snail1-HA o Snail1-P2A. Después de 48 h de transfección se lisaron las células con tampón de lisis no desnaturante (tampón IP/ *pull-down*). 200 μ l de cada condición se purificaron con *Glutathion-Sepharose 4B* (20 μ l) durante 1 h a 4°C. La resina se lavó 5 veces con 1 ml del mismo tampón de lisis incubando 5 min a 4°C cada lavado (el último lavado sin detergentes). Un 5 % del lisado se usó como input. Los complejos se eluyeron con tampón de carga hirviéndolos 4 min.

En el caso de la **figura R.17**, 18 pmoles de cada fragmento de GST-Snail1 se incubaron con 500 μ g de extractos totales (tampón de lisis IP/*pull-down*) de células RWP1 durante 2 h a 4°C o 30 min a 22°C en agitación. La reacción de interacción se completó añadiendo tampón de lisis sin detergente e inhibidores de proteasas y fosfatasa hasta un volumen final de 500 μ l. Los complejos formados se purificaron con *Glutathion-Sepharose 4B* (20 μ l) durante 25 min a 22°C en agitación. La reacción se centrifugó a 3000 rpm 2 min a 4°C y se descartaron los sobrenadantes. La resina resultante del *pull-down* se lavó 5 veces 5 min a 4°C a temperatura ambiente con 1 ml de tampón de lisis (el último lavado sin detergentes). Los complejos se eluyeron con tampón de carga hirviéndolos 4 min. Un 5 % del lisado se usó como input. Todos los complejos formados y purificados en los experimentos se analizaron por *western-blot*.

M.M.7.2 Coinmunoprecipitación (figuras R.21 A, R.22, R.23, R.27 y R.35)

Los experimentos de coinmunoprecipitación sirven para comprobar interacciones *in vivo*, directas o indirectas, entre dos proteínas endógenas o

transfectadas, purificando los complejos con un anticuerpo específico de una de las proteínas de interés.

Se preparó el tipo de extractos deseado y 250-500 μg de estos extractos se incubaron toda la noche a 4°C en agitación constante con $1\ \mu\text{g}$ de anticuerpo específico de una de las dos proteínas de interés. Un 5 % del lisado se usó como input. A la coimmunoprecipitación se le añadió tampón de lisis sin detergente hasta diluir los extractos 1/10 (1 mg/ ml). Al día siguiente se incubaron durante 1 h a 4°C en agitación con 20 μl proteína *A-sepharose* (conejo) o proteína *G-sepharose* (rata, ratón) (GE, Healthcare) equilibrada con el tampón de lisis. Se centrifugó 3 min a 2000 rpm a 4°C , el sobrenadante se descartó y la resina se lavó 3 veces con 1 ml de tampón de lisis + 200 mM NaCl y 2 veces más con 1 ml de tampón IP/ *pull-down* sin detergentes. Cada lavado se realizó durante 5 min a 4°C en agitación. Finalmente se resuspendió la resina en tampón de carga y se hirvió la muestra. Todos los complejos formados y purificados en los experimentos se analizaron por *western-blot*.

M.M.8 Ensayos de fosforilación *in vitro*

M.M.8.1 Ensayo de actividad sobre un péptido sustrato o *crossside* (figura R.6, R.10, R.19).

Una cantidad variable (300 ng-1 μg dependiendo de la actividad) de GST-Akt purificada, (M.M.6.1.1) estimulada o no con IGF-1, se incubó con 30 μM concentración final del *crossside* que en este caso, fue un péptido de 11 aminoácidos derivado de la secuencia que fosforila Akt en GSK3 β (GRPRTSSFAEG la **S** es el residuo fosforilado por Akt). La reacción se realizó en presencia de Glutation 20 mM (para liberar la GST-Akt unida a la sefarosa), tampón de reacción quinasa, MgCl_2 10 mM (el sustrato real de la quinasa es ATP acompañado con Mg^{2+}) y una concentración final de ATP (mezcla de ^{32}P -[γ -ATP] 3000 cpm/ pmol (GE Healthcare) y ATP no marcado) de 100 μM . La reacción duró entre 10-30 min y se realizó a 30°C . El ensayo se detuvo poniendo el volumen de reacción (25-40 μl) en un papel de fosfocelulosa **P81** (Whatman) que después de ser lavado solo retenía el *crossside*. Los papeles se lavaron con ácido fosfórico 50 mM hasta que en el blanco (donde

solo hay quinasa sin *crossstide*) no se detectó radioactividad, por último se lavaron con acetona. Una vez los papeles estuvieron secos, la radioactividad incorporada se midió mediante contaje Cerenkov en un Contador de Centelleo WallacII. La radioactividad detectada se refirió a las cpm de 1 nmol de ATP radioactivo. En cada experimento se realizaron triplicados y los experimentos se repitieron al menos tres veces. Se descartaron los valores de actividad > 1/3 de las cpm de 1 nmol de ^{32}P -[γ -ATP]. Una unidad de actividad es la cantidad de enzima requerida para catalizar la transferencia de 1 nmol de fosfato por minuto.

M.M.8.2 Ensayo de fosforilación sobre proteína sustrato (figuras R.12, R.13, R.14, R.15, R.16, R.29).

Una cantidad variable (300 ng-1 μg dependiendo de la actividad) de GST-Akt purificada (**M.M.6.1.1**) estimulada 5 min con IGF-1 se incubó con 1 μg de proteína de fusión GST-Snail1 y equimolar el resto de mutantes. La reacción se realizó a 30°C durante 30 min en presencia del tampón de reacción quinasa, MgCl_2 10 mM, Glutation 20 mM y ATP 100 μM (mezcla de ^{32}P -[γ -ATP] 3000 cpm/ pmol (GE Healthcare) y ATP no marcado radioactivamente) en un volumen final 30 μl . La reacción se detuvo con 10 μl de tampón de carga y se resolvió por SDS-PAGE en geles al 10 %. El gel se tiñó con *Coomassie blue* para visualizar las proteínas. Una vez secado se expusieron films autoradiográficos un tiempo variable, dependiendo de la radioactividad esperada (1 h o toda la noche a -80°C) o bien las bandas del gel se cortaron y se midió la radioactividad con un contador de centelleo. En todos los ensayos quinasa sobre Snail1 se utilizó como control positivo GST-Bad y como control negativo la GST sola.

En el ensayo de la **figura R.29**, se utilizó 0.4 μg de Akt1 comercial (Invitrogen P2999 lot Lumber 39797E) con actividad quinasa 400 U/mg. Como sustrato se utilizó 1 μg de Histona H3 (H3.1 human) recombinante (New England Biolabs M2503S). La reacción se realizó a 30°C 30min. En el ensayo que se envió a analizar por espectrometría de masas, se aumentaron las cantidades de proteínas a 1 μg de Akt y 3 μg de Histona H3 y se redujo el tiempo de reacción a 10 min para disminuir sitios de fosforilación inespecíficos. En la condición de preincubación de la quinasa con GST-Snail1, se utilizó 1 μg de GST-Snail1.

Tampón reacción quinasa 10x

50 mM Tris-HCl pH 7.5
0.1% β-mercaptoetanol
0.1 mM EGTA

Reacción [final]

10 mM MgCl₂
10 mM Glutacion
100 μM ATP

M.M.9 Inmunofluorescencia

Se sembraron entre 30.000-50.000 células sobre cubreobjetos esterilizados previamente con etanol, lavados con PBS y secados dentro de la campana de flujo laminar. Después de 48 h, una vez las células ya estaban bien adheridas al cubreobjeto, se procedió a estudiar la distribución de las proteínas de interés utilizando el protocolo de permeabilización adecuado.

Permeabilización 0.3% Tritón X-100 (figuras R.2, R.30)

Los cubres se lavaron dos veces con PBS frío. La fijación se hizo añadiendo 4 % paraformaldehído (PFA) durante 20 min a temperatura ambiente. Después de 5 lavados con PBS se añadió 0.3% Triton X-100 durante 10 min. A partir de aquí los lavados se realizaron con PBS+0.01% Tween o Tritón-X-100. Después de 5 lavados se realizó el bloqueo con 4% de leche en PBS+0.01 % Tween o con 3% BSA para la detección de fosfoseñales durante 30-1 h. Los cubreobjetos se incubaron con 15 μl del anticuerpo primario, diluido en la misma solución de bloqueo (ver **tabla M.M.12**) en una cámara húmeda durante 1 h. Después de 5 lavados más, los cubres se incubaron en 15 μl de dilución de anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo por lo que la incubación se tuvo que hacer en una cámara húmeda a oscuras. La incubación se hizo durante 45 min. Después se volvieron a lavar 3 veces con PBS+0.01% Tween y 2 más con PBS solo. Los cubres se montaron en portaobjetos con Mowiol o Fluoromont G. Se dejaron secar a temperatura ambiente 15 min y se guardaron a 4°C hasta la captura de imágenes por microscopía confocal (Leica TCS SP2 AOBS). Los aumentos a los cuales se captaron las imágenes introducidas en este trabajo fueron de x40 o x60.

Anticuerpo primario	Dilución
P-S473 conejo Cell signaling	1/25
Snail1 ratón	EC3
Akt total conejo Cell signaling	1/50
Akt1 conejo Cell signaling	1/50
Akt2 conejo Cell signaling	1/50
P-S10 conejo Millipore	1/200
P-S28 conejo Millipore	1/200

Tabla M.M 12 Anticuerpos y diluciones utilizadas para Inmunofluorescencia

Tratamiento con el tampón CSK (figuras R.24, R.33)

Antes de fijar las células, los cubres se incubaron 5 min con tampón CSK +0.5% Tritón en hielo. Los cubres se lavaron 1 vez con el tampón CSK (sin detergente) para retirar los restos del Tritón. Las células se fijaron añadiendo 4% paraformaldehído (PFA) durante 20 min a temperatura ambiente. Después de 5 lavados con PBS los cubres se bloquearon con 4% de leche en PBS+0.3% Tritón X-100 o con 3% BSA-PBS+0.3% Tritón X-100 durante 1 h. La incubación del anticuerpo primario se realizó durante 1 h en la cámara húmeda. Después de lavar 3 veces con PBS+0.1% Tween los cubres se incubaron con el anticuerpo secundario. En el caso de P-S473 y de Akt se aumentó la señal mediante el sistema amplificador de señal Envision-TSA (PerkinElmer). Los cubres se incubaron 40 min con el Envision (secundario de conejo) en la cámara húmeda y a oscuras. Después de tres lavados, se incubó 5 min con el sustrato del Envision, el TSA, a una dilución 1/200. Se lavaron tres veces más con PBS+0.01%-Tween y dos veces más con PBS. Finalmente los cubres se montaron en los portaobjetos.

Tampón CSK

- 20 mM HEPES pH 7.8
- 100 mM KCl o NaCl
- 3 mM MgCl₂
- 300 mM Sacarosa

M.M.10 Ensayos *reporter* de actividad transcripcional (figuras R.4 B, R.8 A, R.28)

Vectores utilizados

El vector *reporter* utilizado en este trabajo es el pGL3 básico (Promega) en el cual fue mutada una secuencia putativa de unión de Snail1. Este nuevo vector se llamó pGL3*. En la **figura R.8 A y R.26** el vector pGL3* utilizado para estudiar la actividad de Snail1 sobre el promotor de la E-cadherina contenía el fragmento -178/+92 descrito en [84] y proviene de nuestro laboratorio. Este segmento del promotor de la E-cadherina contiene las 3 *E-box* de respuesta a Snail1 descritas en el mismo trabajo y responde en forma dosis dependiente a la represión por Snail1. En la **figura R.4 B** el vector pGL3 (NF3) utilizado para analizar la actividad de NFκB fue cedido por el Dr. Manuel Fresno (Centro de Biología Molecular, CSIC-UAM, Madrid). Contiene el gen de la luciferasa bajo control de tres secuencias consenso para este factor de transcripción. Para los ensayos se sembraron 30.000-40.000 células RWP1 en placas de 24 pozos. Se transfectó 100 ng de pGL3 vacío o pGL3-E-cadherina con 25-50 ng de Akt *kinase dead* o el vector vacío pcMV5. Como control interno de la eficiencia de la transfección se cotransfectó 0.5 ng del plásmido SV40-Renilla luciferasa (*simian virus*) lo que permitió corregir dependiendo de la eficiencia de transfección en cada pozo y por lo tanto comparar entre diferentes experimentos. Se transfectó pcDNA Snail1 en cantidades crecientes de 0, 0.1, 1, 10 ng. Cada condición se complementó la cantidad de DNA transfectado con el vector vacío pcDNA. Las transfecciones se realizaron con LipofectAMINE Plus (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 48 h de expresión, los pozos se lavaron con PBS y las células se lisaron. Las actividades de Firefly (Luciferasa de luciérnaga) y la actividad *Renilla reniformes* se midieron con el kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega) en un luminómetro FB 12 (Berthold Detection System, Germany). Los datos representados en las gráficas corresponden a la actividad luciferasa bajo control de los promotores de interés normalizada con la actividad luciferasa de la Renilla y del vector vacío pGL3*. En cada experimento se realizaron triplicados y los experimentos se repitieron al menos tres veces (en las gráficas se representan la media de los tres experimentos y la desviación estándar).

