

**p120-catenina: un
element essencial de la ruta
de senyalització de Wnt**

David Casagolda Vallribera



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Biofísica, Facultat de Medicina

p120-catenina: un element essencial de la ruta de senyalització de Wnt

David Casagolda Vallribera

Memòria presentada per optar al grau de Doctor en Bioquímica i Biologia
Molecular per la Universitat Autònoma de Barcelona
Setembre 2009

Directora de la Tesi Doctoral:

Dra. Mireia Duñach Majsuan

ÍNDIX

I. Introducció.....	1
1. Les unions adherents.....	3
1.1. <i>Estructura i funció de les unions adherents.....</i>	<i>4</i>
1.2. <i>Regulació de les unions adherents.....</i>	<i>10</i>
1.3. <i>p120-catenina.....</i>	<i>13</i>
2. Ruta de senyalització de Wnt.....	21
2.1. <i>El factor Wnt.....</i>	<i>22</i>
2.2. <i>Via canònica de Wnt.....</i>	<i>24</i>
2.3. <i>Via no-canònica de Wnt.....</i>	<i>37</i>
2.4. <i>Senyalització de Wnt a l'intestí.....</i>	<i>39</i>
II. Objectius.....	43
III. Resultats.....	45
1. CK1ϵ, una nova quinasa regulant la funció de p120catenina.....	45
1.1. <i>La fosforilació de p120ctn per CK1 modula de manera inversa la seva interacció amb E-cadherina i amb el repressor transcripcional Kaiso.....</i>	<i>45</i>
1.2. <i>Els residus Ser268 i Ser269 de p120ctn estan involucrats en la regulació de la interacció amb E-cadherina.....</i>	<i>49</i>
1.3. <i>CK1ϵ s'uneix a p120ctn i la fosforila in vivo</i>	<i>58</i>
1.4. <i>Wnt activa CK1ϵ.....</i>	<i>64</i>
1.5. <i>Wnt controla a través del complex p120ctn/CK1ϵ la localització nuclear de Kaiso.....</i>	<i>67</i>
1.6. <i>Wnt3a i CK1ϵ modulen la interacció de Kaiso amb Tcf4.....</i>	<i>75</i>
2. p120ctn, un nou component essencial en la ruta de senyalització de Wnt.....	80
2.1. <i>Wnt disminueix la interacció del complex p120ctn/CK1ϵ amb el coreceptor LRP6.....</i>	<i>80</i>
2.2. <i>El complex de les unions adherents participa en els estadis inicials de la ruta canònica de Wnt</i>	<i>87</i>
IV. Discussió.....	95
V. Conclusions.....	115

VI. Materials i Mètodes.....	117
1. Organismes i condicions de cultiu.....	117
1.1. <i>Cultius bacterians.....</i>	117
1.2. <i>Línies cel·lulars eucariotes.....</i>	120
2. Mètodes d'obtenció, manipulació i anàlisis del DNA.....	124
2.1. <i>Tècniques d'obtenció de DNA plasmídic.....</i>	124
2.2. <i>Tècniques de modificació del DNA.....</i>	125
2.3. <i>Tècniques d'anàlisis del DNA.....</i>	129
3. Mètodes d'expressió i purificació de proteïnes.....	130
3.1. <i>Proteïna recombinant en procarïotes.....</i>	130
3.2. <i>Expressió i obtenció de proteïnes en línies cel·lulars.....</i>	132
4. Tècniques per a l'estudi de proteïnes.....	136
4.1. <i>Tècniques electroforètiques.....</i>	136
4.2. <i>Assaig d'interacció proteïna-proteïna.....</i>	139
4.3. <i>Assaigs d'interacció proteïna-DNA.....</i>	140
4.4. <i>Assaig de fosforilació.....</i>	142
4.5. <i>Tècniques de microscòpia òptica.....</i>	143
4.6. <i>Assaigs reporters.....</i>	146
5. Vectors i construccions emprades.....	147
5.1. <i>Descripció dels vectors utilitzats.....</i>	147
5.2. <i>Construccions Utilitzades.....</i>	150
VII. Bibliografia.....	153

I. INTRODUCCIÓ

En els organismes pluricel·lulars, la unió entre cèl·lules s'involucra en la majora de processos de desenvolupament. Aquestes unions són necessàries, per exemple, per la formació de les capes coherents de cèl·lules epitelials i endotelials que formen les barreres en les superfícies internes i externes dels organismes, tals com la pell, l'intestí i els vasos sanguinis.

En els teixits adults aquestes unions no són pas estructures estàtiques que mantenen les barreres simplement conservant la unió entre cèl·lules unides, sinó que són contínuament remodelades per permetre l'extrusió de cèl·lules velles i la incorporació de cèl·lules joves noves provinents de cèl·lules mare, sense provocar una pèrdua de la funció de barrera [1]. Durant la recuperació de ferides i reparació de teixits, les cèl·lules, a través de moviments coordinats, proliferen i estableixen nous contactes un cop es troben ambles cèl·lules de l'altre costat de la ferida [2].

Aquestes diferents demandes en diferents tipus cel·lulars i situacions fisiològiques diverses requereixen una sofisticada xarxa reguladora que permeti un desmembrament parcial i restabliment dels contactes entre cèl·lules, a la vegada que previnguin la pèrdua del fenotip epitelial. Alteracions d'aquesta xarxa desemboquen freqüentment en progressió tumoral i metàstasi [3].

Les unions cel·lulars de les cèl·lules epitelials contenen tres estructures adhesives fonamentals. Aquestes poden ser identificades a nivell ultraestructural: les unions adherents, les unions estretes i els desmosomes. En les cèl·lules epitelials polaritzades de certs teixits com l'intestí, les unions estretes i les adherents estan distribuïdes asimètricament a la regió apical-lateral dels contactes cel·lulars formant el complex d'unió apical, que encercla l'àpex de les cèl·lules i demarca el límit entre els dominis apicals i basolaterals de la cèl·lula [4].

Troben com a element comú en les tres estructures, la presència de molècules d'adhesió que uneixen les cèl·lules veïnes a través d'interaccions homofíliques i heterofíliques; i també la presència de proteïnes esquelet citoplasmàtiques que organitzen complexos d'adhesió i proveeixen una unió mecànica al citoesquelet

d'Actina (o filaments intermedis en el cas dels desmosomes). Cal notar que aquests complexos proteics són dinàmics, i que la seva composició està regulada depenent de la maduració i integritat de les unions.

La funció principal de les unions adherents és connectar cèl·lules per regular la formació de teixits i la morfogènesis durant el desenvolupament, així com també el manteniment dels teixits durs en l'organisme adult [5]. Les principals molècules d'adhesió de les unions adherents són les cadherines clàssiques, que connecten cèl·lules adjacents a través d'interaccions homofíliques. Aquestes s'uneixen al citoesquelet a través d'unes proteïnes associades a la seva cua citoplasmàtica, les catenines. Aquesta unió genera una xarxa transcel·lular de filaments d'Actina que recorren tota la capa de cèl·lules utilitzant les unions adherents com a connectors del feix de filaments d'Actina a l'espai intercel·lular.

Els desmosomes són unions adherents intercel·lulars que uneixen les cèl·lules amb les seves veïnes. Aquests són molt importants en teixits que sofreixen un estrès mecànic elevat, com l'epiteli estratificat escamos de la pell, les membranes mucoses i el miocardi. A més, aquestes unions les podem trobar en molts altres teixits, epitelials i no. Aquestes contenen proteïnes d'almenys tres famílies diferents; les cadherines desmosomals formen la superfície d'adhesió intercel·lular, mentre que les famílies armadillo i de les plaquines ancoren les estructures als filaments intermedis del citoesquelet [Revisat a [6]].

En cèl·lules epitelials polaritzades, les unions estretes formen una estructura tipus cinturó a la regió apical de la cèl·lula, representant la frontera entra els dominis apicals i basolaterals de la membrana, els quals difereixen entre de composició tant lipídica com proteica [7]. La base molecular de les unions estretes són les claudines, una família de proteïnes integrals de membrana. Aquestes constitueixen els filaments de les unions estretes, formen una barrera selectiva permeable a través de porus selectius per carga i mida [8, 9].

En molts casos trobem que aquests complexos d'adhesió formen part de complexos per a la recepció de senyals de diferents rutes de senyalització, o influencien l'acció d'aquestes. En el cas concret de les unions adherents, la β -catenina, una proteïna és una proteïna estructural d'aquests complexos, i a la vegada

un element central de la ruta de senyalització de Wnt.

1. Les unions adherents

Per a un desenvolupament correcte en els organismes complexos és essencial disposar d'una adhesió cèl·lula-cèl·lula coordinada per tal de mantenir la integritat dels diferents teixits. Durant la formació d'aquestes estructures és important que les cèl·lules en diferenciació puguin distingir entre cèl·lules amb la mateixa identitat i cèl·lules diferents.

Les unions cel·lulars no són estructures estàtiques, fins i tot en un teixit epitelial polaritzat, aquestes són molt dinàmiques. Els contactes adherents entre cèl·lules veïnes estan constantment modificant-se per tal d'adaptar-se als canvis soferts en l'ambient. Aquesta plasticitat es relaciona amb senyals rebuts per la cèl·lula donant-li instruccions per mantenir la posició, dividir-se o bé migrar.

En experiments pioners enfocats en el tema de l'adhesió selectiva en diferents tipus cel·lulars és va descobrir una superfamília de proteïnes les quals presentaven unes característiques d'adhesió dependents de calci: les cadherines [10]. Es va identificar posteriorment el membre principal d'aquesta família de proteïnes, l'E-cadherina (també coneguda com a *Uvomorulina* i *Cdh1*) [11].

La cua citoplasmàtica de les cadherines clàssiques, com l'E-cadherina, interacciona amb la β -catenina i la p120-catenina (p120ctn). Aquestes són proteïnes membres de la família armadillo, que contenen un domini amb repeticions armadillo. En aquest complex, β -catenina i p120ctn s'associen directament amb les regions distal (*CBD*, *Catenin Binding Domain*) i proximal (*JMD*, *JuxtaMembrane Domain*) a la membrana de la cua citoplasmàtica de E-cadherina, respectivament. Les dues regions estan altament conservades entre les cadherines clàssiques, recalçant la importància d'aquestes interaccions.

En condicions on la presència de β -catenina és limitant, el seu lloc d'unió a E-cadherina pot ser ocupat per γ -catenina/placoglobina, una proteïna que d'altra manera trobaríem associada preferentment a cadherines desmosomals [12]. β -catenina, o placoglobina, interaccionen amb α -catenina, que a la vegada és requerida

per la unió amb els filaments d'Actina ancorant aquestes estructures al citoesquelet.

Les estructures adhesives basades en cadherines són llocs ideals per la senyalització basada en la modificació de tirosines. Les proteïnes que en formen part contenen llocs de fosforilació en tirosines; així com també s'hi troba una gran varietat de receptors-tirosina-quinases (*Receptor Tyrosine Kinases*, RTK) i fosfatases-proteïna-tirosines (*Protein Tyrosine Phosphatases*, PTP) [13-15]. La fosforilació en components específics de les unions proveeixen un mecanisme eficient per orquestrar el recanvi de les unions adherents.

1.1. Estructura i funció de les unions adherents

1.1.1. E-cadherina

Les cadherines són molècules d'adhesió presents en varis tipus de contactes cel·lulars, incloent unions adherents i desmosomes. En presència de calci, les cèl·lules que expressen el mateix tipus de cadherines formen contactes estables entre elles, un fenomen designat com adhesió homofílica o homotípica.

Les cadherines es poden classificar a partir de la seva relació filogenètica en 6 subfamílies: cadherines tipus I i II o "cadherines clàssiques", cadherines desmosomals, cadherines de set segments transmembrana, les cadherines llargues dels grups Fat i Dachous, i les més recentment identificades, les protocadherines. Tot i la gran quantitat de membres que trobem en aquesta família, només les cadherines clàssiques formen part de les unions adherents, i aquestes són les més àmpliament estudiades.

Les cadherines són proteïnes de membrana amb una regió N-terminal extracel·lular o ectodomini; seguidament conté una àncora transmembrana i una regió C-terminal intracel·lular. La superfamília de les cadherines es defineix per la presència d'un domini característic d'aproximadament 110 aminoàcids anomenat ectodomini (EC), i per la sensibilitat de les interaccions entre cadherines al calci. La divisió de la superfamília de cadherines en subfamílies es regeix per la homologia d'aquests dominis extracel·lulars i pel seu nombre [16].

Les cadherines clàssiques i desmosòmiques, d'on la E-cadherina i la N-cadherina en formen part, tenen cinc dominis extracel·lulars seguits d'una única ancora transmembrana i un domini C-terminal intracel·lular. Les cadherines clàssiques es subdivideixen en Tipus I i Tipus II en base a homologia de seqüència. El terme “clàssiques” es refereix a la seva habilitat per interaccionar amb β -catenina.

Varis grups han determinat estructures tridimensionals de les cadherines clàssiques tipus I, fins a obtenir l'ectodomini complet [17] [Figura 1a]. Aquesta topologia és idèntica a la dels dominis immunoglobulina, però les interaccions d'empaquetament que estableixen el plegament són diferents entre les dues superfamílies [18]. L'estructura dels cinc dominis EC en les cadherines tipus I i II és molt semblant [17].

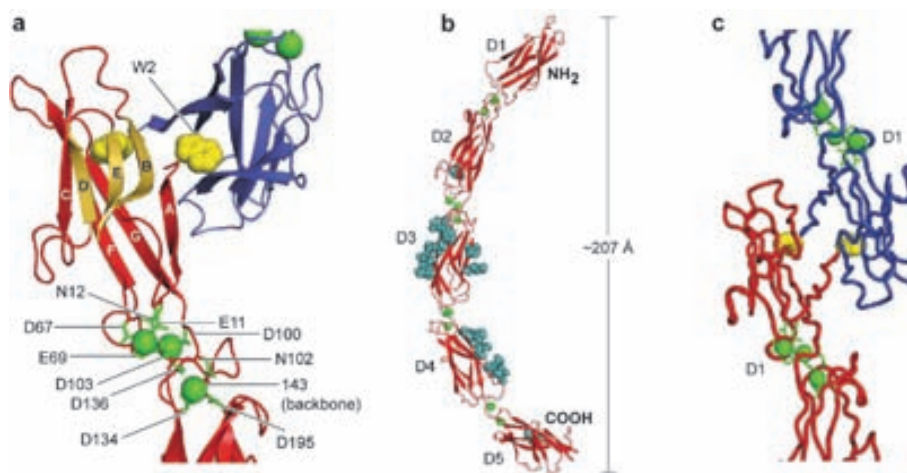


Figura 1: Estructura del domini extracel·lular de la E-cadherina. a. Les dimensions totals del domini EC són 45x25x25 Å. L'estructura del EC es compon per set cadenes β situades com dues fulles β oposades amb N i C terminals als extrems oposats. b. Els estudis cristal·logràfics han revelat la unió de tres molècules de calci entre dominis successius. c. Dos dominis EC1 s'associen intercanviant l'extrem N-terminal de les seves fulles β (W2), aquest residu s'introdueix en una butxaca hidrofòbica del domini oposat i els residus que els flanquegen formen interaccions específiques. Adaptat de (Pokutta and Weis 2007).

La característica que defineix aquesta família de molècules d'adhesió és la seva capacitat per unir calci i la necessitat d'aquesta unió per tal de formar unions estables. La unió a calci dona rigidesa al domini EC de les cadherines [19, 20]. [Figura 1b]. La base molecular de l'especificitat entre cadherines la trobem en el seu domini

EC1; dos dominis EC1 s'associen intercanviant l'extrem N-terminal de les seves fulles β (Trp2) [Figura 1a, c] També s'han observat O- i N-glicosilacions en les cadherines en els dominis del 2 al 5 [17] [Figura 1b].

La funció de les cadherines en la cèl·lula i en els teixits és la d'iniciar els contactes homofílics amb les cadherines de cèl·lules veïnes per tal de formar les unions adherents, i com a proteïna central d'aquestes unions mantenir l'estructura dels complexos. Aquesta funció a les unions adherents requereix l'ensamblatge d'un complex multiproteic que participa a la vegada en senyalització i adhesió.

Les cadherines realitzen un paper fonamental de reconeixement durant l'embriogènesi, durant la qual patrons específics d'expressió marquen els tipus de línies cel·lulars i teixits [13, 21]. La desregulació o pèrdua de cadherines en tumors correlaciona sovint amb fenotips més invasius [16, 22, 23].

1.1.2. β -catenina

La β -catenina és una proteïna molt conservada evolutivament, de 781 aminoàcids. La seva estructura està formada per un domini central anomenat armadillo (d'aproximadament 520 residus) i extrems N- i C-terminals, d'uns 150 i 100 aminoàcids respectivament. El domini armadillo ha estat cristal·litzat [24], i consta de dotze repeticions armadillo de 42 aminoàcids cadascuna. Per aquesta regió, β -catenina interacciona amb la majoria de factors. Així, el domini armadillo uneix els 70 últims aminoàcids del domini citoplasmàtic d'E-cadherina. L'extrem N-terminal de β -catenina (aminoàcids: 118-149) interacciona amb α -catenina [25].

Cadascun dels dominis armadillo conté tres hèlix- α , anomenades H1-3 (al domini 7 li manca la H1). Les hèlix H2 i H3 són antiparal·leles i s'empaqueten amb les repeticions flanquejants formant una estructura helicoidal allargada [26]. Aquesta superhèlix dona lloc a un solc, que es compon per les cadenes laterals de l'H3 i les parets que l'envolten contenen contribucions d'H1 i H2. Aquest solc proporciona un lloc d'unió per E-cadherina i altres lligands involucrats en la via de senyalització de Wnt [27] [Figura 2]. La unió d'aquests lligands al domini armadillo de β -catenina està controlada pels dominis N- i C- terminals d'aquesta proteïna; aquests extrems poden interaccionar amb el domini armadillo interferint o controlant la afinitat amb que els

diferents factors l'uneixen [28-31].

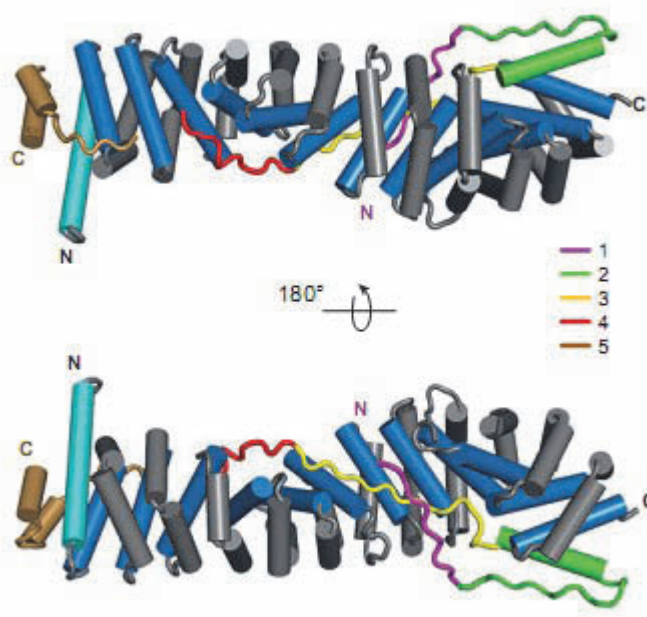


Figura 2: Estructura del domini armadillo de β -catenina complexat amb el domini citoplasmàtic d'E-cadherina. Les hèlix H1 i H2 es representen amb gris, mentre que la H3 es fa en blau. Els residus 134-161, que inclouen part del domini d'unió a α -catenina es representen amb turquesa. L'E-cadherina es divideix en 5 regions segons estructura, representada amb diferents colors. Adaptat de (Pokutta and Weis 2007).

En les unions adherents, β -catenina fa de pont entre E-cadherina i α -catenina, encara que en alguns casos pot ser substituïda per placoglobina [32], formant un nexa d'unió, juntament amb α -catenina, entre les cadherines i el citoesquelet d'Actina. Una altra funció descrita per a β -catenina, la qual es discutirà més àmpliament en apartats posteriors, és actuar com a coactivador transcripcional en la ruta de senyalització de Wnt [33, 34].

1.1.3. α -catenina

La α -catenina és una proteïna de 906 aminoàcids que conté tres regions d'elevada homologia a Vinculina, una proteïna d'unió a Actina. S'han descrit una gran quantitat de proteïnes que interaccionen amb α -catenina. Les més destacables són β -catenina i F-actina, amb les quals interacciona pels dominis N- i C-terminal respectivament [35] [Figura 3].

L'α-catenina es presenta com a homodímer en solució i es dissocia en unir-se amb β-catenina per formar un heterodímer amb aquesta [36]. El domini encarregat de la homodimerització el trobem entre els aminoàcids 57-264, i es forma per 5 hèlix-α. Aquest domini es solapa amb el domini d'interacció amb β-catenina, la interacció entre aquestes proteïnes es produeix entre els aminoàcids 57-81 d'α-catenina [37].

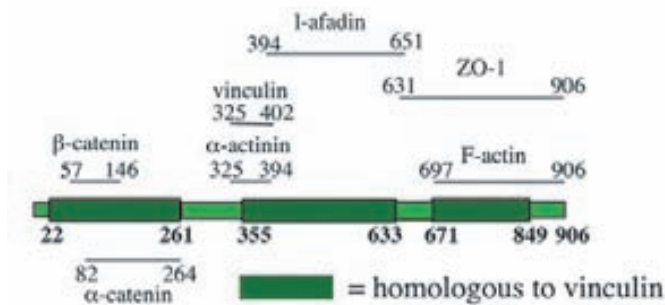


Figura 3: Estructura primària de l'α-catenina. Es representen els tres dominis d'homologia a Vinculina i les regions i proteïnes amb les quals interacciona. Adaptat de (Pokutta and Weis 2007).

La interacció amb els filaments d'Actina es produeix pel seu extrem C-terminal [36]. Aquesta regió comparteix un 34% d'homologia amb la regió d'unió a Actina de Vinculina. No es coneix l'estructura d'aquest domini, però el seu homòleg Vinculina conte 5 hèlix [38].

Degut a les característiques específiques d'unió que posseeix l'α-catenina, unint β-catenina i F-actina, se li ha atribuït durant molts anys la capacitat de formar el nexa d'unió entre aquestes dues proteïnes en les unions adherents. Recentment però, quant s'ha intentat de reconstruir el complex cadherina-catenina-actina *in vitro*, no es va poder trobar E-cadherina o β-catenina coprecipitada amb Actina i α-catenina. A més a més, a mesura que s'incrementaven les quantitats d'E-cadherina i β-catenina per forçar la formació del complex, menys quantitat d'α-catenina coprecipitava amb Actina, suggerint que la unió d'α-catenina a β-catenina o Actina són mútuament excloents [39]. En aquest mateix treball es va confirmar, utilitzant una quimera αβ-catenina, que la prèvia unió d'aquestes dues proteïnes prevenia la unió a Actina. Això demostrava que α-catenina no era el nexa d'unió entre el complex de les unions adherents i l'Actina.

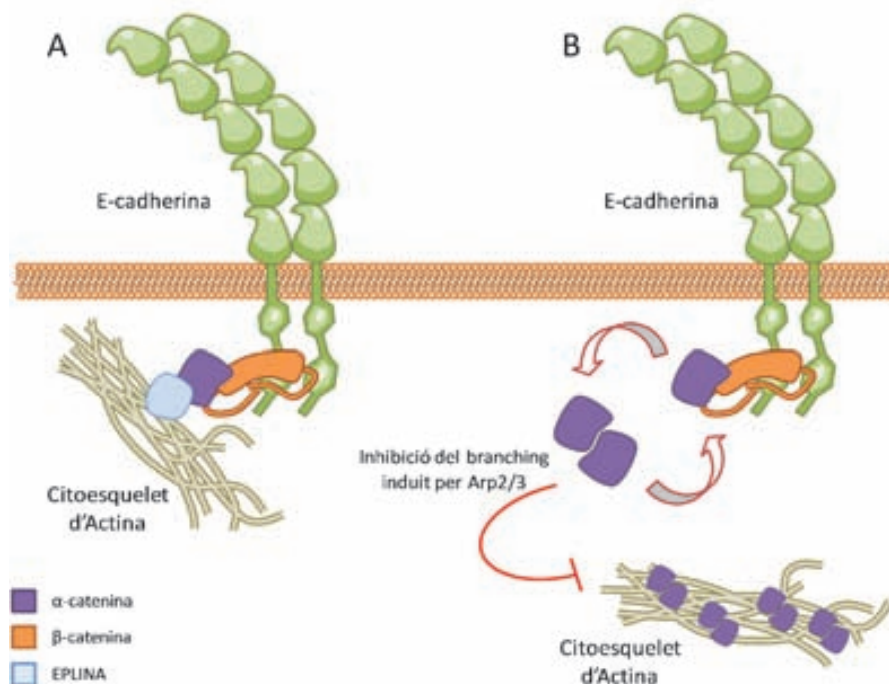


Figura 4: Models de les unions adherents. **A. Model clàssic.** La cua citoplasmàtica de les cadherines clàssiques uneix β -catenina. β -catenina uneix α -catenina, que a la vegada uneix F-actina a través d'EPLINA. **B. Model dinàmic.** L'intercanvi entre la α -catenina unida a les unions adherents i lliure al citosol resulta en una concentració local elevada d' α -catenina, la qual afavoreix la dimerització. El dímer d' α -catenina concentrat prop la membrana pot inhibir Arp2/3 i aturar el branching i moviment de lamelipodis, generant una polimerització de l'Actina en feixos i la formació d'uns contactes cel·lulars estables.

Actualment s'atribueixen a α -catenina dues possibles funcions. La primera, més clàssica en consonància amb el model anterior, proposa que α -catenina recluta EPLINA, un factor que faria de pont entre les unions adherents i el citoesquelet d'Actina [40] [Figura 4A].

El segon grup d'investigadors, sense descartar aquesta primera hipòtesi, creu que una part d' α -catenina és mòbil i pot passar de l'heterodímer que forma amb β -catenina a les unions adherents a homodímer al citosol on uneix Actina [41]. Quan aquesta es troba al citosol en forma d'homodímer, en concentració suficientment elevada (que passa en les proximitats de les unions adherents), competeix amb el complex Arp2/3 (*Actin-related protein 2/3*). Aquesta competició atura la polimerització ramificada de l'Actina produïda per aquest complex a les zones

propres a les unions adherents [42], inhibint la formació de lamelipodis i promovent la polimerització de l'Actina en feixos. Aquest tipus de polimerització dona resistència i forma punts d'ancoratge pels contactes cel·lulars [35, 43] [Figura 4B]. En aquest model, trobaríem altres proteïnes participant en la unió entre les unions adherents i el citoesquelet, com la proteïna 4.1R, que ha estat descrita recentment formant un nexa d'unió entre la β -catenina i l'Actina, i participant en la reorganització del citoesquelet [44].

1.2. Regulació de les unions adherents

La regulació de les unions adherents és un procés complex, degut a que no només tenen un paper estructural, sinó que d'elles sorgeixen varies funcions com a integradors de senyals. Aquesta regulació es produeix sobretot sobre E-cadherina, la proteïna nuclear del complexe, i sobre β -catenina, ja que és un element central de la ruta de senyalització de Wnt.

1.2.1. E-cadherina

L'E-cadherina és una proteïna regulada a diferents nivells, un dels més importants és la regulació a nivell transcripcional. Un dels passos limitants en la formació dels complexos d'adhesió és el nivell d'expressió d'E-cadherina [45]. La transcripció d'E-cadherina està constitutivament activa en les cèl·lules epitelials, i aquesta es pot estimular per factors com Wt-1 i la Vitamina D, o inhibir-se per membres de la família Snail [46] i Smad Interacting Proteins [47].

Les cadherines es sintetitzen al reticle endoplasmàtic com a propèptid, el qual inclou un pèptid senyal pel correcte transit fins a la membrana plasmàtica, un prodomini N-terminal i el senyal de proteòlisi. El prodomini es creu necessari per evitar una adhesió i agregació abans d'hora, protegint el domini EC1 durant tot el transit. La interacció entre E-cadherina i β -catenina (o placoglobina) es produeix ja en el reticle endoplasmàtic. Un cop alliberades al citoplasma les dues proteïnes es mouen cap a la superfície de la cèl·lula [48]. Si aquesta unió es disromp, la E-cadherina és ràpidament destruïda via proteosoma [49]. Això és degut a que la cua citoplasmàtica de la E-cadherina conté un domini PEST (Pro-Glu-Ser-Thr), el qual està

reconegut per la maquinària d'ubiquitinització [50].

L'altre punt de degradació important és la degradació via lisosoma que sofreix un cop és internalitzada des de la membrana plasmàtica. L'E-cadherina pot ser internalitzada per múltiples vies, incloent vies dependents i independents de clatrina [Figura 5]. Sembla que la maquinària utilitzada per la internalització de les cadherines depèn del tipus cel·lular o del teixit [revisat a [51]].

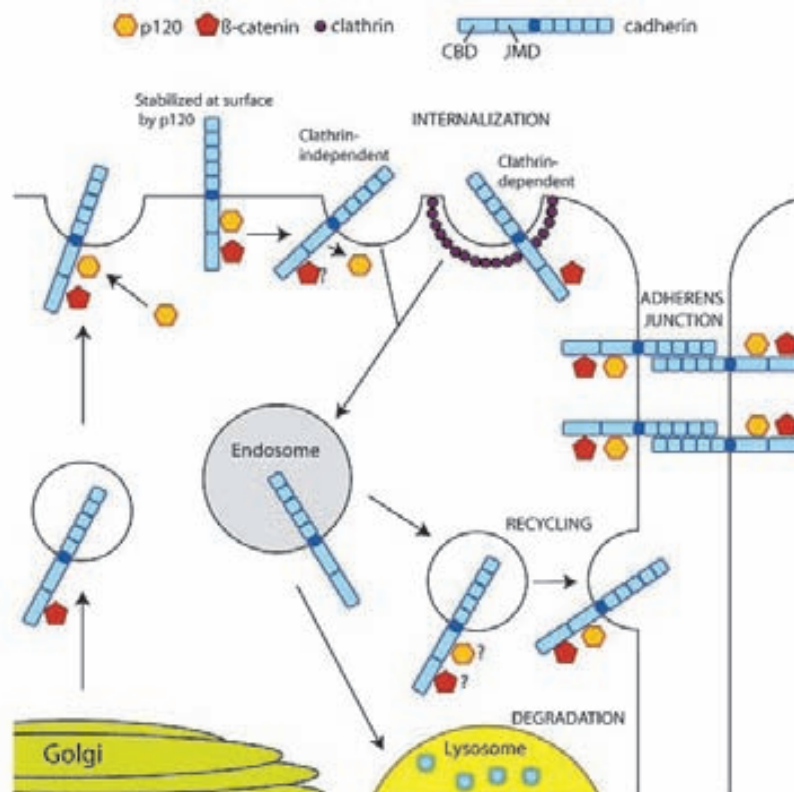


Figura 5: Resum en el transit de cadherines. L'E-cadherina processada en l'aparell de Golgi és transportada a la membrana plasmàtica unida a β-catenina. Un cop a la membrana p120ctn estabilitza la E-cadherina. Quan aquesta estabilització no es produeix, aquesta cadherina es pot internalitzar tant per mecanismes dependents com independents de clatrina. No es coneix encara el mecanisme pel qual la E-cadherina és reciclada a la membrana plasmàtica. Adaptat de (K. Xiao et al. 2006).

L'estabilització de la E-cadherina a la membrana plasmàtica és duta a terme per la p120-catenina [52, 53]. En cèl·lules o tumors deficientes per p120ctn es troba una reducció dels nivells totals E-cadherina [54, 55]. La p120ctn evita la interacció de motius present en la cua citoplasmàtica de E-cadherina amb alguns dels seus

interactors: Clatrines [56], Presenilina 1 (promou la degradació de E-cadherina al tallar la seva cua citoplasmàtica) [57, 58] i Hakai (una E3 ubiquitina lligasa que uneix dominis fosforilats en el domini JMD d'E-cadherina) [59].

També hi ha altres mecanismes d'endocitosi independents de p120ctn. En absència de calci extracel·lular la totalitat del complex és internalitzat a través d'un mecanisme depenent de clatrines i es enviat a un compartiment intracel·lular d'emmagatzemament a punt per ser reciclat si els nivells de calci retornen a la normalitat [60]. Aquest fet dona suport a la teoria que les cadherines són internalitzades i reciclades contínuament per un mecanisme depenent de clatrines [61].

Un punt a tenir en compte en la regulació de l'E-cadherina és la fosforilació; aquesta afecta a diferents nivells. La fosforilació per CK2 (*Casein Kinase*) del domini citoplasmàtic d'E-cadherina augmenta la afinitat per β -catenina [62], contribuint a una major unió i estabilitat de les unions adherents; mentre que la fosforilació d'aquest mateix domini per CK1 provoca una disminució de l'afinitat per aquesta i inicia un cicle d'endocitosis i reciclatge depenent dels nivells de calci extracel·lulars [63].

1.2.2. β -catenina

En cèl·lules epitelials els nivells de β -catenina lliure estan regulats de forma molt precisa. Quan la β -catenina no es troba formant part de les unions adherents, aquesta s'uneix a un complex de degradació format per CK1 α , GSK3 β , APC i Axina. En aquest complex β -catenina és fosforilada en serines, promovent-ne la ubiquitinització i degradació [Ampliat a l'apartat 2.2.1. El complex de degradació de β -catenina]

Està acceptat que la fosforilació de les catenines en residus tirosines és un dels mecanismes principals de regulació de les unions adherents. Aquesta modificació permet una resposta ràpida a l'ambient, permetent una major o menor plasticitat dels contactes cel·lulars, per exemple durant el desenvolupament o per causes tumorals. La fosforilació de β -catenina en tirosines juga un paper important en la regulació de les unions adherents. La fosforilació de la Tyr654 de β -catenina pel receptor d'EGF (*Epithelial Growth Factor*) fa disminuir la seva interacció amb E-cadherina [28, 64],

mentre que la fosforilació en la Tyr142 per Fyn o Fer inhibeix la unió a α -catenina [65-67]. La fosforilació de la β -catenina en aquests dos residus de tirosina provoca la pèrdua d'adhesió de les unions, i l'alliberament de la β -catenina al citoplasma. La desfosforilació d'aquesta provoca un reensamblament dels complexos [68].

1.3. p120-catenina

Degut a la importància emergent que ha pres aquesta catenina, i degut a ser la peça central d'aquest treball, se li ha dedicat un apartat a part.

Va ser al 1989 quant per primer cop es va identificar la p120ctn, com a substrat de la quinasa Src, en un intent per estudiar els mecanismes de transformació promoguts per aquesta quinasa [69]. Tot i ser l'únic substrat la fosforilació del qual correlacionava amb el fenotip provocat per la transformació de Src no es van trobar dominis relacionats amb molècules de senyalització de Tyr-quinases (SH2 i SH3) en la seqüència de p120ctn, sinó una regió amb dominis armadillo que compartien poca homologia (22%) amb β -catenina o Plakoglobina [70].

Va ser aquest fet el que més tard va donar la idea de que p120ctn podria interaccionar amb les unions adherents, publicant-se finalment la seva interacció amb E-cadherina l'any 1994 [71]. Aquesta proteïna no interacciona però amb E-cadherina pel domini d'unió a catenines, sinó per un altre domini conservat, el domini juxtamembrana.

1.3.1. Estructura

La p120catenina és una proteïna de 85 a 115 KDa que s'engloba dintre de la subfamília de proteïnes armadillo-p120. Es troben dos grups en aquesta subfamília depenent de la seva similitud amb p120ctn. El primer grup, que comparteix un 45% d'homologia en els dominis armadillo, conté proteïnes com ARVCF, δ -catenina i p0071; mentre que el segon, que només comparteixen un 30% de similitud, s'hi engloben les proteïnes que trobem als desmosomes: les plakofilines.

La nomenclatura de p120 és complicada degut a les nombroses variants de splicing. Aquestes variants es generen a partir del splicing en un mateix gen [72, 73].

En l'extrem N-terminal hi ha quatre inicis de transcripció diferents que donen lloc a les quatre isoformes principals: p120_I (iniciant en l'aminoàcid 1), p120_{II} (55), p120_{III} (102) i p120_{IV} (340) [72], indicades a l'esquema de la Figura 6. Trobem també un splicing alternatiu al C-terminal amb la possibilitat d'utilitzar els exons A , B, ambdós o cap d'ells; es coneix que l'exó B codifica per una seqüència d'export nuclear (Nuclear Export Signal: NES). Trobem un últim exó C que es pot introduir enmig de la sisena repetició del domini armadillo.

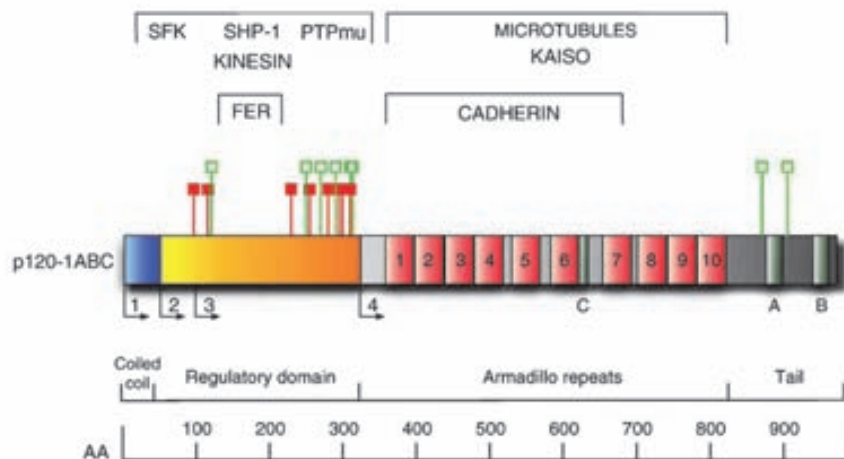


Figura 6: Característiques estructurals de p120ctn. Es mostren els diferents inicis de transcripció (1-4), la posició del 3 exons generats per splicing (ABC) i les zones d'interacció amb cofactors. Amb verd es representen els llocs de fosforilació en Ser/Thr i en vermell en Tyr. Adaptat de (S. Alemà, M. Salvatore 2006).

Totes aquestes variants de splicing generen una gran quantitat d'isoformes que s'expressen diferencialment depenent del tipus de teixit. Aquesta expressió diferencial en teixits denota diferències funcionals entre les diferents isoformes de la p120-catenina; de forma general les formes més curtes (isoforma III) s'associen a l'E-cadherina en teixit epitelial, i les més llargues (isoforma I) les trobem associades a N-cadherina en un fenotip més mesenquimal i mòbil [74, 75].

Tot i que p120ctn no ha estat cristal·litzada, sí que ho ha estat el domini armadillo d'un dels membres de la subfamília de proteïnes armadillo-p120: la Plakofilina 1, que forma part dels desmosomes [76]. Els alineaments de seqüència suggereixen que la subfamília de p120ctn conté 10 repeticions armadillo, però

l'estructura en revela només 9. Una de les repeticions predites al mig del domini forma una inserció que produeix una corba pronunciada en el domini [Figura 7]. Aquesta estructura difereix bastant de la que trobem en β -catenina, tot i així es forma un solc en la hèlix de manera similar.

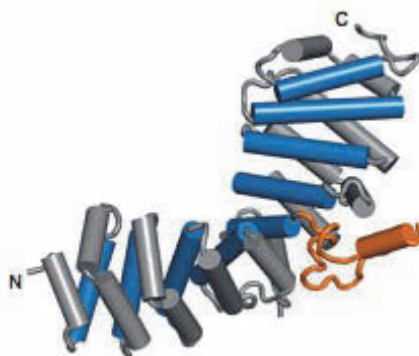


Figura 7: *Estructura del domini armadillo de la Plakofilina. Les hèlix H1 i H2 es representen amb gris, mentre que la H3 es fa en blau. La inserció es representada amb taronja. Adaptat de (Pokutta and Weis 2007).*

1.3.2. Funció

Regulació de les unions adherents

La p120-catenina colocalitza amb les cadherines en la majoria de teixits, i localitza de forma aberrant al citoplasma en cèl·lules metastàsiques que han perdut l'E-cadherina. Les cadherines són de fet necessàries i suficients per reclutar la p120ctn a la membrana [77]. p120catenina però, no interacciona ni amb α - ni amb β -catenina [78], ni amb altres components de les unions adherents.

Una de les funcions atribuïdes a p120ctn és permetre l'establiment d'unes unions adherents fortes i, a més està implicada en l'agrupament i oligomerització lateral de les cadherines [79], així com també en el transport i recanvi de cadherines a la membrana associant-se amb Kinesina i augmentant la velocitat en que aquestes es dirigeixen a la membrana [52, 53, 80]. p120ctn també forma el nexe d'unió entre els complexos de les unions adherents i els microtúbuls [81], els quals participen en la organització dels complexos d'adhesió [82].

Tal com ja he esmentat en l'apartat 1.1.1 de l'E-cadherina, el paper principal de p120ctn a les unions adherents és doncs regular l'estabilitat d'E-cadherina. En absència de p120ctn, la majoria de les cadherines són internalitzades i degradades, suggerint que p120ctn controla el recanvi de cadherines a la membrana. El mecanisme és post-translacional i requereix una interacció directa entre p120ctn i les cadherines. L'eliminació selectiva de p120ctn és suficient per desfer el complex d'adhesió [54].

Tot i que s'ha posat en entredit aquesta funció degut a que en estudis fets en invertebrats els efectes ocasionats per la pèrdua de p120ctn han estat lleus [83, 84], estudis posteriors han demostrat que en mamífers p120ctn és necessària per mantenir uns nivells elevats d'E-cadherina a la membrana i unes unions adherents correctes [52, 53]. Aquesta és una funció que manté una àmplia controvèrsia, ja que també s'ha vist que modificacions en p120ctn provoquen un desmembrament de les unions adherents, tal com la fosforilació en tirosines induïda per vSrc [85, 86]. Així doncs es creu que p120ctn té un paper com a modulador de les unions adherents, regulant la seva formació així com la destrucció [revisat a [87]].

Control de l'activitat de les GTPases de la família de Rho

Els primers estudis que presenten una relació funcional entre p120ctn i la família de les GTPases monomèriques RhoA, Rac1 i Cdc42 apareixen l'any 2000 [88]. Aquests estudis proposen un paper de p120ctn regulant l'activitat entre les cadherines i el citoesquelet a través de les GTPases. Aquests mecanismes de p120ctn són els que ara han guanyat importància, degut a que es coneix clarament que les GTPases de la família de Rho controlen la funció de les cadherines i viceversa [89].

La p120-catenina és capaç d'interaccionar amb RhoA *in vivo* [90], i la pot mantenir en un estat inactiu unida a GDP *in vitro*. La p120ctn no unida a l'E-cadherina pot estar actuant com a GDI (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*) de Rho [91], segrestant RhoA en un estat inactiu. Altres estudis han demostrat que p120ctn és important per a l'activació de Rac1 [92].

Les GTPases de la família de Rho (RhoA, Rac1 i Cdc42) juguen un paper important en la organització del citoesquelet i en la dinàmica durant processos de

migració i dispersió [93, 94]. La p120 citoplasmàtica pot inhibir RhoA [90, 91], i activa Rac1 i Cdc42 possiblement a través de la unió amb Vav2 [88], un factor d'intercanvi de la família de Rho. És interessant el fet que la p120ctn unida a E-cadherina té un altre comportament i no pot inhibir RhoA [91], permetent un reclutament de RhoA actiu a les unions adherents. Degut al fet que aquestes GTPases monomèriques s'han involucrat en el transit cap a la membrana [95, 96] a través de la regulació del citoesquelet d'Actina, hi ha la possibilitat que p120ctn no controli la dinàmica de l'E-cadherina a la membrana només per interacció directa sinó també a través de la modulació de l'activitat de les GTPases [Figura 8].

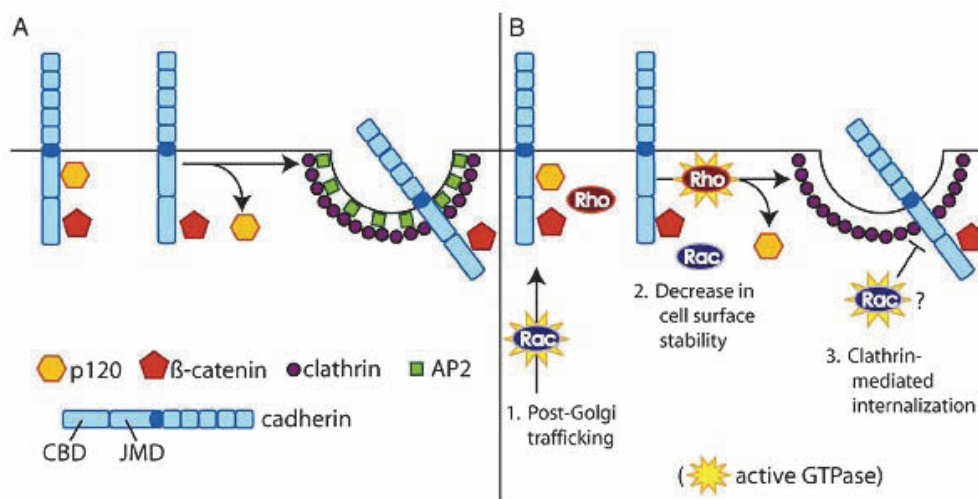


Figura 8: Models de la regulació de l'endocitosis de E-cadherina per p120ctn. **A.** Model d'endocitosis d'E-cadherina dependent de p120ctn. **B.** Model d'endocitosis d'E-cadherina dependent de la regulació de les GTPases de la família de Rho per part de p120ctn. Adaptat de (K. Xiao et al. 2006).

Control de l'expressió de gens a través de Kaiso

El descobriment del factor de transcripció Kaiso com a interactor de p120ctn va plantejar la primera evidència que p120ctn podia tenir un paper al nucli [97]. Aquesta possibilitat va sorgir per analogia amb β -catenina i, més tard, va obtenir suport al veure una mobilització d'aquesta cap al nucli en fer estudis amb cèl·lules deficientes per E-cadherina [98]. Aquesta localització nuclear de p120ctn és necessària per promoure la deslocalització del repressor transcripcional Kaiso del nucli [99].

1.3.3. Regulació

Regulació per fosforilació

Al principi p120ctn va ser identificada com a substrat de Src [69], i posteriorment s'han trobat altres fosforilacions en tirosines com a resposta a factors de creixement: EGF [100], HGF [101] i VEGF [102]. S'han descrit 8 llocs de fosforilació en p120ctn per vSrc [103]; tots es localitzen en l'extrem N-terminal de p120ctn i 6 es localitzen en una regió de 100 aminoàcids just abans del domini armadillo (aminoàcids 250-350). Aquesta regió N-terminal també conté la majoria de llocs de fosforilació en serina/treonina de p120ctn, fet que li ha atribuït el nom de *regió reguladora*.

Una de les famílies de quinases que regulen les unions adherents és la família de Src (*Src Family Kinases*, SFK). Aquestes colocalitzen amb les cadherines a nivell dels contactes cel·lulars, i algunes d'elles com Fyn i Fer es troben associades a la mateixa p120ctn [65, 104]. S'ha vist que la fosforilació en tirosines de les proteïnes de les unions adherents participa tant en efectes positius com negatius.

p120ctn fa un paper de bastida per aquestes quinases i en regular l'activitat a les unions adherents. Aquesta és capaç de reclutar Yes activada, una altra de les SFK, que a la vegada activaria Fyn i Fer [65, 105]. Cal destacar que al expressar al·lels no-miristoilats de Src, p120ctn es manté desfosforilada [106], de la mateixa manera que quan no la trobem localitzada a les unions adherents [77, 107]. Sembla que la fosforilació de p120ctn és dependent de quinases associades a la membrana plasmàtica [108].

Les conseqüències d'aquestes modificacions no són clares. La fosforilació en tirosines de p120ctn tant *in vitro* com *in vivo* incrementa l'afinitat per les cadherines [64, 65, 109, 110]. No s'ha pogut trobar però canvis significatius en l'associació de p120ctn/E-cadherina al tenir p120ctn altament fosforilada, en casos com la transformació per v-Src o l'estimulació per RTK's [71, 85]. A més a més, aquesta fosforilació en p120ctn i en altres membres dels complexos d'adhesió té, en molts casos, conseqüències negatives per a la estabilitat de les unions adherents, provocant una dissociació d'aquestes [revisat a [87]].

Això reflecteix un procés de regulació complex en l'associació de p120ctn amb les cadherines, on és possible que la modificació diferencial de residus puntuals produeixi canvis en l'afinitat per E-cadherina; tal com succeeix amb la unió a RhoA, on la modificació de diferents residus del domini regulador de p120ctn per Src o Fyn provoca efectes oposats [111]. Aquest efecte que provoquen les fosforilacions es creu que pot estar influenciat per altres esdeveniments i modificacions de la resta de proteïnes dels complexos de les unions adherents.

Transport nuclear de p120ctn

Durant molt de temps no es va apreciar una localització nuclear de la p120-catenina. El tractament de vèries línies cel·lulars amb *Leptomycin B (LMB)*, un inhibidor específic del receptor d'export nuclear CMR-1 (*Chromosomal Region Maintenance*), va permetre observar l'acumulació de p120ctn al nucli [98]. Aquesta informació va reforçar la idea que p120 tenia un paper nuclear, podia entrar al nucli i era exportada per un mecanisme sensible a LMB.

Es van fer estudis de mapeig per veure si p120ctn presentava una seqüència de localització nuclear (Nuclear Localization Sequence: NLS) [99]. Es va trobar una NLS bàsica entre els dominis armadillo 6-7, KKGKGKKP (K=lisina, G=glicina i P=prolina). Posteriorment, en un estudi independent es va veure que aquesta i altres NLS putatives no tenien un efecte significatiu en el transport nuclear de p120ctn, i que aquest efecte residia en el domini armadillo en si [112]. Cal destacar la presència d'una NES en l'exó B de p120ctn, encara que només el contenen les formes d'splicing que l'incorporen.

1.3.4. Kaiso, un factor de transcripció associat a p120ctn

Kaiso és un membre de la família de proteïnes BTB/POZ (*Broad complex, Tramtrak, Bric à Brac/Pox virus and Zinc finger*). Kaiso migra aproximadament a 95 kDa i conté els dos dominis bàsics de la família. El domini BTB/POZ, d'uns 120 aminoàcids es localitza a l'extrem N-terminal; Kaiso conté els 6 residus invariables d'aquest domini, així com 31 més dels altament conservats en els diferents membres. El segon domini de Kaiso el formen tres dits de zinc C₂H₂ en l'extrem C-terminal, que

coincideixen amb el motiu F/Y-X-C-X2-C-X12-H-X3-4-H-X5, el qual és considerat característic de factors de transcripció.

La funció del domini BTB/POZ resideix en les interaccions proteïna-proteïna, mentre que els dits de zinc permeten la unió al DNA. De la mateixa manera que altres proteïnes de la família, Kaiso homodimeritza a través el seu domini POZ [113]. S'ha detectat també una NLS que regeix la seva localització nuclear [114]. És interessant remarcar que tots els membres d'aquesta família identificats fins ara tenen algun paper en desenvolupament o en càncer [115].

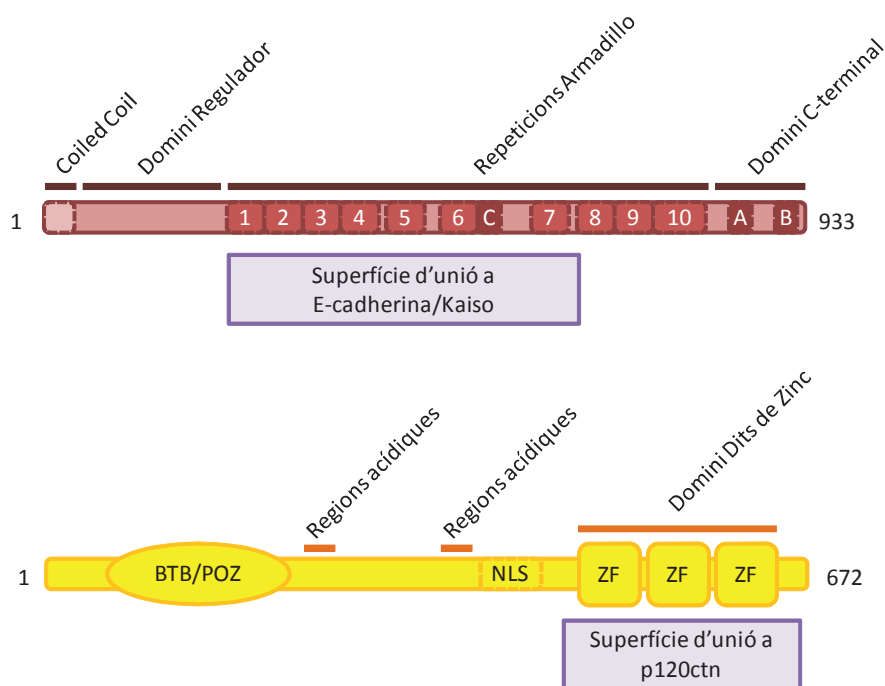


Figura 9: Diagrama dels diferents dominis de p120ctn i Kaiso. En el gràfic es mostren les diferents regions de p120ctn i Kaiso, juntament amb les superfícies d'unió de les dues proteïnes. p120ctn uneix Kaiso i E-cadherina per la mateixa regió.

Kaiso es va descobrir com a interactor de p120ctn en un assaig de doble híbrid [97] i no s'ha descrit unió amb cap altre membre dels complexos de les unions adherents. Recentment s'ha associat a δ -catenina, un membre de la subfamília de p120ctn en cèl·lules neuronals [116]. La unió de Kaiso es realitza per una zona discontinua flanquejant els dits de zinc, sobre els armadillos 1-7 de p120ctn [Figura 9]. Aquesta unió de p120ctn a Kaiso produeix un impediment estèric que no permet la

unió de Kaiso al DNA [117].

Pel que fa a la unió al DNA, Kaiso reconeix dinuceòtids CpG metilats en cisteïna ($^{Me}\text{-CG}^{Me}\text{-CG}$) [118]. Posteriorment es va descriure una segona especificitat d'unió per Kaiso, la caixa CTGCNA (KCS, *Kaiso Consensus Sequence*) [117]. Kaiso s'uneix amb gran afinitat a aquesta caixa i la trobem present en alguns gens regulats per β -catenina/TCF, com la Matrilisina, c-Myc, Ciclina D1, PPAR- δ i Siamois. A partir d'aquest fet s'han fet diferents estudis, amb la conclusió que Kaiso regula conjuntament amb β -catenina/Tcf4 l'expressió d'aquests gens, reclutant corepressors transcripcionals i impedit l'activació d'aquests [119]. La unió de p120ctn amb Kaiso impedeix la unió d'aquest al DNA, s'atribueix així un paper d'activador de gens a p120ctn derivat de la inhibició de l'activitat repressora de Kaiso [119]. Aquesta funció només es pot produir al nucli, i per tant p120ctn ha d'haver sofert una translocació nuclear prèvia per poder inhibir Kaiso [99].

Els gens descrits regulats per Kaiso estan implicats en la regulació de la migració; se li atribueix a Kaiso un paper com a inhibidor de la invasió. Tot i així, estudis en línies cel·lulars i tumors mostren la desaparició de Kaiso nuclear *in vivo*, trobant-lo localitzat al nucli només en cultius cel·lulars a confluències baixes. A alta confluència i en matrius 3D, imitant un entorn més proper a les condicions *in vivo*, també es perd aquesta localització nuclear de Kaiso [120]. Només es conserva Kaiso nuclear *in vivo* en les cèl·lules de la perifèria del tumor, considerades les més agressives; neix així una controvèrsia en el seu paper en el càncer.

Recentment, s'ha descrit per aquest mateix grup, un paper per Kaiso com a oncogen en colon. S'ha vist que en un model murí la deficiència completa de Kaiso té un efecte negligible. A més, aquesta deficiència provoca una reducció del creixement dels tumors en diversos models de càncer de colon; com l'APC^{min} o el Muc2 -/- [121]. Aquest fet contrasta amb *Xenopus*, on Kaiso té un paper essencial [122].

2. Ruta de senyalització de Wnt

En els últims 20-30 anys s'han identificat varies famílies de molècules de senyalització, una d'aquestes és la família de Wingless(Wg)/Wnt, i els seus mecanismes de senyalització s'han clarificat. La senyalització per Wnt és un dels

mecanismes fonamentals que dirigeixen la proliferació cel·lular, la polaritat cel·lular i determinen el destí de la cèl·lula durant el desenvolupament embriogènic i la homeòstasi en teixit adult [Revisat a [123]].

Les alteracions en rutes de senyalització s'involucren sovint en les malalties, particularment el càncer, reforçant el concepte de que el càncer és una forma de creixement descontrolat. Les mutacions en la ruta de senyalització de Wnt sovint es relacionen amb defectes de naixement, càncer o altres patologies variades [Revisat a [124]].

Actualment es creu que hi ha tres rutes de senyalització diferents activades per la unió de *Wnt* al seu receptor: la via canònica β -catenina/TCF, la no canònica *Planar Cell Polarity - Convergent Extension* (PCP-CE), i la ruta Wnt/Ca²⁺.

2.1. El factor Wnt

El gen murí *Wnt1* (també anomenat *Int1*) va ser identificat per Nusse i Varmus al 1982 com a lloc d'integració preferencial pel virus de tumor mamari de ratolí, implicat en tumors de mama induïts víricament [125]. Seguidament es va mostrar el factor de *Drosophila* Wingless (Wg), el qual controla la polarització dels segments durant el desenvolupament larval [126], era un ortòleg de *Wnt1* [127].

Els factors Wnt es troben conservats en gairebé tots els animals metazous; en mamífers en trobem 19 de diferents. Aquests són glicoproteïnes secretades de 350-400 aminoàcids riques en cisteïnes (de les quals 23 tenen un patró inalterable). Aquestes contenen un pèptid senyal en N-terminal que els marca per la secreció i varis llocs potencials per a N-glicosilacions [Revisat a [128]]. Tot i ser proteïnes secretades, ens trobem amb uns factors relativament insolubles. Aquesta poca solubilitat ha estat atribuïda a una modificació proteica, la palmitoilació de cisteïnes, la qual és essencial per la funció de Wnt. Les palmitoilacions descrites fins al moment les trobem en la Cys77 i la Ser209; la modificació de la Cys77 està involucrada directament en la capacitat de la glicoproteïna per activar el seu complex receptor [129].

Es creu que *Wnt* actua com un morfògen (un senyal els efectes del qual depenen

de la seva concentració) tant a rangs curts com llargs [Revisat a [123]]. No es coneix però encara com es generen aquest gradient. Es postula que les proteïnes Wnt poden unir-se entre elles o a altres partícules lipoproteiques per amagar els seus elements lipòfils i aconseguir una millor distribució a rangs llargs [Revisat a [130]].

2.1.1. Secreció de Wnt

Els factors Wnt, abans de ser secretats, necessiten de modificacions tan glucídiques com lipídiques. La palmitoilació de la Ser209 en regula el trafic vesicular i l'exocitosi [131]. S'ha descrit en *Drosophila* una proteïna transmembrana del reticle endoplasmàtic, la Porcupina, la qual presenta un domini O-acil-transferasa i és necessària per a la secreció de Wnt [132, 133]; es considera responsable de la palmitoilació dels dos residus descrits en les proteïnes Wnt [134]. La deficiència d'aquesta provoca una acumulació de Wnt en el reticle endoplasmàtic i una reducció de la palmitoilació en la Ser209 [135].

Ja més recentment, s'ha descrit en *Drosophila* i *C. elegans* dos elements indispensables per la secreció de Wnt. El primer s'ha anomenat Wntless(Wls)/Evennes interrupted (Evi)/Sprinter(Srt) [136-138]. Aquest gen codifica per una proteïna amb set dominis transmembrana, localitzada majoritàriament en l'aparell de Golgi, però també en compartiments endocítics i en la membrana plasmàtica. Aquesta està molt conservada evolutivament i, en la seva absència, el factor Wnt queda retingut dins la cèl·lula i no es pot secretar. Es creu que la funció de Wls és actuar d'element de càrrega per Wnt i acompanyar-lo fins a la secreció. Un cop Wnt ha estat secretat, Wls ha de ser reciclat dels endosomes un cop ha estat retirat de la membrana [Figura 10]; aquesta funció és realitzada pel segon element, el retròmer, un complex multi-proteic involucrat en tràfic intracel·lular de proteïnes entre l'aparell de Golgi i els endosomes, molt conservat evolutivament. Aquest és essencial per la secreció i generació d'un gradient de Wnt [139]; la pèrdua de funció del retròmer condueix en una degradació lisosomal de Wls amb la consegüent reducció dels nivells d'aquesta proteïna i de la secreció de Wnt [Revisat a [140]].

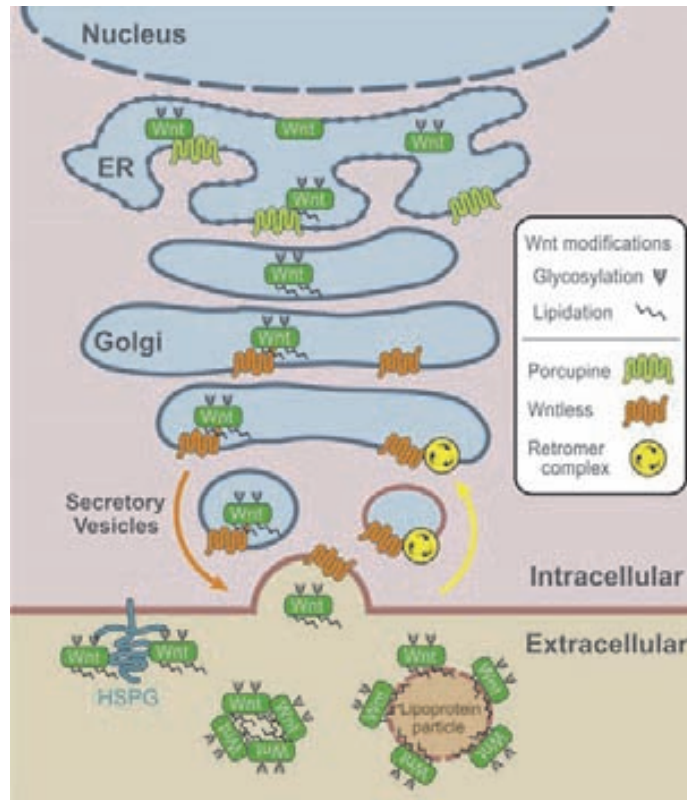


Figura 10: Esquema de la secreció i reciclatge de Wnt. Wnt és modificat per porcupina al reticle endoplasmàtic i després la seva secreció és facilitada per Wls. Aquest Wls es recicla posteriorment a través del complex del retròmer un cop endocitat. Adaptat de (MacDonald, Keiko Tamai, and Xi He 2009).

2.2. Via canònica de Wnt

2.2.1. El complex de degradació de β -catenina

La via canònica de Wnt o altrament anomenada senyalització Wnt/ β -catenina és la que té com a element central la regulació dels nivells cel·lulars del coactivador transcripcional β -catenina, el qual controla programes d'expressió genètica claus per al desenvolupament. Així, el nucli central de la regulació de la via canònica de Wnt el trobem en β -catenina i el seu complex de degradació [Revisat a [141]].

Components

La composició exacta del complex de degradació no es del tot segura, i potser hi

ha altres factors que s'hi associen de forma transitòria. Una de les proteïnes centrals d'aquest complex és la proteïna supressora de tumors Axina. Aquesta és la proteïna esquelet o bastida del complex, ja que és capaç d'unir tots els seus membres: β -catenina, la proteïna supressora de tumors APC i les quinases CK1 α i GSK3 β .

APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) és una proteïna molt gran que es troba alterada en un 90% dels càncers de colon [142]. Conté tres repeticions amb la seqüència SAMP (Serina-Alanina-Metionina-Prolina) que faciliten la interacció entre APC i el domini d'Axina homòleg a RGS (*Regulator of G protein Signaling*) [143]. APC també té tres repeticions de 15 aminoàcids i set de 20 aminoàcids, per on s'uneix la β -catenina [144].

La regió C-terminal de GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3*) s'uneix al domini central en Axina [145]. El lloc exacte d'unió de CK1 α (*Casein Kinase 1*) a Axina no es coneix, però experiments de deleció l'han descrit en una posició C-terminal al lloc d'unió de β -catenina [146].

També es troba associada al complex de degradació la fosfatasa PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) i la fosfatasa PP1 (*Protein Phosphatase 1*). La PP2A està formada per tres subunitats, una unitat esquelet o bastida A, una unitat catalítica C i varies unitats B reguladores que són responsables de la localització subcel·lular i el reconeixement de substrat. S'ha observat que la subunitat C uneix Axina [147], mentre que les B56 α i B56 δ ho fan a APC [148]. PP2A té un efecte negatiu desfosforilant β -catenina [149]. La PP1 desfosforila la Axina provocant una alliberació de GSK3 β del complex de degradació [150].

Mecanisme

Les hipòtesis més recents situen GSK3 β i CK1 α en el complex de destrucció. Aquestes quinases fosforilen diferents dominis d'Axina incrementant la seva afinitat per altres components del complex de degradació. La β -catenina lliure en el citosol uneix Axina per la regió situada entre els dominis d'unió de les dues quinases [151]. APC s'uneix a Axina i a β -catenina pels armadillos 5-9 a través de les repeticions de 15 aminoàcids d'APC. Aquesta unió acosta l'extrem flexible N-terminal de β -catenina a la proximitat de les quinases CK1 α i GSK3 β , que fosforilen seqüencialment β -catenina en

Ser/Thr en aquesta mateixa regió. Una primera fosforilació per CK1 α (Ser45) [revisat a [152]], prima a β -catenina per la fosforilació seqüencial per GSK3 β en quatre residus més (Thr41, Ser37, Ser33 i Ser29).

Es creu que APC és fosforilat per CK1 α o en menor grau per GSK3 β en els motius de 20 aminoàcids esmentats anteriorment. Aquesta fosforilació augmenta l'afinitat d'aquests motius per β -catenina de forma dràstica (de 100 a 500 vegades), desplaçant la unió a Axina i a les seqüències de 15 aminoàcids d'APC (ja que aquesta regió de 20 residus es solapa amb ambdues) [153, 154], deixant lliures aquestes dues regions. A més, aquesta unió té una funció protectora, ja que manté la β -catenina protegida de la fosfatasa PP2A, la qual la desfosforilaria un cop alliberada del complex [149].

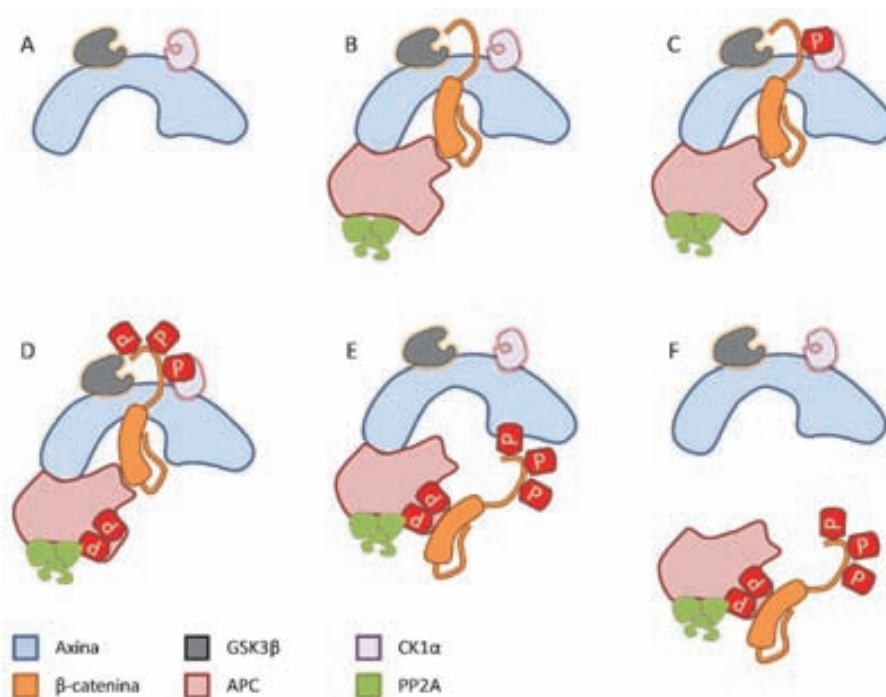


Figura 11: Complex de degradació de β -catenina. A. Es pensa que el complex es forma per Axina, CK1 α i GSK3 β . B. APC uneix per un dels dominis de 15 aminoàcids β -catenina i la recluta al complex de degradació. C. CK1 α fosforila β -catenina en la Ser45. D. GSK3 β fosforila quatre residus Ser/Thr més en l'extrem N-terminal de β -catenina. Paral·lelament APC és fosforilat en els dominis de 20 aminoàcids. E. Els dominis de 20 residus incrementen l'afinitat per β -catenina, unint-la i desplaçant la unió d'aquests a Axina i als dominis de 15 residus. F. APC/ β -catenina es desacobla del complex.

La β -catenina fosforilada en aquestes serines N-terminals (concretament les Ser33 i Ser37 juntament amb un aspàrtic proper conservat) és reconeguda per proteïna β -TrCP1, que forma part del complex ubiquitina lligasa SCF (*Skp1-Cul1-F-box-protein*). Aquest complex uneix una lligasa E2 específica, β -catenina és ubiquitinada en les Lys19 i Lys49, i marcada per posterior degradació via proteosoma. No es coneix exactament com β -catenina deixa el complex, es postula que abandona el complex juntament amb APC i que aquestes dues proteïnes són separades posteriorment pel proteosoma. APC es desfosforilaria en acabat en el citoplasma (veure esquema de la Figura 11).