M.M.11 RT-PCR (figuras R.28 A, R.39, R.41 A, R.42 A, R.43 A, C)

El RNA se extrajo de las células transfectadas o infectadas después de 48 h con el kit *Gene Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep* (Sigma-Aldrich) y cuantificado con el Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer. Para los análisis por PCR semicuantitativa se utilizaron 150-200 ng de RNA y se analizaron con el kit *One-Step RT-PCR* (Quiagen) que permite la retrotranscripción y la amplificación por PCR del cDNA generado en el primer paso, en un solo tubo. Para los análisis por PCR-cuantitativa se utilizaron 50 ng-100 ng de cDNA obtenido mediante el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche) (en este caso primero se obtiene el cDNA (unos 5 µg) y se reparte para hacer todas las PCR).

Las temperaturas de PCR oscilaron entre 55-60°C para PCR semicuantitativa y los ciclos de 24-27 para cDNA de E-cadherina dependiendo la línea celular utilizada y para los demás hasta 28-30 (siempre hay que tener en cuenta la cantidad relativa de cada mRNA según la línea celular estudiada). En el caso del análisis por PCR cuantitativa, se hizo una *master* PCR analizando todos los cDNA de interés y utilizando una temperatura de 59°C. En ambos casos, los productos de la PCR se cargaron en un gel de agarosa al 2% (ya que los fragmentos esperados no superaban los 150 bp) y se comprobó si el tamaño obtenido era el esperado.

Amplificón	Oligonucleótidos	
	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
HPRT	GGCCAGACTTTGTTGGATTTG	TGCGCTCATCATCTTAGGCTTTGT
pumillio	CGGTCGCCTGAGGATAAAA	CGTACGTGAGGCGTGAGTAA
mmsnail1	GCGCCCGTCGTCCTTCTCGTC	CTTCCGCGACTGGGGGTCCT
akt1	CAACCGCCATCCAGACTGT	CTCAAACCTCGTTCATGGTCAC
akt2	CAAGCGTGGTGAATACAT CAAGAC	CTGCTACGGAGAAGTTGTT TAAGGG
fibronectina	AGCAAGCCCGTTGTTATG	GCTCCACGTTGACCCATCTG
lef1	CGAAGAGGAAGGCGATTTAG	GTCTGGCCACCTCGTGTC
zeb1	CGGCGCAATAACGTTACAAA	TTTCACTGCTCCTCCCTGGT
E-cadherina	GAACGCATTGCCACATACAC	ATTCGGGCTTGTTGTCATTC

Tabla M.M.13 Oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR semicuantitativa y cuantitativa.

M.M.12 Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) (figuras R.25, R.31, R.32, R.36 y R.37)

Las células se sembraron en placas de 150 mm de diámetro (5×10^6) y se dejaron crecer 48 h. El medio se retiró lavando dos veces con PBS precalentado a 37°C. Seguidamente se procedió a *crosslinkar* mediante 5 ml de medio DMEM sin suero con 1 % de formaldehído 10 min en agitación suave (100 rpm) a 32°C. La reacción se paró con 250 μ l de Glicina 2.5 M (0.125 M de concentración final) incubando durante 2 min. Las células se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en 1 ml de Tampón de lisis suave (en hielo siempre para mantener las estructuras). Los lisados se incubaron 10 min en hielo y se centrifugaron 15 min a 3000 rpm. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis SDS. Los lisados se sonicaron para generar fragmentos de DNA de 200 hasta 1000 bp (40% amplitud en *Branson DIGITAL Sonifier UNIT Model S-450D sonicator 20 x 10 segundos*). Seguidamente se incubaron en hielo al menos 20 min y se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min. Si la sonicación fue correcta, en esta última centrifugación debería aparecer un pellet mínimo oscuro si no era así se repitió la sonicación. El tamaño de los fragmentos de DNA generados se comprobó cargando 1-5 μ l de las cromatinas en un gel de agarosa y tiñendo con BrEt..

La concentración de proteína se determinó con el método *Lowry*. Se utilizaron 250 μ g (para las inmunoprecipitaciones de marcas en histonas) y 500 μ g (para las inmunoprecipitaciones de Akt). Estas cromatinas se diluyeron 1/10 en tampón de dilución y se les realizó un *pre-clearing* con proteína A/G bloqueada con esperma de salmón (Upstate) más IgGs inespecíficas durante 3 h en agitación a 4°C para reducir la unión inespecífica. Las muestras se centrifugaron 2 min a 2000 rpm y 100 μ l se retiraron como input. El resto de lisado se dividió entre las diferentes IP (sin anticuerpo (control negativo)/ con anticuerpo específico). La incubación se realizó toda la noche a 4°C en agitación. Las concentraciones de anticuerpo para el ChIP fueron las utilizadas para el *western-blot* (tabla **M.M.11**) pero 10 veces más concentradas.

Al día siguiente se añadieron 30 μ l de proteína-A/G bloqueada con esperma de salmón y se incubó 1 h a 4°C en agitación. Para reducir el fondo o unión inespecífica, las IP se centrifugaron 2 min a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante y la resina se

lavó 5 veces en *MoBitec columns* o en la noria con cada tampón frío (bajo en sal, alto en sal, LiCl y TE). Las muestras se eluyeron añadiendo 100 μ l de tampón de elución después de centrifugar las columnas 2 min a 2000 rpm para retirar el TE. La elución de las muestras se hizo a 37°C 30 min⁻¹ h. El DNA se recuperó por centrifugación de los eluidos 5 min a 2000 rpm.

Seguidamente se procedió a *descrosslinkar* las muestras añadiendo NaCl 0.2 M e incubando toda la noche a 65°C. Al día siguiente se digirieron los restos de proteína con proteinasa K durante 2 h a 55°C y el DNA se purificó mediante columnas del kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Biosciences). Los fragmentos de DNA presentes en los inmunoprecipitados se analizaron mediante PCR cuantitativa.

Promotor		Figura	oligonucleótidos	
			Sense (5'-3')	antisense (5'-3')
CDH1	- 178/+92	R. 27	AACCCTCAGCCAATCAGCGG	GTTCCGACGCCACTGAGAGG
		R.31, R.44	CGCTGCTGATTGGCTGTGG	CTGGAGCGGGCTGGAGTC
FN1	-375/- 320	R.32, R.44	GGGAAGGGGGAGCGTCTTG	AAGGGAGTGGCTGGACTTGT
PTEN	-370/- 165	R.32	GAGGCGAGGATAACGAGCTA	CCGTGCATTTCCTCTACAC

Tabla M.M.14 Oligonucleótidos utilizados para amplificar los promotores por PCR cuantitativa.

Los tampones utilizados para estos prodecimientos fueron

Tampón de lisis suave

50 mM Tris pH 8.0
2 mM EDTA
0.1% Nonidet P-40
10% glicerol
Inhibidores de proteasas y fosfatasas

Tampón de lisis SDS

1% SDS
10 mM EDTA
50 mM Tris pH 8.0

Tampón de dilución

0.001% SDS
1.1% Triton X-100
16.7 mM Tris pH 8.0
2 mM EDTA
2 mM EGTA
167 mM NaCl

Tampón de elución

100 mM Na₂CO₃
1% SDS

Tampón bajo en sal

0.1% SDS
1% Triton X-100
2 mM EDTA
20 mM Tris pH 8.0
150 mM NaCl

Tampón alto en sal

0.1 % SDS
1% Triton X-100
2 mM EDTA
20 mM Tris pH 8.0
500 mM NaCl

Tampón LiCl

250 mM LiCl
1% NP-40
1% Sodium deoxycolate
1 mM EDTA
10 mM Tris pH 8.0

Tampón proteínasa K

20 µl 1 M Tris-HCl pH 6.5
10 µl 0.5 M EDTA
2 µl proteínasa K

REFERENCIAS

1. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**:57-70.
2. Kinzler KW, Vogelstein B: **Oncogenesis: Landscaping the Cancer Terrain.** *Science* 1998, **280**:1036-1037.
3. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD: **The three Es of cancer immunoediting.** *Annu Rev Immunol* 2004, **22**:329-360.
4. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD: **The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.** *Immunity* 2004, **21**:137-148.
5. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD: **Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity.** *Adv Immunol* 2006, **90**:1-50.
6. Thiery JP, Sleeman JP: **Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**:131-142.
7. Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Hermann R, Foisner R, Beug H, Mikulits W: **Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis.** *Mutat Res* 2004, **566**:9-20.
8. Hay ED: **An overview of epithelio-mesenchymal transformation.** *Acta Anat (Basel)* 1995, **154**:8-20.
9. LaGamba D, Nawshad A, Hay ED: **Microarray analysis of gene expression during epithelial-mesenchymal transformation.** *Dev Dyn* 2005, **234**:132-142.
10. Kalluri R, Weinberg RA: **The basics of epithelial-mesenchymal transition.** *J Clin Invest* 2009, **119**:1420-1428.
11. Boyer B, Thiery JP: **Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity.** *Apmis* 1993, **101**:257-268.
12. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL: **Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration.** *J Biol Chem* 2000, **275**:36803-36810.
13. Voulgari A, Pintzas A: **Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1796**:75-90.
14. Huber MA, Kraut N, Beug H: **Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression.** *Curr Opin Cell Biol* 2005, **17**:548-558.
15. Yang J, Weinberg RA: **Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis.** *Dev Cell* 2008, **14**:818-829.
16. Zeisberg M, Neilson EG: **Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions.** *J Clin Invest* 2009, **119**:1429-1437.
17. Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I: **Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy.** *Placenta* 1980, **1**:3-19.

18. Kalluri R: **EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells.** *J Clin Invest* 2009, **119**:1417-1419.
19. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA: **Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease.** *J Clin Invest* 2009, **119**:1438-1449.
20. Duband JL, Monier F, Delannet M, Newgreen D: **Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development.** *Acta Anat (Basel)* 1995, **154**:63-78.
21. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW: **The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease.** *J Cell Biol* 2006, **172**:973-981.
22. Nichols DH: **Neural crest formation in the head of the mouse embryo as observed using a new histological technique.** *J Embryol Exp Morphol* 1981, **64**:105-120.
23. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW: **Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression.** *J Cell Physiol* 2007, **213**:374-383.
24. Shook D, Keller R: **Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development.** *Mech Dev* 2003, **120**:1351-1383.
25. Kalluri R, Neilson EG: **Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis.** *J Clin Invest* 2003, **112**:1776-1784.
26. Flanders KC: **Smad3 as a mediator of the fibrotic response.** *Int J Exp Pathol* 2004, **85**:47-64.
27. Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, Dell'Antonio G, Grillo C, Grillo P, Strutz F, Muller GA, Colasanti G, D'Amico G: **Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies.** *Kidney Int* 2002, **62**:137-146.
28. Neilson EG: **Setting a trap for tissue fibrosis.** *Nat Med* 2005, **11**:373-374.
29. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG: **Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis.** *J Clin Invest* 2002, **110**:341-350.
30. Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z: **Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis.** *Am J Pathol* 2005, **166**:1321-1332.
31. Willis BC, Borok Z: **TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, **293**:L525-534.
32. Yao HW, Xie QM, Chen JQ, Deng YM, Tang HF: **TGF-beta1 induces alveolar epithelial to mesenchymal transition in vitro.** *Life Sci* 2004, **76**:29-37.
33. Martin P: **Wound healing--aiming for perfect skin regeneration.** *Science* 1997, **276**:75-81.

34. Schafer M, Werner S: **Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**:628-638.
35. Thiery JP: **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:442-454.
36. Geiger TR, Peeper DS: **Metastasis mechanisms.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1796**:293-308.
37. Fidler IJ, Hart IR: **Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications.** *Science* 1982, **217**:998-1003.
38. Friedl P, Wolf K: **Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**:362-374.
39. Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, Wei G, Shen L, Tanner SM, Creasap N, Rosol TJ, Robinson ML, Eng C, et al: **Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer.** *Cancer Res* 2008, **68**:937-945.
40. Gavert N, Ben-Ze'ev A: **Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors.** *Trends Mol Med* 2008, **14**:199-209.
41. Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF: **The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia.** *Cancer Res* 2005, **65**:5996-6000; discussion 6000-5991.
42. Heppner GH: **Tumor heterogeneity.** *Cancer Res* 1984, **44**:2259-2265.
43. Fidler IJ, Kripke ML: **Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor.** *Science* 1977, **197**:893-895.
44. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL: **Stem cells, cancer, and cancer stem cells.** *Nature* 2001, **414**:105-111.
45. Bonnet D, Dick JE: **Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.** *Nat Med* 1997, **3**:730-737.
46. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:3983-3988.
47. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE: **A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice.** *Nature* 2007, **445**:106-110.
48. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R: **Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells.** *Nature* 2007, **445**:111-115.
49. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB: **Identification of human brain tumour initiating cells.** *Nature* 2004, **432**:396-401.
50. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, et al: **The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.** *Cell* 2008, **133**:704-715.

51. Eastham AM, Spencer H, Soncin F, Ritson S, Merry CL, Stern PL, Ward CM: **Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation.** *Cancer Res* 2007, **67**:11254-11262.
52. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T: **Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**:744-749.
53. Hollier BG, Evans K, Mani SA: **The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009, **14**:29-43.
54. De Wever O, Pauwels P, De Craene B, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Gespach C, Bracke M, Berx G: **Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front.** *Histochem Cell Biol* 2008, **130**:481-494.
55. Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R: **Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1.** *Mech Dev* 1996, **59**:3-10.
56. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W: **Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1.** *Nature* 1996, **382**:638-642.
57. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: **Identification of c-MYC as a target of the APC pathway.** *Science* 1998, **281**:1509-1512.
58. Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, Sheppard D, Oettgen P, Mercurio AM: **Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma.** *J Clin Invest* 2005, **115**:339-347.
59. Vignjevic D, Schoumacher M, Gavert N, Janssen KP, Jih G, Lae M, Louvard D, Ben-Ze'ev A, Robine S: **Fascin, a novel target of beta-catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer.** *Cancer Res* 2007, **67**:6844-6853.
60. Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD, Goodwin JM, Zhu AX, Lanuti M, Tanabe KK: **Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells.** *Cancer Res* 2008, **68**:2391-2399.
61. Moll R: **Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors.** *Subcell Biochem* 1998, **31**:205-262.
62. Omary MB, Coulombe PA, McLean WH: **Intermediate filament proteins and their associated diseases.** *N Engl J Med* 2004, **351**:2087-2100.
63. Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P: **Tumour invasion and matrix metalloproteinases.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2004, **49**:179-186.

64. Przybylo JA, Radisky DC: **Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition: tumor progression at Snail's pace.** *Int J Biochem Cell Biol* 2007, **39**:1082-1088.
65. Nguyen QD, De Wever O, Bruyneel E, Hendrix A, Xie WZ, Lombet A, Leibl M, Mareel M, Gieseler F, Bracke M, Gespach C: **Commutators of PAR-1 signaling in cancer cell invasion reveal an essential role of the Rho-Rho kinase axis and tumor microenvironment.** *Oncogene* 2005, **24**:8240-8251.
66. Kajita M, McClinic KN, Wade PA: **Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:7559-7566.
67. Vega S, Morales AV, Ocana OH, Valdes F, Fabregat I, Nieto MA: **Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death.** *Genes Dev* 2004, **18**:1131-1143.
68. Wu WS, Heinrichs S, Xu D, Garrison SP, Zambetti GP, Adams JM, Look AT: **Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma.** *Cell* 2005, **123**:641-653.
69. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA: **Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways.** *Cancer Res* 2008, **68**:3645-3654.
70. Hyafil F, Morello D, Babinet C, Jacob F: **A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos.** *Cell* 1980, **21**:927-934.
71. Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R: **E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:8263-8267.
72. Uemura T, Oda H, Kraut R, Hayashi S, Kotaoka Y, Takeichi M: **Zygotic Drosophila E-cadherin expression is required for processes of dynamic epithelial cell rearrangement in the Drosophila embryo.** *Genes Dev* 1996, **10**:659-671.
73. Burdsal CA, Damsky CH, Pedersen RA: **The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak.** *Development* 1993, **118**:829-844.
74. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G: **A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma.** *Nature* 1998, **392**:190-193.
75. Semb H, Christofori G: **The tumor-suppressor function of E-cadherin.** *Am J Hum Genet* 1998, **63**:1588-1593.
76. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W: **E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells.** *J Cell Biol* 1991, **113**:173-185.
77. Birchmeier W, Behrens J: **Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness.** *Biochim Biophys Acta* 1994, **1198**:11-26.

78. Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG: **E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases.** *Breast Cancer Res* 2003, **5**:R217-222.
79. Peinado H, Portillo F, Cano A: **Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis.** *Int J Dev Biol* 2004, **48**:365-375.
80. Peinado H, Olmeda D, Cano A: **Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**:415-428.
81. Hennig G, Behrens J, Truss M, Frisch S, Reichmann E, Birchmeier W: **Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter in vivo.** *Oncogene* 1995, **11**:475-484.
82. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA: **Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.** *Cell* 2009, **139**:871-890.
83. Giroldi LA, Bringuier PP, de Weijert M, Jansen C, van Bokhoven A, Schalken JA: **Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **241**:453-458.
84. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A: **The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:84-89.
85. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA: **The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:76-83.
86. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A: **The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors.** *J Cell Sci* 2003, **116**:499-511.
87. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Bex G, Cano A, Beug H, Foisner R: **DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells.** *Oncogene* 2005, **24**:2375-2385.
88. Comijn J, Bex G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F: **The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion.** *Mol Cell* 2001, **7**:1267-1278.
89. Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, Cano A: **A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions.** *J Biol Chem* 2001, **276**:27424-27431.
90. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA: **Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis.** *Cell* 2004, **117**:927-939.
91. Oda H, Tsukita S, Takeichi M: **Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during Drosophila gastrulation.** *Dev Biol* 1998, **203**:435-450.

92. Sefton M, Sanchez S, Nieto MA: **Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo.** *Development* 1998, **125**:3111-3121.
93. Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J: **Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene.** *Science* 1994, **264**:835-839.
94. Van de Putte T, Maruhashi M, Francis A, Nelles L, Kondoh H, Huylebroeck D, Higashi Y: **Mice lacking ZFH1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome.** *Am J Hum Genet* 2003, **72**:465-470.
95. De Craene B, van Roy F, Berx G: **Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors.** *Cell Signal* 2005, **17**:535-547.
96. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA: **The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer.** *Development* 2005, **132**:3151-3161.
97. Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH: **Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel.** *Cancer Res* 2007, **67**:1979-1987.
98. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME: **The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2.** *Genes Dev* 2008, **22**:894-907.
99. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ: **The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**:593-601.
100. Scheel C, Onder T, Karnoub A, Weinberg RA: **Adaptation versus selection: the origins of metastatic behavior.** *Cancer Res* 2007, **67**:11476-11479; discussion 11479-11480.
101. Moustakas A, Heldin CH: **Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression.** *Cancer Sci* 2007, **98**:1512-1520.
102. Lo HW, Hsu SC, Xia W, Cao X, Shih JY, Wei Y, Abbruzzese JL, Hortobagyi GN, Hung MC: **Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression.** *Cancer Res* 2007, **67**:9066-9076.
103. Savagner P, Yamada KM, Thiery JP: **The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition.** *J Cell Biol* 1997, **137**:1403-1419.
104. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF: **Met, metastasis, motility and more.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**:915-925.

105. Boyer B, Thiery JP: **Cyclic AMP distinguishes between two functions of acidic FGF in a rat bladder carcinoma cell line.** *J Cell Biol* 1993, **120**:767-776.
106. Bellusci S, Moens G, Thiery JP, Jouanneau J: **A scatter factor-like factor is produced by a metastatic variant of a rat bladder carcinoma cell line.** *J Cell Sci* 1994, **107 (Pt 5)**:1277-1287.
107. Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lehembre F: **Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail.** *Embo J* 2006, **25**:3534-3545.
108. Li Y, Hively WP, Varmus HE: **Use of MMTV-Wnt-1 transgenic mice for studying the genetic basis of breast cancer.** *Oncogene* 2000, **19**:1002-1009.
109. Clevers H: **Wnt/beta-catenin signaling in development and disease.** *Cell* 2006, **127**:469-480.
110. Yook JI, Li XY, Ota I, Fearon ER, Weiss SJ: **Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail.** *J Biol Chem* 2005, **280**:11740-11748.
111. Yook JI, Li XY, Ota I, Hu C, Kim HS, Kim NH, Cha SY, Ryu JK, Choi YJ, Kim J, et al: **A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells.** *Nat Cell Biol* 2006, **8**:1398-1406.
112. Zavadil J, Bottinger EP: **TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions.** *Oncogene* 2005, **24**:5764-5774.
113. Rahimi RA, Leof EB: **TGF-beta signaling: a tale of two responses.** *J Cell Biochem* 2007, **102**:593-608.
114. Buijs JT, Henriquez NV, van Overveld PG, van der Horst G, ten Dijke P, van der Pluijm G: **TGF-beta and BMP7 interactions in tumour progression and bone metastasis.** *Clin Exp Metastasis* 2007, **24**:609-617.
115. Balzac F, Avolio M, Degani S, Kaverina I, Torti M, Silengo L, Small JV, Retta SF: **E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function.** *J Cell Sci* 2005, **118**:4765-4783.
116. Li Y, Yang J, Dai C, Wu C, Liu Y: **Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis.** *J Clin Invest* 2003, **112**:503-516.
117. Li X, Deng W, Lobo-Ruppert SM, Ruppert JM: **Gli1 acts through Snail and E-cadherin to promote nuclear signaling by beta-catenin.** *Oncogene* 2007, **26**:4489-4498.
118. Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Alvarez H, Iacobuzio-Donahue C, Jimeno A, et al: **Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers.** *Cancer Res* 2007, **67**:2187-2196.

119. Grego-Bessa J, Diez J, Timmerman L, de la Pompa JL: **Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw.** *Cell Cycle* 2004, **3**:718-721.
120. Leong KG, Niessen K, Kulic I, Raouf A, Eaves C, Pollet I, Karsan A: **Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin.** *J Exp Med* 2007, **204**:2935-2948.
121. Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U: **Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:6392-6397.
122. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grunert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T: **NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression.** *J Clin Invest* 2004, **114**:569-581.
123. Huber MA, Beug H, Wirth T: **Epithelial-mesenchymal transition: NF-kappaB takes center stage.** *Cell Cycle* 2004, **3**:1477-1480.
124. Bachelder RE, Yoon SO, Franci C, de Herreros AG, Mercurio AM: **Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition.** *J Cell Biol* 2005, **168**:29-33.
125. Julien S, Puig I, Caretti E, Bonaventure J, Nelles L, van Roy F, Dargemont C, de Herreros AG, Bellacosa A, Larue L: **Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition.** *Oncogene* 2007, **26**:7445-7456.
126. Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Bottinger EP: **Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition.** *Embo J* 2004, **23**:1155-1165.
127. Levy L, Hill CS: **Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2006, **17**:41-58.
128. Mauhin V, Lutz Y, Dennefeld C, Alberga A: **Definition of the DNA-binding site repertoire for the Drosophila transcription factor SNAIL.** *Nucleic Acids Res* 1993, **21**:3951-3957.
129. Knight RD, Shimeld SM: **Identification of conserved C2H2 zinc-finger gene families in the Bilateria.** *Genome Biol* 2001, **2**:RESEARCH0016.
130. Manzanares M, Locascio A, Nieto MA: **The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution.** *Trends Genet* 2001, **17**:178-181.
131. Nieto MA: **The snail superfamily of zinc-finger transcription factors.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**:155-166.
132. Manzanares M, Blanco MJ, Nieto MA: **Snail3 orthologues in vertebrates: divergent members of the Snail zinc-finger gene family.** *Dev Genes Evol* 2004, **214**:47-53.

133. Grau Y, Carteret C, Simpson P: **Mutations and Chromosomal Rearrangements Affecting the Expression of Snail, a Gene Involved in Embryonic Patterning in DROSOPHILA MELANOGASTER.** *Genetics* 1984, **108**:347-360.
134. Alberga A, Boulay JL, Kempe E, Dennefeld C, Haenlin M: **The snail gene required for mesoderm formation in Drosophila is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers.** *Development* 1991, **111**:983-992.
135. Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF, Gridley T: **The Mouse Snail Gene Encodes a Key Regulator of the Epithelial-Mesenchymal Transition.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**:8184-8188.
136. Barbera MJ, Puig I, Dominguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, Peiro S, Baulida J, Franci C, Dedhar S, Larue L, Garcia de Herreros A: **Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells.** *Oncogene* 2004, **23**:7345-7354.
137. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, Nieto MA: **Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas.** *Oncogene* 2002, **21**:3241-3246.
138. Rosivatz E, Becker KF, Kremmer E, Schott C, Blechschmidt K, Hofler H, Sarbia M: **Expression and nuclear localization of Snail, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract.** *Virchows Arch* 2006, **448**:277-287.
139. Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, Taguchi K, Aishima S, Shimada M, Sugimachi K, Tsuneyoshi M: **Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**:2657-2664.
140. Franci C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gomez S, Rodriguez R, Escriva M, Montserrat-Sentis B, Baro T, Garrido M, et al: **Expression of Snail protein in tumor-stroma interface.** *Oncogene* 2006, **25**:5134-5144.
141. Boutet A, De Frutos CA, Maxwell PH, Mayol MJ, Romero J, Nieto MA: **Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney.** *Embo J* 2006, **25**:5603-5613.
142. Dominguez D, Montserrat-Sentis B, Virgos-Soler A, Guaita S, Grueso J, Porta M, Puig I, Baulida J, Franci C, Garcia de Herreros A: **Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:5078-5089.
143. Grimes HL, Chan TO, Zweidler-McKay PA, Tong B, Tschlis PN: **The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**:6263-6272.
144. Yokoyama K, Kamata N, Hayashi E, Hoteiya T, Ueda N, Fujimoto R, Nagayama M: **Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro.** *Oral Oncol* 2001, **37**:65-71.

145. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER: **The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer.** *Cancer Res* 2002, **62**:1613-1618.
146. Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC: **Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:931-940.
147. Wu Y, Evers BM, Zhou BP: **Small C-terminal domain phosphatase enhances snail activity through dephosphorylation.** *J Biol Chem* 2009, **284**:640-648.
148. Vinas-Castells R, Beltran M, Valls G, Gomez I, Garcia JM, Montserrat-Sentis B, Baulida J, Bonilla F, de Herreros AG, Diaz VM: **The hypoxia-controlled FBXL14 ubiquitin ligase targets SNAIL1 for proteasome degradation.** *J Biol Chem*, **285**:3794-3805.
149. Peinado H, Portillo F, Cano A: **Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta.** *Cell Cycle* 2005, **4**:1749-1752.
150. Yang Z, Rayala S, Nguyen D, Vadlamudi RK, Chen S, Kumar R: **Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions.** *Cancer Res* 2005, **65**:3179-3184.
151. MacPherson MR, Molina P, Souchelnytskyi S, Wernstedt C, Martin-Perez J, Portillo F, Cano A: **Phosphorylation of serine 11 and serine 92 as new positive regulators of human Snail1 function: potential involvement of casein kinase-2 and the cAMP-activated kinase protein kinase A.** *Mol Biol Cell*, **21**:244-253.
152. Evdokimova V, Tognon C, Ng T, Ruzanov P, Melnyk N, Fink D, Sorokin A, Ovchinnikov LP, Davicioni E, Triche TJ, Sorensen PH: **Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition.** *Cancer Cell* 2009, **15**:402-415.
153. Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP: **Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion.** *Cancer Cell* 2009, **15**:416-428.
154. Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, Sancho E, Dedhar S, De Herreros AG, Baulida J: **Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression.** *J Biol Chem* 2002, **277**:39209-39216.
155. Beltran M, Puig I, Pena C, Garcia JM, Alvarez AB, Pena R, Bonilla F, de Herreros AG: **A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition.** *Genes Dev* 2008, **22**:756-769.
156. Behrens J, Lowrick O, Klein-Hitpass L, Birchmeier W: **The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:11495-11499.
157. Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A: **Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:306-319.