2.2.2. Recepció del senyal de Wnt

Components

El complex receptor de Wnt requereix la participació de dues proteïnes transmembrana diferents. Una d'elles és un membre de la família de receptors Frizzled (Fz) [155]; aquesta família conté 10 membres en mamífers i es caracteritza per tenir set dominis transmembrana i un domini extracel·lular ric en cisteïnes (CRD: *Cysteine-rich Domain*). La segona és un coreceptor amb un sol segment transmembrana pertanyent a la família *LDL-receptor related protein (LRP)*. En vertebrats trobem LRP5/6, els quals comparteixen un 71% d'homologia [156, 157]; i en *Drosophila* trobem Arrow [158]. Tots contenen un domini extracel·lular amb repeticions EGF (*Epidermal Growth Factor*) i LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*), seguit d'una regió transmembrana i una domini citoplasmàtic sense motius catalítics reconeguts [159, 160].

La pèrdua de funció tant d'Arrow [158] com de Frizzled [161] independentment, provoquen un fenotip semblant a la mutació *wingless (Wg)*, ortòleg de Wnt1). En mamífers però, trobem redundància funcional en el receptor Fz, diferents lligands poden unir un mateix receptor i diferents receptors un mateix lligand [revisat a [123]]. Pel que fa a LRP5/6, LRP6 juga un paper dominant i és essencial per l'embriogènesi, mentre que LRP5 és dispensable per aquesta, però és crucial per l'homeòstasi del teixit ossi adult. Tot i així, LRP5 i LRP6 són parcialment redundants al

ser requerits ambdós per la gastrulació en ratolí [revisat a [162]].

Cal introduir també Dishevelled (Dsh en *Drosophila*, Dvl en vertebrats). La pèrdua completa de l'activitat del gen *dsh* desencadena en letalitat embrionària [163]. Aquests efectes s'assemblen, tot i no ser idèntics, als causats per un grup de gens anomenats *tissue polarity gens* o gens PCP [164]. Les proteïnes Dsh/Dvl tenen entre 600-700 aminoàcids, i contenen tres dominis conservats: el domini DIX (*Dishevelled* i *Axin*), el domini PDZ (*PSD*, *Discs-large* i *ZO1*) i el domini DEP (*Dishevelled*, *Egl10* i *Plekstrin*); a més, contenen regions amb aminoàcids bàsics, llocs probables de fosforilació conservats i un domini d'homologia a Src 3 (SH3, *Src Homology Domain*).

El domini més N-terminal és el DIX, que conté al voltant de 80 aminoàcids; aquest domini el trobem present tant en proteïnes Dsh/Dvl com Axina, i permet tant l'homo- com heterodimerització. El domini PDZ, d'uns 90 aminoàcids, és el més central; aquests dominis estan presents en receptors submembrana i involucrats en el clustering de complexos per la transducció de senyals. El domini DEP, localitzat a la part C-terminal de la proteïna, conté uns 90 aminoàcids; aquests dominis són presents en varis reguladors de la senyalització de proteïnes G (*Regulator of G-proteing Signaling*, RGS), entre d'altres proteïnes de senyalització. El domini DIX és necessari per la senyalització Wnt/ β -catenina, mentre que la necessitat dels altres difereix segons l'estudi [revisat a [165, 166]].

Mecanisme

El model més senzill és que Wnt indueix la formació d'un complex receptor format per Fz i LRP5/6/Arrow, i és aquest el que promou la transmissió del senyal [revisat a [167]].

El coreceptor LRP5/6 juga un paper fonamental en l'activació de la cascada de senyalització de Wnt. L'estimulació per Wnt fosforila LRP6 *in vivo*, i aquesta fosforilació és un pas clau per a l'activació del receptor [168]. La fosforilació és duta a terme en l'extrem citoplasmàtic del receptors LRP5/6/Arrow, on s'ha localitzat 5 motius PPPSPxS fosforilables (P=prolina, S=serina/treonina, x=qualsevol aminoàcid). La fosforilació produïda en aquests motius incrementa la transmissió de la senyal de

Wnt i la unió del coreceptor LRP5/6 a Axina [168-170]. Aquest fet provoca un reclutament d'Axina a la membrana.

S'han identificat posteriorment les quinases responsables de la modificació d'aquest motiu. La fosforilació del motiu PPPSPxS és produïda per GSK3 [171], i aquesta no es dependent d'encebament. Un segon lloc conservat de fosforilació en el mateix motiu PPPSPxS (anomenat clúster 2, conservat també en Arrow) és fosforilat per CK1 [169, 171], i necessita de l'encebament previ del lloc PPPSP [Figura 12]. S'ha vist que metre el motiu PPPSP és necessari per a la transmissió del senyal de Wnt i per la unió d'Axina, el clúster 2 promou l'amplificació d'ambdós efectes [171].

Immediatament anterior al primer domini PPPSPxS, s'ha trobat un clúster ric en Ser/Thr. Aquest és fosforilat amb gran eficiència per CK1 sense necessitat d'encebament (anomenat clúster 1) [Figura 12]. La fosforilació d'aquesta regió incrementa notablement després de l'estimulació per Wnt; aquesta fosforilació es produeix per la CK1 γ resident a la membrana [169]. Els autors d'aquest treball proposen que el domini extracel·lular del receptor LRP6 actua com a inhibidor d'aquesta fosforilació [172] en cèl·lules no estimulades, i que la fosforilació inicial es produeix per CK1 γ sobre aquest clúster quan la unió Wnt/Fz/LRP6 provoca un canvi conformacional en LRP6. A més s'ha descrit que aquest clúster forma un lloc d'unió per GSK3, el qual incrementa l'afinitat per aquesta un cop ha estat fosforilat per CK1 γ . Una fracció de GSK3 present a la membrana seria reclutada al coreceptor LRP6 i iniciaria la fosforilació en el clúster PPPSP [173].

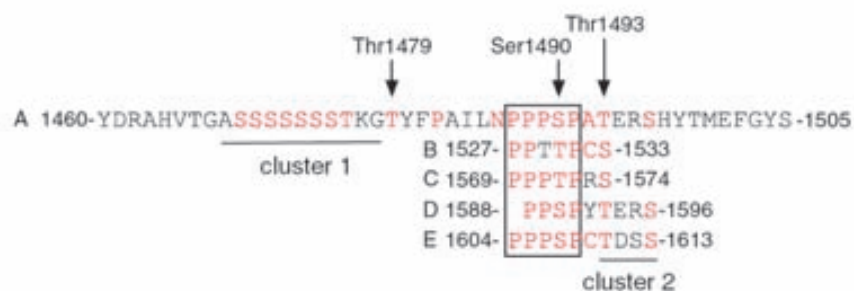


Figura 12: Seqüència dels cinc dominis PPPSPxS del receptor LRP6.

Tot i que aquest treball demostra que només la fosforilació per CK1 és induïda

per Wnt, dades més recents demostren que Wnt indueix la fosforilació en el motiu PPPSP [174, 175], primer per GSK3 que prima la posterior fosforilació en xS per CK1. Tot i no poder descartar la presència d'altres quinases ni la intervenció d'altres motius, aquests treballs indiquen que GSK3 fosforila, si no tota, la majoria de seqüències PPPSP.

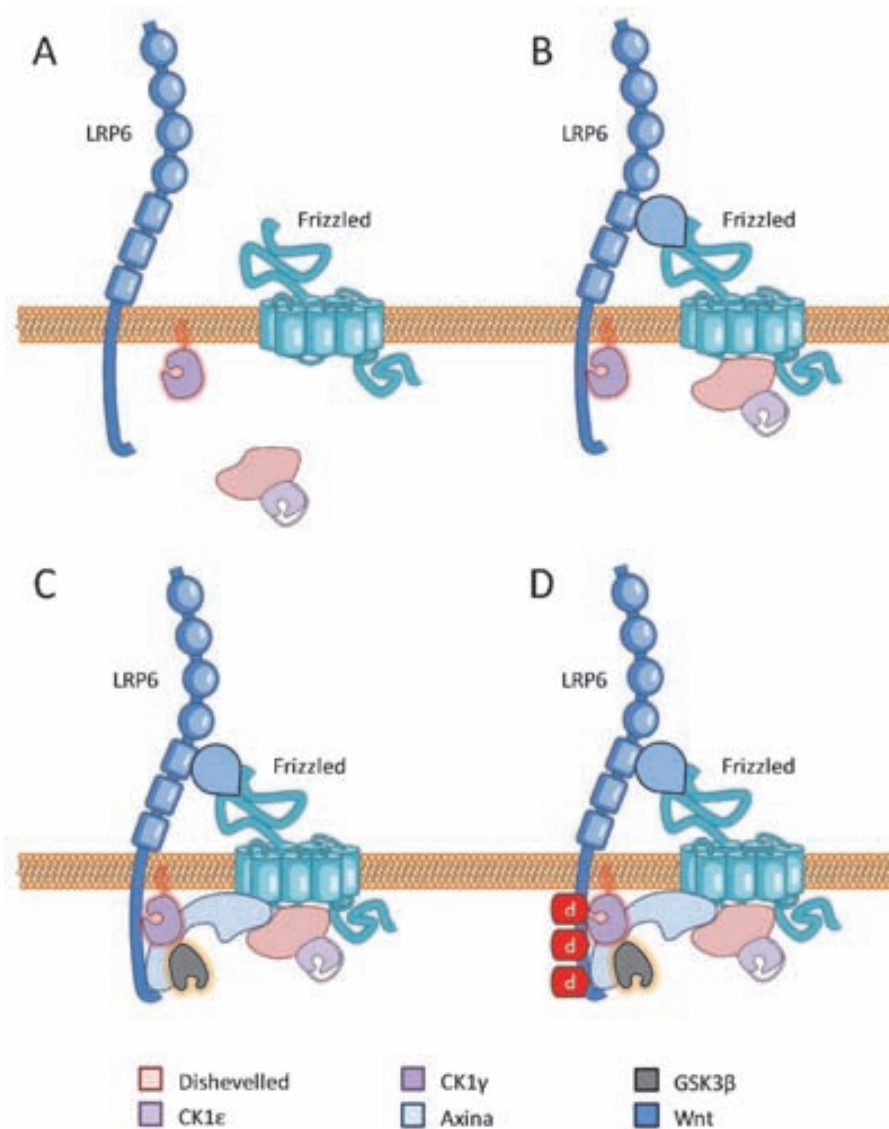


Figura 13: Fosforilació de LRP6 depenent del reclutament d'Axina. Iniciació. **A.** Proteïnes del complex receptor de Wnt en absència de senyal. **B.** La formació del complex Wnt/Fz/LRP6 provoca una localització de Dvl a la membrana. **C.** Aquest forma un punt d'ancoratge per Axina-GSK3β. **D.** Aquesta quinasa inicia la fosforilació del motiu PPPSP i CK1γ seqüencialment la del xS. En aquest punt el coreceptor LRP6 ja es troba modificat incrementant la afinitat per Axina.

Quin paper juga Fz, l'altre membre del complex de recepció de Wnt, en la fosforilació del coreceptor LRP5/6? Fz és necessari per a que es produeixi aquesta fosforilació induïda per Wnt; la unió forçada Fz-LRP6 és suficient per produir la transmissió del senyal [175]. El paper de Fz va molt lligat a Dvl [revisat a [165]] i recentment s'ha vist que la unió Dvl-Fz és necessària per a la fosforilació del receptor LRP6 [175-177].

Dvl pot interaccionar amb Axina i Fz. S'ha observat que el reclutament d'Axina a la membrana plasmàtica és necessari durant la senyalització per Wnt [178]. S'hipotetitza que és el reclutament a la membrana del complex Axina-GSK3 per part de Fz-Dvl un cop s'ha format el complex Wnt/Fz/LRP6 el que inicia la fosforilació de LRP6. La GSK3 associada a Axina, al desplaçar-se a la membrana plasmàtica amb Dvl/Fz, fosforilaria les seqüències PPPSP iniciant la modificació dels motius PPPSPxS [tal com mostra l'esquema de la Figura 13].

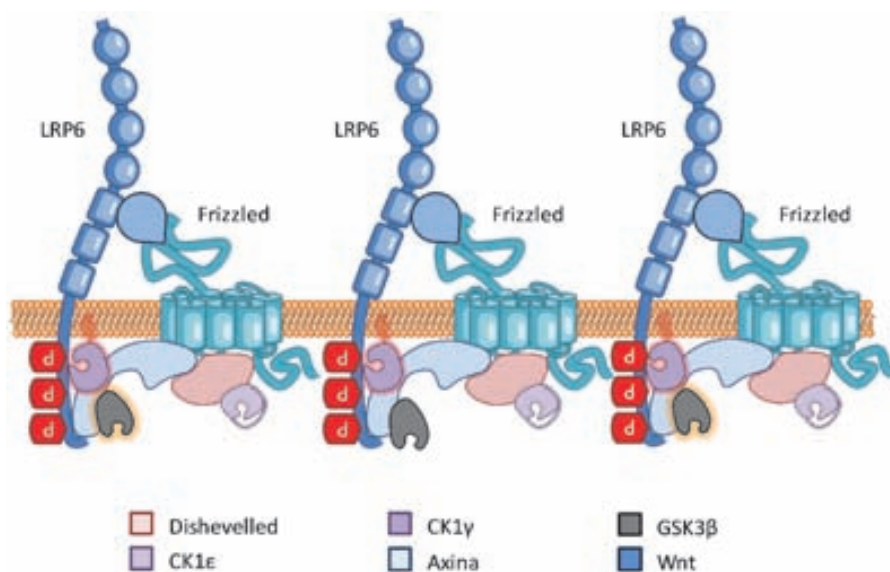


Figura 14: Fosforilació de LRP6 depenent del reclutament d'Axina: Amplificació. Un cop s'ha produït la fosforilació del domini citoplasmàtic de LRP5/6, Axina-GSK3β es desplaça a la membrana on s'uneix a LRP6 i es promou la fosforilació de més motius PPPSP incrementant més encara l'afinitat del coreceptor per Axina. Durant aquesta etapa apareixen els complexos formats per Axina i Dvl a la membrana coneguts com *Signalosomes*.

S'ha demostrat que la localització d'Axina/GSK3 a la membrana es produeix de forma correlativa a la fosforilació i agregació del receptor. També s'ha observat en aquests complexos Dvl al estimular per Wnt [177], el qual forma agregats paral·lels a la membrana plasmàtica degut a la polimerització d'aquest juntament amb Axina i el receptor Fz [179]. Es creu doncs que la unió de Dvl al complex Wnt/Fz/LRP6 possibilitaria un lloc d'ancoratge per Axina/GSK3, tal com s'observa en l'aparició d'agregacions d'Axina/GSK3 colocalitzant amb les de Dvl. Aquestes estructures se les ha anomenat el *Signalosoma de LRP6* [177] [representat a la Figura 14].

Al estudiar l'afinitat del domini citoplasmàtic del coreceptor LRP6 s'ha vist que les 5 repeticions PPPSPxS actuen sinèrgicament. La falta de només un dels motius provoca una pèrdua important d'unió a Axina. S'ha atribuït aquest sinergisme al reclutament d'Axina. El fet de localitzar més Axina-GSK3 a la membrana incrementa la quantitat de GSK3 capaç de fosforilar els motius PPPSP [170]. En aquesta fase es produiria l'amplificació del senyal.

Com es produeix la inhibició del complex de degradació de β -catenina per Wnt?

L'activació del receptor LRP5/6 promou l'estabilització de β -catenina, de forma independent de la degradació d'Axina i inhibint la fosforilació de GSK3 β específicament sobre β -catenina (la fosforilació d'altres substrats no es veu alterada). S'ha correlacionat la inhibició de GSK3 β amb la conservació dels motius PPPSPxP del coreceptor LRP6 [180]. En paral·lel a aquest estudi s'ha descrit que els dominis PPPSPxP fosforilats tenen la capacitat d'inhibir la GSK3 β reclutada a la membrana plasmàtica. Això permet inhibir de forma selectiva la fracció de quinasa que forma part del complex Axina-GSK3 responsable de la fosforilació de β -catenina [181]. S'explicaria així el fet que la fosforilació d'altres substrats de GSK3 no es trobi alterat.

Ha estat també descrit que la fosforilació de Dvl (en les Ser139/Ser142) per CK1 ϵ provoca un efecte positiu en la senyalització de Wnt [182]. Aquesta fosforilació de Dvl s'ha descrit com un signe inequívoc de l'activació de la ruta de Wnt [183], i produeix un increment de la unió de Dvl a FRAT/GBP (*GSK3 Binding Protein*), un inhibidor de GSK3 [184].

Per altra banda Wnt activaria també la fosfatasa PP1, present en el complex de

degradació unida a Axina. Aquesta fosfatasa desfosforilaria Axina, disminuint l'afinitat d'aquesta per GSK3 β , alliberant-la del complex i disminuint la fosforilació de β -catenina [150].

2.2.3. Activació de la transcripció

Entrada al nucli de β -catenina

Inicialment es va suggerir que β -catenina entra al nucli de manera independent a senyals de localització nuclear, interaccionant directament amb les proteïnes dels porus nuclears [revisat a [185]]. Aquest mecanisme d'entrada és àmpliament discutit, i en molts casos no es produeix una entrada específica sinó un increment general en tota la cèl·lula.

Dues proteïnes, Tcf i Pygo (actuant conjuntament amb BCL9-2) [186-188], estan relacionades amb la entrada al nucli de β -catenina, però la falta d'ambdues no impedeix a aquesta la seva presència al nucli. β -catenina pot exportar-se al citoplasma altre cop per un senyal d'export intrínsec, o bé com a càrrega d'APC [189] o Axina [190]. Tant TCF com els coactivadors de β -catenina BCL9-2/Pygo incrementen la quantitat nuclear d'aquesta proteïna, mentre que APC i Axina n'incrementen els nivells citoplasmàtics. Cap d'aquests però accelera ni l'export ni l'import de β -catenina, si no que en regulen la localització per retenció en un dels dos compartiments [191].

Més recentment un estudi mostra que l'estabilització de β -catenina induïda per Wnt no és suficient per la seva acumulació nuclear [192]. Els autors demostren que l'activació de la GTPasa Rac1 per part de Wnt és necessària per la translocació nuclear de β -catenina. Rac1 activaria JNK2 (*Jun N-terminal Kinase 2*) que fosforila β -catenina en les Ser191 i Ser605 promovent-ne la translocació al nucli.

Formació del complex transcripcional

β -catenina al nucli interacciona amb components de la família de factors de transcripció Tcf/Lef. Mentre que en invertebrats hi ha un sol gen Tcf, en vertebrats en trobem quatre. Els gens Tcf poden sofrir splicing alternatiu obtenint un gran nombre

de variants. La família Tcf/Lef forma part dels factors HMG d'unió al DNA (*High Mobility Group*), i uneixen la seqüència consens anomenada WRE (*Wnt Responsive Element*), de seqüència CCTTTGWW (W=alanina/timina) molt conservada entre *Drosophila* i vertebrats. La unió d'aquests causa un doblegament del DNA significatiu que pot alterar l'estructura local de la cromatina [revisat a [193]].

En absència de activació per Wnt, Tcf actua com a repressor transcripcional formant un complex amb Groucho/TLE1 (*Transducin-like enhancer of split 1*) [194] [195]. Aquesta unió promou la desacetilació de les histones i la compactació de la cromatina. La unió de β -catenina a l'extrem N-terminal de Tcf/Lef converteix transitòriament Tcf en un activador transcripcional. Per tal d'aconseguir-ho, β -catenina ha de desplaçar físicament a Groucho de Tcf/Lef [196] i reclutar altres coactivadors transcripcionals. Aquesta interacció es capaç de provocar la remodelació de la cromatina de varies maneres. El domini C-terminal de β -catenina, que ja per si sol té gran capacitat transactivadora [197], uneix coactivadors com p300/CBP (*CREB Binding Protein*), histona-acetiltransferases, histona-metiltransferases, el complex de remodelació de cromatina SWI/SNF (*SWItch/Sucrose NonFermentable*) i el complex PAF1 (*RNA polymerase II-associated factor 1*) per l'elongació de la transcripció i modificació d'histones [Revisat a [198]].

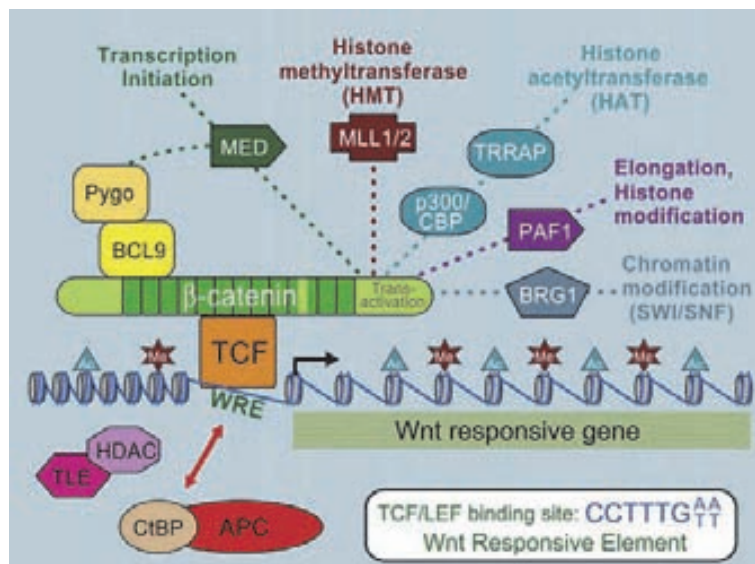


Figura 15: Complex de transactivació dels gens diana de Wnt. Adaptat de (MacDonald, Keiko Tamai, and Xi He 2009).

β -catenina uneix Tcf pel domini armadillo, i la majoria de coactivadors per l'extrem C-terminal, mentre que Bcl9 interacciona per l'extrem N-terminal [199, 200] [Figura 15]. La mutació/deleció de qualsevol d'aquestes comporta un fenotip semblant al *Wingless*, i la sobreexpressió dels dos provoca un increment de l'activitat β -catenina/Tcf en cèl·lules de mamífer [201]. S'ha descrit que Bcl9 forma un pont entre β -catenina i Pygo, i aquest últim reclutaria altres coactivadors contribuint directament en la seva activitat transcripcional [202, 203]. Tot i que la implicació de Pygo i Legless ha estat àmpliament demostrada i constatada en *Drosophila*, en els homòlegs de mamífers Bcl9/Pygo encara hi ha opinions oposades.

Gens diana de Wnt

Canvis en la ruta de senyalització de Wnt produeixen fenotips dramàtics que afecten a una gran varietat d'òrgans i teixits. Una visió simplificada d'aquest fet és la que l'equipara al manteniment o activació de cèl·lules mare [204]. Hem d'adonar-nos però, que la última finalitat de Wnt és activar programes transcripcionals, i que no hi ha restricció al tipus d'esdeveniments que promouen aquests. Wnt, per exemple, és capaç d'activar proliferació i expansió de teixits, a la vegada que pot encaminar la cèl·lula a una diferenciació terminal [205]. Aquest dos fets, proliferació i diferenciació terminal, poden ser activats per Wnt en diferents tipus cel·lulars dins de la mateixa estructura, com pot ser el fol·licle pilós o la cripta intestinal [204].

L'activació del subgrup de gens ve determinat pel tipus de línia cel·lular que rep el senyal, més que no pas pel senyal en si. La majoria de gens diana de Wnt semblen ser específics de teixit, no se sap amb certesa si existeix un grup universal de gens activats per Wnt [123]. A més, la senyalització per Wnt està autoregulada a molts nivells, l'expressió de gran varietat de reguladors positius i negatius de la ruta (Frizzled, LRP, Axina2, Dkk1, Rspo i Tcf/Lef) estan controlats pel mateix complex β -catenina/Tcf [123, 193].

2.2.4. Família CK1, involucrada en la via canònica de Wnt

Els membres de la família de CK1 han estat involucrats en diverses funcions: transport cap a la membrana, divisió cel·lular, reparació del DNA, localització nuclear

i en la regulació dels ritmes circardiàris. Més recentment s'ha vist implicada aquesta família tant en rols positius com negatius en la via de senyalització de Wnt [revisat a [206]].

Aquesta família de Ser/Thr quinases monomèriques es troba en organismes eucariotes des de llevats fins a mamífers. Trobem, en els mamífers, set diferents gens (α , β , γ_1 , γ_2 , γ_3 , δ , i ϵ). Aquests codifiquen per enzims amb dominis catalítics altament conservats (d'un 53-98% d'homologia) i amb extrems N- i C- terminals divergents. Aquestes són constitutivament actives, excepte les quinases CK1 ϵ/δ , que tenen un domini C-terminal d'uns 100 aminoàcids amb un paper autoinhibidor al ser fosforilat en residus conservats [207-209]. Quant la quinasa és activa aquest domini s'autofosforila, canvia de conformació i bloqueja el centre catalític, impeding l'accés del substrat a aquest [210]. Aquest es pot desfosforilar per fosfatases i reactivar-se [211, 212].

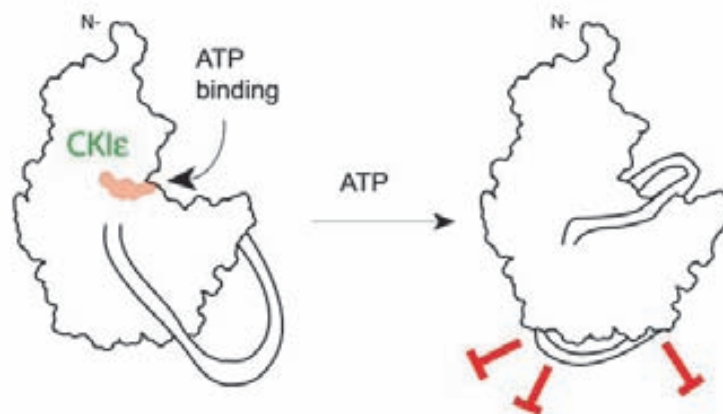


Figura 16: Esquema de l'autoinhibició de CK1 ϵ . Després de l'autofosforilació sobre l'extrem C-terminal de CK1 ϵ , aquest es plega sobre el domini catalític d'aquesta quinasa bloquejant-ne l'accés del substrat. Adaptat de (Dahlberg et al. 2009).

Els membres d'aquesta família tenen una especificitat semblant pels seus substrats *in vitro* [213], i la selecció del substrat es pensa que es regula a través re localització subcel·lular *in vivo*. La diana de fosforilació consens és S/TpXXS/T (S/Tp=fosfo-serina/treonina, X=qualsevol aminoàcid) [214]. Així trobem que les quinases de la família de CK1 necessiten d'una fosforilació prèvia per una altra quinasa. També s'han descrit però, altres motius sense encebament. El primer

necessita un clúster acídica a $n-3$ i una regió hidrofòbica en C-terminal de la S/T a fosforilar [215]; el segon el trobem en proteïnes com NFAT i β -catenina, el forma la seqüència SLS seguida d'un clúster de residus acídics [216]

La localització subcel·lular d'aquestes quinases es determina per variants de splicing en el cas de CK1 α [217, 218], o per acetilació en CK1 γ localitzant-la a les membranes [219]; de forma general però trobem solapament en la localització de CK1 α , CK1 δ i CK1 ϵ [220], tot i que aquestes presenten diferent especificitat en quant a reconeixement de substrats [210].

Les quinases de la família de CK1 s'han vist involucrades tant en papers positius com negatius en la via de senyalització de Wnt. Aquestes participen en la fosforilació de diversos factors, tals com LRP6, Dvl, Axina, APC, β -catenina i Tcf/Lef [revisat a [221]]. Aquesta família de quinases doncs, és un punt d'estudi molt atractiu per ampliar el coneixement sobre la regulació de la ruta de senyalització de Wnt.

2.3. Via no-canònica de Wnt

Les proteïnes Wnt s'han dividit al llarg dels anys en dues subclasses diferents. Mentre que els membres del subgrup Wnt1/Wg activen la senyalització de la via canònica de Wnt a través de l'activació de la transcripció regulada per β -catenina/Tcf; els membres del subgrup Wnt5a, no tant sols no son capaços de fer-ho, si no que a més inhibeixen aquesta activació. Els processos activats per aquest segon subgrup s'han anomenat via no-canònica de Wnt. Avui en dia sabem però, que algun dels efectes atribuïts a la via canònica de Wnt poden ser produïts per ambdós subgrups de proteïnes Wnt, cada cop hi ha un entrecreuament més gran entre les diferents vies.

2.3.1. La ruta Wnt/Ca²⁺

Fa uns anys es va observar que la sobreexpressió de certs receptors Frizzled o proteïnes Wnt en embrions de *Zebrafish* promouien una alliberació intracel·lular de calci [222, 223]. La pèrdua de Wnt11 o Wnt5a, a més a més, resultava en una reducció intracel·lular de la senyalització a través de calci. La importància va incrementar al descobrir-se que l'alliberament de calci produït per Wnt era suficient per activar diferents enzims sensibles a l'increment de calci intercel·lular, com PKC

(*Protein Kinase C*), CamKII (*Calcium-calmodulin-dependent Kinase II*) i la fosfatasa sensible a calci Calcineurina, que seqüencialment activa al factor de transcripció NF-AT [224].

Aquesta qüestió ha quedat més o menys resolta quant s'ha vist que el factor Wnt5a purificat és capaç de promoure un alliberament del calci intracel·lular en varies línies cel·lulars. Aquest, a través de lligands dependents de proteïnes G heteromèriques, activa el cicle del fosfatidilinositol. A més, també s'ha involucrat en aquesta ruta PDE6 (una fosfodiesterasa específica de cGMP) i PKG (*Protein Kinase G*), juntament amb NLK (*Nemo-Like Kinase*) la funció final de la qual és fosforilar Tcf i inhibir la via canònica de Wnt [revisat a [225]].

2.3.2. Via Wnt/JNK o *Planar-Cell-Polarity (PCP)*

Aquesta ruta regula la polaritat de les cèl·lules epitelials dins del pla que formen els teixits [226]. En vertebrats s'ha descrit una ruta de senyalització similar regulant l'extensió convergent dels moviments de les cèl·lules durant la gastrulació o la migració de les crestes neuronals [227].

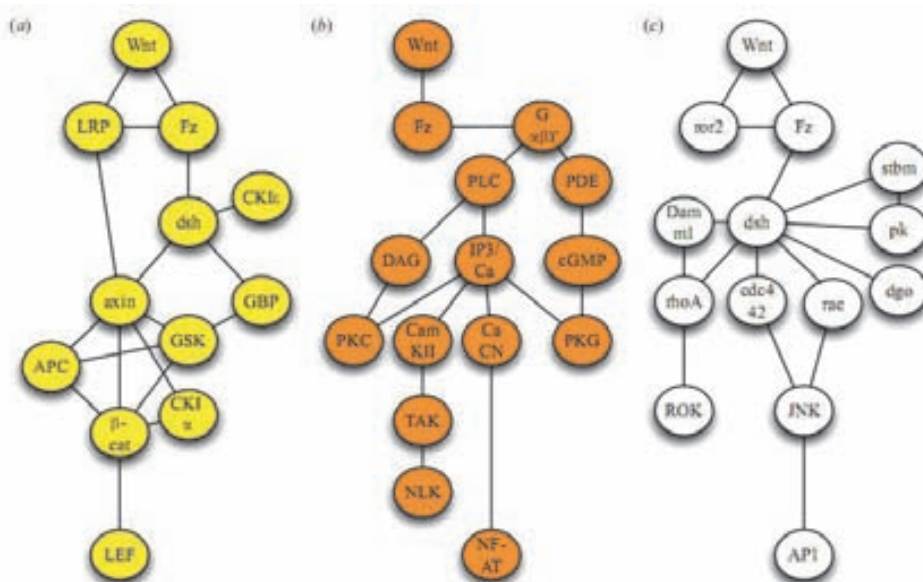


Figura 17: Comparació dels diferents factors involucrats en les 3 rutes de senyalització activades per Wnt. a. Ruta Wnt/ β -catenina. b. Ruta Wnt/ Ca^{2+} . c. Ruta Wnt/JNK. Adaptat de (Kestler and Michael Kühl 2008).

Aquesta ruta s'activa en vertebrats per Wnt-11 o Wnt5a. L'element central d'aquesta via inclou l'activació de les GTPases de la família de Rho, com RhoA, Rac1 o Cdc42 de forma depenent de Dvl. Aquestes poden activar altres mitjancers a la seva vegada com JNK o ROK [228]. En vertebrats el receptor tirosina quinasa Ror-2 s'ha vist que regula els moviments d'extensió convergent i que es capaç d'unir la proteïna Wnt [229]. Aquest receptor actua en estadis anteriors a l'activació de Cdc42 i regula l'activitat de JNK.

2.4. Senyalització de Wnt a l'intestí

Funció fisiològica

L'epiteli de l'intestí esta organitzat en un gran nombre de criptes i villi. Aquest és el teixit amb una autorenovació més ràpida en els mamífers adults. En el cas d'un ratolí, es produeix la renovació completa de l'epiteli cada 3-5 dies. Aquesta elevada proliferació, que es produeix en un compartiment a la base de la cripta, es compensa per apoptosi a la part apical dels villi. Els progenitors proliferatius de la cripta i les cèl·lules diferenciades dels villi formen una capa continua de cèl·lules en constant moviment cap a la part apical dels villi. Les cèl·lules mare resideixen a la part basal de la cripta on romanen estàtiques. Aquestes cèl·lules, que ciclen lentament, produeixen les cèl·lules progenitores que són capaces de diferenciar-se en tots els tipus cel·lulars epitelials. Aquestes cèl·lules mare es renoven i regeneren l'epiteli intestinal després de rebre dany [Figura 18]. Les cèl·lules progenitores arriben a la intersecció cripta-villi [204].

Les evidències actuals indiquen que la senyalització per Wnt dicta el destí cel·lular al llarg de l'axis cripta-villi. En ratolins nomenats sense Tcf4, la diferenciació de l'epiteli dels villi no esta afectat, però no hi trobem el compartiment dels progenitors a la cripta [230]. Això implica que per l'establiment d'un correcte compartiment de progenitors a la cripta necessitem una senyalització fisiològica de Wnt. La inhibició de la senyalització per Wnt en ratolins adults utilitzant l'expressió transgènica de Dkk-1, un antagonista de Wnt, indueix la pèrdua d'aquestes mateixes criptes, identificant així Wnt com al principal mitogen dels progenitors de la cripta

durant la vida de l'individu [204]. De la mateixa manera, la expressió transgènica d'un agonista de Wnt, la R-spondina-1, resulta en una hiperproliferació massiva de les criptes intestinals, confirmant aquesta hipòtesi [231]. Les glicoproteïnes Wnt són expressades pel mateix epitelí de les criptes, i no només estimulen el creixement dels progenitors de la cripta [232], sinó que també promouen la diferenciació terminal de les cèl·lules de Paneth, situades al fons de les criptes [233].