158. von Burstin J, Eser S, Paul MC, Seidler B, Brandl M, Messer M, von Werder A, Schmidt A, Mages J, Pagel P, et al: **E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex.** *Gastroenterology* 2009, **137**:361-371, 371 e361-365.
159. Hou Z, Peng H, Ayyanathan K, Yan KP, Langer EM, Longmore GD, Rauscher FJ, 3rd: **The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**:3198-3207.
160. Herranz N, Pasini D, Diaz VM, Franci C, Gutierrez A, Dave N, Escriva M, Hernandez-Munoz I, Di Croce L, Helin K, et al: **Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**:4772-4781.
161. Ara T, Deyama Y, Yoshimura Y, Higashino F, Shindoh M, Matsumoto A, Fukuda H: **Membrane type 1-matrix metalloproteinase expression is regulated by E-cadherin through the suppression of mitogen-activated protein kinase cascade.** *Cancer Lett* 2000, **157**:115-121.
162. Noren NK, Arthur WT, Burrige K: **Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP.** *J Biol Chem* 2003, **278**:13615-13618.
163. Wu H, Liang YL, Li Z, Jin J, Zhang W, Duan L, Zha X: **Positive expression of E-cadherin suppresses cell adhesion to fibronectin via reduction of alpha5beta1 integrin in human breast carcinoma cells.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2006, **132**:795-803.
164. Kuphal S, Bosserhoff AK: **Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma.** *Oncogene* 2006, **25**:248-259.
165. Kuphal S, Poser I, Jobin C, Hellerbrand C, Bosserhoff AK: **Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma.** *Oncogene* 2004, **23**:8509-8519.
166. Ohkubo T, Ozawa M: **The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation.** *J Cell Sci* 2004, **117**:1675-1685.
167. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S: **Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail.** *J Cell Sci* 2003, **116**:1959-1967.
168. Palmer HG, Larriba MJ, Garcia JM, Ordenez-Moran P, Pena C, Peiro S, Puig I, Rodriguez R, de la Fuente R, Bernad A, et al: **The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer.** *Nat Med* 2004, **10**:917-919.
169. Sarrio D, Perez-Mies B, Hardisson D, Moreno-Bueno G, Suarez A, Cano A, Martin-Perez J, Gamallo C, Palacios J: **Cytoplasmic localization of p120ctn and E-cadherin loss characterize lobular breast carcinoma from preinvasive to metastatic lesions.** *Oncogene* 2004, **23**:3272-3283.

170. Yokoyama K, Kamata N, Fujimoto R, Tsutsumi S, Tomonari M, Taki M, Hosokawa H, Nagayama M: **Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas.** *Int J Oncol* 2003, **22**:891-898.
171. Miyoshi A, Kitajima Y, Sumi K, Sato K, Hagiwara A, Koga Y, Miyazaki K: **Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells.** *Br J Cancer* 2004, **90**:1265-1273.
172. Lee SH, Lee SJ, Jung YS, Xu Y, Kang HS, Ha NC, Park BJ: **Blocking of p53-Snail binding, promoted by oncogenic K-Ras, recovers p53 expression and function.** *Neoplasia* 2009, **11**:22-31, 26p following 31.
173. Escriva M, Peiro S, Herranz N, Villagrasa P, Dave N, Montserrat-Sentis B, Murray SA, Franci C, Gridley T, Virtanen I, Garcia de Herreros A: **Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**:1528-1540.
174. Vivanco I, Sawyers CL: **The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:489-501.
175. Manning BD, Cantley LC: **AKT/PKB signaling: navigating downstream.** *Cell* 2007, **129**:1261-1274.
176. Hanada M, Feng J, Hemmings BA: **Structure, regulation and function of PKB/AKT-a major therapeutic target.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1697**:3-16.
177. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S: **The protein kinase complement of the human genome.** *Science* 2002, **298**:1912-1934.
178. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN: **A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region.** *Science* 1991, **254**:274-277.
179. Staal SP, Hartley JW, Rowe WP: **Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**:3065-3067.
180. Coffey PJ, Woodgett JR: **Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families.** *Eur J Biochem* 1991, **201**:475-481.
181. Brazil DP, Hemmings BA: **Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow.** *Trends Biochem Sci* 2001, **26**:657-664.
182. Brodbeck D, Hill MM, Hemmings BA: **Two splice variants of protein kinase B gamma have different regulatory capacity depending on the presence or absence of the regulatory phosphorylation site serine 472 in the carboxyl-terminal hydrophobic domain.** *J Biol Chem* 2001, **276**:29550-29558.
183. Toda T, Cameron S, Sass P, Wigler M: **SCH9, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein distinct from, but functionally and structurally related to, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits.** *Genes Dev* 1988, **2**:517-527.

184. Morano KA, Thiele DJ: **The Sch9 protein kinase regulates Hsp90 chaperone complex signal transduction activity in vivo.** *Embo J* 1999, **18**:5953-5962.
185. Yang ZZ, Tschopp O, Baudry A, Dummler B, Hynx D, Hemmings BA: **Physiological functions of protein kinase B/Akt.** *Biochem Soc Trans* 2004, **32**:350-354.
186. Yang ZZ, Tschopp O, Hemmings-Mieszczak M, Feng J, Brodbeck D, Perentes E, Hemmings BA: **Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth.** *J Biol Chem* 2003, **278**:32124-32131.
187. Woulfe D, Jiang H, Morgans A, Monks R, Birnbaum M, Brass LF: **Defects in secretion, aggregation, and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt2.** *J Clin Invest* 2004, **113**:441-450.
188. Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, Lee VM, Szabolcs M, de Jong R, Oltersdorf T, et al: **Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:1869-1878.
189. Dummler B, Tschopp O, Hynx D, Yang ZZ, Dirnhofer S, Hemmings BA: **Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:8042-8051.
190. Alessi DR, Cohen P: **Mechanism of activation and function of protein kinase B.** *Curr Opin Genet Dev* 1998, **8**:55-62.
191. Wymann MP, Zvelebil M, Laffargue M: **Phosphoinositide 3-kinase signalling-- which way to target?** *Trends Pharmacol Sci* 2003, **24**:366-376.
192. Franke TF: **Intracellular signaling by Akt: bound to be specific.** *Sci Signal* 2008, **1**:pe29.
193. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA: **Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1.** *Embo J* 1996, **15**:6541-6551.
194. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P: **Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha.** *Curr Biol* 1997, **7**:261-269.
195. Shaw M, Cohen P, Alessi DR: **The activation of protein kinase B by H2O2 or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2.** *Biochem J* 1998, **336 (Pt 1)**:241-246.
196. Hill MM, Feng J, Hemmings BA: **Identification of a plasma membrane Raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1.** *Curr Biol* 2002, **12**:1251-1255.
197. Toker A, Newton AC: **Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site.** *J Biol Chem* 2000, **275**:8271-8274.
198. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM: **Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.** *Science* 2005, **307**:1098-1101.

199. Meier R, Hemmings BA: **Regulation of protein kinase B.** *J Recept Signal Transduct Res* 1999, **19**:121-128.
200. Borgatti P, Martelli AM, Tabellini G, Bellacosa A, Capitani S, Neri LM: **Threonine 308 phosphorylated form of Akt translocates to the nucleus of PC12 cells under nerve growth factor stimulation and associates with the nuclear matrix protein nucleolin.** *J Cell Physiol* 2003, **196**:79-88.
201. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW: **Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN.** *Cell* 1998, **95**:29-39.
202. Huber M, Helgason CD, Damen JE, Scheid M, Duronio V, Liu L, Ware MD, Humphries RK, Krystal G: **The role of SHIP in growth factor induced signalling.** *Prog Biophys Mol Biol* 1999, **71**:423-434.
203. Trotman LC, Alimonti A, Scaglioni PP, Koutcher JA, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP: **Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function.** *Nature* 2006, **441**:523-527.
204. Gao T, Furnari F, Newton AC: **PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth.** *Mol Cell* 2005, **18**:13-24.
205. Kuo YC, Huang KY, Yang CH, Yang YS, Lee WY, Chiang CW: **Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt.** *J Biol Chem* 2008, **283**:1882-1892.
206. Brazil DP, Park J, Hemmings BA: **PKB binding proteins. Getting in on the Akt.** *Cell* 2002, **111**:293-303.
207. Biondi RM: **Phosphoinositide-dependent protein kinase 1, a sensor of protein conformation.** *Trends Biochem Sci* 2004, **29**:136-142.
208. Gao H, Yu Z, Bi D, Jiang L, Cui Y, Sun J, Ma R: **Akt/PKB interacts with the histone H3 methyltransferase SETDB1 and coordinates to silence gene expression.** *Mol Cell Biochem* 2007, **305**:35-44.
209. Mitsuuchi Y, Johnson SW, Sonoda G, Tanno S, Golemis EA, Testa JR: **Identification of a chromosome 3p14.3-21.1 gene, APPL, encoding an adaptor molecule that interacts with the oncoprotein-serine/threonine kinase AKT2.** *Oncogene* 1999, **18**:4891-4898.
210. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA: **Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.** *Nature* 1995, **378**:785-789.
211. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME: **Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.** *Cell* 1997, **91**:231-241.

212. Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME: **The many forks in FOXO's road.** *Sci STKE* 2003, **2003**:RE5.
213. Mayo LD, Donner DB: **A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:11598-11603.
214. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC: **Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.** *Science* 1998, **282**:1318-1321.
215. Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV: **Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**:893-901.
216. Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW, Lienhard GE: **Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation.** *J Biol Chem* 2003, **278**:14599-14602.
217. Edinger AL, Thompson CB: **Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**:2276-2288.
218. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL: **TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**:648-657.
219. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, et al: **PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest.** *Nat Med* 2002, **8**:1153-1160.
220. Zhou GL, Tucker DF, Bae SS, Bhatheja K, Birnbaum MJ, Field J: **Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration.** *J Biol Chem* 2006, **281**:36443-36453.
221. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L: **VEGF receptor signalling - in control of vascular function.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**:359-371.
222. Morbidelli L, Donnini S, Ziche M: **Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis.** *Curr Pharm Des* 2003, **9**:521-530.
223. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL: **Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics.** *Cancer Res* 2000, **60**:1541-1545.
224. Ackah E, Yu J, Zoellner S, Iwakiri Y, Skurk C, Shibata R, Ouchi N, Easton RM, Galasso G, Birnbaum MJ, et al: **Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis.** *J Clin Invest* 2005, **115**:2119-2127.
225. Liu W, Bagaitkar J, Watabe K: **Roles of AKT signal in breast cancer.** *Front Biosci* 2007, **12**:4011-4019.

226. Larue L, Bellacosa A: **Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways.** *Oncogene* 2005, **24**:7443-7454.
227. Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tschlis PN, Larue L: **The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines.** *Cancer Res* 2003, **63**:2172-2178.
228. Iliopoulos D, Polytaichou C, Hatziapostolou M, Kottakis F, Maroulakou IG, Struhl K, Tschlis PN: **MicroRNAs differentially regulated by Akt isoforms control EMT and stem cell renewal in cancer cells.** *Sci Signal* 2009, **2**:ra62.
229. Hong KO, Kim JH, Hong JS, Yoon HJ, Lee JI, Hong SP, Hong SD: **Inhibition of Akt activity induces the mesenchymal-to-epithelial reverting transition with restoring E-cadherin expression in KB and KOSCC-25B oral squamous cell carcinoma cells.** *J Exp Clin Cancer Res* 2009, **28**:28.
230. Muraoka-Cook RS, Shin I, Yi JY, Easterly E, Barcellos-Hoff MH, Yingling JM, Zent R, Arteaga CL: **Activated type I TGFbeta receptor kinase enhances the survival of mammary epithelial cells and accelerates tumor progression.** *Oncogene* 2006, **25**:3408-3423.
231. Cho HJ, Baek KE, Saika S, Jeong MJ, Yoo J: **Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **353**:337-343.
232. Maroulakou IG, Oemler W, Naber SP, Tschlis PN: **Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice.** *Cancer Res* 2007, **67**:167-177.
233. Ju X, Katiyar S, Wang C, Liu M, Jiao X, Li S, Zhou J, Turner J, Lisanti MP, Russell RG, et al: **Akt1 governs breast cancer progression in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:7438-7443.
234. Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, Natesan S, Brugge JS: **Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition.** *J Cell Biol* 2005, **171**:1023-1034.
235. Yan W, Fu Y, Tian D, Liao J, Liu M, Wang B, Xia L, Zhu Q, Luo M: **PI3 kinase/Akt signaling mediates epithelial-mesenchymal transition in hypoxic hepatocellular carcinoma cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **382**:631-636.
236. Tian Q, Feetham MC, Tao WA, He XC, Li L, Aebersold R, Hood L: **Proteomic analysis identifies that 14-3-3zeta interacts with beta-catenin and facilitates its activation by Akt.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:15370-15375.
237. Fukumoto S, Hsieh CM, Maemura K, Layne MD, Yet SF, Lee KH, Matsui T, Rosenzweig A, Taylor WG, Rubin JS, et al: **Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled.** *J Biol Chem* 2001, **276**:17479-17483.