Paper de Wnt en el càncer de colon

Un dels primers gens de la via de senyalització de Wnt relacionat amb el càncer de colon va ésser APC, aquest va ser un dels primers supressors de tumors identificat. Una mutació d'APC en la línia germinal és la causant de la Poliposis Familiar Hereditària (FAP, *Familiar Adenomatous Poliposis*). Els pacients que desenvolupen la FAP hereten un al·lel APC defectuós i com a conseqüència desenvolupen un gran nombre de pòlips en el colon. Aquests pòlips són benignes, creixements de cèl·lules epitelials on el segon al·lel d'APC ha quedat inactiu; aquests però amb el temps poden malignitzar. La pèrdua dels dos al·lells a la vegada succeeix amb la majoria de càncers de colon esporàdics. La mutació d'APC comporta un increment de l'estabilització de β -catenina. En càncers de colon esporàdics on APC està conservat, trobem mutacions en Axina2 o en l'extrem N-terminal de β -catenina, els dos resultant amb l'acumulació d'aquesta.

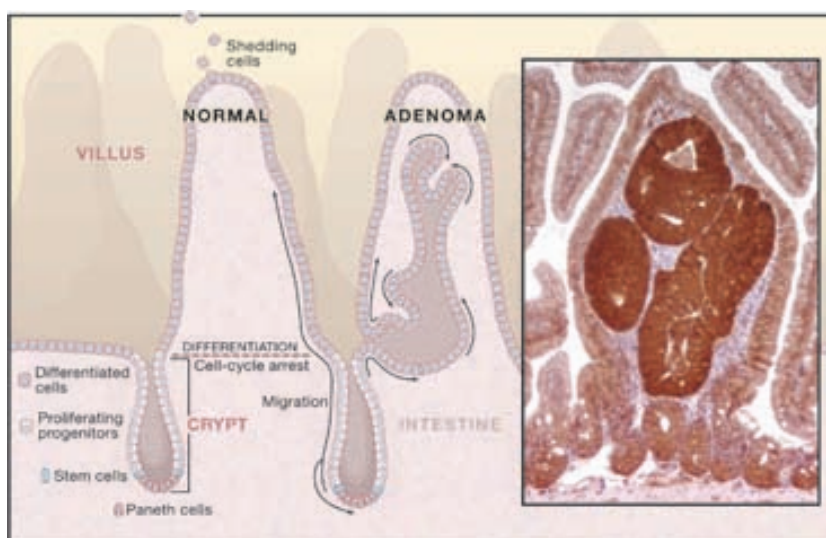


Figura 18: Autorenovació del teixit intestinal. Adaptat de (Hans Clevers 2006).

En l'intestí, l'activació constitutiva del complex β -catenina/Tcf4 activa un programa genètic en les cèl·lules mare i progenitores de la cripta, estabilitzant la proliferació de les cèl·lules progenitores. El gradient de Wnt també controla l'expressió dels receptors i lligands EphB/EphrinB, els quals estableixen l'estructura i la posició dels diferents tipus cel·lulars en l'estructura cripta-villi. Quant aquesta senyalització es troba alterada obtenim en conjunt una proliferació incrementada i una desorganització del teixit.

II. OBJECTIUS

La p120-catenina és una proteïna associada a l'E-cadherina a les unions adherents, que en regula la seva funció i estabilitat. Aquesta catenina té altres funcions a la cèl·lula tals com la regulació de l'activitat de les GTPases de la família de Rho i també està involucrada en la regulació de la transcripció unint-se al repressor transcripcional Kaiso.

En aquest treball ens vam proposar investigar quin paper podia tenir la fosforilació de p120ctn per CK1 en el control de la unió als seus cofactors, tals com l'E-cadherina i el repressor transcripcional Kaiso; si aquesta fosforilació es produïa en línies cel·lulars, i quins senyals fisiològics la induïen. Experiments previs del grup indicaven que la p120ctn era un substrat de la quinasa CK1.

III. RESULTATS

1. CK1 ϵ , una nova quinasa regulant la funció de p120catenina

1.1. La fosforilació de p120ctn per CK1 modula de manera inversa la seva interacció amb E-cadherina i amb el repressor transcripcional Kaiso

1.1.1. La fosforilació *in vitro* de p120ctn per CK1 disminueix la seva afinitat per E-cadherina

S'havia descrit recentment la presència de varies isoformes de CK1 a les unions adherents [63]. Per això vam voler analitzar si p120ctn podia ser un substrat de CK1. Per això es va utilitzar una forma truncada constitutivament activa d'aquesta quinasa per fosforilar p120ctn *in vitro*.

Com s'ha esmentat en la introducció, la proteïna central de les unions adherents és la E-cadherina. Aquesta acobla altres proteïnes que formen part dels complexos d'adhesió. Un d'aquests factors es la p120ctn, que estableix l'E-cadherina present en les unions adherents. Vam investigar quin efecte tenia la fosforilació en Ser/Thr de p120ctn en la unió a E-cadherina.

Es va realitzar un assaig d'interacció directa *in vitro* utilitzant proteïnes recombinants. Tal com es pot observar en la Figura 19, la fosforilació de p120ctn per CK1 disminueix la interacció d'aquesta amb el fragment citosòlic d'E-cadherina.

Tal com s'ha descrit en la introducció, la p120ctn no unida a E-cadherina pot interaccionar amb repressor transcripcional Kaiso, retirant-lo del nucli i promovent l'expressió de gens regulats per aquest factor. Donat que la fosforilació en Ser/Thr de p120ctn per CK1 inhibeix la seva interacció amb E-cadherina, vam estudiar els efectes d'aquesta modificació en l'afinitat per Kaiso.

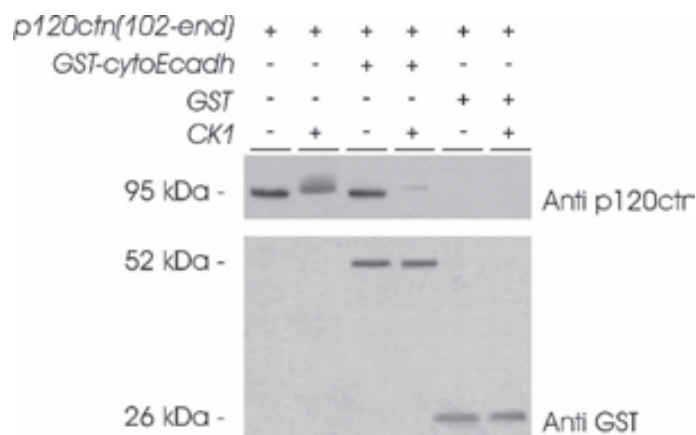


Figura 19: La fosforilació de p120ctn per CK1 disminueix la seva interacció amb E-cadherina. Es va fosforilar 1 pmol de p120ctn(102-911) amb el domini catalític de CK1. p120ctn fosforilada per CK1 i p120ctn sense modificar es van incubar amb 2,5 pmols de GST-cytoE-cadherina, o GST com a control. Els complexos es van purificar per afinitat amb glutatió-sefarosa 4B i van ser analitzats per *Western Blot* amb anticossos anti-p120ctn i anti-GST per normalitzar la quantitat de proteïna utilitzada.

Es van dur a terme assaigs d'interacció *in vitro* utilitzant proteïnes recombinants. S'observa en la Figura 20 com la fosforilació de p120ctn per CK1 no afecta la seva interacció amb Kaiso.

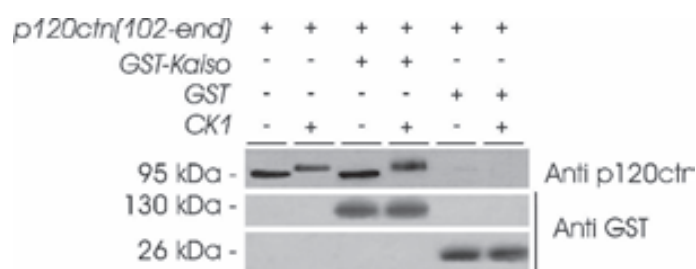


Figura 20: La fosforilació *in vitro* de p120ctn per CK1 no afecta a la interacció p120ctn/Kaiso. Es va fosforilar 1 pmol p120ctn(102-911) amb el domini catalític de CK1. p120ctn fosforilada per CK1 i p120ctn sense modificar es van incubar amb 2,5 pmols de GST-Kaiso, o GST com a control. Els complexos es van purificar per afinitat amb glutatió-sefarosa 4B i van ser analitzats per *Western Blot* amb anticossos anti-p120ctn. El blot es va reanalitzar amb GST per normalitzar la quantitat de proteïna utilitzada.

1.1.2. La fosforilació de p120 per CK1 controla de manera inversa la unió a E-cadherina i a Kaiso

Per tal de corroborar aquests canvis utilitzant un model més proper a l'entorn cel·lular, es va realitzar un assaig de *pull-down* utilitzant GST-p120ctn fosforilada per CK1, o p120ctn sense modificar, per capturar E-cadherina o Kaiso d'extractes cel·lulars procedents de cèl·lules epitelials SW480. En aquests experiments es va veure com la fosforilació de p120ctn per CK1 no tant sols disminuïa la interacció amb E-cadherina, sinó que també augmentava la interacció de p120ctn amb Kaiso (Figura 21).

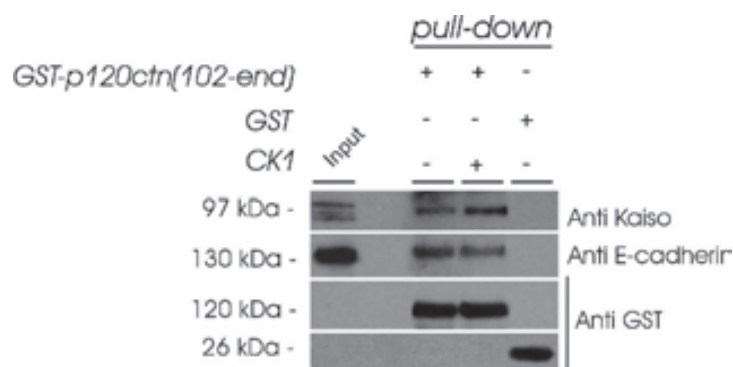


Figura 21: La fosforilació de p120ctn per CK1 modula inversament la interacció de p120ctn amb Kaiso i E-cadherina. Proteïna recombinant GST-p120ctn(102-911), o GST com a control, van ser fosforilades amb el domini catalític de CK1. 7,5 pmols de p120ctn fosforilada i control es varen incubar amb 500 µg d'extractes totals de cèl·lules SW480. Els complexos proteics es van purificar per afinitat amb glutatió-sefarosa 4B i van ésser analitzats per *Western Blot* amb els anticossos corresponents. Es va carregar com a input 5 µg dels extractes utilitzats.

1.1.3. E-cadherina i Kaiso competeixen per la unió a p120ctn

Les diferències obtingudes entre l'assaig d'interacció *in vitro* i el *pull-down* podrien ser degudes a una competició entre Kaiso i E-cadherina per p120ctn. En l'experiment d'interacció *in vitro*, a diferència del de *pull-down*, no hi ha E-cadherina present que competeixi per la unió amb Kaiso.

Per tal de veure una possible competició entre aquestes dues proteïnes per la

unió amb p120ctn, es va fer un assaig d'interacció *in vitro* amb p120ctn i GST-Kaiso en presència o no del fragment citosòlic d'E-cadherina. Tal com es pot veure en el 2on carril de la Figura 22, al afegir a la incubació cytoE-cadherina, la quantitat de p120ctn purificada amb Kaiso es redueix considerablement. Així doncs la unió de Kaiso i E-cadherina a p120ctn són mútuament excloents.

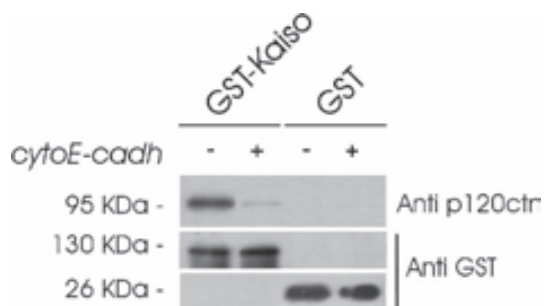


Figura 22: El fragment citosòlic d'E-cadherina competeix amb Kaiso per la unió a p120ctn. 2,5 pmols de GST i GST-Kaiso es van incubar amb 1 pmol de p120ctn(102-911) en presència o no de cytoE-cadherina (5 pmols). Els complexos es van purificar per afinitat amb glutatió-sefarosa 4B i es van analitzar per *Western Blot* amb anticossos específics.

1.1.4. La fosforilació *in vitro* d'E-cadherina per CK1 no canvia la unió d'aquesta a p120ctn

S'havia descrit que la fosforilació d'E-cadherina per CK1 afecta l'estabilitat de les unions adherents, disminuint la interacció d'aquesta amb la β -catenina [63]. Vam analitzar si aquesta fosforilació també podia afectar la unió d'E-cadherina amb p120ctn.

Es va fosforilar *in vitro* el fragment citosòlic d'E-cadherina amb CK1 i es va avaluar si canviava la unió amb p120ctn. Tal com s'observa en la Figura 23, no s'aprecien diferències d'unió entre p120ctn i l'E-cadherina fosforilada o no per CK1 (comparar carrils 2 i 3). Podem concloure que la regulació de CK1 sobre la unió E-cadherina/p120ctn només té efecte quan el substrat de la quinasa és p120ctn, tot i que és capaç de fosforilar ambdues proteïnes, tal com es pot observar per l'increment en la mobilitat electroforètica experimentat per la GST-cytoE-cadherina un cop ha estat fosforilada per CK1.

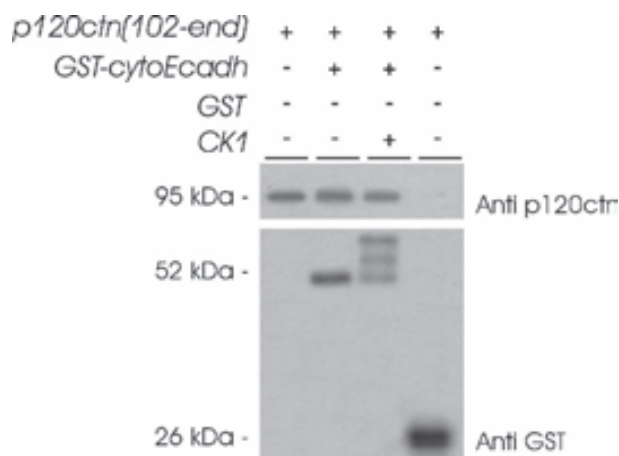


Figura 23: La fosforilació d'E-cadherina per CK1 no afecta a la unió amb p120ctn. Es van fosforilar 2,5 pmols de cytoE-cadherina-GST amb el domini catalític de CK1. 1 pmol de p120ctn es va incubar amb la cytoE-cadherina-GST fosforilada o no per CK1, o GST com a control. Els complexos es van purificar per afinitat amb glutatió-sefarosa 4B i van ser analitzats per *Western Blot* amb anticossos anti-p120ctn. El blot es va reanalitzar amb GST per normalitzar la quantitat de proteïna utilitzada.

1.2. Els residus Ser268 i Ser269 de p120ctn estan involucrats en la regulació de la interacció amb E-cadherina

1.2.1. Els residus rellevants pel control de la interacció amb l'E-cadherina es troben en la seqüència 234-347 de p120ctn

Per caracteritzar la seqüència involucrada en la regulació de la unió entre E-cadherina i p120ctn vam construir una sèrie de mutants de deleció de p120ctn. Es va reduir l'extrem N-terminal de p120ctn, donant lloc a proteïnes amb diferents llargades del domini N-terminal (Figura 24), ja que és en aquest domini on es troben la majoria de residus descrits que poden ser fosforilats, tant en Ser/Thr com Tyr [103] [234].

Vam realitzar varis assaigs d'interacció directa *in vitro* amb aquestes proteïnes recombinants fosforilades o no per CK1. Es va comparar la seva unió al fragment citosòlic d'E-cadherina. Tal com es pot observar en la Figura 25B, les formes que

Resultats

contenen el domini N-terminal més complet (1-911 i 102-911) perden completament la interacció amb E-cadherina al ser fosforilades per CK1 (carrils 1-2 i 3-4). Quan delecionem per complet el domini N-terminal (350-911), la fosforilació de CK1 no té cap efecte en la unió de p120ctn a E-cadherina (carrils 7-8). En el cas del mutant de p120ctn(234-911) es troba una situació intermèdia, disminueix la unió a E-cadherina sense arribar a perdre-la (carrils 5-6). Així doncs, la regió de p120ctn que un cop fosforilada per CK1 regula la interacció entre aquesta i l'E-cadherina es troba entre els aminoàcids 234 i 350.

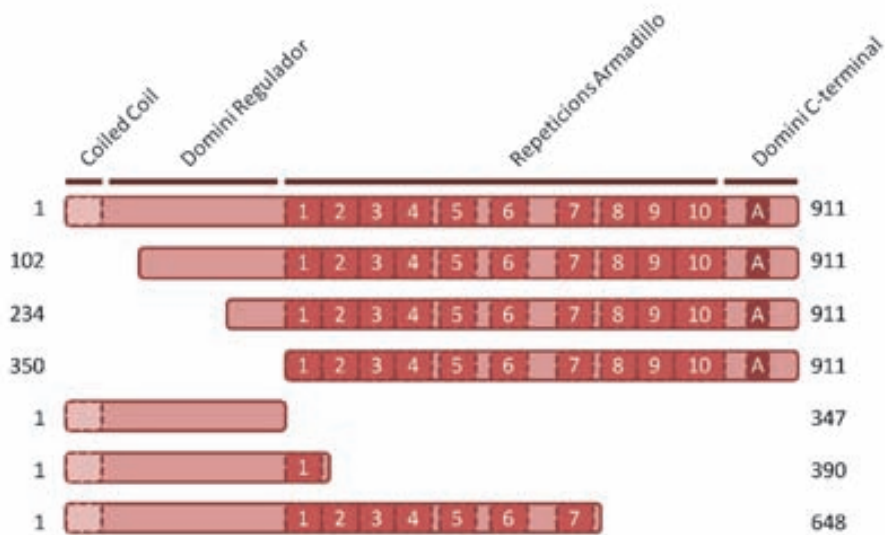


Figura 24: Diagrama dels diferents dominis de p120ctn. Es mostren aquí la llargada dels fragments de p120ctn utilitzats en aquest treball.

Tot i que en la construcció p120ctn(350-911) fosforilada per CK1 no es veuen canvis en la unió amb E-cadherina (Carrils 7-8 Figura 25), no podem descartar que també hi hagi residus involucrats en aquest efecte en el domini C-terminal. S'ha vist en altres membres de la família armadillo, com β -catenina o placoglobina, que es produeix una interacció entre els dos extrems terminals de la proteïna, i que aquesta interacció regula la unió als seus cofactors [235, 236].

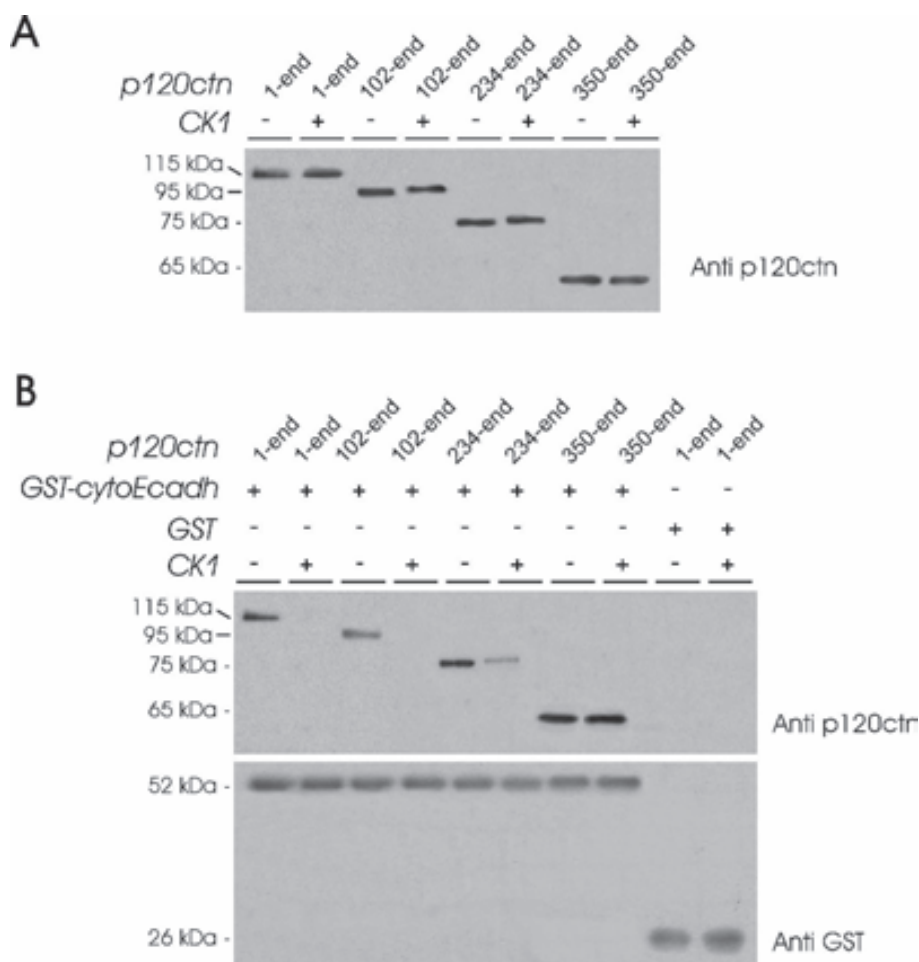


Figura 25: Els residus rellevants pel control de la unió entre p120ctn i E-cadherina es troben entre els aminoàcids 234-347. **A.** 0,1 pmols de les construccions de p120ctn, fosforilades o no per CK1, es van carregar amb a estàndards de referència. **B.** Diferents proteïnes recombinants de p120ctn incorporant diferents delecions es van fosforilar per CK1. 1 pmol de proteïna fosforilada i sense modificar es va incubar amb 2,5 pmols de GST-cytoE-cadherina, o GST com a control en un volum 200 μ l. Els complexos es van purificar per afinitat amb glutatió-sefarosa 4B i es van analitzar per *Western Blot* amb anticossos específics.

Així doncs, vam realitzar un altre assaig d'interacció utilitzant una forma de p120ctn delecionada pel seu domini C-terminal. Tal com mostra la Figura 26, la construcció p120ctn(1-648) continua essent sensible a la fosforilació per CK1, provocant la pèrdua d'interacció amb E-cadherina. Aquest resultat suggereix doncs que els residus rellevants pel control de la unió p120ctn/E-cadherina resideixen en la seqüència 234-350, i no s'afecten per la cua C-terminal de p120ctn.

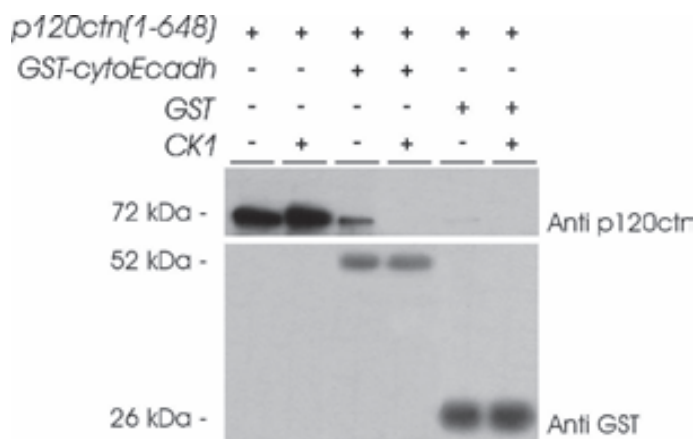


Figura 26: La fosforilació de l'extrem C-terminal de p120ctn per CK1 no afecta a la interacció amb cytoE-cadherina. La proteïna recombinant p120ctn(1-648) es va fosforilar per CK1. 1 pmol de proteïna fosforilada o no es va incubar amb 2,5 pmols de GST-cytoE-cadherina, o GST com a control. Els complexos es van purificar per afinitat amb glutatió-sefarosa 4B i es van analitzar *Western Blot* amb anticossos específics. S'han inclòs 0,1 pmol de les proteïnes fosforilades o no com a estàndards interns de referència.

1.2.2. Identificació dels residus de p120ctn fosforilats per CK1

Per corroborar que CK1 fosforilava el domini regulador de p120ctn *in vitro*, es va realitzar un assaig d'incorporació d'ATP radioactiu sobre p120ctn i el mutant p120ctn(350-911). Ja que és en el domini N-terminal on es produeixen la majoria de fosforilacions descrites, esperàvem que la p120ctn salvatge es trobés altament fosforilada. Es va realitzar un assaig de fosforilació amb ATP [γ - 32 P] i el domini catalític de la quinasa CK1.

Es va trobar una fosforilació molt menor en p120ctn(350-911) comparant-la amb la produïda sobre la p120ctn(1-911). Aquest fet indica que majoritàriament la fosforilació es produeix sobre l'extrem N-terminal de p120ctn, sobre el domini regulador.

Per tal d'identificar els residus fosforilats per CK1 es va realitzar un anàlisi per espectrometria de masses dels llocs fosforilats de p120ctn. Amb aquesta finalitat p120ctn va ser fosforilada *in vitro* per CK1 i va ser analitzada comparant-la amb p120ctn sense fosforilar.

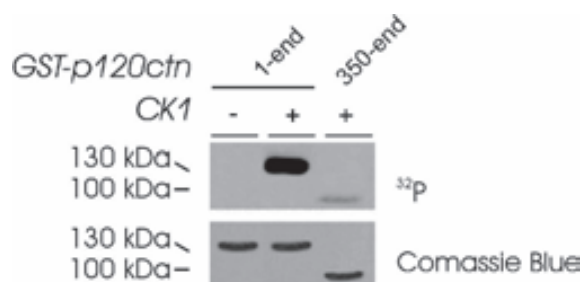


Figura 27: CK1 fosforila el domini N-terminal de p120ctn. 0,1 pmols de p120ctn(1-911) i p120ctn(347-911) es van fosforilar en presència de 0,1 mM d'ATP [γ - 32 P] amb 10 mU de CK1(1000 cpm/pmol) durant 2h a 30°C. Autoradiografia exposada 12h a -80°C (panell superior) i normalització per tinció del gel amb Coomassie Blue (panell inferior).

Aquest anàlisi va indicar, tal com ja esperàvem, que el fosfat s'incorpora majoritàriament en els primers 347 aminoàcids de la proteïna (veure Figura 28). L'anàlisi proteòmic va identificar varis residus: Ser 47, 53, 252, 268, 269, 610, 858, 878 i la Thr 879. Per a un posterior estudi utilitzant mutants puntuals vam descartar la S53 i la S610 ja que aquestes no es troben conservades entre diferents organismes.

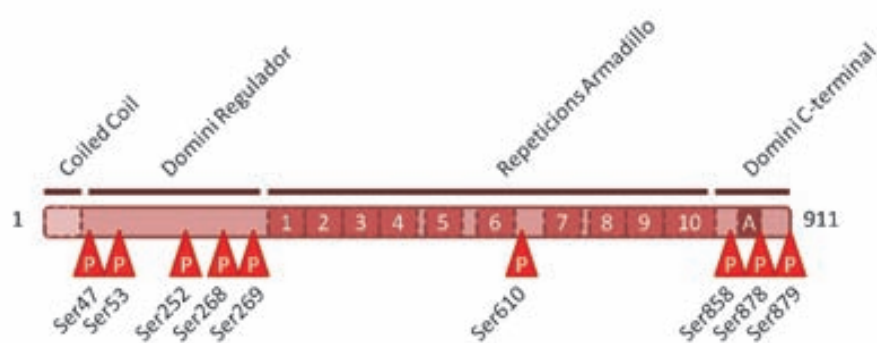


Figura 28: Diagrama dels residus fosforilats per CK1 en p120ctn identificats.

A la regió 234-347, que prèviament havíem identificat crítica per la regulació de la interacció E-cadherina/p120ctn, trobem les Ser: 252, 268 i 269.

Homo sapiens	248	YRAPSRQDVY GPQPQVRVGG SSV DLHRFHP	277
Pan troglodytes	248	YRAPSRQDVY GPQPQVRVGG SSV DLHRFHP	277
Mus musculus	248	YRAPSRQDVY GPQPQVRVGG SSV DLHRFHP	277
Rattus norvegicus	147	YRAPSRQDVY GPQPQVRVGG SSV DLHRFHP	176
Bos taurus	248	YRAPSRQDVY GPQPQVRVGG SSV DLHRFHP	277
Canis familiaris	248	YRAPSRQDVY GPQPQVRVGG SSV DLHRFHP	277

Figura 29: Seqüència alineada de la regió 248-277 de p120ctn. Es representen en vermell les serines detectades a la regió 234-347 fosforilades per CK1. Els residus conservats es marquen en turquesa, i els estructuralment conservats en blau.

1.2.3. La fosforilació de les Ser268 i Ser269 de p120ctn controla la interacció amb l'E-cadherina

Es desconeixen els efectes cel·lulars de la modificació en Ser/Thr de p120ctn. Sembla que la fosforilació en Ser/Thr es produeix a la membrana plasmàtica de manera constitutiva, però encara no s'ha pogut identificar cap funció concreta ni per residus individuals ni de forma col·lectiva. La S268 és una d'aquestes, i s'ha vist que el tractament amb Staurosporine, un inhibidor d'ampli espectre de proteïna-quinases, condueix a la seva desfosforilació. El tractament amb *Staurosporine* correlaciona amb un increment de l'adhesió en cèl·lules Colo205 [237]. Segons els nostres resultats aquest fet podria encaixar amb un increment en la interacció p120ctn/E-cadherina, vam decidir doncs construir el doble mutant S268/S269.

Per tal d'estudiar quin paper té la fosforilació sobre aquests dos aminoàcids en el control de la unió entre p120ctn i E-cadherina, vam utilitzar un mutant on varem reemplaçar aquestes serines per alanines (S268A/S269A), prevenint-ne així la fosforilació. En realitzar un assaig d'interacció *in vitro* amb proteïnes recombinants, s'observa com aquest mutant, a diferència de p120ctn salvatge (Figura 30A) és insensible a la fosforilació per CK1, indicant la rellevància d'aquests dos aminoàcids. Per corroborar la implicació d'aquests dos residus, les Ser268/Ser269 van ser substituïdes per aspàrtic (S268D/S269D), que en introduir una càrrega negativa a la seqüència, mimetitza la fosforilació. Aquest mutant uneix el fragment citosòlic de l'E-cadherina amb molta menys afinitat que la proteïna salvatge (Figura 30B).

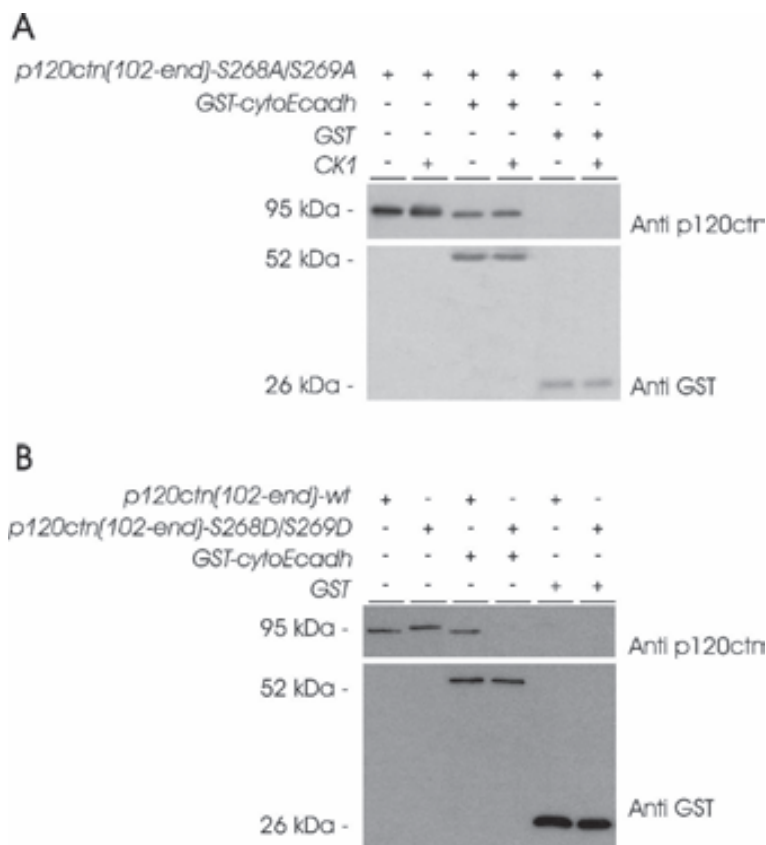


Figura 30: La modificació de les S268/S269 controla l'afinitat de p120ctn per E-cadherina. **A. La substitució de les Ser 268/269 per Ala insensibilitza p120ctn a la fosforilació per CK1.** La proteïna recombinant p120ctn(S268A/S269A) va ser fosforilada per CK1. 1 pmol de p120ctn(S268A/S269A), fosforilades o no, es va incubar amb 2,5 pmols de GST-cytoE-cadherina, o GST com a control. Els complexos es van purificar per afinitat amb glutatió-sefarosa 4B i es van analitzar posteriorment per *Western Blot* amb anticossos específics. **B. La substitució de Ser268/269 per Asp disminueix la afinitat de p120ctn per E-cadherina.** 1 pmol de p120ctn salvatge i p120ctn(S268D/S269D) es van incubar amb 2,5 pmols de GST-cytoE-cadherina o GST com a control. Els complexos es van purificar per afinitat amb glutatió-sefarosa 4B i es van analitzar posteriorment per *Western Blot* amb anticossos específics.

1.2.4. La fosforilació de les S268/S269 de p120ctn contribueix a la regulació de l'associació p120ctn/Kaiso

Havent vist com la modificació específica de les S268/S269 controla la unió entre p120ctn i E-cadherina, varem procedir a estudiar quin efecte tenia en la unió de p120ctn a Kaiso. Un assaig de *pull-down* amb aquests mutants fosforilats o no per CK1

Resultats

mostra que la p120ctn(S268A/S269A) encara és sensible a la fosforilació per CK1 (Figura 31, carrils 4 i 5). Aquest mutant fosforilat, tot i que d'una manera menys acusada que la p120ctn salvatge (carrils 2 i 3), presenta una major associació a Kaiso. A més, la p120ctn(S268D/S269D) ja s'associa millor a Kaiso que la forma salvatge, tot i que menys que la p120ctn fosforilada per CK1 (comparar carrils 2, 3 i 6). Aquests resultats indiquen que, tot i que la fosforilació dels residus 268 i 269 augmenten l'afinitat per Kaiso, la modificació d'altres residus encara per identificar també hi pot contribuir.

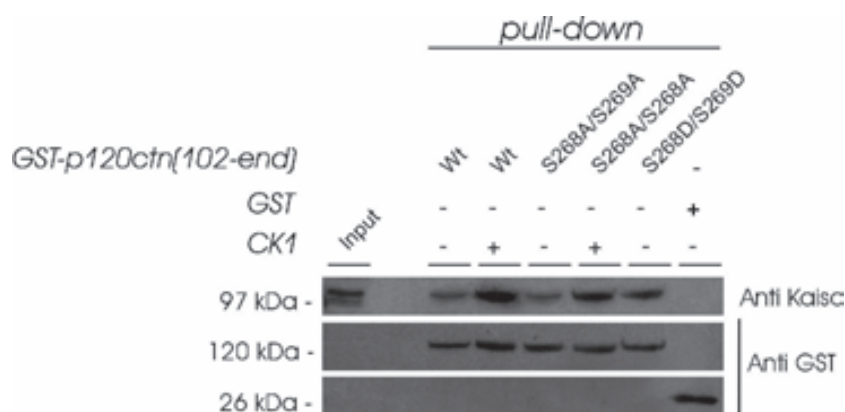


Figura 31: La fosforilació de les S268/S269 de p120ctn contribueix a la regulació de l'associació p120ctn/Kaiso. Les proteïnes recombinants GST-p120ctn salvatge, GST-p120ctn(S268A/S269A) van ser fosforilades amb CK1. 7,5 pmols de GST-p120ctn salvatge, GST-p120ctn(S268A/S269A), GST-p120ctn(S268D/S269D) i GST, fosforilades o no, es varen incubar amb 600 µg d'extractes totals de cèl·lules SW480. Els complexos proteïcs es van purificar per afinitat amb glutatió-sefarosa 4B i van ésser analitzats per *Western Blot* amb els anticossos corresponents. Es va carregar com a input 25 µg dels extractes utilitzats.

1.2.5. La modificació dels residus S268/S269 controla de manera inversa l'afinitat de p120ctn per E-cadherina i Kaiso

Per poder estudiar les fosforilacions en serines de p120ctn diversos anticossos monoclonals fosfoespecífics contra diferents residus de p120ctn havien estat generats pel grup del Dr. A. Reynolds [234, 238]. Un d'aquests va ser dissenyat per detectar la fosforilació en la S268 de p120ctn, i ens fou cedit pel Dr. Albert Reynolds. Vam provar l'especificitat d'aquest anticòs per detectar la p120ctn recombinant fosforilada o no per CK1. Aquest anticòs va ser capaç de reaccionar amb la p120ctn fosforilada per

CK1, però no amb la proteïna sense modificar. A més, tampoc va reaccionar amb la p120ctn(S268A/S269A), fosforilada o no per CK1(Figura 32), demostrant així la seva especificitat pel residu S268 fosforilat. Aquesta eina la vam utilitzar doncs per analitzar l'estat de fosforilació de la S268 de p120ctn en línies cel·lulars.

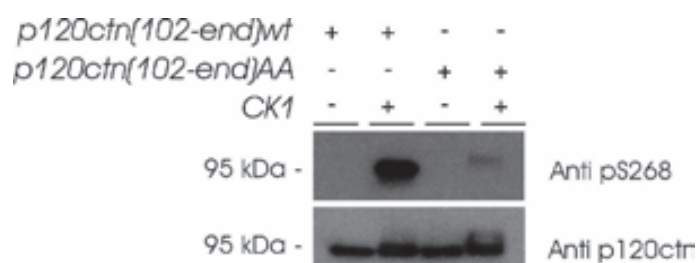


Figura 32: Especificitat de l'anticòs anti-p120ctn-S268. 1 pmol de GST-p120ctn salvatge recombinant i el mutant puntual S268A/S269A van ser fosforilades pel domini catalític de CK1. La fosforilació d'aquestes proteïnes va ser analitzada per electroforesi de SDS-poliacrilamida i *Western Blot* utilitzant l'anticòs específic anti-p120ctn-S268.

Per tal de corroborar els experiments realitzats *in vitro*, es van generar construccions d'aquestes proteïnes (p120ctn salvatge i els mutants S268A/S269A i S268D/S269D) per expressar en eucariotes, fusionades al tag GST per facilitar-ne la purificació. Aquestes van ser transfectades en la línia cel·lular SW480. Posteriorment vam obtenir extractes totals i vam purificar aquestes proteïnes per tal d'analitzar la quantitat d'E-cadherina i Kaiso que coprecipitava.

Tal com es pot observar en la Figura 33, es pot detectar fosforilació en la S268 en la construcció salvatge, però no en el doble mutant puntual S268A/S269A ni en el S268D/S269D. Aquest fet indica que part de la p120ctn ja es troba fosforilada en condicions basals. La unió a E-cadherina és lleugerament major en el mutant S268A/S269A que en la p120ctn salvatge (comparar carrils 6 i 7), mentre que decreix en el mutant S268D/S269D (carril 8). Tal com esperàvem, els efectes en Kaiso són oposats; mentre que el mutant S268D/S269D uneix més quantitat de Kaiso, el S268A/S269A mostra una associació menor que la forma salvatge.

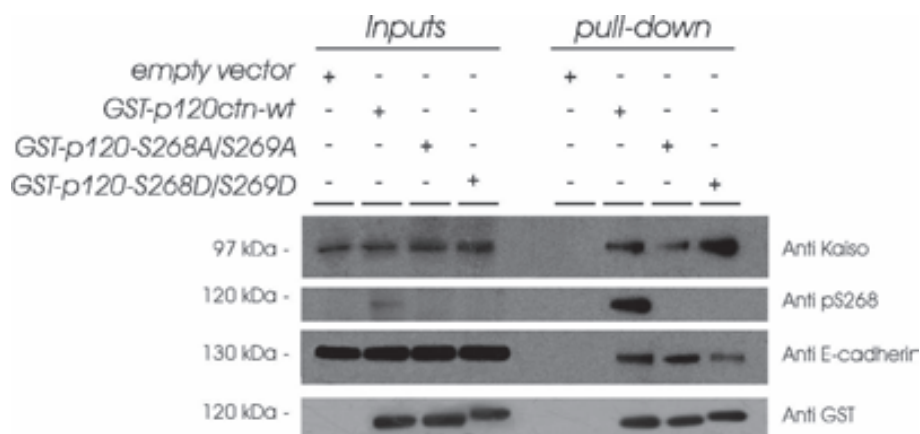


Figura 33: La fosforilació de la S268 modula la interacció de p120ctn amb E-cadherina i Kaiso. Cèl·lules SW480 es van transfectar amb plasmidis que codificaven diferents GST-p120ctn(1-911) (salvatge, i els mutants puntuals S268A/S269A i S268D/S269D) o el plasmidi buit com a control. Després de 48h d'expressió es van preparar extractes totals i les proteïnes exògenes van ser purificades per afinitat utilitzant glutatió-sefarosa 4B. Posteriorment van ser analitzades per electroforesis en SDS-poliacrilamida i Western blot amb anticossos específics. En els inputs es va carregar 25 µg d'extracte total.

1.3. CK1ε s'uneix a p120ctn i la fosforila *in vivo*

1.3.1. CK1ε interacciona amb p120ctn

Hem demostrat que el domini catalític de CK1 fosforila p120ctn *in vitro*, i com aquesta fosforilació regula la interacció de p120ctn amb E-cadherina i Kaiso. S'ha descrit que CK1α i CK1ε coprecipiten amb E-cadherina en assaigs de *pull-down* [63]. Existeix la possibilitat doncs que certes isoformes de CK1 presents a la membrana controlin la unió de p120ctn a E-cadherina. En un assaig d'immunoprecipitació de p120ctn es va analitzar quines isoformes de CK1 es trobaven associades a aquesta. CK1ε i CK1α eren les millors candidates, ja que s'havien localitzat a les unions adherents i a més participen en la regulació de la via de Wnt [revisat a [221]]. Tal com mostra la Figura 34, es va trobar la isoforma CK1ε associada a p120ctn però no pas CK1α.

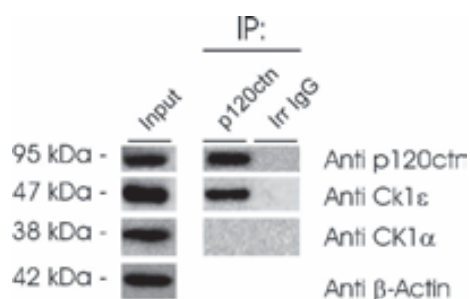


Figura 34: p120ctn s'associa a CK1 ϵ però no a CK1 α . Es va immunoprecipitar p120ctn a partir d'extractes totals de SW480. Les proteïnes associades es van analitzar per electroforesis en gel SDS-poliacrilamida i *Western Blot* amb anticossos específics contra CK1 ϵ i CK1 α .

1.3.2. La seqüència 234-390 de p120ctn està implicada en la interacció amb CK1 ϵ

p120ctn és fosforilada per CK1 *in vitro*, i a més aquesta quinasa coimmunoprecipita amb p120ctn. És probable doncs que CK1 ϵ i p120ctn interaccionin directament. Vam intentar delimitar la zona de p120ctn on es produeix la interacció amb CK1 ϵ portant a terme un assaig de *pull-down* amb les diferents construccions de p120ctn fusionades a GST. Tal com mostra la Figura 35, CK1 ϵ es troba associada als fragments de p120ctn 1-390 i 234-911, i no a les formes 1-347 i 350-911 (comparar carrils 2-3 i 5-6), suggerint que CK1 ϵ interacciona amb p120ctn a través de la seqüència 234-390. Tal com ja havíem observat, l'extrem N-terminal de p120ctn(1-347) per si sol no pot unir correctament CK1 ϵ , i la construcció de p120ctn on s'ha deletat aquest domini terminal (350-911) presenta una interacció feble (carril 6). No obstant, la preincubació de la construcció p120ctn(350-911) amb l'extrem N-terminal (1-347) permet recuperar la unió de CK1 ϵ (carril 7). Aquest fet indicaria que els dos dominis de p120ctn interaccionen, i recuperariem el lloc d'unió de CK1 ϵ .

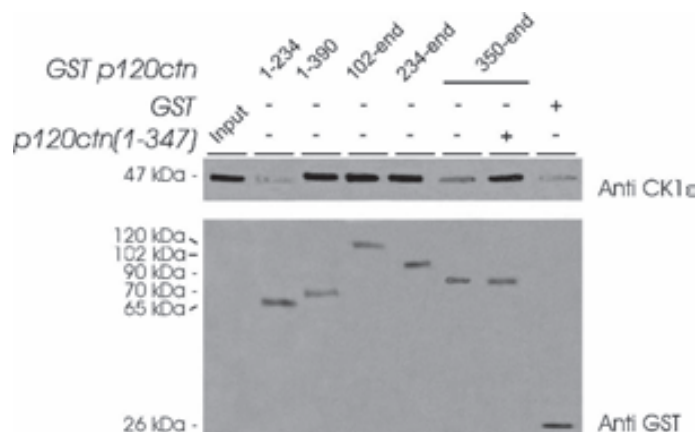


Figura 35: La CK1ε s'associa a la regió 234-390 de p120ctn. Es va realitzar un assaig de *Pull-Down* utilitzant 10 pmols de les diferents formes delecionades de la proteïna de fusió GST-p120ctn amb 400 µg d'extractes totals de cèl·lules SW480. 20 pmols de p120ctn(1-347) han estat suplementats en la incubació quant s'indica. Els complexos van ésser purificats per afinitat amb glutatió-sefarosa 4B i analitzats per *Western Blot* amb anticòs anti-CK1ε i anti-GST per assegurar una correcta normalització. Es carregaren com a input 5 µg de l'extracte utilitzat.

Tenint en compte que la unió de p120ctn amb CK1ε es produeix pel segment 234-390, i que la unió amb E-cadherina és a través del domini armadillo, deduïm que la unió de CK1ε no es produeix a través d'E-cadherina, tal com es pot deduir de l'article de Dupre-Crochet et al, 2007. Pensem doncs que la unió CK1ε/p120ctn es produeix de forma directa, i que la CK1ε que coprecipita amb E-cadherina ho fa a través de la unió amb p120ctn.

1.3.3. CK1ε controla la unió de p120ctn amb E-cadherina i Kaiso en línies cel·lulars

Per tal de comprovar l'efecte de CK1ε en línies cel·lulars, es van tractar les cèl·lules SW480 amb un inhibidor de CK1, *IC261*. Aquest inhibidor químic ha demostrat una gran especificitat per les formes δ ($IC_{50} = 1,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$) i ε ($IC_{50} = 1,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$) de CK1, i amb un ordre de magnitud més gran per CK1α ($IC_{50} = 16 \pm 5 \mu\text{M}$). Aquest inhibidor no afecta a altres quinases a les concentracions inhib tòries requerides per la inhibició de CK1ε ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ per PKA, p34^{cdc2} i p55^{fyn}) [239]. Les cèl·lules van ser

tractades per l'inhibidor durant 4h, es va immunoprecipitar la p120ctn i es va analitzar la fosforilació en la S268, i l'associació de p120ctn amb Kaiso i E-cadherina.

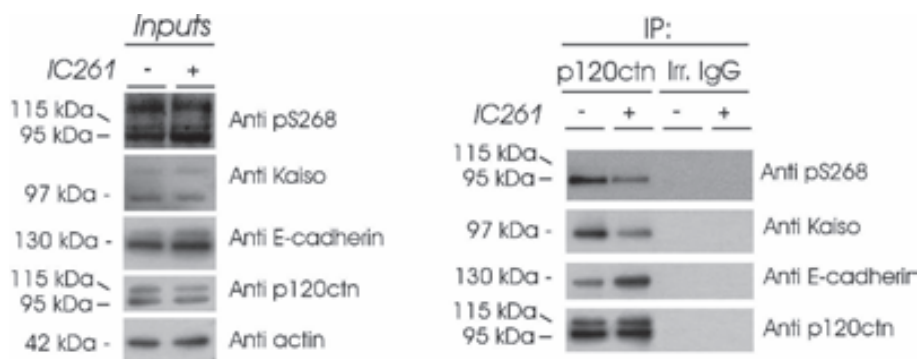


Figura 36: La inhibició de CK1 incrementa la unió p120ctn/E-cadherina i disminueix la fosforilació en la S268 de p120ctn així com la seva unió a Kaiso. Cèl·lules SW480 van ser tractades amb l'inhibidor de CK1 IC261 (15 μ M) durant 4h. Es va immunoprecipitar p120ctn de 500 μ g d'extractes totals de cèl·lules tractades i no amb aquest, i les proteïnes associades es van analitzar posteriorment per electroforesi de SDS-poliacrilamida i *Western Blot* amb anticossos específics.

Tal com es pot observar en la Figura 36, l'inhibidor de CK1 IC261 redueix la fosforilació en la S268 de p120ctn. Aquest fet correlaciona amb la davallada de la interacció de p120ctn amb Kaiso i un increment de la unió p120ctn/E-cadherina, suggerint que aquesta fosforilació de p120ctn podria regular la localització diferencial de p120ctn a les unions adherents (en absència de fosforilació per CK1) o bé interaccionant amb el factor transcripcional Kaiso.

Durant la realització de l'experiment es va observar un canvi fenotípic en algunes de les línies cel·lulars utilitzades al llarg del treball. Tal com es pot observar en la Figura 37, el tractament amb IC261 de línies cel·lulars amb característiques mesenquimals augmenta de manera dràstica la formació de contactes entre cèl·lules. Aquest resultat reforça la hipòtesi que l'activitat de CK1 té un efecte negatiu en l'estabilitat de les unions adherents. En el cas de la línia cel·lular SW480, que mostra un fenotip epitelial, augmenta també la formació de contactes, però de manera molt més lleu.

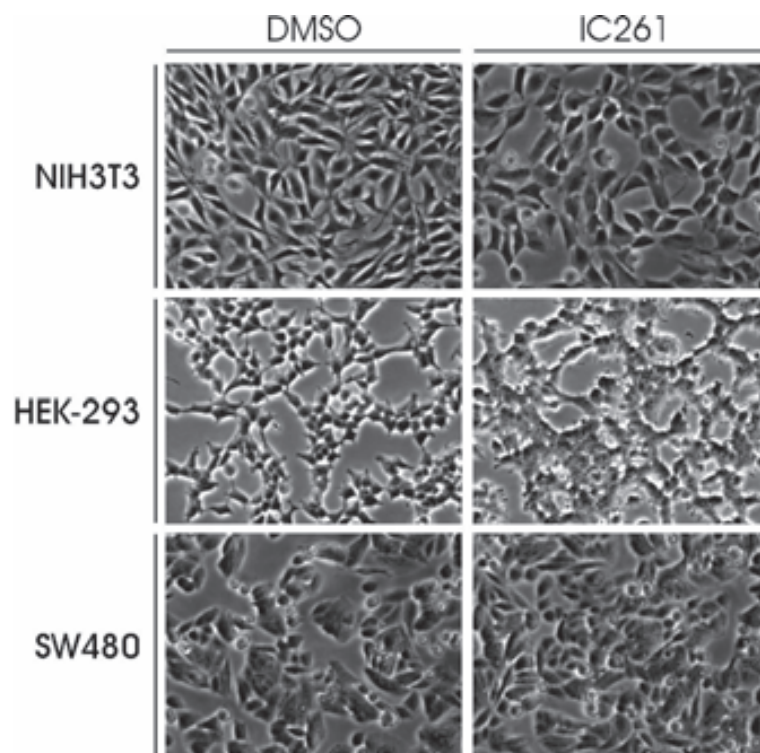


Figura 37: El tractament amb l'inhibidor de CK1 IC261 afavoreix un fenotip epitelial. Cèl·lules NIH3T3, HEK-293 i SW480 van ser tractades amb IC261 15 μ M o DMSO com a control durant 3h. Posteriorment es van observar els canvis morfològics en un microscopi de transmissió.

Tot i que els inhibidors químics poden ser bastant selectius, no es pot descartar una reacció creuada amb una altra quinasa. Per aquest motiu es va dur a terme un assaig amb un RNA d'interferència contra la quinasa CK1 ϵ . Es va seleccionar precisament CK1 ϵ , en haver trobat aquesta isoforma unida directament a p120ctn, i ja que l'inhibidor IC261 presenta una especificitat major per aquesta isoforma.

Es va transfectar un shRNA específic per a la CK1 ϵ humana en SW480 o un shRNA irrellevant com a control, i es van seleccionar aquestes cèl·lules amb puromicina, obtenint una reducció d'un 80% en els nivells de proteïna. Es va immunoprecipitar p120ctn de cèl·lules interferents per CK1 ϵ i control, i es va analitzar les proteïnes associades.

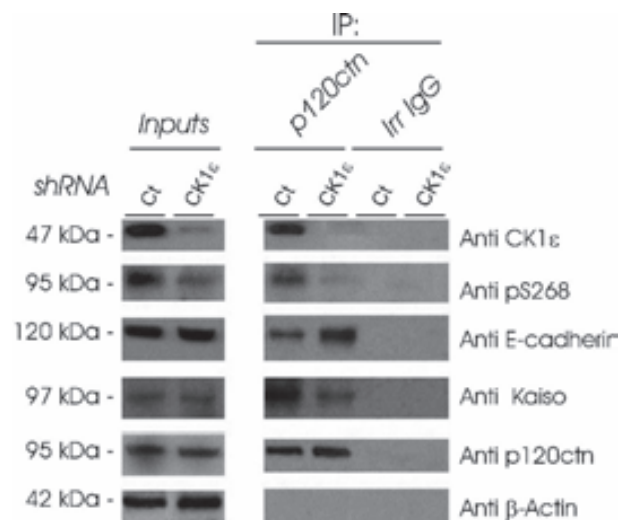


Figura 38: La quinasa CK1 ϵ controla la funció de p120ctn. Es van transfectar cèl·lules SW480 amb un shRNA específic per a la isoforma humana de CK1 ϵ o amb un shRNA inespecífic com a control. Després de la selecció amb 2 μ g/ml amb puromicina, es va immunoprecipitar p120ctn de 300 μ g d'extracte totals. Es van analitzar les proteïnes per *Western Blot* amb anticossos específics. Es van carregar 30 μ g com a inputs.

Es mostra a la Figura 38 com la reducció dels nivells de CK1 ϵ correlaciona amb una disminució de la fosforilació en la S268 de p120ctn (comparar carrils 1-2), sense afectar la quantitat total de les altres proteïnes estudiades. Com es pot observar en els carrils 3-4, la reducció de la CK1 ϵ associada a p120ctn coincideix amb una disminució de la quantitat de Kaiso coprecipitat, i un increment de la E-cadherina associada. Aquest experiment revela com concretament la isoforma CK1 ϵ controla la funció de p120ctn. La fosforilació de la Ser268 de p120ctn disminueix l'afinitat per E-cadherina, alliberant a p120ctn del complex de les unions adherents. Aquesta modificació, junt amb altres encara desconegudes (mirar apartat 1.2.4), incrementa la unió p120ctn/Kaiso, promovent la desrepressió dels gens regulats per aquest factor de transcripció.

1.4. Wnt activa CK1 ϵ

1.4.1. L'activitat de CK1 ϵ es regula per Wnt

Demostrat que la CK1 ϵ modifica la Ser268 de p120ctn, promovent un canvi de funcionalitat d'aquesta catenina que passa d'interaccionar amb l'E-cadherina a les unions adherents a interaccionar amb el repressor transcripcional Kaiso, volíem analitzar quin senyal activava aquesta fosforilació.

S'havia descrit que l'activació de CK1 ϵ es pot produir per l'estimulació de Wnt8 [183]. Ens va semblar plausible doncs que Wnt pogués controlar la fosforilació de p120ctn a través de CK1 ϵ . A més, s'havia descrit que els complexos Kaiso/p120ctn i Tcf4/ β -catenina regulen un mateix subconjunt de gens de la via de Wnt. Quan la β -catenina s'allibera de les unions adherents es transloca al nucli, on interacciona amb membres de la família de factors de transcripció Tcf i regula l'expressió d'una gran varietat de gens, incloent-ne d'involucrats en el desenvolupament embrionari i en la progressió tumoral. La translocació nuclear de β -catenina s'estimula per Wnt en prevenir-ne la degradació citoplasmàtica. Estudis en *Xenopus laevis* han demostrat que p120ctn allibera la repressió causada per Kaiso en gens diana de Wnt [119]. Així l'activació de la ruta de Wnt podria controlar ambdós processos incrementant així l'expressió de gens diana de Wnt.

Es va utilitzar un medi condicionat procedent de fibroblastos L transfectats establement amb un plasmidi d'expressió de Wnt3a (membre de la via canònica de Wnt). Es van estimular cèl·lules SW480 amb el medi condicionat o control, i es va immunoprecipitar p120ctn, analitzant la fosforilació de la Ser268 i les proteïnes associades.

Tal com s'observa en la Figura 39, l'estimulació per Wnt provoca un augment en la fosforilació de la S268 de p120ctn (carrils 1-2 i 4-5). En aquests mateixos carrils podem observar com l'activació de la via incrementa la afinitat de p120ctn per Kaiso i disminueix l'afinitat per l'E-cadherina reduint doncs l'ancoratge de p120ctn a les unions adherents. Al tractar les cèl·lules amb l'inhibidor de CK1 IC261 revertim els efectes causats per l'estimulació de Wnt (carrils 3 i 6).

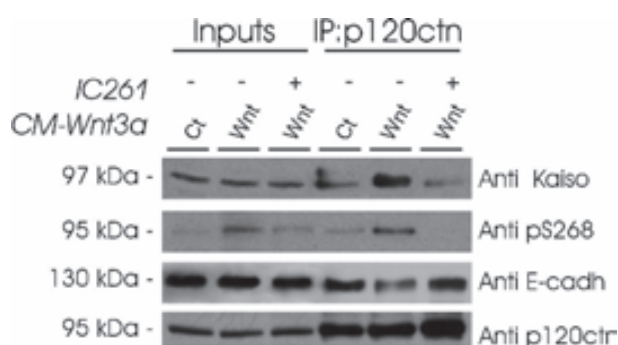


Figura 39: Wnt3a indueix una fosforilació de p120ctn que correlaciona amb un increment d'afinitat per Kaiso i una reducció de la unió a E-cadherina. L'inhibidor de CK1 IC261 bloqueja aquests efectes. Es van tractar cèl·lules SW480 amb medi condicionat amb Wnt3a durant 4h. En els punts on s'indica es va afegir IC261 15µM durant el mateix temps, o DMSO com a control. Es van preparar extractes totals i es va immunoprecipitar p120ctn. Els complexos es van analitzar per *Western Blot* amb els anticossos indicats. En els inputs es van carregar una mostra del 5% dels extractes utilitzats.

Hem demostrat anteriorment que la fosforilació de la S268 de p120ctn és produïda per CK1ε; també hem observat que la utilització de l'inhibidor de CK1 IC261 bloqueja aquesta fosforilació induïda per Wnt. Per demostrar que l'efecte provocat per Wnt és a través de CK1ε, es va transfectar un shRNA interferent específic per la forma humana de CK1ε, o amb un shRNA irrellevant com a control, a les cèl·lules SW480.

Tal com s'observa en els inputs de la Figura 40, la disminució dels nivells de CK1ε va reduir també la fosforilació de la S268 de p120ctn, bloquejant l'increment de fosforilació causat per Wnt (comparar carrils 1-4). No es van observar canvis en els nivells de CK1α ni de les altres proteïnes estudiades. Quan s'analitza l'E-cadherina unida a p120ctn (carrils 5-8), veiem com la depleció de CK1ε no només ha reduït la fosforilació de la Ser 268 induïda per Wnt, sinó que ha mantingut p120ctn a les unions adherents, bloquejant a la vegada la unió a Kaiso induïda per aquest factor.

Si ens fixem en els carrils 5-6, observem que el tractament amb Wnt no modifica la unió de CK1ε amb p120ctn. La nostra primera hipòtesis era que, com que la majoria de membres de la família CK1 es regulen per reclutament a la zona on actuen [213],

Wnt provocaria un increment en la unió de CK1 ϵ a les unions adherents a través de p120ctn. Aquest experiment demostra que això no és així.

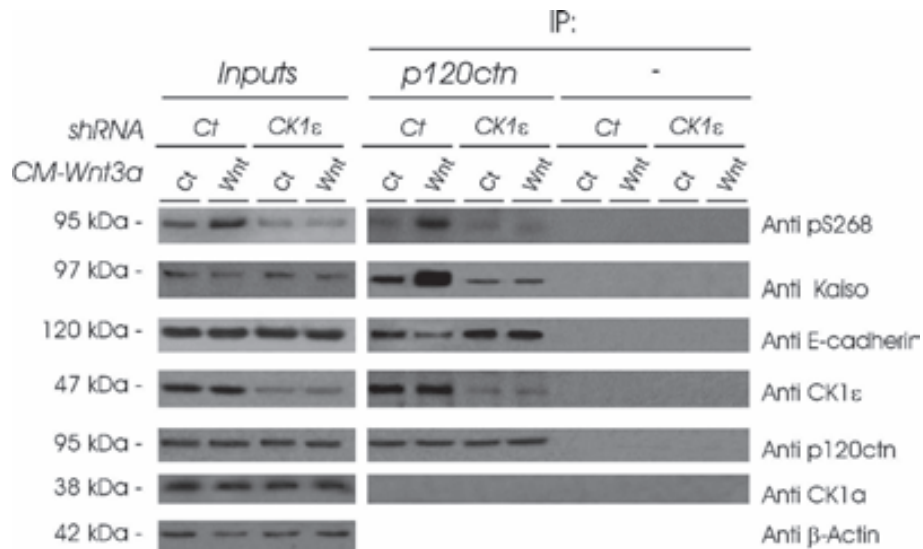


Figura 40: Wnt, a través de CK1 ϵ , controla la funció de p120ctn. Es van transfectar cèl·lules SW480 amb un shRNA interferent per CK1 ϵ , o bé un d'irrellevant. Després de la selecció amb 2 μ g/ml de puomicina, les cèl·lules es van tractar amb medi condicionat amb Wnt3a o control durant 4h. Es van preparar extractes totals i es va immunoprecipitar p120ctn. Els complexos es van analitzar per *Western Blot* amb els anticossos indicats. En els inputs es van carregar una mostra de 5% dels extractes utilitzats.

Cal remarcar però que CK1 ϵ i CK1 δ , a diferència de la resta de membres de la família CK1, tenen un domini auto-regulador. Quan la quinasa és inactiva aquest domini es troba autofosforilat i bloqueja el centre catalític, impedit l'accés del substrat. Aquest domini regulador es pot desfosforilar per fosfatases i reactivar-se. La nostra següent hipòtesi va ser que la CK1 ϵ present a les unions adherents unida a p120ctn es trobava inactiva, i que era l'estimulació per Wnt el que l'activava.

Per tal d'avaluar aquesta possibilitat, vam immunoprecipitar directament CK1 ϵ o p120ctn de cèl·lules SW480 estimulades o no per Wnt. Es van utilitzar aquests precipitats per fosforilar GST-p120ctn exògena *in vitro*. Es va analitzar l'activitat de la quinasa detectant amb l'anticòs específic anti-fosfoS268 la fosforilació produïda sobre la GST-p120ctn recombinant.

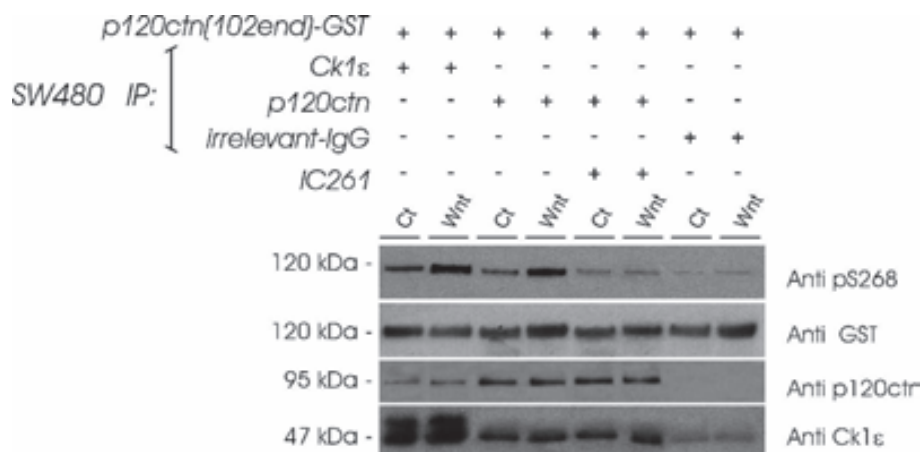


Figura 41: Wnt activa CK1ε. Es van tractar cèl·lules SW480 amb medi control o condicionat amb Wnt3a durant 2h. Es prepararen extractes totals i es va immunoprecipitar CK1ε i p120ctn (200 µg). Els complexos immunoprecipitats es van incubar amb 2 pmols de GST-p120ctn (120-911) en condicions de fosforilació de CK1 en presència o no de l'inhibidor de CK1 *IC261*. La fosforilació en la S268 es va analitzar per *Western Blot* amb un anticòs específic anti-p120ctn-S268.

Tant la CK1ε immunoprecipitada directament o la coimmunoprecipitada amb p120ctn és més activa quan les cèl·lules han estat prèviament tractades amb Wnt (carris 1-2 i 3-4). Per corroborar l'especificitat d'aquesta quinasa es va afegir *IC261*, l'inhibidor de CK1, en el tub de reacció. Veiem com en presència de l'inhibidor la fosforilació de la S268 de p120ctn queda bloquejada (carrils 5-6).

Aquest experiment demostra que Wnt augmenta l'activitat de CK1ε, probablement a través de l'activació o reclutament d'una fosfatasa que desfosforila el motiu autoregulator de CK1ε.

1.5. Wnt controla a través del complex p120ctn/CK1ε la localització nuclear de Kaiso

1.5.1. La localització de Kaiso es regula per Wnt a través de p120ctn/CK1ε

La repressió gènica mitjançada per Kaiso requereix la localització nuclear d'aquest factor. Vam comparar, realitzant una immunofluorescència de Kaiso, la seva

localització en diferents línies cel·lulars. Tal com es pot observar en la Figura 42, en totes les línies cel·lulars estudiades Kaiso té una localització predominantment nuclear.

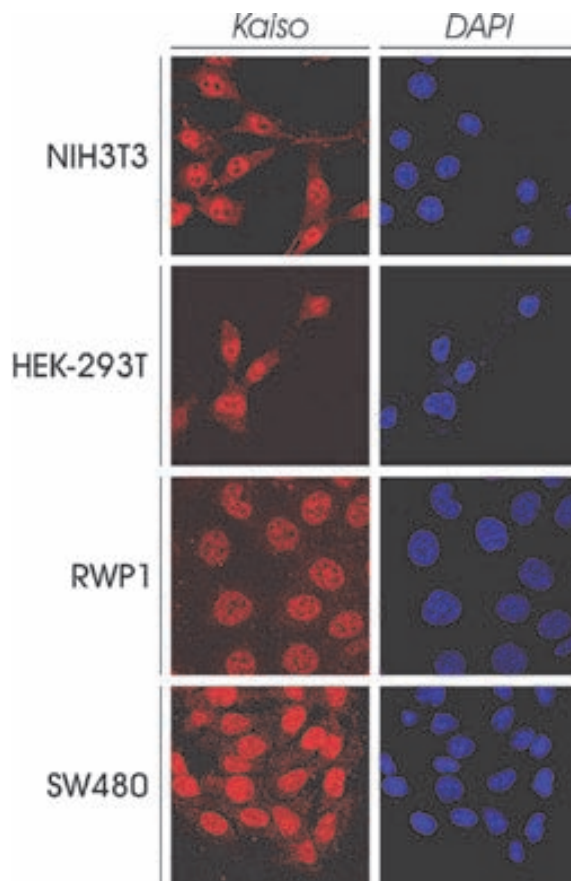


Figura 42: El repressor nuclear Kaiso es troba localitzat al nucli en cèl·lules en cultiu. Es va realitzar un anàlisi de localització subcel·lular de Kaiso (vermell) en diferents línies cel·lulars. Es va detectar per immunofluorescència utilitzant un anticòs contra Kaiso. No es va obtenir senyal quan el mateix procés es va realitzar sense la utilització d'anticòs primari. Es va utilitzar DAPI per tenyir els nuclis.

Ha estat descrit anteriorment que la sobreexpressió de p120ctn provoca una sortida del Kaiso nuclear, permetent així l'expressió dels gens regulats per Kaiso [240]. Vam reproduir aquesta translocació de Kaiso en cèl·lules HEK-293T, SW480 i HT29 M6, transfectant GFP-p120ctn i realitzant una immunofluorescència de Kaiso per seguir com es distribuïa aquesta proteïna en les cèl·lules que sobreexpressen p120ctn, o GFP com a control. Tal com es pot observar en la Figura 43, la sobre-expressió de GFP-p120ctn provoca una sortida de Kaiso del nucli.