238. Veeraraghavalu K, Subbaiah VK, Srivastava S, Chakrabarti O, Syal R, Krishna S: **Complementation of human papillomavirus type 16 E6 and E7 by Jagged1-specific Notch1-phosphatidylinositol 3-kinase signaling involves pleiotropic oncogenic functions independent of CBF1;Su(H);Lag-1 activation.** *J Virol* 2005, **79**:7889-7898.
239. Altomare DA, Testa JR: **Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer.** *Oncogene* 2005, **24**:7455-7464.
240. Tan C, Costello P, Sanghera J, Dominguez D, Baulida J, de Herreros AG, Dedhar S: **Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells.** *Oncogene* 2001, **20**:133-140.
241. Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR: **Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation.** *Biochem J* 1998, **335 (Pt 1)**:1-13.
242. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC: **Phosphoinositide kinases.** *Annu Rev Biochem* 1998, **67**:481-507.
243. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A: **IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkkappaB kinases essential for NF-kappaB activation.** *Science* 1997, **278**:860-866.
244. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB: **NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase.** *Nature* 1999, **401**:82-85.
245. Solanas G, Porta-de-la-Riva M, Agusti C, Casagolda D, Sanchez-Aguilera F, Larriba MJ, Pons F, Peiro S, Escriva M, Munoz A, et al: **E-cadherin controls beta-catenin and NF-kappaB transcriptional activity in mesenchymal gene expression.** *J Cell Sci* 2008, **121**:2224-2234.
246. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME: **Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.** *Cell* 1999, **96**:857-868.
247. Aoki M, Jiang H, Vogt PK: **Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:13613-13617.
248. Plas DR, Thompson CB: **Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome.** *J Biol Chem* 2003, **278**:12361-12366.
249. Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JM, Tindall DJ: **Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:1649-1654.
250. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G: **Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt.** *Science* 1997, **278**:687-689.

251. Zhou GL, Zhuo Y, King CC, Fryer BH, Bokoch GM, Field J: **Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:8058-8069.
252. Higuchi M, Onishi K, Kikuchi C, Gotoh Y: **Scaffolding function of PAK in the PDK1-Akt pathway.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**:1356-1364.
253. Mao K, Kobayashi S, Jaffer ZM, Huang Y, Volden P, Chernoff J, Liang Q: **Regulation of Akt/PKB activity by P21-activated kinase in cardiomyocytes.** *J Mol Cell Cardiol* 2008, **44**:429-434.
254. Schurmann A, Mooney AF, Sanders LC, Sells MA, Wang HG, Reed JC, Bokoch GM: **p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:453-461.
255. Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Derijard B, Moore G, Davis R, Karin M: **JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation.** *Genes Dev* 1994, **8**:2996-3007.
256. Kallunki T, Deng T, Hibi M, Karin M: **c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions.** *Cell* 1996, **87**:929-939.
257. Biondi RM, Nebreda AR: **Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions.** *Biochem J* 2003, **372**:1-13.
258. Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN: **AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation.** *Annu Rev Biochem* 1999, **68**:965-1014.
259. Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, Toker A: **Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT.** *Mol Cell* 2005, **20**:539-550.
260. Anai M, Shojima N, Katagiri H, Ogihara T, Sakoda H, Onishi Y, Ono H, Fujishiro M, Fukushima Y, Horike N, et al: **A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis.** *J Biol Chem* 2005, **280**:18525-18535.
261. Huang WC, Chen CC: **Akt phosphorylation of p300 at Ser-1834 is essential for its histone acetyltransferase and transcriptional activity.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:6592-6602.
262. Cha TL, Zhou BP, Xia W, Wu Y, Yang CC, Chen CT, Ping B, Otte AP, Hung MC: **Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3.** *Science* 2005, **310**:306-310.
263. Taylor SS: **The in vitro phosphorylation of chromatin by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase.** *J Biol Chem* 1982, **257**:6056-6063.
264. Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, Heckel A, van Meel J, Rieder CL, Peters JM: **The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint.** *J Cell Biol* 2003, **161**:281-294.

265. DeManno DA, Cottom JE, Kline MP, Peters CA, Maizels ET, Hunzicker-Dunn M: **Follicle-stimulating hormone promotes histone H3 phosphorylation on serine-10.** *Mol Endocrinol* 1999, **13**:91-105.
266. Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jacquot S, Hanauer A, Allis CD: **Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3.** *Science* 1999, **285**:886-891.
267. Thomson S, Clayton AL, Hazzalin CA, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC: **The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase.** *Embo J* 1999, **18**:4779-4793.
268. Yamamoto Y, Verma UN, Prajapati S, Kwak YT, Gaynor RB: **Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression.** *Nature* 2003, **423**:655-659.
269. He Z, Ma WY, Liu G, Zhang Y, Bode AM, Dong Z: **Arsenite-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10 is mediated by Akt1, extracellular signal-regulated kinase 2, and p90 ribosomal S6 kinase 2 but not mitogen- and stress-activated protein kinase 1.** *J Biol Chem* 2003, **278**:10588-10593.
270. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD: **Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation.** *Chromosoma* 1997, **106**:348-360.
271. Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P: **Signaling to chromatin through histone modifications.** *Cell* 2000, **103**:263-271.
272. Chin YR, Toker A: **Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer.** *Cell Signal* 2009, **21**:470-476.
273. Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinar FF, Bray MR, Snow BE, Ayala R, Danino M, Karlan BY, Slamon DJ: **Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells.** *Cancer Res* 2003, **63**:196-206.
274. Lai ZC, Fortini ME, Rubin GM: **The embryonic expression patterns of zfh-1 and zfh-2, two Drosophila genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins.** *Mech Dev* 1991, **34**:123-134.
275. Grootclaes ML, Frisch SM: **Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis.** *Oncogene* 2000, **19**:3823-3828.
276. Perez-Tenorio G, Stal O: **Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients.** *Br J Cancer* 2002, **86**:540-545.
277. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, et al: **A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer.** *Nature* 2007, **448**:439-444.

278. Samuels Y, Diaz LA, Jr., Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I, Rago C, Huso DL, Lengauer C, Kinzler KW, et al: **Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells.** *Cancer Cell* 2005, **7**:561-573.
279. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, et al: **PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer.** *Science* 1997, **275**:1943-1947.
280. Nicholson KM, Anderson NG: **The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy.** *Cell Signal* 2002, **14**:381-395.
281. Testa JR, Bellacosa A: **AKT plays a central role in tumorigenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:10983-10985.
282. Mende I, Malstrom S, Tschlis PN, Vogt PK, Aoki M: **Oncogenic transformation induced by membrane-targeted Akt2 and Akt3.** *Oncogene* 2001, **20**:4419-4423.
283. Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tschlis PN, Nicosia SV, Cheng JQ: **AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells.** *Am J Pathol* 2001, **159**:431-437.
284. Dillon RL, Marcotte R, Hennessy BT, Woodgett JR, Mills GB, Muller WJ: **Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression.** *Cancer Res* 2009, **69**:5057-5064.
285. Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, Murakumo Y, Usukura J, Kaibuchi K, Takahashi M: **Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE.** *Dev Cell* 2005, **9**:389-402.
286. Park BK, Zeng X, Glazer RI: **Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells.** *Cancer Res* 2001, **61**:7647-7653.
287. Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, Chung J: **Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production.** *Faseb J* 2001, **15**:1953-1962.
288. Tanno S, Tanno S, Mitsuuchi Y, Altomare DA, Xiao GH, Testa JR: **AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells.** *Cancer Res* 2001, **61**:589-593.
289. Liu H, Radisky DC, Nelson CM, Zhang H, Fata JE, Roth RA, Bissell MJ: **Mechanism of Akt1 inhibition of breast cancer cell invasion reveals a protumorigenic role for TSC2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:4134-4139.
290. Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A: **The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**:540-544.
291. Chen M, O'Connor KL: **Integrin alpha6beta4 promotes expression of autotaxin/ENPP2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells.** *Oncogene* 2005, **24**:5125-5130.

292. Yiu GK, Toker A: **NFAT induces breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2.** *J Biol Chem* 2006, **281**:12210-12217.
293. Hutchinson J, Jin J, Cardiff RD, Woodgett JR, Muller WJ: **Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**:2203-2212.
294. Courtneidge SA, Smith AE: **The complex of polyoma virus middle-T antigen and pp60c-src.** *Embo J* 1984, **3**:585-591.
295. Hutchinson JN, Jin J, Cardiff RD, Woodgett JR, Muller WJ: **Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion.** *Cancer Res* 2004, **64**:3171-3178.
296. Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G, Masciullo V, et al: **Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas.** *Int J Cancer* 1995, **64**:280-285.
297. Rychahou PG, Kang J, Gulhati P, Doan HQ, Chen LA, Xiao SY, Chung DH, Evers BM: **Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:20315-20320.
298. Grande M, Franzen A, Karlsson JO, Ericson LE, Heldin NE, Nilsson M: **Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes.** *J Cell Sci* 2002, **115**:4227-4236.
299. Khoury H, Naujokas MA, Zuo D, Sangwan V, Frigault MM, Petkiewicz S, Dankort DL, Muller WJ, Park M: **HGF converts ErbB2/Neu epithelial morphogenesis to cell invasion.** *Mol Biol Cell* 2005, **16**:550-561.
300. Eger A, Stockinger A, Park J, Langkopf E, Mikula M, Gotzmann J, Mikulits W, Beug H, Foisner R: **beta-Catenin and TGFbeta signalling cooperate to maintain a mesenchymal phenotype after FosER-induced epithelial to mesenchymal transition.** *Oncogene* 2004, **23**:2672-2680.
301. Gotzmann J, Huber H, Thallinger C, Wolschek M, Jansen B, Schulte-Hermann R, Beug H, Mikulits W: **Hepatocytes convert to a fibroblastoid phenotype through the cooperation of TGF-beta1 and Ha-Ras: steps towards invasiveness.** *J Cell Sci* 2002, **115**:1189-1202.
302. Guaita S: **ZEB1, un gen implicat en la repressió transcripcional de l'E-cadherina durante la transició epiteli-mesènquima. Caracterització del mecanisme de regulació de la seva expressió.** Universitat Pompeu Fabra, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut; 2005.
303. Davies MA, Stemke-Hale K, Tellez C, Calderone TL, Deng W, Prieto VG, Lazar AJ, Gershenwald JE, Mills GB: **A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines.** *Br J Cancer* 2008, **99**:1265-1268.
304. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, Kester M, Sandirasegarane L, Robertson GP: **Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma.** *Cancer Res* 2004, **64**:7002-7010.

305. Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Weigel RJ, Roth RA: **Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines.** *J Biol Chem* 1999, **274**:21528-21532.
306. Padmanabhan S, Mukhopadhyay A, Narasimhan SD, Tesz G, Czech MP, Tissenbaum HA: **A PP2A regulatory subunit regulates C. elegans insulin/IGF-1 signaling by modulating AKT-1 phosphorylation.** *Cell* 2009, **136**:939-951.
307. Walker KS, Deak M, Paterson A, Hudson K, Cohen P, Alessi DR: **Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha.** *Biochem J* 1998, **331 (Pt 1)**:299-308.
308. Calera MR, Martinez C, Liu H, Jack AK, Birnbaum MJ, Pilch PF: **Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles.** *J Biol Chem* 1998, **273**:7201-7204.
309. Kim EK, Tucker DF, Yun SJ, Do KH, Kim MS, Kim JH, Kim CD, Birnbaum MJ, Bae SS: **Linker region of Akt1/protein kinase Balpha mediates platelet-derived growth factor-induced translocation and cell migration.** *Cell Signal* 2008, **20**:2030-2037.
310. Kato S, Ding J, Du K: **Differential activation of CREB by Akt1 and Akt2.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **354**:1061-1066.
311. Maira SM, Galetic I, Brazil DP, Kaech S, Ingley E, Thelen M, Hemmings BA: **Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane.** *Science* 2001, **294**:374-380.
312. Strahl BD, Allis CD: **The language of covalent histone modifications.** *Nature* 2000, **403**:41-45.
313. Hurd PJ, Bannister AJ, Halls K, Dawson MA, Vermeulen M, Olsen JV, Ismail H, Somers J, Mann M, Owen-Hughes T, et al: **Phosphorylation of histone H3 Thr-45 is linked to apoptosis.** *J Biol Chem* 2009, **284**:16575-16583.
314. Sabbattini P, Canzonetta C, Sjoberg M, Nikic S, Georgiou A, Kembell-Cook G, Auner HW, Dillon N: **A novel role for the Aurora B kinase in epigenetic marking of silent chromatin in differentiated postmitotic cells.** *Embo J* 2007, **26**:4657-4669.
315. Duan Q, Chen H, Costa M, Dai W: **Phosphorylation of H3S10 blocks the access of H3K9 by specific antibodies and histone methyltransferase. Implication in regulating chromatin dynamics and epigenetic inheritance during mitosis.** *J Biol Chem* 2008, **283**:33585-33590.
316. Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, et al: **EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:11606-11611.
317. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, et al: **The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer.** *Nature* 2002, **419**:624-629.

318. Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ, 3rd: **SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins.** *Genes Dev* 2002, **16**:919-932.
319. Li H, Rauch T, Chen ZX, Szabo PE, Riggs AD, Pfeifer GP: **The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells.** *J Biol Chem* 2006, **281**:19489-19500.
320. Porta de la Riva M: **Transcriptional activation induced by snail1 during epithelial to mesenchymal transition.** 2009.
321. Reddy VS, Harskamp RE, van Ginkel MW, Calhoon J, Baisden CE, Kim IS, Valente AJ, Chandrasekar B: **Interleukin-18 stimulates fibronectin expression in primary human cardiac fibroblasts via PI3K-Akt-dependent NF-kappaB activation.** *J Cell Physiol* 2008, **215**:697-707.
322. Kashour T, Burton T, Dibrov A, Amara FM: **Late Simian virus 40 transcription factor is a target of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in anti-apoptotic Alzheimer's amyloid precursor protein signalling.** *Biochem J* 2003, **370**:1063-1075.
323. Young P, Boussadia O, Halfter H, Grose R, Berger P, Leone DP, Robenek H, Charnay P, Kemler R, Suter U: **E-cadherin controls adherens junctions in the epidermis and the renewal of hair follicles.** *Embo J* 2003, **22**:5723-5733.
324. Tinkle CL, Lechler T, Pasolli HA, Fuchs E: **Conditional targeting of E-cadherin in skin: insights into hyperproliferative and degenerative responses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:552-557.
325. Kaneko S, Feldman RI, Yu L, Wu Z, Gritsko T, Shelley SA, Nicosia SV, Nobori T, Cheng JQ: **Positive feedback regulation between Akt2 and MyoD during muscle differentiation. Cloning of Akt2 promoter.** *J Biol Chem* 2002, **277**:23230-23235.
326. Meredith JE, Jr., Fazeli B, Schwartz MA: **The extracellular matrix as a cell survival factor.** *Mol Biol Cell* 1993, **4**:953-961.
327. Peng XD, Xu PZ, Chen ML, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J, Sundararajan D, Chen WS, Crawford SE, Coleman KG, Hay N: **Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2.** *Genes Dev* 2003, **17**:1352-1365.
328. Calautti E, Li J, Saoncella S, Brissette JL, Goetinck PF: **Phosphoinositide 3-kinase signaling to Akt promotes keratinocyte differentiation versus death.** *J Biol Chem* 2005, **280**:32856-32865.
329. Sugatani T, Hruska KA: **Akt1/Akt2 and mammalian target of rapamycin/Bim play critical roles in osteoclast differentiation and survival, respectively, whereas Akt is dispensable for cell survival in isolated osteoclast precursors.** *J Biol Chem* 2005, **280**:3583-3589.

330. Maroulakou IG, Oemler W, Naber SP, Klebba I, Kuperwasser C, Tsichlis PN: **Distinct roles of the three Akt isoforms in lactogenic differentiation and involution.** *J Cell Physiol* 2008, **217**:468-477.
331. Rodrigo I, Cato AC, Cano A: **Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element.** *Exp Cell Res* 1999, **248**:358-371.
332. Liu YN, Lee WW, Wang CY, Chao TH, Chen Y, Chen JH: **Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression.** *Oncogene* 2005, **24**:8277-8290.
333. Serra C, Palacios D, Mozzetta C, Forcales SV, Morante I, Ripani M, Jones DR, Du K, Jhala US, Simone C, Puri PL: **Functional interdependence at the chromatin level between the MKK6/p38 and IGF1/PI3K/AKT pathways during muscle differentiation.** *Mol Cell* 2007, **28**:200-213.
334. Pore N, Liu S, Shu HK, Li B, Haas-Kogan D, Stokoe D, Milanini-Mongiat J, Pages G, O'Rourke DM, Bernhard E, Maity A: **Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism.** *Mol Biol Cell* 2004, **15**:4841-4853.
335. Bae IH, Park MJ, Yoon SH, Kang SW, Lee SS, Choi KM, Um HD: **Bcl-w promotes gastric cancer cell invasion by inducing matrix metalloproteinase-2 expression via phosphoinositide 3-kinase, Akt, and Sp1.** *Cancer Res* 2006, **66**:4991-4995.
336. Goh CS, Lan N, Douglas SM, Wu B, Echols N, Smith A, Milburn D, Montelione GT, Zhao H, Gerstein M: **Mining the structural genomics pipeline: identification of protein properties that affect high-throughput experimental analysis.** *J Mol Biol* 2004, **336**:115-130.
337. Stagljar I: **Finding partners: emerging protein interaction technologies applied to signaling networks.** *Sci STKE* 2003, **2003**:pe56.
338. Fowler AM, Alarid ET: **Nuclear receptor and transcriptional complex cycles.** *Sci STKE* 2004, **2004**:tr11.
339. Ding Z, Liang J, Lu Y, Yu Q, Songyang Z, Lin SY, Mills GB: **A retrovirus-based protein complementation assay screen reveals functional AKT1-binding partners.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:15014-15019.
340. Kim AH, Yano H, Cho H, Meyer D, Monks B, Margolis B, Birnbaum MJ, Chao MV: **Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis.** *Neuron* 2002, **35**:697-709.
341. Heron-Milhavet L, Mamaeva D, Rochat A, Lamb NJ, Fernandez A: **Akt2 is implicated in skeletal muscle differentiation and specifically binds Prohibitin2/REA.** *J Cell Physiol* 2008, **214**:158-165.
342. Du K, Tsichlis PN: **Regulation of the Akt kinase by interacting proteins.** *Oncogene* 2005, **24**:7401-7409.

343. Ingley E, Hemmings BA: **PKB/Akt interacts with inosine-5' monophosphate dehydrogenase through its pleckstrin homology domain.** *FEBS Lett* 2000, **478**:253-259.
344. Sato S, Fujita N, Tsuruo T: **Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:10832-10837.
345. Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M: **TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver.** *Science* 2003, **300**:1574-1577.
346. Yuan ZQ, Kim D, Kaneko S, Sussman M, Bokoch GM, Kruh GD, Nicosia SV, Testa JR, Cheng JQ: **ArgBP2gamma interacts with Akt and p21-activated kinase-1 and promotes cell survival.** *J Biol Chem* 2005, **280**:21483-21490.
347. Jahn T, Seipel P, Urschel S, Peschel C, Duyster J: **Role for the adaptor protein Grb10 in the activation of Akt.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:979-991.
348. Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, Sessa WC: **Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release.** *Circ Res* 2002, **90**:866-873.
349. Sun L, Liu L, Yang XJ, Wu Z: **Akt binds prohibitin 2 and relieves its repression of MyoD and muscle differentiation.** *J Cell Sci* 2004, **117**:3021-3029.
350. Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, Bichi R, Tresini M, Malstrom S, Russo G, Tschlis P, Croce CM: **Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:3028-3033.
351. Franke TF: **Akt-interacting proteins: attractive opposites. focus on "Carboxy-terminal modulator protein induces Akt phosphorylation and activation, thereby enhancing antiapoptotic, glycogen synthetic, and glucose uptake pathways".** *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, **293**:C1768-1770.
352. Noguchi M, Ropars V, Roumestand C, Suizu F: **Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt.** *Faseb J* 2007, **21**:2273-2284.
353. Tokuda E, Fujita N, Oh-hara T, Sato S, Kurata A, Katayama R, Itoh T, Takenawa T, Miyazono K, Tsuruo T: **Casein kinase 2-interacting protein-1, a novel Akt pleckstrin homology domain-interacting protein, down-regulates PI3K/Akt signaling and suppresses tumor growth in vivo.** *Cancer Res* 2007, **67**:9666-9676.
354. Ahn JY, Rong R, Kroll TG, Van Meir EG, Snyder SH, Ye K: **PIKE (phosphatidylinositol 3-kinase enhancer)-A GTPase stimulates Akt activity and mediates cellular invasion.** *J Biol Chem* 2004, **279**:16441-16451.
355. Laine J, Kunstle G, Obata T, Sha M, Noguchi M: **The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator.** *Mol Cell* 2000, **6**:395-407.
356. Pim D, Massimi P, Dilworth SM, Banks L: **Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A.** *Oncogene* 2005, **24**:7830-7838.

357. Neri LM, Borgatti P, Capitani S, Martelli AM: **The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system.** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1584**:73-80.
358. Lim MA, Kikani CK, Wick MJ, Dong LQ: **Nuclear translocation of 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1): a potential regulatory mechanism for PDK-1 function.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:14006-14011.
359. Inoue H, Nojima H, Okayama H: **High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids.** *Gene* 1990, **96**:23-28.
360. Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A: **Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells.** *Cancer Res* 1990, **50**:6334-6343.
361. Sanchez-Margalet V, Goldfine ID, Vlahos CJ, Sung CK: **Role of phosphatidylinositol-3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor, LY294002.** *Biochem Biophys Res Commun* 1994, **204**:446-452.

ANEXO

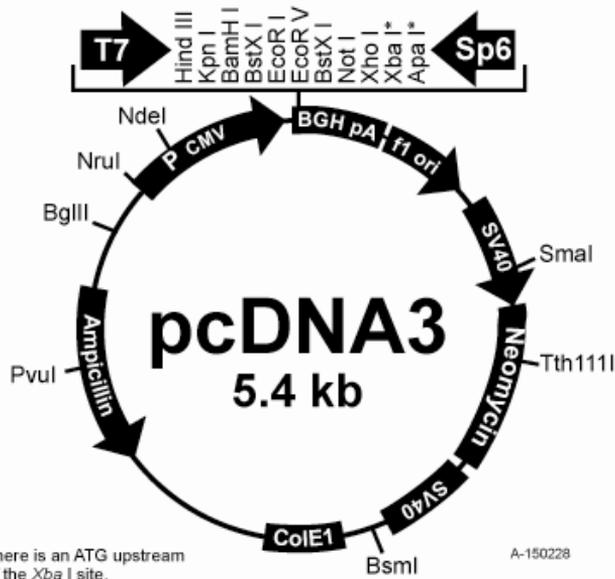
A.1 VECTORES

A.1.1 Vectores de expresión en eucariotas

pcDNA3

Comments for pcDNA3:
5446 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863
T7 promoter: bases 864-882
Polylinker: bases 889-994
Sp6 promoter: bases 999-1016
BGH poly A: bases 1018-1249
SV40 promoter: bases 1790-2115
SV40 origin of replication: bases 1984-2069
Neomycin ORF: bases 2151-2945
SV40 poly A: bases 3000-3372
ColE1 origin: bases 3632-4305
Ampicillin ORF: bases 4450-5310



Inserto	Clonado
mmsnail1-HA	BamHI/NotI
mmsnail1-P2A-HA	BamHI/NotI
mmsnail1-S/A	BamHI/NotI