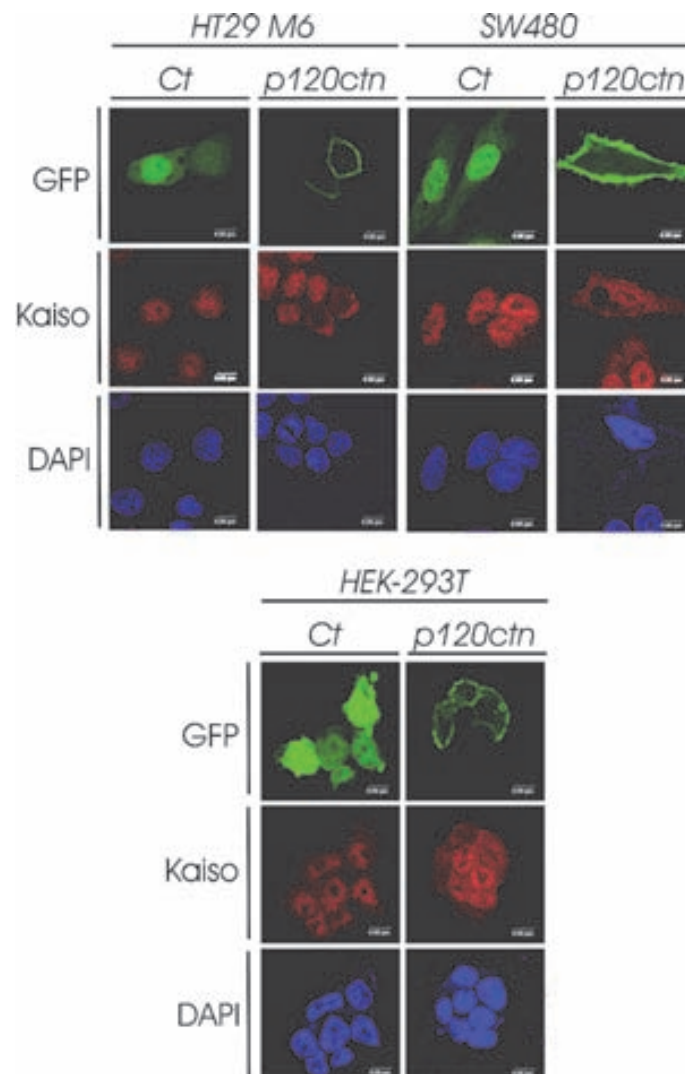


Figura 43: La sobreexpressió de p120ctn disminueix els nivells nuclears de Kaiso. Es van transfectar cèl·lules HEK-293T, SW480 i HT29 M6 amb GFP-p120ctn o GFP com a control. Es va realitzar un anàlisi de localització subcel·lular de Kaiso (vermell) en presència de GFP-p120ctn sobreexpressada (verd). Es va detectar Kaiso per immunofluorescència utilitzant un anticòs específic. No es va obtenir senyal quan el mateix procés es va realitzar sense la utilització d'anticòs primari. Es va utilitzar DAPI per tenyir els nuclis.

Algunes de les línies cel·lulars estudiades però, presentaren una resistència a la deslocalització de Kaiso provocada per p120ctn. Es va observar com en sobreexpressar GFP-p120ctn en les línies cel·lulars IEC-18, HCT-116 i NIH3T3, no es produïa l'export nuclear del factor de transcripció (Figura 43).

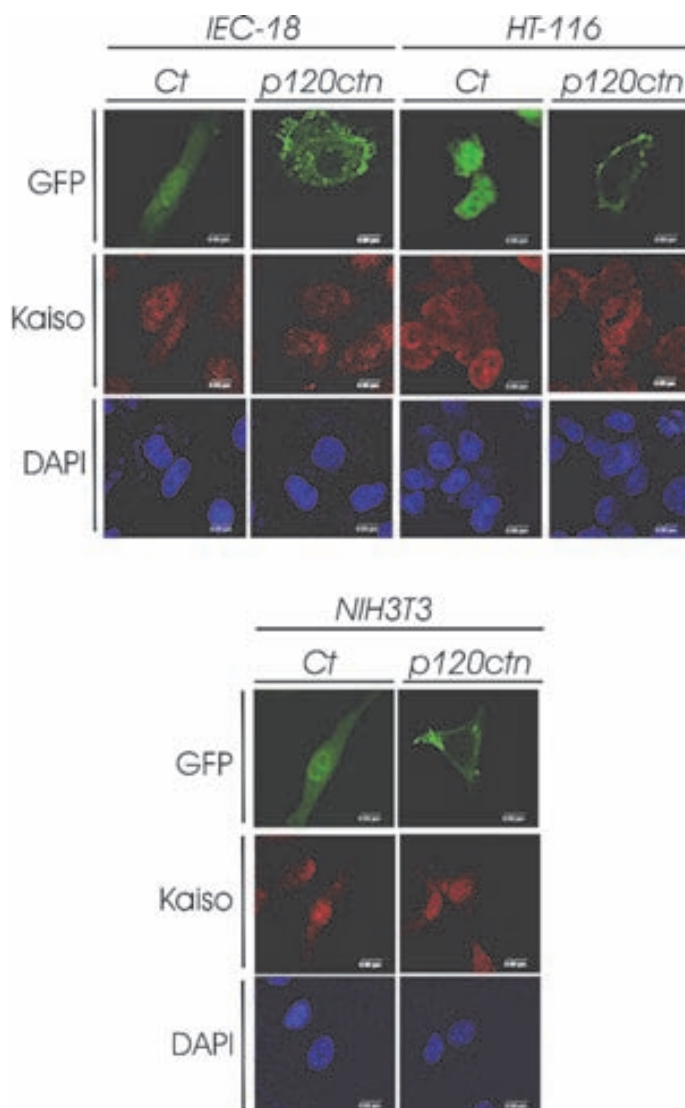


Figura 44: La sobreexpressió de p120ctn no canvia els nivells nuclears de Kaiso en IEC-18, HT-116 i NIH3T3. Es van transfectar les cèl·lules amb GFP-p120ctn o GFP com a control. Es va realitzar un anàlisi de localització subcel·lular de Kaiso (vermell) en presència de GFP-p120ctn sobreexpressada (verd). Es va detectar Kaiso per immunofluorescència utilitzant un anticòs específic. No es va obtenir senyal quan el mateix procés es va realitzar sense la utilització d'anticòs primari. Es va utilitzar DAPI per tenyir els nuclis.

Donat que els nostres experiments indicaven que la unió p120ctn/Kaiso s'incrementa en estimular les cèl·lules per Wnt, i sabent que la sortida de Kaiso del nucli és necessària per alliberar la repressió transcripcional realitzada per Kaiso [99], vam analitzar per immunofluorescència la localització de Kaiso i p120ctn en cèl·lules

SW480 estimulades o no per Wnt.

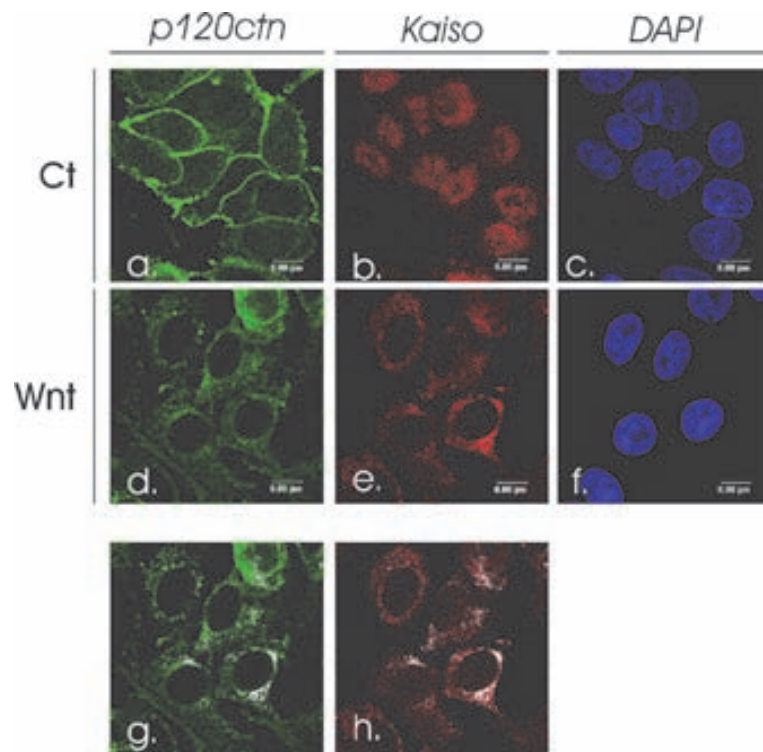


Figura 45: Wnt controla la localització de p120ctn i Kaiso. Es va realitzar un anàlisi de localització subcel·lular de p120ctn (verd) i Kaiso (vermell) en SW480 tractades durant 6h amb medi condicionat amb Wnt3a. Es van detectar les proteïnes per immunofluorescència utilitzant anticossos específics contra p120ctn i Kaiso. No es va obtenir senyal quan el mateix procés es va realitzar sense la utilització d'anticòs primari. Es va utilitzar DAPI per tenyir els nuclis. Les àrees de colocalització en cèl·lules tractades amb medi condicionat es presenten en blanc juntament amb la senyal de Kaiso o p120ctn.

Podem observar a la Figura 45 com en condicions control la p120ctn es troba a la membrana plasmàtica i Kaiso té una localització nuclear. Un cop les cèl·lules han estat tractades amb Wnt, p120ctn es deslocalitza al citoplasma (comparar panells *a* i *d*), mentre que Kaiso deixa de ser nuclear i també es troba al citoplasma (comparar panells *b* i *e*). Podem observar com p120ctn/Kaiso colocalitzen en el citoplasma (panells *g* i *h*). Mentre la majoria de Kaiso la trobem en àrees de colocalització, una part important de p120ctn continua dissociada de Kaiso. En cap cas hem sigut capaços de detectar p120ctn al nucli. S'ha descrit que p120ctn té un export molt ràpid essent difícilment detectable al nucli si no s'ha tractat prèviament les cèl·lules amb

Leptomicina B (LMB), un inhibidor de l'export nuclear mitjançat per CMR-1 [98].

Per corroborar aquestes diferències en la localització d'aquestes dues proteïnes vam realitzar un fraccionament subcel·lular en aquestes mateixes cèl·lules tractades o no per Wnt.

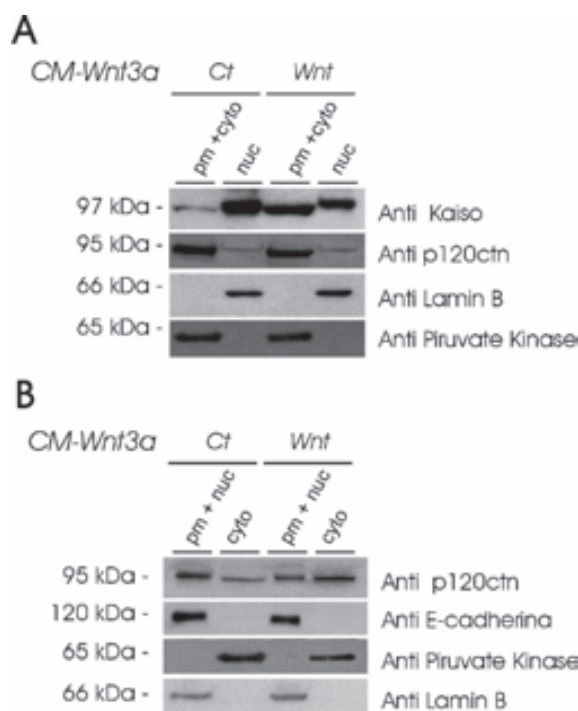


Figura 46: Wnt3a provoca la mobilització de Kaiso i p120ctn al citoplasma. Cèl·lules SW480 es van tractar durant 6h amb medi condicionat amb Wnt3a o control. Es van realitzar extractes amb fraccionament subcel·lular. **A.** Es va separar els nuclis (nuc) de les membranes i citoplasmes (pm + cyto) i es va analitzar la presència de Kaiso per Western blot. **B.** Es va separar la membrana plasmàtica i els nuclis (pm + nuc) de la fracció citoplasmàtica i es va analitzar la presència de p120ctn per Western blot.

En realitzar un fraccionament subcel·lular que permet separar els nuclis de la resta de la cèl·lula, observem com amb Wnt es produeix una sortida del repressor transcripcional Kaiso del nucli (Figura 46A). Quan el fraccionament es fa de manera que s'obté el citoplasma separat de la resta de compartiments cel·lulars, es pot observar com el tractament per Wnt mobilitza una fracció de p120ctn cap al citoplasma (Figura 46B). Confirmem així les nostres dades d'immunofluorescència que indiquen que Wnt3a provoca una deslocalització de p120ctn de la membrana que correlaciona amb una export nuclear de Kaiso.

Es va comprovar si en altres cèl·lules on p120ctn és capaç de provocar l'export del Kaiso nuclear, aquest efecte era també induït per Wnt. S'observa en la Figura 47 com en les cèl·lules HT29 M6 Kaiso és totalment nuclear (panells *a* i *e*), un cop les cèl·lules han estat estimulades per Wnt trobem Kaiso distribuït pel citoplasma (panells *b* i *f*).

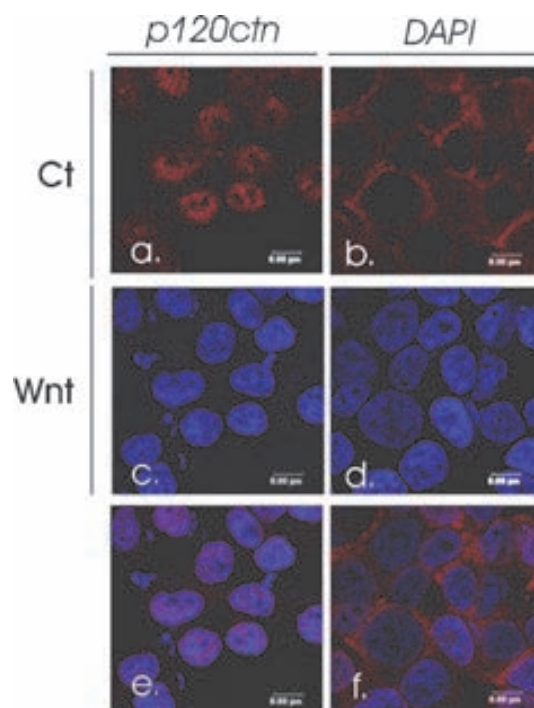


Figura 47: Wnt controla promou l'export nuclear de Kaiso en HT29 M6. Es va realitzar un anàlisi de localització subcel·lular Kaiso (vermell) en HT29 M6 tractades durant 6h amb medi condicionat amb Wnt3a. Es va detectar les proteïnes Kaiso per immunofluorescència. No es va obtenir senyal quan el mateix procés es va realitzar sense la utilització d'anticòs primari. Es va utilitzar DAPI per tenyir els nuclis.

Per tal de demostrar que l'export nuclear de Kaiso és dependent de p120ctn, vam transfectar cèl·lules SW480 amb un shRNA contra aquesta catenina, per tal de veure si en aquestes condicions Wnt és capaç de modificar la localització nuclear de Kaiso. Tal com es pot observar en els panells *a* i *d* de la Figura 48, els nivells de p120ctn no són detectables per immunofluorescència. Observem també en els panells *b* i *e*, com en absència de p120ctn, Kaiso roman nuclear tant en cèl·lules control com tractades amb Wnt.

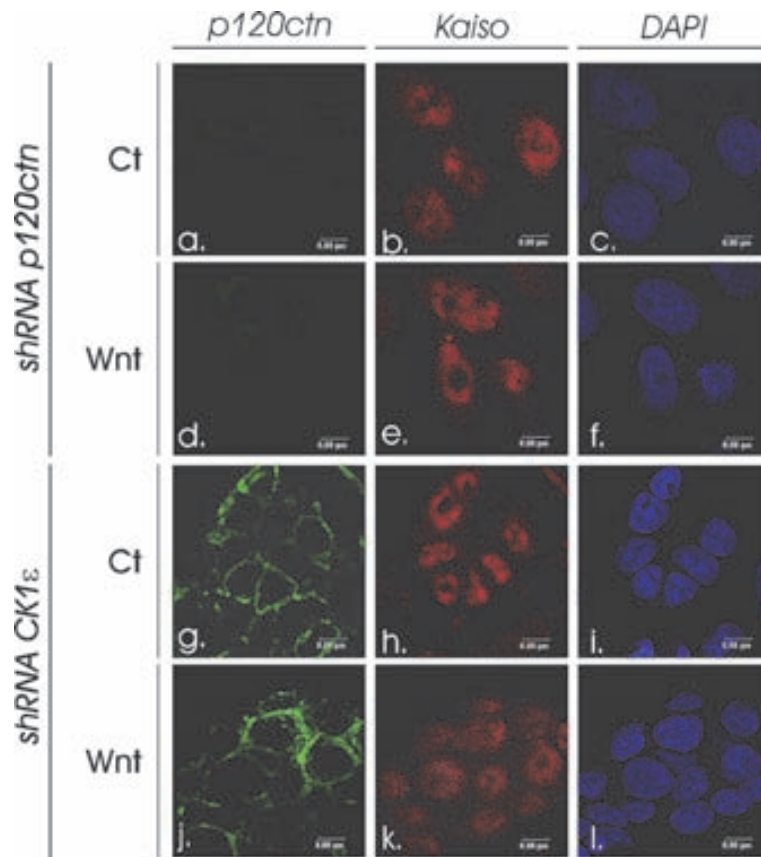


Figura 48: p120ctn i CK1ε són necessàries per la deslocalització de Kaiso induïda per Wnt. Es va realitzar un anàlisi de localització subcel·lular de p120ctn (verd) i Kaiso (vermell) en SW480 transfectades amb shRNAs específics contra p120ctn, CK1ε o irrelevant com a control. Aquestes es van seleccionar amb puromicina 2 μg/ml. Les cèl·lules van ser tractades durant 6h amb medi condicionat amb Wnt3a. Es van detectar les proteïnes per immunofluorescència utilitzant anticossos específics contra p120ctn i Kaiso. No es va obtenir senyal quan el mateix procés es va realitzar sense la utilització d'anticòs primari. Es va utilitzar DAPI per tenyir els nuclis. En la utilització del shRNA control vam obtenir els mateixos resultats que en cèl·lules sense transfectar (Figura 46).

Sabent que la fosforilació de p120ctn per CK1ε induïda per Wnt és la responsable de la reducció d'afinitat de p120ctn per E-cadherina i el guany per Kaiso, vam avaluar utilitzant un shRNA contra CK1ε quin efecte tenia la depleció de CK1ε en la localització nuclear d'aquest repressor transcripcional.

Si comparem els panells *d-e* de la figura Figura 45 amb els *j-k* de la Figura 48, veiem com en les cèl·lules tractades amb el shRNA contra CK1ε l'estimulació per Wnt

no es capaç d'exportar Kaiso del nucli ni deslocalitzar p120ctn de les unions adherents. Així doncs, l'export nuclear de Kaiso depèn totalment de p120ctn i de l'activitat de CK1 ϵ .

1.6. Wnt3a i CK1 ϵ modulen la interacció de Kaiso amb Tcf4

1.6.1. Kaiso interacciona amb Tcf-4 i la unió amb p120ctn impedeix aquesta interacció

Diferents autors han descrit diferents hipòtesis del mecanisme de repressió de Kaiso. Aquestes s'han basat en una unió directa de Kaiso a una caixa consens present en alguns dels gens de la ruta canònica de Wnt (veure introducció). Durant el transcurs d'aquesta tesi, Ruzov et al. ha publicat dos articles en els quals es demostra que la unió de Kaiso al DNA per la seva seqüència consens és marginal [241], i que aquest es troba unit a Tcf3/4 impedit la unió d'aquest factor de transcripció al DNA [242]. És el desplaçament de la unió de Kaiso de Tcf4 i la unió de β -catenina a Tcf4 el que segons aquests autors activaria l'expressió gènica depenent de Wnt.

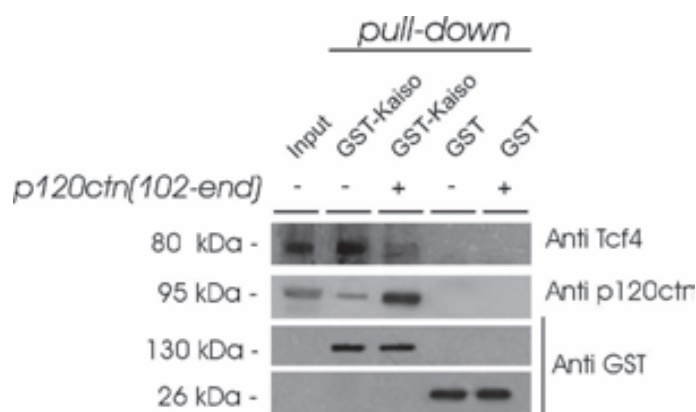


Figura 49: La unió de p120ctn a Kaiso impedeix la interacció d'aquest amb Tcf4. 7,5 pmols de proteïna recombinant GST-Kaiso, o GST com a control, es van incubar amb 500 μ g d'extractes totals de cèl·lules SW480. Es va afegir al medi d'incubació 37,5 pmols de p120ctn quan s'indica. Els complexos proteics es van purificar per afinitat amb glutatió-sefarosa 4B i analitzar per *Western Blot* amb els anticòs corresponents. Es va carregar com a input 5 μ g dels extractes utilitzats.

Per tal de verificar aquesta hipòtesi vam realitzar assaigs de *pull-down* de Tcf4

amb GST-Kaiso per tal de veure si podíem detectar associació d'aquestes dues proteïnes. A la Figura 49 s'observa unió entre Tcf4 i GST-Kaiso. A més, per tal de veure com afectava p120ctn a aquesta unió, vam preincubar aquesta catenina amb Kaiso abans de fer el *pull-down*. Si comparem els carrils 2-3 de la figura podem observar com p120ctn disminueix la quantitat de Tcf4 associada al repressor transcripcional GST-Kaiso.

1.6.2. Wnt3a disminueix la interacció entre Kaiso i Tcf4 en un procés dependent de p120ctn/CK1ε

A continuació es va analitzar els efectes de Wnt sobre la interacció de Kaiso amb Tcf4. Ja hem demostrat anteriorment que Wnt provoca una sortida de Kaiso del nucli dependent de p120ctn i CK1ε. Vam assajar si Wnt també provocava la dissociació de la unió Tcf4/Kaiso i si en aquest efecte, tal com podem deduir del *pull-down* anterior, hi intervé p120ctn.

Per aconseguir una reducció dels nivells de p120ctn vam utilitzar un shRNA contra aquesta proteïna. Vam utilitzar una línia cel·lular SW480 que expressa aquest shRNA de forma estable. En aquesta línia la disminució dels nivells de p120ctn provoca una reducció dels nivells de E-cadherina, degut a que aquesta catenina controla la seva estabilitat (veure introducció). També es veuen reduïts lleugerament els nivells de β-catenina (Figura 50).

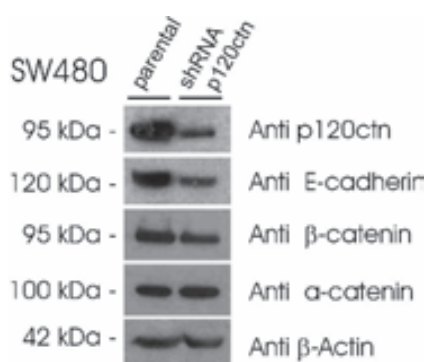


Figura 50: *Western Blot* comparant cèl·lules SW480 parentals amb SW480 shRNA-p120ctn. Es van lisar les cèl·lules SW480 i SW480 shRNA-p120ctn amb tampó de lisis SDS a l'1%. Es van analitzar els nivells de p120ctn i dels altres components de les unions adherents per *Western Blot* amb anticòssos específics.

Es va immunoprecipitar Tcf4 de cèl·lules SW480 i cèl·lules SW480 interferents per p120ctn, estimulades o no amb Wnt3a. Tal com es pot observar en el carril 5 de la Figura 51, en condicions control Kaiso està unit a Tcf-4. En tractar les cèl·lules amb Wnt la quantitat de Kaiso que coprecipita amb Tcf4 disminueix considerablement (carril 6). En canvi, en absència de p120ctn, els nivells de Kaiso units a Tcf4 romanen constants després del tractament amb Wnt (carrils 7-8). En cap cas s'ha detectat p120ctn unida a Tcf4.

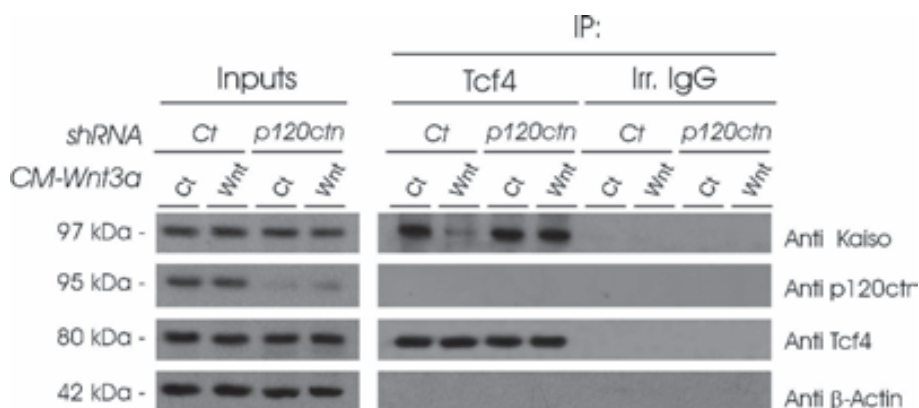


Figura 51: Wnt desplaça la unió de Kaiso a Tcf4 per un mecanisme dependent de p120ctn. Cèl·lules SW480 parentals i estables per l'expressió d'un shRNA contra p120ctn van ser tractades per medi condicionat amb Wnt3a durant 4h. Es va immunoprecipitar Tcf4 endogen i es va analitzar la quantitat de Kaiso associat amb aquest per *Western Blot* amb anticossos específics. Es va carregar un 5% dels extractes utilitzats en els inputs.

Seguidament varem interferir també l'expressió de CK1 ϵ de les cèl·lules SW480 amb un shRNA específic per aquesta quinasa amb la finalitat de mostrar la dependència en aquest procés de l'activitat de CK1 ϵ . Tal com podem veure en la Figura 52, la dissociació del complex Kaiso/Tcf4 provocada per l'estimulació per Wnt (carrils 7-8) no es produeix en cèl·lules deficientes per CK1 ϵ (carrils 9-10).

Aquests experiments suggereixen que la interacció Kaiso/p120ctn, resultant de l'activació de CK1 ϵ en resposta a l'estímul de Wnt, dissocia Kaiso de Tcf4, permetent així la correcta unió de Tcf4 al DNA i l'expressió dels gens diana de la via de Wnt. A continuació es va avaluar la unió de Tcf4 al DNA utilitzant un oligonucleòtid procedent del promotor de Myc que conté una caixa d'unió a aquest factor. Segons estudis anteriors, l'addició de Kaiso recombinant prevenia la unió de Tcf4 al DNA [242].

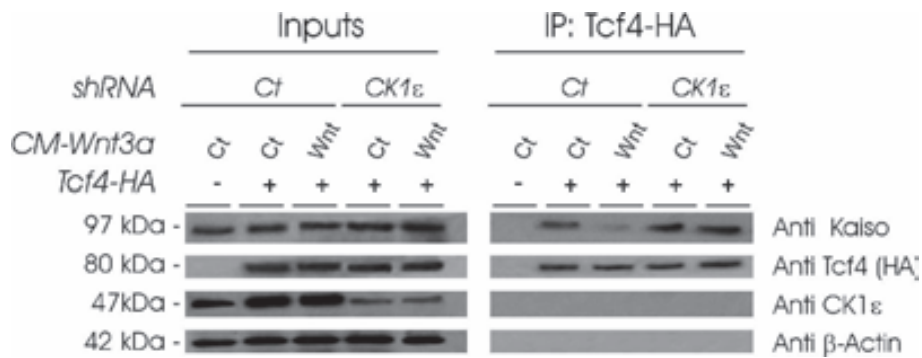


Figura 52: L'efecte de dissociació de Tcf4/Kaiso causat per Wnt és dependent de CK1ε. Es van transfectar cèl·lules SW480 amb un shRNA contra CK1ε o amb un d'irrellevant com a control. Aquestes es van seleccionar amb puromicina 2 µg/ml. Posteriorment es va transfectar Tcf4-HA i van ser tractades per medi condicionat amb Wnt3a. Es va immunoprecipitar el Tcf4-HA i es va analitzar la quantitat de Kaiso associat amb aquest per *Western Blot* amb anticossos específics. Es va carregar un 5% dels extractes utilitzats en els inputs.

Tal com es pot veure en la Figura 53, la sobreexpressió de Kaiso en les cèl·lules SW480 disminueix la unió de Tcf4 al promotor Myc, i el fet de sobreexpressar p120ctn fa que es recuperi la unió de Tcf4 al DNA (carril 6-8).

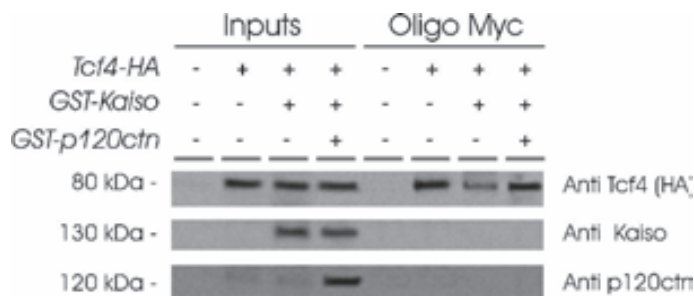


Figura 53: La sobreexpressió de p120ctn prevé l'efecte inhibitori de Kaiso sobre la unió de Tcf4 al DNA. Es va utilitzar un oligonucleòtid de cadena doble corresponent al promotor Myc, marcat amb biotina, per purificar el Tcf4-HA transfectat en cèl·lules SW480. Es va cotransfectar GST-Kaiso o GST-p120ctn quan s'indica, o GST com a control. Es van analitzar els inputs i la fracció unida a streptavidina-agarosa per *Western Blot* amb els anticossos indicats. Es va carregar un 5% dels extractes utilitzats en els inputs.

Aquest experiment confirma que la unió de Kaiso a Tcf4 impedeix la interacció de Tcf4 al DNA. A més hem observat que l'addició de p120ctn desplaça Kaiso de Tcf4, permetent a aquest factor unir-se una altra vegada al DNA.

1.6.3. p120ctn no modifica la unió de Kaiso a seqüències de DNA metilades

Com ha estat esmentat en la introducció, Kaiso presenta una unió dual al DNA: la seva seqüència consens KCS i regions de dinucleòtids CpG metilats. També es va examinar si la unió de Kaiso al DNA metilat era modificada per la seva associació amb p120ctn. En aquest assaig vam utilitzar un fragment del promotor del gen murí S100A4, on s'hi ha descrit prèviament una regió d'unió a Kaiso [118]. Es va realitzar un assaig *in vitro* amb aquest promotor analitzant la unió a GST-Kaiso recombinant en presència de p120ctn. S'observa a la Figura 54 com p120ctn no es capaç de desplaçar la unió de Kaiso al DNA metilat, contràriament com passa amb la unió Kaiso/Tcf4. Aquest fet suggereix una regulació diferencial per part de p120ctn d'ambdós processos.

Hem detectat unit al DNA p120ctn només en presència de Kaiso, indicant que el complex p120ctn/Kaiso pot unir el DNA metilat.

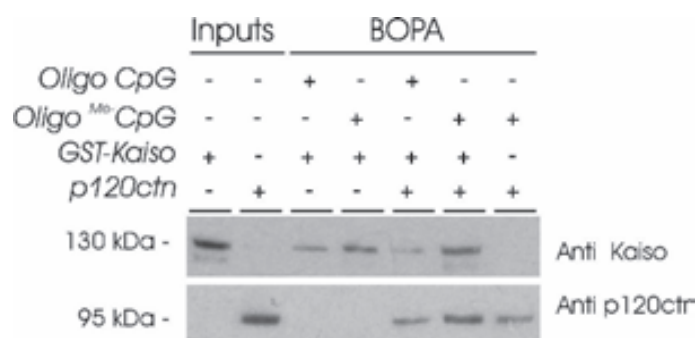


Figura 54: p120ctn no és capaç de desplaçar la unió de Kaiso al DNA metilat. Es va utilitzar un oligonucleòtid de cadena doble corresponent al promotor S100A4, marcat amb biotina, per purificar 2,5 pmols de GST-Kaiso. Es va afegir a la incubació 7,5 pmols (2,5 vegades en excés) de p120ctn(102-911) quan s'indica, o GST com a control. Es van analitzar la fracció unida a streptavidina-agarosa per *Western Blot* amb els anticossos indicats. Es va carregar un 10% de la proteïna recombinant en els inputs.

2. p120ctn, un nou component essencial en la ruta de senyalització de Wnt

2.1. Wnt disminueix la interacció del complex p120ctn/CK1 ϵ amb el coreceptor LRP6

2.1.1. El complex E-cadherina/p120ctn/CK1 ϵ interacciona amb el coreceptor de Wnt LRP6. Aquesta interacció és bloquejada per Wnt.

Un cop establertes les bases moleculars per les quals l'activació de CK1 ϵ per Wnt i posterior fosforilació de p120ctn condueix a l'alliberament de p120ctn de les unions adherents, amb la consegüent retirada del Kaiso nuclear unit a Tcf4, facilitant així l'expressió dels gens regulats per β -catenina/Tcf4; ens vam plantejar investigar per quin mecanisme Wnt produiria l'activació de la CK1 ϵ associada a p120ctn.

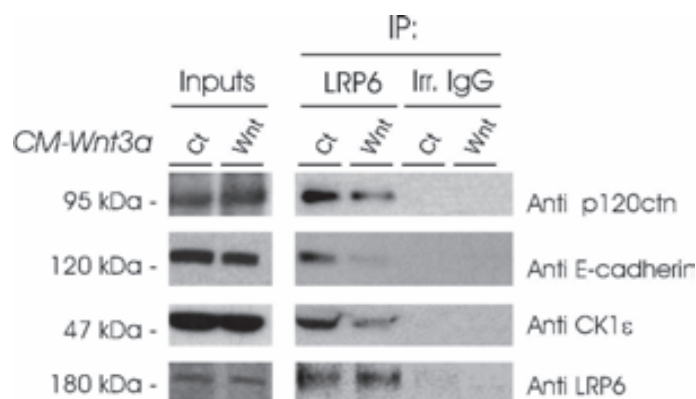


Figura 55: El receptor LRP6 s'associa al complex de les unions adherents. Wnt disromp aquesta associació. Es van estimular amb medi condicionat amb Wnt3a cèl·lules SW480. Aquestes van ser lisades amb tampó digitonina a l'1% i es va immunoprecipitar LRP6. Es van analitzar les proteïnes associades per *Western Blot* amb anticossos específics. Es va carregar un 5% dels lisats com a input.

En un article recent s'ha descrit com el domini citoplasmàtic de la N-cadherina interacciona amb el coreceptor de Wnt LRP5 [243]. Vam analitzar doncs si aquesta interacció també existia amb la E-cadherina. Tal com es pot veure en la Figura 55, LRP6 coimmunoprecipita amb E-cadherina. A més, aquesta unió es sensible a l'activació per Wnt. Comparant els carrils 3-4 de la immunoprecipitació, el tractament

amb Wnt disminueix els nivells de E-cadherina que interaccionen amb el receptor. Veiem també associades a aquest complex p120ctn i CK1 ϵ , i de la mateixa forma que passa amb E-cadherina, aquesta associació es disromp al estimular amb Wnt.