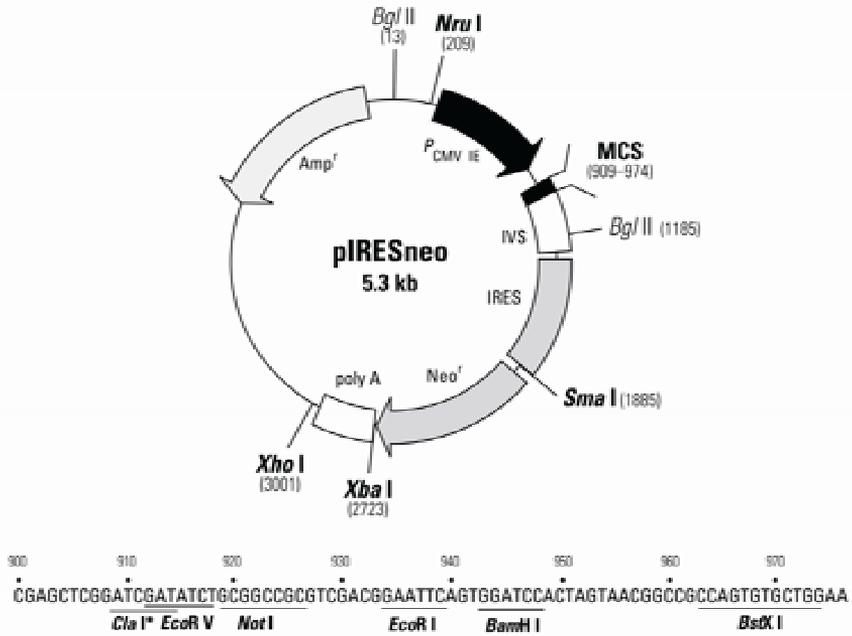
pIRES

pIRESneo Vector Information

GenBank Accession #: U89673

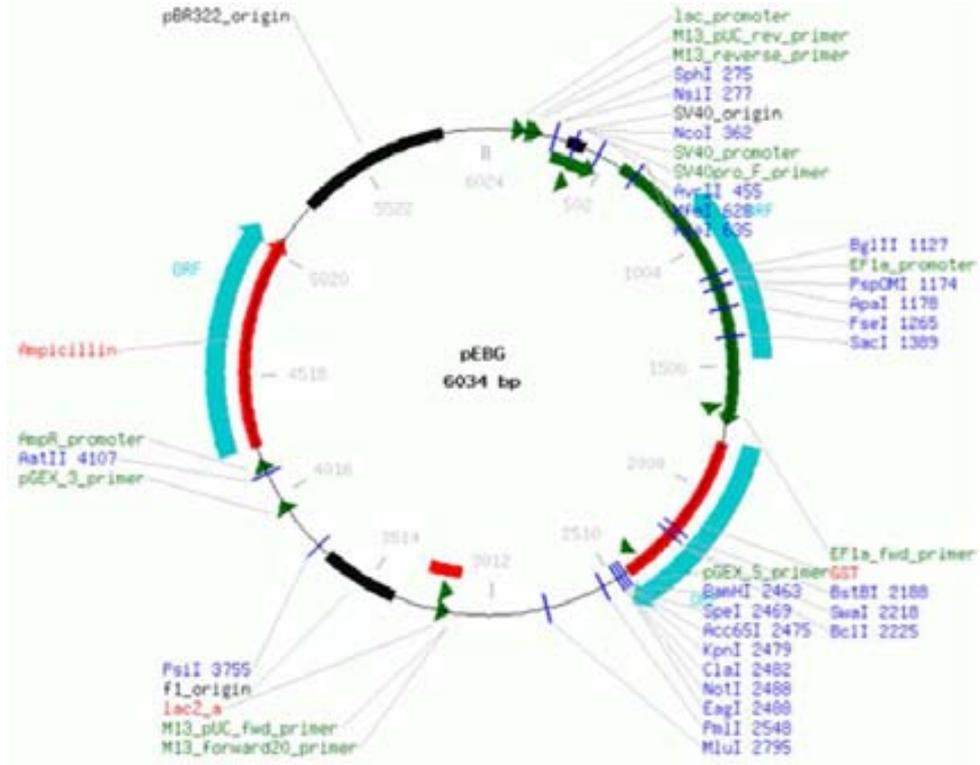
PT3043-5

Catalog #6060-1



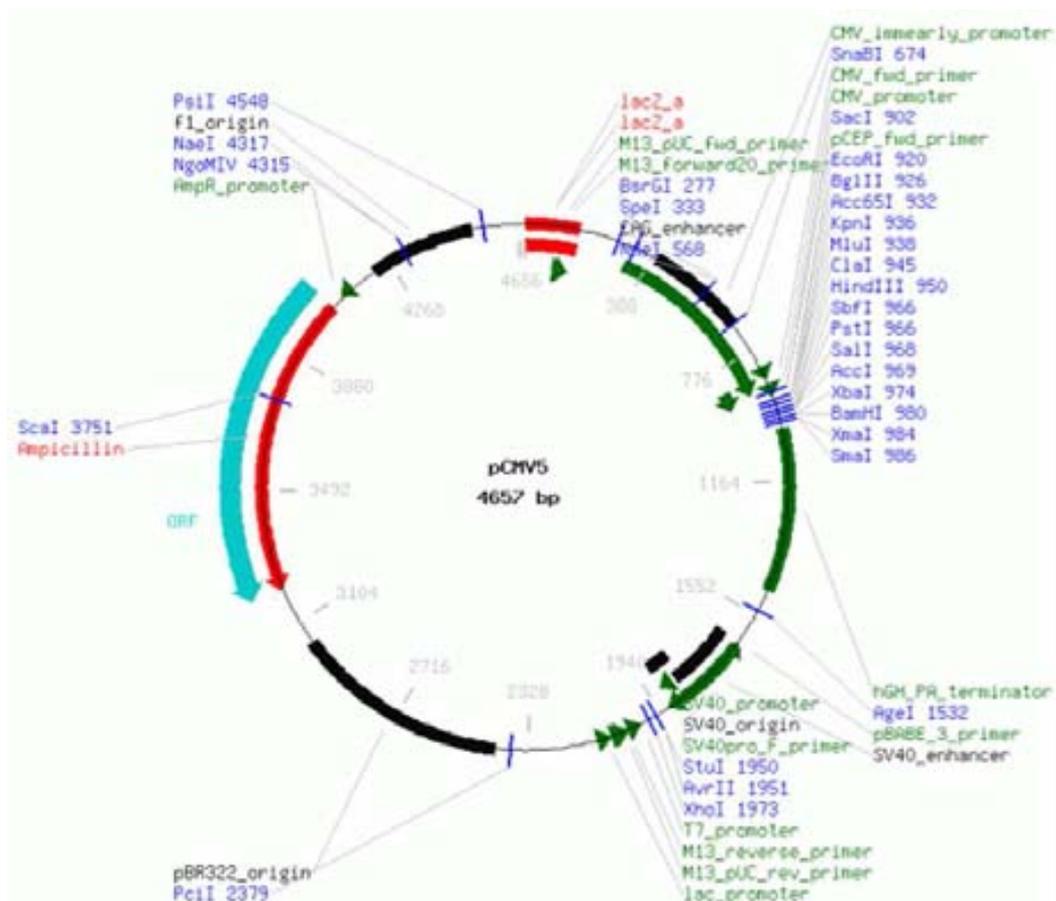
Inserto	Clonado
mmsnail1-HA	BamHI/NotI
mmsnail1-P2A-HA	BamHI/NotI

pEBG-T2



Inserto	Clonado
GST-Akt1	BamHI/KpnI
GST-ΔPH-Akt1	BamHI/KpnI

pcMV5



Inserto	Clonado
Akt-HA-K179M	EcoRI/BglIII

A.1.3 Luciferase reporter vector

pGL3

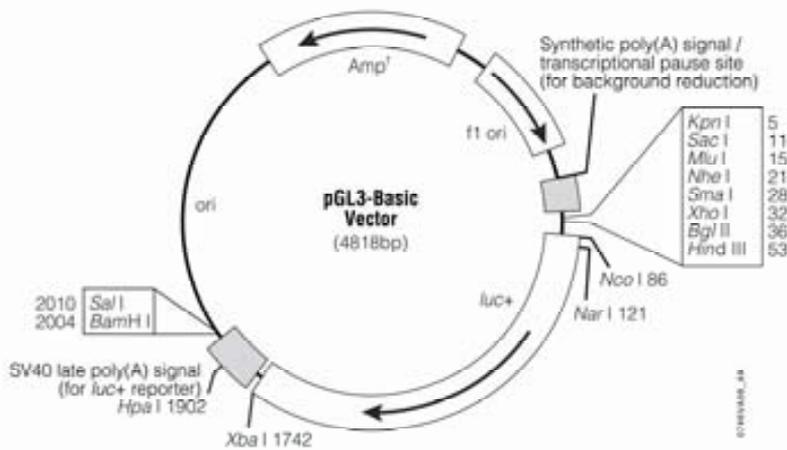


Figure 1. pGL3-Basic Vector circle map. Additional description: *luc+*, cDNA encoding the modified firefly luciferase; *Amp^r*, gene conferring ampicillin resistance in *E. coli*; *f1 ori*, origin of replication derived from filamentous phage; *ori*, origin of replication in *E. coli*. Arrows within *luc+* and the *Amp^r* gene indicate the direction of transcription; the arrow in the *f1 ori* indicates the direction of ssDNA strand synthesis.

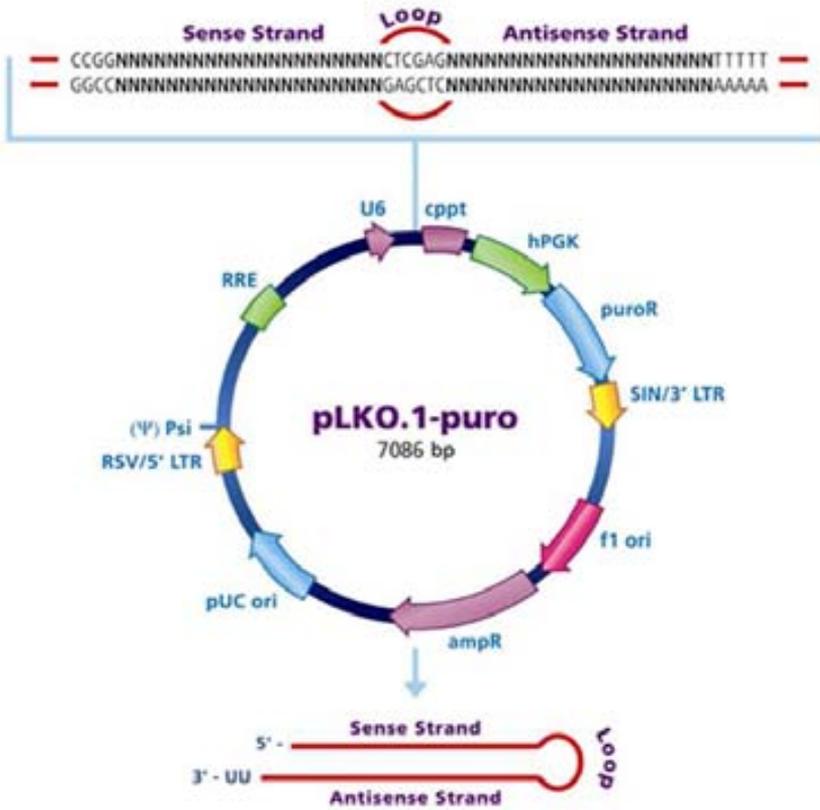
pGL3-Basic Vector Sequence Reference Points:

SV40 Promoter	(none)
SV40 Enhancer	(none)
Multiple cloning region	1–58
Luciferase gene (<i>luc+</i>)	88–1740
GLprimer2 binding site	89–111
SV40 late poly(A) signal	1772–1993
RVprimer4 binding site	2080–2061
ColE 1-derived plasmid replication origin	2318
β -lactamase gene (<i>Amp^r</i>)	3080–3940
<i>f1</i> origin	4072–4527
Synthetic poly(A) signal	4658–4811
RVprimer3 binding site	4760–4779

Inserto	Clonado
-178/+92 <i>CDH1</i>	MluI/XhoI

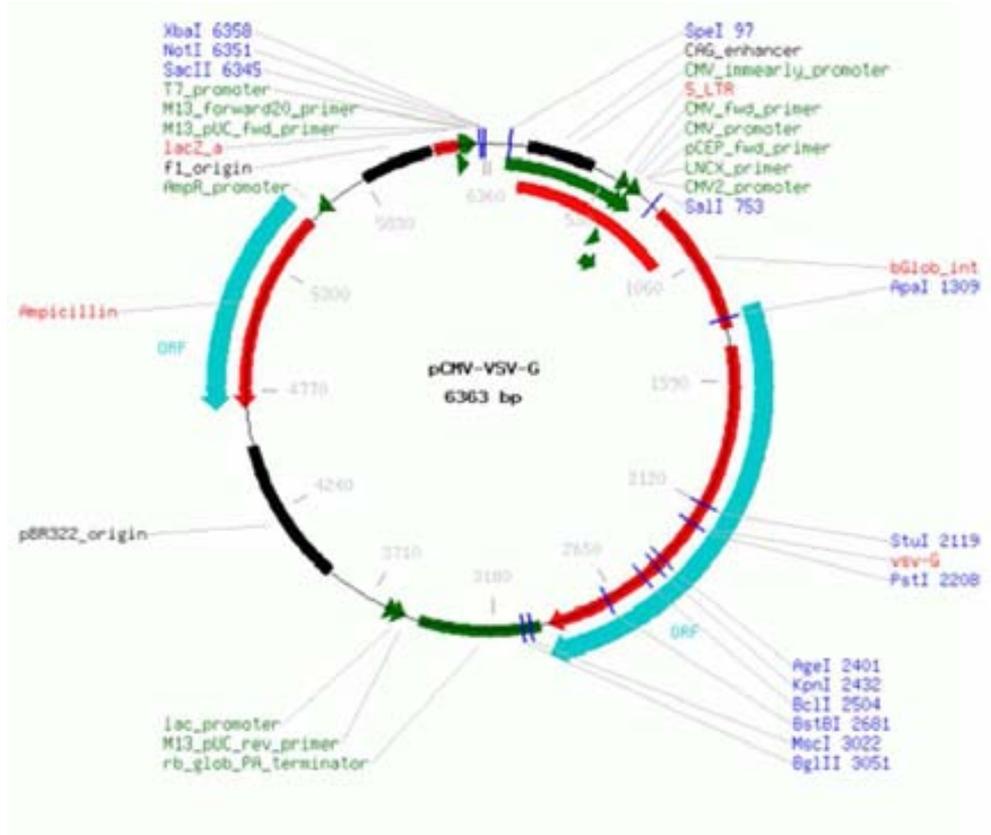
A.1.4 Lentivirus

pLKO.1-puro

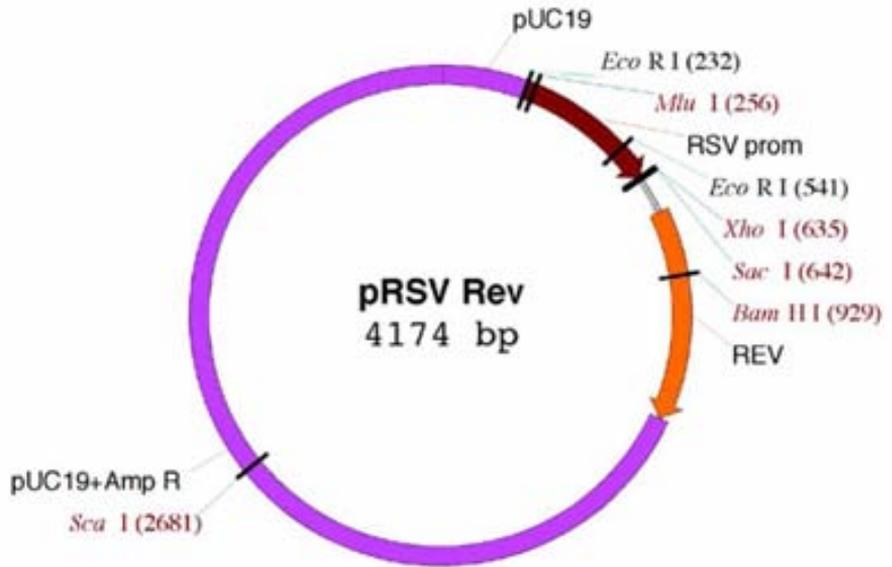


Inserto	Números de referencia Sigma
shAkt1	TRC0000039793
	TRC0000039794
	TRC0000039795
	TRC0000039796
	TRC0000039797
shAkt2	TRC0000039968
	TRC0000039969
	TRC0000039770
	TRC0000039771
	TRC0000039772

pCMV-VSV-G



pRSV



AGRADECIMIENTOS

En fin, largo ha sido el viaje. De hecho, 5 años y medio. Todavía me acuerdo cuando estudiaba biología y pensaba que tenía que estudiar mucho para poder conseguir mis sueños, pero está claro que sin la ayuda de los incondicionales como familia y amigos y de toda la gente que me ha acompañado en este camino no lo hubiera conseguido. Así que ¡mil gracias a todos! Me gustaría no olvidarme de nadie pero, si por desgracia no te nombro, recuerda que mi corazón te lo agradece aunque no quede reflejado en estas líneas.