En realitzar un experiment immunoprecipitant p120ctn, s'obtenen resultats similars (Figura 56). Com ja havíem observat anteriorment, la unió a E-cadherina i LRP6 disminueix en tractar les cèl·lules amb Wnt3a. Simultàniament p120ctn augmenta la unió a Kaiso i els nivells de CK1 ϵ associats romanen els mateixos.

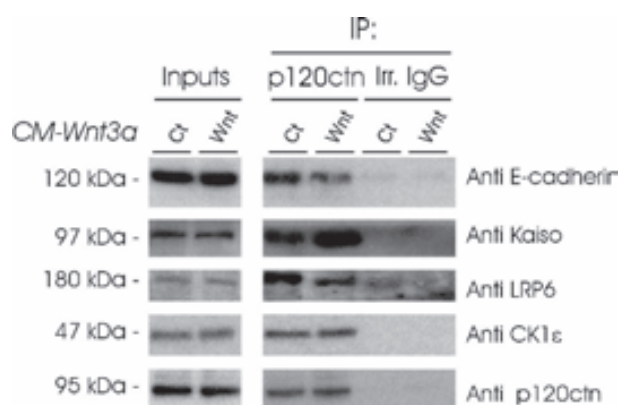


Figura 56: p120ctn es dissocia del complex format per LRP6 i E-cadherina en cèl·lules estimulades per Wnt. Es van estimular amb medi condicionat amb Wnt3a cèl·lules SW480. Aquestes van ser lisades amb tampó de digitonina a 1% i es va immunoprecipitar p120ctn. Es van analitzar les proteïnes associades per *Western Blot* amb anticossos específics. Es va carregar un 5% dels lisats com a input.

Troblem així que E-cadherina, LRP6 i p120ctn/CK1 ϵ formen un complex que en estimular per Wnt es dissocia, alliberant la p120ctn/CK1 ϵ al citoplasma on pot unir Kaiso.

2.1.2. La fosforilació *in vitro* d'E-cadherina per CK1 disminueix la unió a LRP6

Per tal d'avaluar si és l'activitat de CK1 la que provoca la dissociació del complex LRP6/E-cadherina, vam realitzar un assaig de *pull-down* amb GST-p120ctn i GST-cytoE-cadherina recombinants fosforilades o no per CK1. Ha estat descrit durant la realització d'aquest treball que el domini citoplasmàtic de l'E-cadherina també és un substrat de CK1 [63].

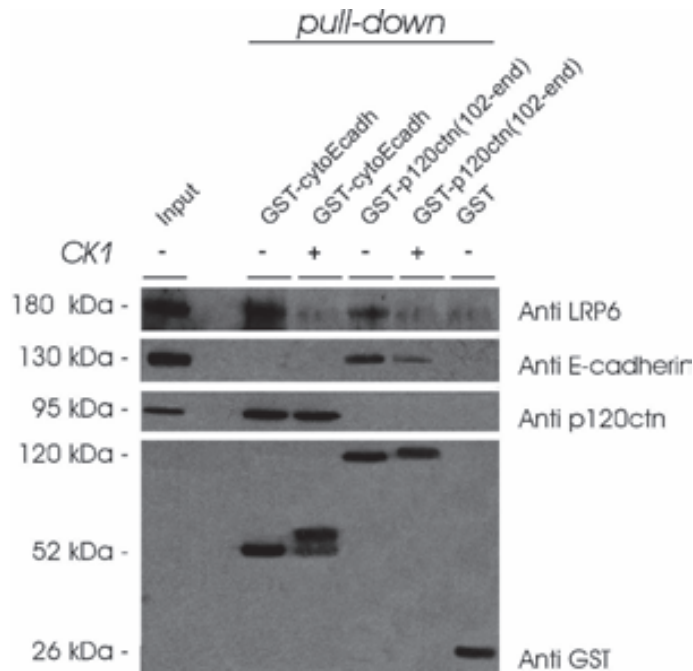


Figura 57: La fosforilació sobre la cua citoplasmàtica d'E-cadherina impedeix la unió a LRP6. 7,5 pmols de proteïnes recombinants GST-cytoE-cadherina i GST-p120ctn van ser fosforilats o no amb el domini catalític de CK1. Aquestes, o GST com a control, van ser incubats amb extractes de SW480 (digitonina a l'1%). Els complexos proteics van ser purificats per afinitat amb glutatió-sefarosa 4B i analitzats per *Western Blot* amb anticossos específics. Es va carregar un 5% dels lisats com a input.

La Figura 57 mostra com el coreceptor LRP6 és retingut eficientment pel domini citoplasmàtic de l'E-cadherina, però no per la GST. En fosforilar aquest fragment s'observa un desplaçament en la seva mobilitat, a conseqüència de l'extensiva fosforilació. Aquesta fosforilació disminueix la unió a LRP6 que obteníem en condicions control (comparar carrils 2 i 3). Podem observar també com la quantitat de p120ctn unida a E-cadherina no canvia per la fosforilació de l'E-cadherina, tal com ja hem observat en els assaigs d'interacció directa.

L'associació de la GST-p120ctn amb LRP6 disminueix un cop ha estat fosforilada per CK1, a la vegada que també disminueix la unió a E-cadherina (carrils 4 i 5), tal com esperàvem. Suposem doncs que la unió de p120ctn a LRP6 es produeix a través d'E-cadherina, i que és la pèrdua d'afinitat envers aquesta la que separa p120ctn del complex format per E-cadherina i LRP6.

Aquest experiment mostra com la CK1 té un paper dual en l'estabilització del complex LRP6/E-cadherina/p120ctn, fosforilant E-cadherina i disrompent la seva associació a LRP6, i també fosforilant p120ctn inhibint la seva interacció amb E-cadherina.

2.1.3. La depleció de CK1 ϵ bloqueja la disminució de l'associació d'E-cadherina amb LRP6 induïda per Wnt3a

Amb la finalitat de descobrir si és també CK1 ϵ la quinasa implicada en el control de l'associació de p120ctn a LRP6, vam inhibir-ne l'expressió en cèl·lules SW480 utilitzant un shRNA específic contra aquesta isoforma.

Tal com es mostra en la Figura 58, es van reduir els nivells de CK1 ϵ un 80-90% (comparar carrils 1-4 dels inputs). La depleció dels nivells de CK1 ϵ evita la disminució de la interacció entre E-cadherina i LRP6 induïda per Wnt que observem en cèl·lules control (comparar carrils 5-8). Per tant, CK1 ϵ també es troba implicada en la dissociació del complex LRP6/E-cadherina/p120ctn que promou l'estimulació de Wnt.

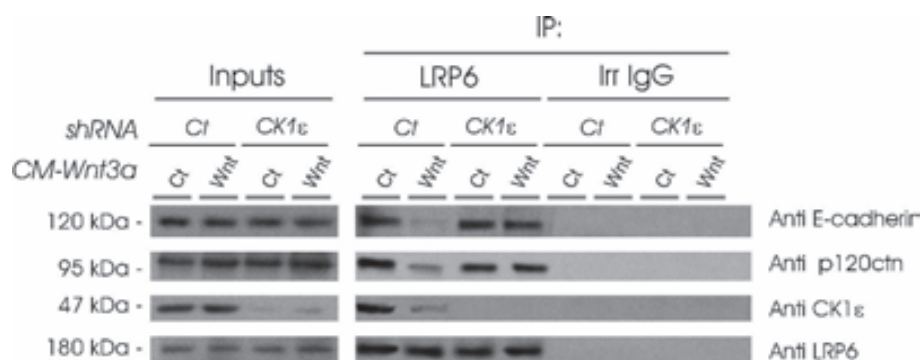


Figura 58: CK1 ϵ controla la interacció de LRP6 amb E-cadherina. Es van transfectar cèl·lules SW480 amb un shRNA específic contra CK1 ϵ o bé un d'irrellevant com a control. Es van seleccionar les cèl·lules amb 2 μ g/ml de puomicina i tractar posteriorment amb medi condicionat amb Wnt3a durant 4h. Aquestes es van lisar amb tampó de digitonina a l'1% i es va immunoprecipitar LRP6. Els complexos precipitats es van analitzar per *Western Blot* amb anticossos específics. Es va carregar un 5% dels lisats com a input.

2.1.4. La depleció de p120ctn suggereix que la interacció d'E-cadherina amb el coreceptor està mitjançada per E-cadherina

En l'assaig de *pull-down* de LRP6 amb GST-cytoE-cadherina i GST-p120ctn(102-911) (veure Figura 57) vam extreure la conclusió que la unió de p120ctn a LRP5/6 es produeix a través d'E-cadherina. Per tal de demostrar que realment és l'E-cadherina la que permet la interacció de p120ctn amb LRP5/6 *in vivo*, es va coimmunoprecipitar LRP6 i E-cadherina en cèl·lules SW480 parentals i cèl·lules SW480 que tenen els nivells de p120ctn deplecionats en expressar establement un shRNA contra aquesta catenina.

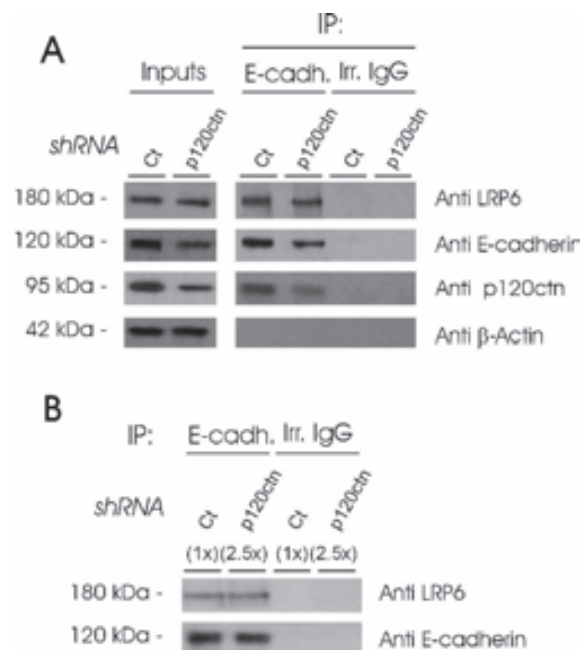


Figura 59: La interacció LRP6 amb E-cadherina no depèn de p120ctn. **A.** Es van tractar cèl·lules SW480 expressant establement un shRNA contra p120ctn, o parentals com a control, amb medi condicionat amb Wnt3a durant 4h. **A.** Aquestes es van lisar amb tampó de digitonina a l'1% i es va immunoprecipitar E-cadherina. Els complexos formats es van analitzar per *Western Blot* utilitzant anticossos específics. **B.** La immunoprecipitació es va repetir utilitzant 2,5 vegades més anticòs en les cèl·lules interferents per precipitar quantitats semblants de E-cadherina.

Com s'observa en els inputs de la Figura 59A la disminució dels nivells de p120ctn correlaciona amb una disminució dels nivells d'E-cadherina. La quantitat d'E-cadherina coprecipitada amb LRP6 disminueix quan ho comparem amb el control. Aquesta

reducció passa de manera equivalent a la que observem en els inputs, suggerint que l'associació entre E-cadherina i LRP6 no és dependent de p120ctn, ja que esperaríem una disminució molt més dràstica si depengués d'aquesta.

Per tal de corroborar aquesta conclusió vam augmentar la quantitat d'anticòs utilitzat en les cèl·lules que expressaven el shRNA contra p120ctn per tal d'immunoprecipitar quantitats equivalents d'E-cadherina. En aquest cas els nivells de LRP6 coimmunoprecipitats eren semblants en ambdues condicions, demostrant que l'associació de LRP6 amb E-cadherina no es produeix a través de p120ctn (Figura 59B).

2.1.5. El complex E-cadherina/p120ctn és necessari per a l'activació de CK1 ϵ induïda per Wnt

Alternativament, per demostrar que la interacció entre LRP6 i p120ctn es dona a través de l'E-cadherina, vam utilitzar un shRNA contra E-cadherina per tal de reduir-ne els nivells. L'eliminació de la E-cadherina va afectar greument la interacció del coreceptor de Wnt LRP6 amb p120ctn. Si comparem els carrils 6 i 7 (Figura 60) veiem que la quantitat de p120ctn/CK1 ϵ coimmunoprecipitada amb LRP6 ha disminuït en absència d'E-cadherina.

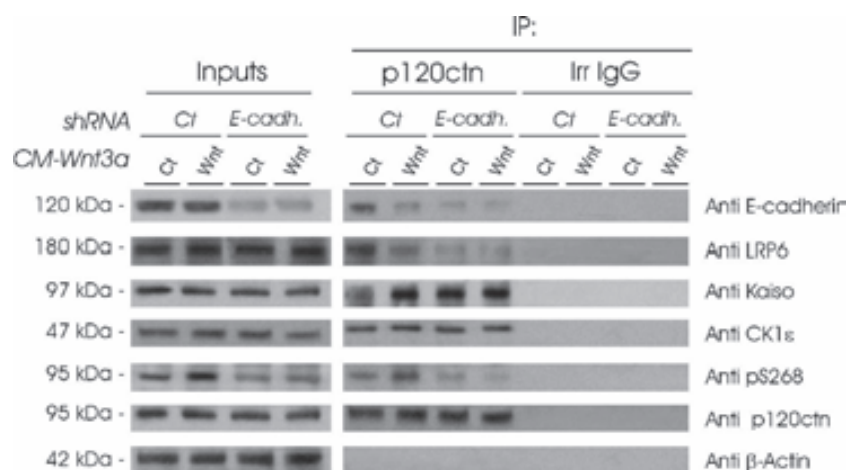


Figura 60: La interacció p120ctn/LRP6 és mitjançada per E-cadherina. Es va deplecionar E-cadherina de cèl·lules SW480 utilitzant un shRNA específic contra aquesta proteïna o bé un d'irrellevant com a control. Es van seleccionar les cèl·lules amb 2 μ g/ml de puromicina i tractar posteriorment amb medi condicionat amb Wnt3a durant 4h. Aquestes es van lissar amb tampó de digitonina a l'1% i es va immunoprecipitar p120ctn. Els complexos formats es van analitzar per *Western Blot* utilitzant anticossos específics. Es va carregar un 5% dels lisats com a input.

A més, en analitzar la fosforilació de la S268 de p120ctn, observem que la depleció de l'E-cadherina impedeix aquesta fosforilació duta a terme per CK1ε. Com es pot observar però, els nivells de CK1ε associats a p120ctn són els mateixos que en condicions control. Aquest fet suggereix que CK1ε s'activa a la membrana plasmàtica.

Com ja hem demostrat anteriorment, Kaiso i E-cadherina competeixen per la unió a p120ctn (veure Figura 22). En absència d'E-cadherina, tot i que p120ctn no es troba fosforilada en la S268, si que es troba unida a Kaiso. Possiblement en no trobar-se p120ctn ancorada a les unions adherents en cèl·lules deplecionades per E-cadherina, p120ctn és lliure per poder interaccionar amb Kaiso.

2.1.6. L'activació de CK1ε induïda per Wnt requereix p120ctn

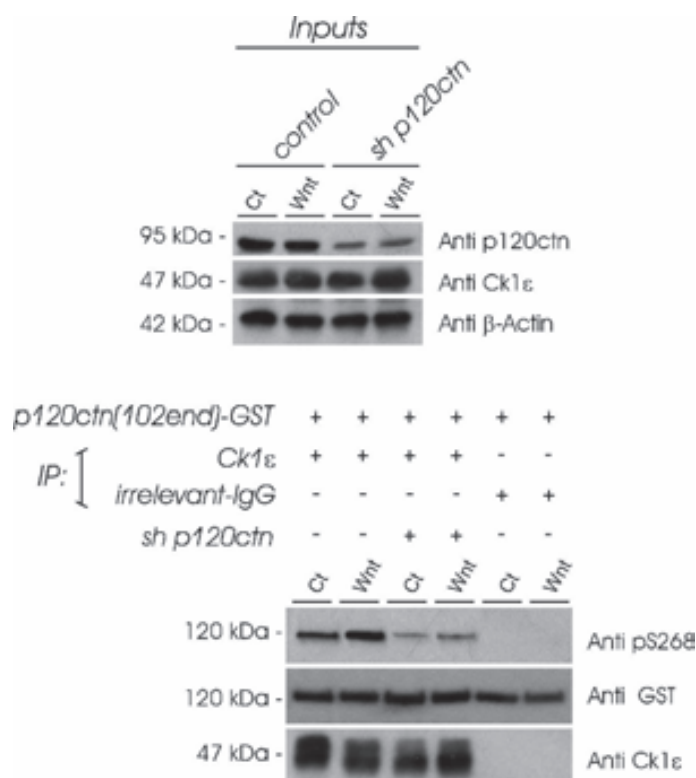


Figura 61: L'activació de CK1ε depèn de la presència de p120ctn. Cèl·lules SW480 expressant establement un shRNA contra p120ctn, o parentals com a control, van ser tractades amb medi Wnt3a durant 2h. Es va immunoprecipitar CK1ε d'ambdues (200µg) i utilitzar el precipitat per fosforilar 2 pmols de proteïna GST-p120ctn102-911 recombinant en condicions de fosforilació de CK1. Es va detectar la fosforilació sobre p120ctn amb l'anticòs fosfoespecífic contra la Ser268. Es va carregar un 5% dels lisats com a input.

Veient que és necessària la localització de CK1 ϵ a les unions adherents per la seva activació un cop estimulades les cèl·lules per Wnt, ens vam preguntar si aquesta activació depèn de la presència de p120ctn. Es va immunoprecipitar CK1 ϵ de cèl·lules SW480 interferents per p120ctn i parentals, tractades o no amb medi condicionat amb Wnt3a, i es va analitzar l'activitat d'aquesta quinasa immunoprecipitada, utilitzant una GST-p120ctn recombinant i analitzant la fosforilació de la S268.

En les cèl·lules deplecionades de p120ctn disminueix dràsticament l'activitat de la CK1 ϵ immunoprecipitada (Figura 61). Aquest fet pot ser degut a que en absència de p120ctn, CK1 ϵ no es troba localitzada a la membrana plasmàtica, com passaria en absència d'E-cadherina (Figura 60). O bé podria ser degut a l'actuació del complex p120ctn/E-cadherina com a bastidor per a l'activació/reclutament de Ser/Thr fosfatases que activin CK1 ϵ .

2.2. El complex de les unions adherents participa en els estadis inicials de la ruta canònica de Wnt

2.2.1. L'absència de p120ctn o CK1 ϵ inhibeixen la fosforilació de Dvl induïda per Wnt

Un altre substrat rellevant de CK1 ϵ en la ruta de senyalització de Wnt és Dvl. La fosforilació de Dvl per CK1 ϵ causa un retardament en la mobilitat electroforètica d'aquesta proteïna [184]. Per aquest motiu es va analitzar si la depleció de p120ctn afectava també a l'activitat de CK1 ϵ sobre Dvl, es a dir si prevenia la seva fosforilació.

La Figura 62 mostra com el retardament electroforètic de Dvl, degut a l'extensiva fosforilació per CK1 ϵ , desapareix en cèl·lules SW480 on s'ha reduït els nivells de p120ctn utilitzant un shRNA contra aquesta proteïna. Com a control hem utilitzat un shRNA contra CK1 ϵ , mostrant que la pèrdua de p120ctn produeix exactament el mateix efecte que la pèrdua de la quinasa encarregada d'aquesta fosforilació.

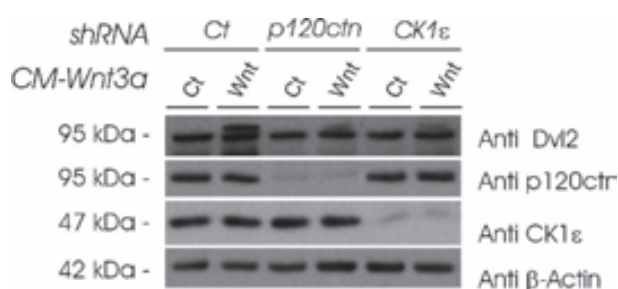


Figura 62: La fosforilació de Dvl per CK1ε depèn de p120ctn. Es van realitzar extractes totals de cèl·lules SW480 transfectades amb un shRNA interferent contra p120ctn, CK1ε respectivament o control. Aquestes van ser tractades amb medi condicionat amb Wnt3a o control durant 4h. Es va analitzar la fosforilació de Dvl-2 per *Western Blot* utilitzant un anticòs específic contra aquesta proteïna i observant la seva migració. Es va carregar un 5% dels lisats com a input.

2.2.2. La fosforilació i reclutament de Dvl al complex LRP6 induït per Wnt es bloqueja en absència de E-cadherina

En experiments anteriors hem vist com la disminució dels nivells d'E-cadherina bloquejava la fosforilació de p120ctn en la S268 per CK1ε. Vam estudiar quin efecte tenia la pèrdua d'E-cadherina en la fosforilació de Dvl, pas necessari per a la transmissió del senyal de la ruta de Wnt.

Es van tractar cèl·lules SW480 amb shRNA contra E-cadherina, es van seleccionar i es va immunoprecipitar LRP6. Es pot observar a la Figura 63 com una forma de Dvl de migració més lenta, deguda a la fosforilació per CK1ε, s'associa al coreceptor LRP6 només en cèl·lules estimulades per Wnt. Quan no hi ha E-cadherina a les cèl·lules, no es produeix el retardament electroforètic de Dvl i aquest no és reclutat al complex receptor. Tal com s'esperava, la disminució d'E-cadherina també redueix els nivells de p120ctn i CK1ε units a LRP6.

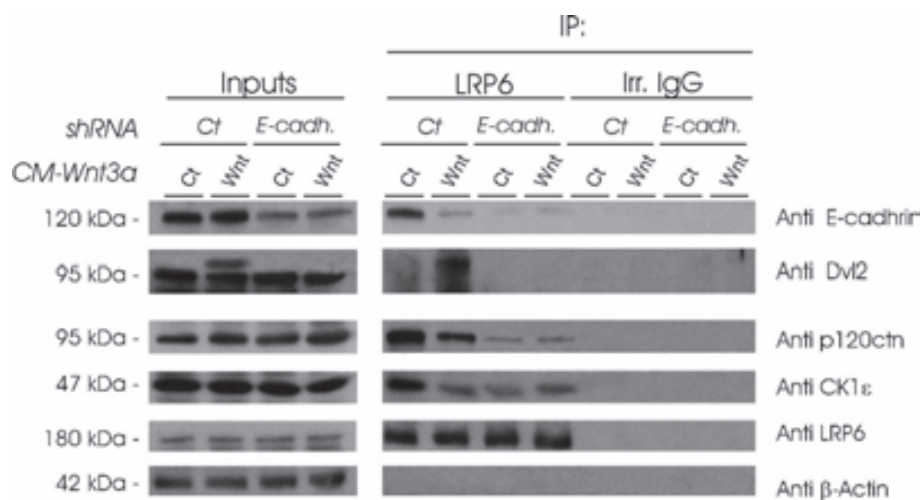


Figura 63: E-cadherina és necessària per al reclutament de Dvl al Signalosoma. Es van transfectar cèl·lules SW480 amb un shRNA específic contra E-cadherina, van ser seleccionades amb puromicina (2 µg/ml) i tractades posteriorment amb medi condicionat amb Wnt3a, o bé control, durant 4h. Es van fer extractes cel·lulars (digitonina a l'1%) i es va immunoprecipitar LRP6. Les proteïnes associades als complexos es van analitzar per *Western Blot* amb anticossos específics. Es va carregar un 5% dels lisats com a input.

2.2.3. Cinètica de la interacció entre p120ctn i CK1ε amb Dvl

En l'experiment anterior vam observar com després de l'activació per Wnt, p120ctn i Dvl coprecipitaven amb el coreceptor de Wnt LRP6. Vam determinar doncs la cinètica de l'associació p120ctn/Dvl.

Amb aquesta finalitat vam immunoprecipitar Dvl de cèl·lules SW480 parentals i expressant establement un shRNA contra p120ctn. Aquestes es van estimular amb medi condicionat amb Wnt3a a diferents temps. Tal com podem veure en la Figura 64, l'associació màxima de p120ctn a Dvl es produeix als 30 minuts després de l'addició de Wnt. Aquesta associació és transitòria ja que a les 3h ja no es donava.

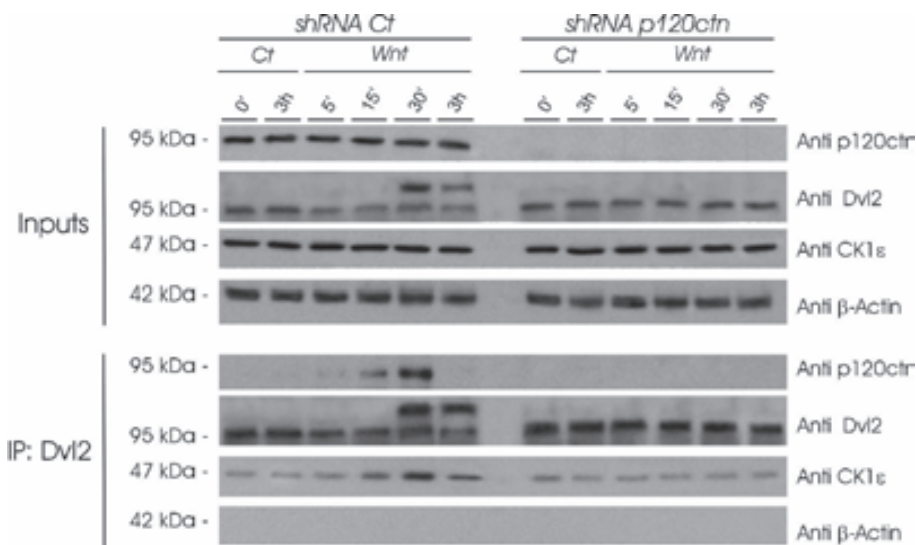


Figura 64: La fosforilació de Dvl depèn de l'associació amb p120ctn/CK1ε. Es van tractar cèl·lules SW480 que expressen establement un shRNA específic contra p120ctn, o parentals com a control, amb medi condicionat amb Wnt3a durant els temps indicats. Es van fer extractes cel·lulars digitonina a l'1% i es va immunoprecipitar Dvl-2. Les proteïnes associades als complexos es van analitzar per *Western Blot* amb anticossos específics. Es va carregar un 5% dels lisats com a input.

En el mateix experiment també es va analitzar l'associació de CK1ε a Dvl. Es coneix que Dvl porta unida CK1ε, però observem com també es produeix un increment en els nivells de quinasa associada a Dvl corresponent a l'increment d'associació de p120ctn al complex LRP6. En qualsevol cas, l'associació de CK1ε/Dvl es troba augmentada als 30 minuts d'estimulació per Wnt, i retorna als nivells basals a les 3h. L'eliminació de p120ctn de les cèl·lules bloqueja l'increment de CK1ε associada.

La fosforilació de Dvl, signe inequívoc de la seva activació es troba també als 30 minuts després de l'addició de Wnt, però en aquest cas es manté durant les 3h. Es pot observar també com la reducció dels nivells de p120ctn impedeix aquesta fosforilació.

2.2.4. L'activació de la CK1 ϵ associada a Dvl depèn de la presència de p120ctn

Vam voler conèixer el patró d'activitat d'aquesta CK1 ϵ associada a Dvl. Per fer-ho vam transfectar Myc-Dvl1 en cèl·lules SW480, parentals i transfectades establement amb un shRNA contra p120ctn. Vam estimular les cèl·lules diferents temps amb medi condicionat Wnt3a i es va purificar Dvl1-Myc amb la CK1 ϵ associada. Després vam testar l'activitat del precipitat sobre la S268 utilitzant GST-p120ctn recombinant.

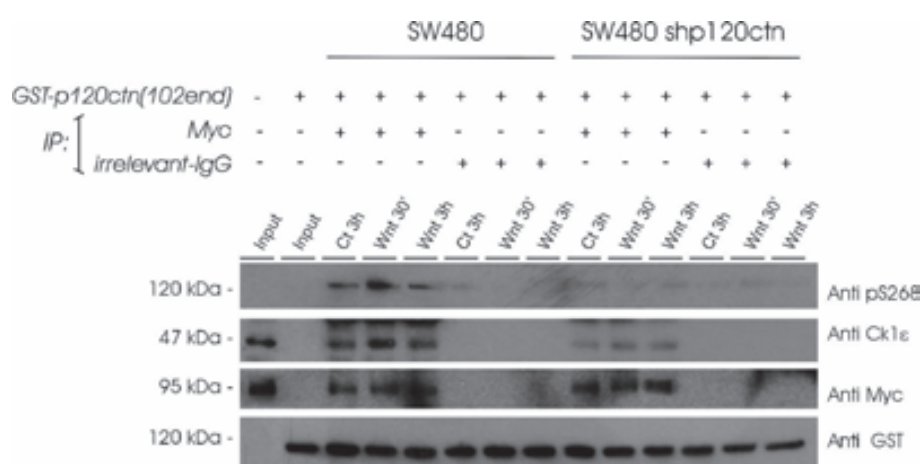


Figura 65: *L'activació de la CK1 ϵ associada a Dvl depèn de la presència de p120ctn* Es van transfectar cèl·lules SW480 que expressen establement un shRNA específic contra p120ctn, o parentals com a control, amb Myc-Dvl1. Es va tractar les cèl·lules amb medi condicionat amb Wnt3a durant els temps indicats. Es van fer extractes cel·lular 1% digitonina i es va immunoprecipitar Myc-Dvl1. Es van utilitzar els complexos immunoprecipitats per fosforilar una GST-p120ctn(102-911) en condicions de fosforilació de CK1. Es va analitzar per *Western Blot* l'activitat de la CK1 ϵ immunoprecipitada amb un anticòs fosfoespecífic contra la Ser268 de p120ctn.

Tal com mostra la Figura 65, en el carril corresponent als 30' és on la CK1 ϵ associada a Dvl1 és més activa. Aquest punt correspon també amb un increment de l'associació de la quinasa a Dvl, que correlaciona a la vegada amb un augment de la unió de p120ctn al complex, tal com observàvem en l'experiment anterior.

2.2.5. p120ctn i CK1ε són rellevants per a l'estabilització de β-catenina induïda per Wnt

Finalment, vam avaluar com afectava l'absència de p120ctn en l'activació de la via de Wnt. Vam analitzar la quantitat de β-catenina estabilitzada en cèl·lules HEK-2693T, ja que l'estabilització i posterior acumulació nuclear d'aquesta catenina és el pas indispensable per a l'expressió dels gens regulats per Tcf4/LEF.

No vam utilitzar SW480 ja que degut a mutacions en el gen APC, aquestes cèl·lules no degraden correctament β-catenina. Vam utilitzar un shRNA contra p120ctn (Figura 66A) i CK1ε (Figura 66B). En ambdós casos, si comparem amb els carrils control, no es produeix acumulació de β-catenina després de l'estimulació per Wnt.

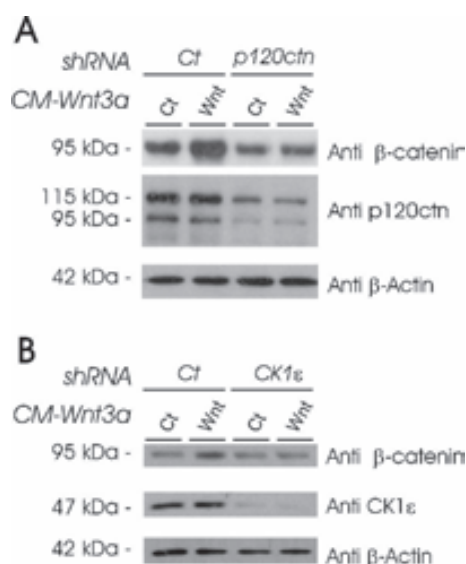


Figura 66: L'acumulació de β-catenina requereix p120ctn/CK1ε. Cèl·lules HEK-293T van ser transfectades amb shRNAs específics contra p120ctn (A) i CK1ε (B) o irrelevants com a control. Aquestes van ser tractades amb medi condicionat amb Wnt3a durant 4h i es va avaluar els nivells de β-catenina per *Western Blot* amb anticossos específics.

Aquest fet indica que tant la CK1ε com la p120ctn són indispensables per a la iniciació o transmissió del senyal de la ruta de Wnt. La reducció dels nivells de qualsevol de les dues proteïnes bloqueja l'acumulació de β-catenina a la cèl·lula. Aquest fet junt amb els experiments anteriors, on veiem que aquesta mateixa disminució bloqueja el reclutament i fosforilació de Dvl, suggereix que aquestes dues

proteïnes tenen un paper essencial en la iniciació de la transmissió del senyal, ja sigui per la correcta formació del complex receptor a la membrana o per la transmissió del senyal a partir d'aquest.

Per veure com es tradueix la disminució de p120ctn en l'activitat transcripcional de β -catenina/Tcf4, es va utilitzar el plasmidi TOP-FLASH en cèl·lules SW480 control i estables pel shRNA contra p120ctn. Tal com s'observa en el gràfic (Figura 67) l'activitat transcripcional de β -catenina/Tcf4 incrementa en les cèl·lules control. Atribuïm aquest increment provocat per Wnt, en trobar-se β -catenina ja estabilitzada en aquestes cèl·lules, a l'alliberament del Tcf4 segregat per Kaiso degut a l'actuació de p120ctn. En cèl·lules deplecionades de p120ctn es bloqueja aquest increment d'activitat.

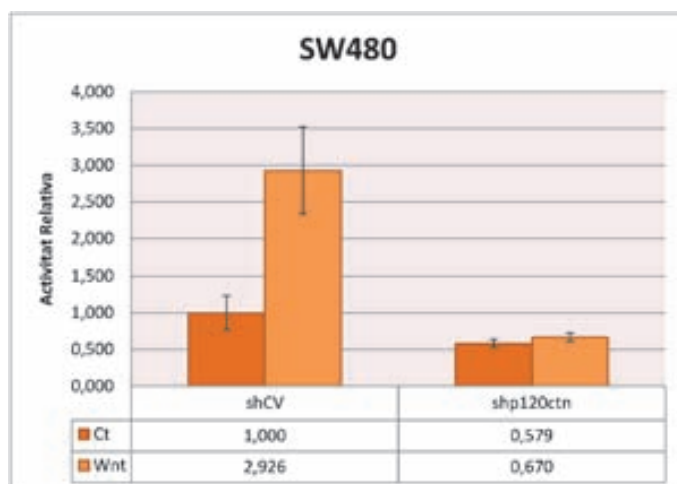


Figura 67: L'increment de l'activitat transcripcional de β -catenina/Tcf4 és dependent de p120ctn. Es van sembrar 10000 cèl·lules SW480 control i shRNA-p120ctn per pou, en plaques de 96 pous. Aquestes es van transfectar amb 100 ng TOP-FLASH i 5 ng de pTK-Renilla. Es van lisar les cèl·lules a les 24h i llegir l'activitat de la luciferasa. El valor representa la mitjana de varis experiments i les barres d'error la desviació estàndard de les mostres.