En primer lugar agradecer a Mireia y Antonio la oportunidad que me han dado de cumplir uno de mis sueños o al menos iniciarlo, el de hacer ciencia. El primer año con Mireia fue difícil y duro. Todavía recuerdo cuando nos decía a mí y a los "cateninos" -tenéis que hacer un pull-down y un binding al día-. En esos momentos piensas - ¡madre mía que dura!- con el tiempo acabas viendo que es la única manera de conseguir las cosas: trabajando. Me gustaría agradecerte, Mireia, que siempre te hayas preocupado por nosotros, incluso a veces como una madre. Gracias por escucharme esos viernes por la tarde cuando no salía nada. Gracias por animarme siempre a seguir luchando.

En los dos últimos años he tenido la suerte de poder conocerte, Antonio. No sé cómo agradecerte todo lo que me has enseñado y lo que me has ayudado. Sólo decirte que ha sido un placer hablar de ciencia contigo. Gracias por escuchar mis ideas, fueran buenas o malas. Gracias por darme alas. Gracias por tener paciencia y, sobretodo, gracias por ayudarme a seguir mi sueño en el nuevo viaje que inicio en unos meses. Por cierto, tenemos un paper pendiente ;p

Gracias a los dos, espero algún día poder devolvéroslo.

Otra persona importante en esta etapa de mi vida has sido tú Jose. ¿Cómo podría agradecerte todo el apoyo que me has dado? Sé que siempre te lo digo y tú siempre me dices que no hace falta que te lo agradezca, pero quiero que sepas, que si no fuera por esos grandes momentos en la UAB en los que te interesabas por mi trabajo y en los que buscábamos experimentos para demostrar nuestra ideas, está claro que no hubiera llegado hasta aquí. Mil gracias Jose. De paso, agradecer a Arantzazu, esa impresionante becaria que tienes, sin la cual no hubiera podido acabar muchos experimentos. Gracias

Arantzazu por siempre estar ahí. Mucho ánimo y fuerza. Ya sabes dónde estoy para lo que necesites.

Otras personas importantes en este tiempo han sido la Rosanilla, la Granell y la Anna. Ese trío sin el cual no hubiera pasado ni del primer año. Muchas gracias a las tres por sacarme a fumar un piti cuando me veíais con esa cara de "me voy y lo dejo todo". Es una lástima que la distancia no me deje disfrutar más de vosotras, pero que sepáis, que siempre que me necesitéis estaré ahí. Gracias Anna por tu ternura. Gracias Rosana por tu sabiduría. Gracias Txell por tu paciencia y por entenderme. De verdad muchas gracias a las tres.

Los "cateninos", vosotros habéis sido mis primeros compañeros de trabajo y por ello hemos pasado situaciones complicadas, pero también situaciones muy divertidas. Gracias Julio por enseñarme a hacer una construcción y por las charlas. Gracias Imma por mostrarme una sonrisa cada vez que la necesitaba. Gracias Neus por tu disposición, tu ayuda y tu comprensión. Guío, gracias por enseñarme en mis inicios y por esas charlas y reuniones de pelu en casa de Ali que permitieron que te conociera fuera del labo. David, bueno ya sabes lo que pienso de ti, pero quiero que la gente lo sepa. Eres uno de los mejores compañeros de trabajo que una persona puede desear (sólo hay que decirte alguna vez "calla" ;p). Recuerda, todos somos especiales, lo que pasa es que algunos no tienen paciencia. Gracias por todo David. Montse, dos tíos que están en una discoteca y le dice uno al otro -eo ¿qué hora es?- y le dice el otro -las cuatro de la madrugada-, -joé que tarde!, y contesta, -pues haberlo preguntado antes ;p. Ya, ya muy malo pero lo que daría por verte reír de nuevo. Gracias por esos momentos en la comida. Gracias por responder siempre a mis preguntas. Por favor, no cambies, espero que todo el mundo vea lo grande que eres. Gabri, ¡qué ya está que estoy a punto de depositar! ¿Ves? y al igual que me ha llegado a mí, también te llegará a ti. No sabes cuantas veces he pensado qué lástima no haber coincidido más tiempo contigo, menos mal que aún así te he podido conocer y quiero seguir conociéndote. Ya sabes dónde estoy para cualquier cosa (sí, sí, también cuando me llames a las tres de la madrugada ;p). Bea, esa sevillana, hemos coincidido poco pero también hemos pasado muy buenos momentos. Gracias por aportar frescura al grupo. La nueva troupe Ero y Txell, sólo deciros que ánimo y que cuando intentamos hacer lo imposible, es cuando lo hacemos posible. Antes de cambiar de equipo me gustaría agradecer

a toda la gente que ha pasado por la unidad de Biofísica. A todos los compañeros Alba, Núria, Marta, Mercè, Álex etc...a todos los profesores, ha sido un placer compartir estos años con todos vosotros.

Ahora le toca a mi segundo grupo, los "snail". Recuerdo lo nerviosa que estaba la primera estancia que pasé con vosotros, de la cual quiero destacar la ayuda de Bárbara. Gracias por todos los momentos en los que me ayudaste a mejorar técnicas y gracias por escuchar todas mis batallitas. Luego vino una estancia más larga, estos dos últimos años, los cuáles me han permitido conoceros un poquito mejor a todos. En primer lugar me gustaría agradecer a Sandra y a Nico, gracias a los dos por enseñarme más ciencia y por permitirme acabar la tesis con nuevas ideas. Sandra, sé que te tocó trabajar conmigo por obligación, sólo quiero que sepas que te agradezco esos momentos, aunque fueran menos de los que me hubiera gustado, en los que me dedicaste tu tiempo gracias a los cuáles, he aprendido mucho tanto de ciencia como de la vida. Nico, gracias también por la paciencia que tuviste conmigo durante los primeros meses y, aunque un día se te acabó, durante el resto de los días siempre has estado ahí, gracias. Rosa, gracias por mantener el laboratorio tanto físicamente como emocionalmente. Creo que la gente no sabe realmente lo afortunada que es de tenerte como compañera de trabajo yo, al menos, no tengo palabras para agradecerte todo lo que me has ayudado. Gracias Rosa. Manolo, ese ruiseñor que tanto me gusta oírle cantar, ejem... (entre tú y yo, en el fondo me gusta, pero ya sabes que también soy una amante del silencio). No te tomes a mal esos días de estrés que pedía por favor que "mataran al canario" ya sabes que te agradezco lo que me has ayudado enseñándome muchas cosas y dándome un abrazo cuando lo necesitaba. Gracias Manolo. Jelena, gracias por intentar enseñarme inglés (espero no haber sido muy mala alumna...) y por ser tan buena compañera de trabajo, ¡hvalá. Raquel, gracias por muchas conversaciones que hemos tenido. Natalia, sin ninguna duda eres todo un personaje. Gracias por esos momentos de risas. Víctor, para mí ha sido un placer conocerte. Tienes que explicarme el secreto de conciliar la vida familiar con la científica. Ya te lo dije un día, eso es de admirar. Y ese equipo magnífico de los técnicos, gracias a todos. Gracias Raúl por haberme echado una mano siempre que te lo he pedido e incluso sin habértelo pedido y sobretodo, gracias por enseñarme a trabajar en ese laboratorio que, como todos sabemos, no es

fácil. Gracias Ali por siempre tener una sonrisa, por ser tan encantadora. Gracias a ti también Jordina por tener tanta pasión por lo que haces ya sea contar células como jugar un partido de fútbol. La nueva generación, Alba, Estel, Álex y Elena, ánimo en vuestra andadura por la ciencia, habéis escogido un buen grupo, aprovechad la oportunidad.

No quiero dejarme a la otra parte del IMIM que no pertenece al grupo snail pero que han compartido muchos momentos conmigo, gracias a los cuáles he podido seguir mi camino. Gracias Laura por esas charlas en la sala de cultivos sobre el futuro, sobre los experimentos, gracias por compartir alegrías y penas científicas, ya te queda poco. Gracias Elena por tus consejos y por tu ayuda, siempre has estado ahí para echarme una mano. Gracias Neus por tu sensibilidad y tus ánimos. Gracias Mari y Vero no hemos coincidido mucho, pero hemos compartido cosas como si nos conociéramos desde hace mucho tiempo y espero seguir compartiéndolas. Al igual que David, estos últimos años me has ayudado mucho a tomar decisiones, sin ni siquiera conocerme. Gracias David ¡nos vemos en Columbia!

Quiero agradecer a todos aquellos que siempre me han dedicado una sonrisa por los pasillos o al menos me han preguntado -¿qué tal Patri?- no los nombro porque seguro me dejaría alguno. Gracias a todos.

Ahora mis amigos de toda la vida. Es imposible agradecerlos todo lo que me habéis dado. Toda vuestra comprensión, vuestra paciencia, vuestro interés por saber como estoy y vuestra ayuda. Ya sabéis que mi amistad es para toda la vida. Como no, tengo que agradecer especialmente a varias personas como los padres de Ali y de Marina que siempre han escuchado mis dudas y siempre han intentado aconsejarme sobre los pasos a seguir. Gracias de todo corazón. Gracias a mi Marina, que pena que ahora estés tan lejos pero ya sabes, aunque la distancia nos separe siempre estaremos juntas. Gracias por ser como eres y por siempre estar ahí. Sin duda eres mi mejor amiga. *Thanks Vicky for all your advices and for taking care of Marina.* Gracias a las chicas de la uni, Nuri, Marta, Noe y Meri. Tengo tantos recuerdos, tanta vida con vosotras y, lo mejor de todo, es que sé que aún quedan más cosas por compartir con vosotras. Gracias a todas y especialmente gracias a ti Meri por dejar que te recupere. Gracias a mi familia política, gracias por preguntarme siempre cómo va todo y por acogerme en vuestro hogar. Gracias a toda la panda Ana, Luis, Joan, Eli,

los padres de Meri y Joan, Vero, Alberto, Iván, Vero, Angi, JR, etc... gracias a todos por dedicarme vuestro tiempo y por siempre preocuparos de cómo estoy.

De igual forma que mantienes amigos durante toda la vida aparecen de nuevos y ahí estás tu Montse ja saps que una de les coses que més agraeixo d'haver fet la tesis és haver-te conegut. ¡Com pot cabre tanta bondat en una persona! Ojalà haguéssim compartit més temps juntes però crec que ha estat suficient com per saber que sempre estarem allà la una amb l'altra per qualsevol cosa. Mil gràcies per haver tingut tanta paciència amb mí i per ajudar-me tant espero haver estat i estar a l'alçada. Mil gràcies Montse. Gràcies també al Jordi, a la Núria i als teus pares, de veritat sou i heu estat un regal que sempre agrairé.

Alí, madre mía, no sé por dónde empezar, es imposible agradecerte todo lo que me has dado durante tantos años, ni siquiera escribiendo la palabra GRACIAS un millón de veces, sería suficiente. Quiero que quede claro que tú has sido, eres y serás uno de los pilares de mi vida y que sin ti podría caer en cualquier momento, pero sé que nunca vas a permitir eso. Siempre encuentras salida, siempre me haces ver las cosas desde otro punto de vista, me has cuidado y me cuidas. Sólo quiero que sepas que me tendrás toda la vida, que te echaré mucho de menos pero, que esté donde esté, responderé. Gracias mí Alí.

Raúl, hace unos diez años que te conozco y la vida nos ha llevado por caminos diferentes hasta que ha decidido que se cruzaran. Me considero tan afortunada de que hayas decidido compartir tu vida conmigo. No sé porque he tenido tanta suerte pero cada mañana que me levanto agradezco que estés a mi lado. Gracias por hacerme reír siempre con tus chistes malos, por quitarle siempre hierro al asunto y por cuidarme. Gracias por permitirme realizar mis sueños sólo espero compartírllos contigo y que tú compartas los tuyos conmigo. Te estás convirtiendo en otro de mis pilares y espero agradecértelo día a día y durante toda la vida.

Mi familia, Papá, Mamá, Bea tampoco hay suficientes palabras para agradeceros todo lo que habéis hecho por mí aún sin comprender porque he elegido este camino. Siempre respetáis, aunque no compartáis lo que decido, ése es el mejor regalo que podríais haberme hecho. Gracias, de todo corazón, gracias por tener tanta paciencia, por saberme perdonar cuando me he equivocado y por felicitarme cuando lo he hecho bien. Gracias por haber

trabajado tanto y haberme permitido llegar hasta aquí. Gracias por estar siempre ahí, en los malos y en los buenos momentos. ¡Os quiero con toda mi alma!

¡GRACIAS A TODOS!

*“Y que mi luz te acompañe
Pues la vida es un jardín
Donde lo bueno y lo malo
Se confunden y es humano
A veces no saber elegir”*

MdO