2.2.6. L'activació de la via no-canònica de Wnt per PMA no canvia l'afinitat de p120ctn pels seus cofactors

S'ha vist que Wnt3a, un factor de la via canònica de Wnt, activa CK1 ϵ a les unions adherents, provocant la fosforilació de p120ctn i la disrupció del complex que

Resultats

forma p120ctn amb LRP6/E-cadherina, augmentant la unió d'aquesta catenina a Kaiso. Vam voler investigar si aquest efecte era produït també per l'activació de la via no canònica de Wnt, o era un esdeveniment exclusiu de la via canònica. Vam tractar cèl·lules SW480 amb PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), un activador de PKC i de la via no-canònica de Wnt [244]. Es va immunoprecipitar p120ctn de cèl·lules control i tractades, per tal d'observar si es produïen els mateixos canvis que observem amb Wnt3a.

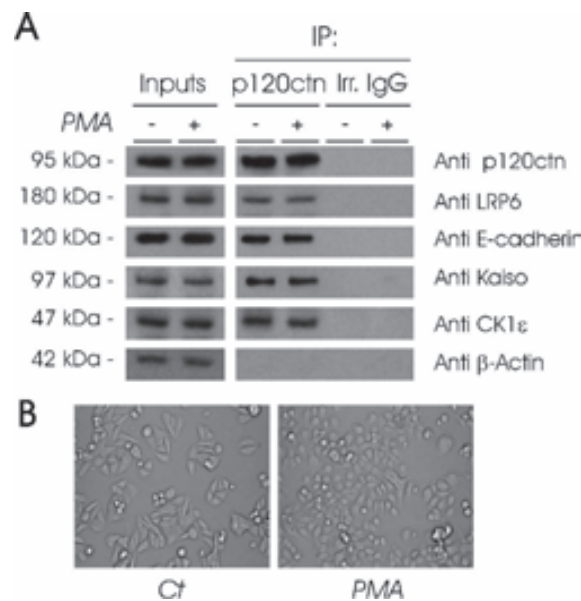


Figura 68: L'activació de la via no-canònica de Wnt per PMA no canvia l'afinitat de p120ctn pels seus cofactors. Cèl·lules SW480 van ser tractades amb PMA 100 nM durant 1'5h. Es va immunoprecipitar p120ctn d'extractes totals i es van analitzar els complexos obtinguts per *Western Blot* amb anticossos específics. Es va carregar un 5% dels extractes utilitzats com a inputs.

A la Figura 68 es pot veure com el tractament amb PMA, tot i que produeix un canvi morfològic important (Figura 68B), no canvia la interacció de p120ctn amb els cofactors estudiats (E-cadherina i Kaiso, Figura 68A). L'activació de la via no-canònica de Wnt per PMA no produeix la activació/deslocalització del complex p120ctn/CK1ε.

IV. DISCUSSIÓ

p120ctn, una proteïna àmpliament fosforilada

La p120-catenina és una proteïna pleiotròpica involucrada en diferents processos cel·lulars. p120ctn va ésser descoberta inicialment en un screening com a substrat de l'oncogen vSrc, relacionant-la amb la seva capacitat transformant [69]. Aquest fet va fer que s'estudiés amb detall la fosforilació d'aquesta proteïna.

En l'actualitat se sap que p120ctn és fosforilada majoritàriament en el seu domini regulador, una zona de l'extrem N-terminal compresa entre els aminoàcids 96 i 302, rica en residus Ser/Thr/Tyr. S'han descrit 19 tirosines en aquest domini. La fosforilació en residus específics regula de manera inversa l'associació de p120ctn amb RhoA [111] o incrementa en tots els casos la unió de p120ctn amb E-cadherina [64], depenent del residu fosforilat o de la quinasa involucrada. A la vegada però, s'ha descrit que la fosforilació extensiva en tirosines de les proteïnes dels complexos de les unions adherents provoca una dissociació d'aquests [revisat a [87]].

La fosforilació en serines és un tema més complex. La funció d'aquesta fosforilació ha eludit als investigadors durant molt de temps. Aquesta sembla ser constitutiva i dependent de l'ancoratge de p120ctn a les unions adherents [108]. L'ancoratge de p120ctn als complexos incrementa la fosforilació en la Thr310 i Ser916. La mutació d'aquestes dos residus conjuntament amb altres s'ha vist que afecta al dinamisme de la E-cadherina a la membrana plasmàtica, disminuint la velocitat del recanvi d'aquesta; aquesta però no afecta la unió E-cadherina/p120ctn [245].

En aquest treball mostra per primera vegada com una fosforilació en Ser/Thr de p120ctn, concretament en les Ser268/Ser269, té un efecte negatiu en la interacció de p120ctn amb E-cadherina, la proteïna central de les unions adherents, inhibint la formació d'aquest complex [Figura 19 i Figura 21]. Així, s'ha observat com la fosforilació en el domini N-terminal de p120ctn per CK1 disminueix notablement la capacitat d'aquesta proteïna per unir E-cadherina. Aquesta fosforilació reguladora s'ha atribuït, utilitzant mutants puntuals i de deleció, a la regió 234-350 i concretament involucrant les Ser268 i Ser269 [Figura 25 i Figura 30].

La desfosforilació del residu Ser268 s'ha relacionat amb una activació de PKC (component de la via no canònica de Wnt) [237], com també amb la utilització d'inhibidors generals de proteïna quinases com la Staurosporina. Aquest inhibidor provoca un enfortiment dels contactes entre cèl·lules, que podria ser degut a la modificació d'innombrables substrats. Altres estudis han atribuït aquest enfortiment de les unions a la fosforilació per CK1 del domini citoplasmàtic d'E-cadherina, utilitzant com a inhibidor, un inhibidor selectiu de CK1 (IC261) [63].

En el nostre estudi s'ha utilitzat l'inhibidor selectiu de CK1, IC261, per tal de veure si la modificació del residu Ser268 *in vivo* provocava un enfortiment d'aquestes unions. S'ha observat que aquesta inhibició de CK1 correspon amb un increment en l'associació de p120ctn amb E-cadherina a la vegada que disminueixen els nivells de Ser268 fosforilada [Figura 36]. Aquest tractament, a més, incrementa la formació de contactes en cèl·lules de fenotip més mesenquimal [Figura 37]. Aquest efecte però, també podia ésser causat per la modificació de la cua citoplasmàtica de la E-cadherina.

Per comprovar quin efecte tenia aquesta modificació de les Ser268/Ser269 es van transfectar els mutants puntuals en aquestes posicions en línies cel·lulars [Figura 33]. Dels dos utilitzats, el primer fou un doble mutant a alanina que impedia la fosforilació dels residus, mentre que l'altre, al qual se li havien canviat els residus a àcid aspàrtic mimetitzava la fosforilació. El bloqueig de la fosforilació en aquests residus incrementa ja l'afinitat per E-cadherina, mentre que la construcció que mimetitzava la forma fosforilada la disminueix. Aquest fet reforçava la hipòtesi que és la modificació d'aquests residus, i no els de la cua citoplasmàtica d'E-cadherina, la responsable de la regulació de la unió amb E-cadherina. A més, al fosforilar *in vitro* l'extrem citoplasmàtic d'E-cadherina amb CK1 no es van observar canvis d'interacció amb p120ctn [Figura 23].

El fet que aquests residus es trobin a la regió reguladora de p120ctn, i no situats en el domini armadillo, per on interacciona amb E-cadherina [78], fa pensar que la cua N-terminal de p120ctn podria estar interaccionant amb el domini armadillo i regulant-ne la seva especificitat, tal com passa amb altres proteïnes amb dominis armadillo, com β -catenina [29] i placoglobina [246]. Ha estat descrit anteriorment pel

nostre grup que els extrems N- i C-terminals de β -catenina interaccionen amb el domini armadillo central i regulen l'associació dels diferents cofactors a aquest [31]. Molt possiblement p120ctn es comporta de manera similar i la fosforilació en un extrem de la proteïna regula l'associació de l'E-cadherina a un domini distant [111].

En analitzar els efectes de la fosforilació de p120ctn per CK1 sobre la unió de p120ctn a altres factors, hem vist com aquesta incrementa l'associació de p120ctn amb el repressor transcripcional Kaiso [Figura 21]. Kaiso és el primer cofactor nuclear descrit de p120ctn. En iniciar aquest treball es sabia que aquesta repressió de Kaiso era alliberada per la presència de p120ctn al nucli [99]. Aquesta capacitat de p120ctn de facilitar l'expressió de gens, s'ha equiparat a la de β -catenina [119], el membre de la família de proteïnes armadillo més estudiat, que a més d'un paper estructural a les unions adherents forma part de la via canònica de Wnt (veure introducció) i és un coactivador transcripcional.

S'ha demostrat en aquest estudi que la fosforilació en serines de p120ctn incrementa la unió amb el repressor Kaiso. Sembla que part d'aquest increment és degut a que la fosforilació de p120ctn disminueix la afinitat per E-cadherina, i E-cadherina competeix amb Kaiso per la unió a p120ctn [Figura 22]. En assaigs d'interacció directa *in vitro*, sense presència de E-cadherina, no hem vist canvis destacables en la unió p120ctn/Kaiso un cop p120ctn ha estat fosforilada per CK1 [Figura 20]. No obstant, la fosforilació del doble mutant de p120ctn S268A/S269A bloqueja la inhibició de la interacció amb E-cadherina, però no és capaç de bloquejar totalment l'increment en la unió p120ctn/Kaiso. Per tant la fosforilació de p120ctn per CK1, que té un paper positiu en la unió a Kaiso, no es pot atribuir exclusivament a la fosforilació de les Ser268/Ser269, sinó que també podria haver-hi altres residus implicats.

La falta de localització de p120ctn a la membrana produeix una disminució en la fosforilació en serines de p120ctn. Aquesta deslocalització de p120ctn s'ha forçat disminuint els nivells d'E-cadherina amb un shRNA específic. Això ha comportat que es detectés una reducció de la fosforilació de la Ser268 de p120ctn. En aquest mateix experiment es veia una major associació de p120ctn/Kaiso, demostrant que p120ctn no necessita de la fosforilació per CK1 per tal d'unir Kaiso [Figura 60]. No podem

descartar no obstant, un paper positiu d'aquesta fosforilació en la unió p120ctn/Kaiso, ja que en els assaig de *pull-down* es veu un increment en l'associació.

Resumint, la fosforilació de les serines 268-269 de p120ctn disminueix l'afinitat d'aquesta per la E-cadherina i les unions adherents. Aquesta fosforilació promou la deslocalització de p120ctn al citoplasma i la unió a Kaiso, canviant la seva funció de proteïna estabilitzadora de les unions adherents, a promoure l'expressió de gens retirant aquest repressor transcripcional del nucli. Aquest fet dona a la fosforilació en serines de p120ctn un paper en la regulació dels contactes en les unions adherents. Aquesta fosforilació s'ha vist que afecta a la velocitat del moviment de les cadherines cap a la membrana. Seria una bona opció analitzar si aquestes modificacions, a més de controlar la unió a E-cadherina, afecten la unió de p120ctn amb les kinesines, ja que p120ctn a través d'aquestes regulen el transport a la membrana d'E-cadherina [80].

CK1 ϵ , una Ser/Thr quinasa que fosforila p120ctn i en regula la seva funció

La p120-catenina ha estat descrita com a bastida pel reclutament de quinases a les unions adherents. S'ha vist que uneix quinases de la família de Src com Fyn i Fer, així com també la forma activada de Yes [65], entre d'altres (veure introducció). Ens plantejarem si CK1 podia unir directament p120ctn, o bé la trobàvem associada a altres proteïnes de les unions adherents. Algunes isoformes de CK1 ja s'havien estat localitzat en aquests complexos d'adhesió [63].

S'ha trobat CK1 ϵ associada a p120ctn, però no altres isoformes d'aquesta quinasa [Figura 34]. A més, aquesta associació és constitutiva. Hem observat com el tractament de les cèl·lules amb Wnt, que provoca una dissociació de p120ctn de les unions adherents, no afecta a la unió p120ctn/CK1 ϵ [Figura 40]. Aquest fet posa en evidència que aquesta isoforma es troba reclutada als complexos de les unions adherents a través de p120ctn.

En aquest treball s'ha mapejat la regió de p120ctn per on interacciona CK1 ϵ . Aquesta es localitza entre els aminoàcids 234-390 de p120ctn [Figura 35]. Curiosament, s'ha observat que els fragments 1-350 i 350-911, els quals per separat no uneixen CK1 ϵ , recuperen aquesta unió si han estat preincubats anteriorment. Aquest

fet reforça la teoria que la cua N-terminal de p120ctn pot interaccionar amb el domini armadillo, tal com havia suggerit el nostre grup anteriorment [111]. Al interaccionar el domini armadillo de p120ctn amb el seu extrem N-terminal, recuperaria el lloc d'interacció amb CK1 ϵ .

Aquesta quinasa ha resultat ser, a més, la responsable de la fosforilació de la Ser268 *in vivo*. Utilitzant un shRNA contra aquesta isoforma, per tal de reduir els nivells de CK1 ϵ a la cèl·lula, s'obté el mateix resultat que quan s'ha utilitzat l'inhibidor de CK1, IC261 [comparar Figura 36 i Figura 38]. La disminució de la fosforilació en la Ser268 de p120ctn provoca una disminució de la unió amb Kaiso, així com també reforça la seva presència a les unions adherents, augmentant l'afinitat per E-cadherina.

Hem trobat doncs que la p120-catenina és un nou substrat de CK1 ϵ *in vivo*. A més, CK1 ϵ és una nova quinasa reclutada per p120ctn, que té un paper crucial en l'estabilitat de les unions adherents al afectar directament la unió entre l'E-cadherina i la p120ctn. A més, aquesta quinasa promou la funció nuclear de p120ctn facilitant el reclutament de Kaiso i l'alliberament de la repressió.

Wnt controla l'activitat repressora de Kaiso sobre Tcf4 a través de p120ctn/CK1 ϵ

La ruta de senyalització de Wnt és una via complexa on les respostes que genera poden ser diferents dins d'un mateix teixit. El punt central d'aquesta via és l'activació de la transcripció de gens a través de la estabilització de β -catenina. Aquesta uneix Tcf4, alliberant-lo de Groucho i de la maquinaria de repressió transcripcional i promovent l'expressió de gens regulats per β -catenina/Tcf4 (veure introducció). Hi ha autors que proposen que la interacció de p120ctn amb Kaiso podria contribuir a l'activació de gens de la via de Wnt [240, 242, 247].

El nostre treball mostra com l'activació de la via de Wnt provoca la fosforilació de la Ser268 de p120ctn, promovent una disminució de la unió a E-cadherina i un increment de la unió a Kaiso [Figura 39]. Aquesta fosforilació es produïda per CK1 ϵ [Figura 40], que es troba sota el control de Wnt. Hem descrit com l'estimulació per Wnt provoca un augment en l'activitat de la quinasa [Figura 41]. Aquesta quinasa

conté un domini regulador autofosforilable que inhibeix la seva activitat bloquejant l'accés del substrat al centre catalític [210]. No se sap com s'activa CK1 ϵ . Pensem que Wnt podria induir algun canvi estructural en p120ctn que provocaria el desplaçament d'aquest domini autoregulador, deixant el centre catalític lliure; ja que l'activitat de CK1 ϵ és depenent de la presència de p120ctn [Figura 61]. Una altra possibilitat és que Wnt activés alguna fosfatasa present a les unions adherents. Es coneix que tant CK1 ϵ com CK1 δ , la isoforma de CK1 més propera, s'activen i regulen per fosfatases [212] [211]. S'ha descrit fins i tot, que l'activitat de CK1 ϵ és promoguda per Wnt a través de la modificació del seu domini autoregulador; quinases amb aquest domini delecionat s'escapen del control de Wnt [183]. Les dues són opcions viables que requeririen posteriors estudis per aclarir-ho.

Seguint la localització de p120ctn i Kaiso, s'ha vist com aquesta estimulació per Wnt3a en les cèl·lules SW480 promou la deslocalització de p120ctn de la membrana al citosol que correlaciona amb una sortida de Kaiso del nucli [Figura 45 i Figura 46]. El mateix comportament s'ha observat en una altra línia cel·lular de colon (HT29 M6) [Figura 47]. L'export de Kaiso és depenent de la presència de p120ctn i CK1 ϵ a la cèl·lula, la depleció de qualsevol de les dues bloqueja la sortida de Kaiso del nucli [Figura 48], i la depleció de CK1 ϵ la localització citoplasmàtica de p120ctn.

Inicialment l'efecte desrepressor de p120ctn sobre els gens regulats per Kaiso ha estat relacionat amb l'habilitat de p120ctn per alliberar Kaiso del DNA [117]. S'ha proposat que Kaiso pot unir directament caixes específiques KCS i també seqüències que contenen parells de dinucleòtids CpG metilats. Aquesta unió de Kaiso a les seqüències KCS ha estat posada en entredit recentment. Treballs del grup del Dr. Richard R. Meehan han posat de manifest que aquesta unió és un artefacte i no es produeix en condicions experimentals més astringents [241], quedant en entredit els articles publicats anteriorment. El grup del Dr. Meehan ha proposat un nou mecanisme de l'activitat repressora de Kaiso, unint directament Tcf i bloquejant la unió de Tcf al DNA [242].

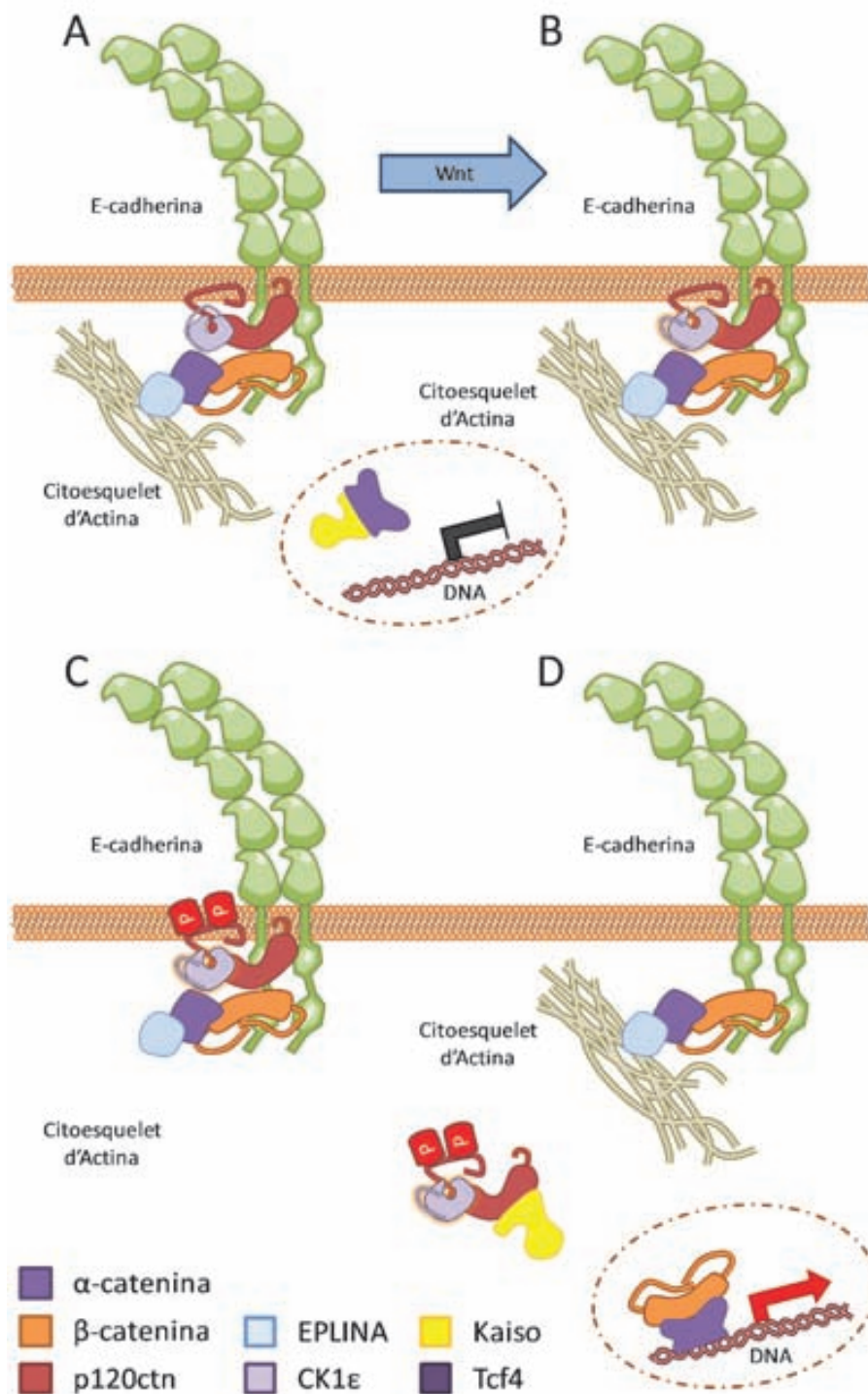


Figura 69: Model: Wnt a través de p120ctn/CK1ε promou l'export nuclear del Kaiso unit a Tcf4. A. En situació basal trobem p120ctn/CK1ε a les unions adherents i Kaiso/Tcf4 al nucli. B. L'estimulació de Wnt provoca la activació de CK1ε. C. Aquesta quinasa fosforila p120ctn en els residus S268/S269. D. Aquesta fosforilació provoca un canvi d'afinitat de p120ctn, perdent la interacció amb E-cadherina i guanyant-ne per Kaiso, produint una sortida d'aquest repressor del nucli i permetent la unió del Tcf4 segrestat per Kaiso al DNA.

Aquests estudis obren noves possibilitats. En el nostre treball, sense desmentir la possible unió de Kaiso a les caixes KCS, s'ha explorat els efectes de p120ctn sobre la unió Kaiso/Tcf4. Hem corroborat que la unió Kaiso/Tcf4 es produeix i a més que Kaiso impedeix la unió de Tcf4 al DNA. També demostrem que aquesta unió Tcf4/Kaiso es disromp per acció de p120ctn, recuperant així la unió de Tcf4 al DNA [Figura 49 i Figura 53]. Hem vist que la dissociació del complex Tcf4/Kaiso és promoguda Wnt, de forma dependent de la presència de p120ctn i CK1 ϵ [Figura 51 i Figura 52]. Dels nostres resultats es pot despendre doncs que Wnt, a través de l'acció de p120ctn/CK1 ϵ , promou l'expressió de gens regulats per Kaiso, dissociant aquest factor de Tcf4. Aquesta dissociació permet a Tcf4 l'associació al DNA i l'activació transcripcional promoguda per β -catenina (tal com mostra l'esquema de la Figura 69).

Aquest model obre nous interrogants. Té β -catenina algun efecte en el complex Kaiso/Tcf4? Per altra banda, el Tcf4 segrestat per Kaiso no es troba reprimint l'expressió de gens conjuntament amb Groucho, reclutant la maquinària de repressió gènica. Té doncs aquest segrest de Tcf4 per part de Kaiso alguna funció permetent una expressió mínima dels gens regulats per Tcf4? El fet que Kaiso segresti Tcf4 podria tenir tant connotacions negatives com positives en l'activació de gens, dependent del context cel·lular.

Ja que Kaiso uneix tant Tcf4 com també parells de dinucleòtids CpG metilats, ens vam plantejar si la unió Tcf4/Kaiso i DNA/Kaiso es regula de la mateixa manera, a través de p120ctn. Donat que Kaiso s'uneix a Tcf4 i al DNA a través de dominis diferents [241, 242], podria ser que p120ctn regules ambdues fraccions de Kaiso de manera diferencial. En les condicions on veiem alliberament de Kaiso/Tcf4 per p120ctn, observem un increment d'associació de Tcf4 amb el promotor Myc. No obstant, no observem la dissociació de Kaiso de les seqüències de DNA metilades [Figura 54]. Per tant en els nostres experiments preliminars, p120ctn no és capaç d'alliberar Kaiso del DNA metilat.

Aquest resultat reobre una porta parcialment explorada, la regulació diferencial de Kaiso reprimint gens activats per β -catenina/Tcf4 (unint directament Tcf4), o bé promotors que continguin dinucleòtids CpG metilats (unint el DNA). Aquest fet atribuiria a Kaiso la regulació dels gens implicats a la via de Wnt a través de Tcf4 i

p120ctn, i el diferenciaria del seu paper en els gens als quals s'uneix directament al seu promotor a través de dinucleòtids CpG metilats, les quals es troben majoritàriament en promotors de gens supressors de tumors [248, 249]. Els nostres resultats preliminars indicarien que p120ctn no seria capaç de desplaçar aquesta segona fracció de Kaiso unida al DNA metilat, explicant així perquè la sobreexpressió de p120ctn no és capaç de promoure l'export nuclear de Kaiso en algunes línies cel·lulars [Figura 44].

Com ja s'ha esmentat en la introducció, s'han publicat articles contradictoris sobre la capacitat supressora de tumors de Kaiso. Estudis de *xenografts* en ratolins demostren la desaparició del Kaiso nuclear al implantar-los, trobant-lo només localitzat al nucli en cultius cel·lulars a confluències baixes [120]. En aquests tumors només es conserva el Kaiso nuclear en les cèl·lules de la perifèria del tumor, considerades les més agressives. Els models murins *Knock out* per Kaiso són viables, la deficiència completa de Kaiso té un efecte negligible. A més, aquesta deficiència els hi confereix una resistència addicional a la formació de tumors intestinals en models com APCmin o Muc2 -/- [121]. Aquest fet contrasta amb la majoria d'estudis, així com en el fet que el *Knock out* de Kaiso és letal en organismes com *Xenopus* [122].

Per tal d'explicar aquestes diferències es pot recórrer a dos homòlegs de Kaiso trobats en mamífers. ZBTB38 i ZBTB4 comparteixen afinitat per les mateixes seqüències d'unió al DNA que Kaiso, ambdós unint seqüències CpG metilades i ZBTB4, a més, unint la caixa KCS; aquests però, no uneixen p120ctn [250]. Això podria explicar la resistència a la formació de tumors, ja que p120ctn no podria alliberar el seu efecte repressor; al no poder ser retirats per p120ctn, podrien continuar mitjançant la repressió de gens en aquests models murins *Knock out* per Kaiso.

La incapacitat de p120ctn d'alliberar el Kaiso unit a les seqüències CpG metilades també podria explicar aquest efecte de resistència a la formació de tumors observat en els models murins, ja que els gens on les trobem són, en molts casos, gens supressors de tumors. L'altre fet important a destacar és la regulació prèvia necessària per la repressió mitjançada per Kaiso sobre aquest conjunt de gens. Aquest factor només pot unir les caixes CpG metilades, hi ha doncs una regulació per metilació prèvia en el DNA per tal que Kaiso pugui actuar sobre aquestes caixes [249].

Ha estat descrit per Kaiso també un paper positiu en l'activació de gens, com en el cas de la Rapsina [116]. Aquest fet, junt amb els resultats d'un treball molt recent on s'ha vist que el *Knock out* de Kaiso bloqueja l'expressió de gens regulats per Wnt [251], proposen per aquest factor transcripcional un paper dual, en l'activació i repressió de gens a la vegada. Segons aquests autors, l'activitat de Kaiso depèn dels nivells cel·lulars de Kaiso. Tant la sobreexpressió com la supressió d'aquest repressor conduirien a l'inhibició dels gens regulats per Tcf4; mentre que nivells intermedis de Kaiso, conjuntament amb una estimulació per Wnt, provocaria un augment de l'activitat transcripcional β -catenina/Tcf4.

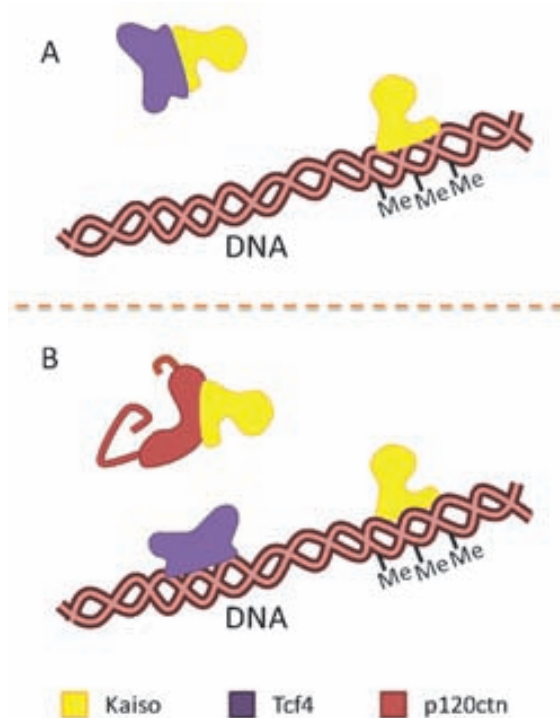


Figura 70: p120ctn controla de forma diferent el Kaiso unit a Tcf4 o directament al DNA. **A.** En absència de p120ctn podem trobar Kaiso unit a Tcf4 prevenint la seva unió al DNA, o directament unit a seqüències CpG metilades. **B.** P120ctn té la capacitat d'alliberar el Tcf4 unit a Kaiso permetent de nou la seva interacció amb el DNA, però no és capaç de retirar el Kaiso unit a motius CpG metilats.

Tot plegat, s'atribueix a Kaiso un paper complex i enigmàtic. Per una banda, apareix una nova manera de regular l'activitat transcripcional de gens de la via de Wnt a través de la interacció de Kaiso amb Tcf4, i no per unió directa al DNA com es pensava fins ara. Per l'altre, trobem una dualitat en la funció dels gens regulats per

Kaiso, i una incapacitat de p120ctn per alliberar la repressió del subgrup regulat a través de motius CpG metilats (representat esquemàticament a la Figura 70). Aquests fets impliquen una separació més gran de les dues branques d'actuació de Kaiso, depenent de si la repressió de gens es duta a terme a través de la interacció a Tcf4 o de la unió directa al DNA, i la necessitat de nous estudis per clarificar la funció d'aquesta dualitat.

E-cadherina/p120ctn/CK1ε són elements essencials que participen en l'activació de la via de Wnt

L'activació de la ruta de senyalització de Wnt ha estat àmpliament estudiada. La unió de Wnt als seus receptors Fz i LRP5/6 causa un increment d'afinitat per Dvl a la membrana, creant-se un lloc d'ancoratge per Axina-GSK3B en el complex. Aquesta quinasa inicia la fosforilació sobre LRP5/6 que és continuada per CK1γ. Aquesta fosforilació sobre LRP5/6 crea llocs d'unió per noves molècules d'Axina a la vegada que inhibeix la GSK3B present a la membrana inhibint el complex de degradació de β-catenina (veure introducció).

En aquest treball es mostra per primera vegada com E-cadherina forma part d'aquest complex, unida al coreceptor LRP6. Recentment ha estat descrit que N-cadherina uneix també LRP6 [243]. Aquesta associació entre E-cadherina i LRP6 es produiria en absència d'estimulació per Wnt [Figura 55]. Trobem també en aquest complex CK1ε i p120ctn (representat a la Figura 71). Al produir-se l'estimulació per Wnt aquest complex es dissocia, LRP6 i E-cadherina perden la seva interacció i p120ctn/CK1ε s'alliberarien al citoplasma on es veu incrementada la seva unió a Kaiso [Figura 56]. Aquesta dissociació del complex E-cadherina/LRP6 es produeix per la fosforilació per part de CK1ε del domini citoplasmàtic de l'E-cadherina [Figura 57 i Figura 58].

Els assaigs realitzats demostren que la interacció entre LRP6 i el complex de les unions adherents es realitza a través d'E-cadherina; p120ctn/CK1ε es troben ancorades al complex a través de E-cadherina i no afecten a la unió entre les dues proteïnes transmembrana (E-cadherina i LRP6) en cèl·lules no estimulades [Figura 59]. La disminució dels nivells de E-cadherina impedeix la formació d'aquest complex. A la

Discussió

vegada, aquesta disminució localitza p120ctn/CK1 ϵ al citoplasma degut a la falta d'ancoratge a la membrana. Aquest fet deixa a p120ctn insensible a l'activació per Wnt i permanentment unida a Kaiso [Figura 60]. Es demostra doncs que la funció de p120ctn es regula a nivell de membrana.

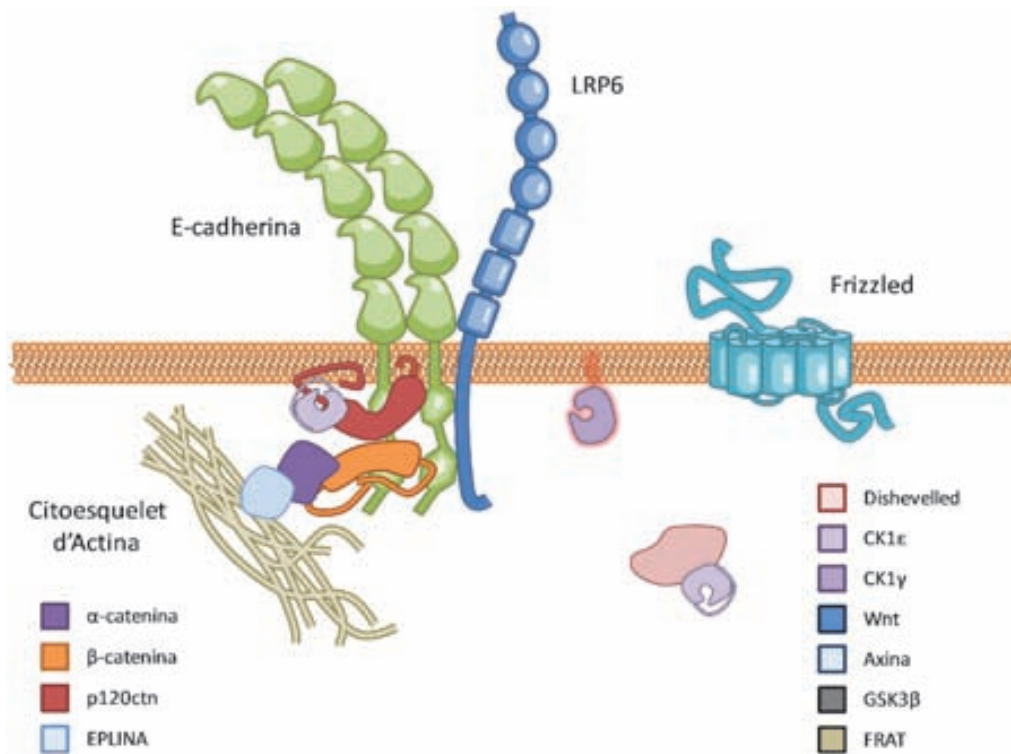


Figura 71: Complexos de les unions adherents en absència d'estimulació de Wnt. El coreceptor de Wnt LRP6 es troba unit al complex de les unions adherents.

En la fase coneguda com iniciació de l'activació de la senyalització per Wnt, on es recluten les primeres quinases al complex de recepció del senyal, està en discussió i hi ha molts aspectes per clarificar. La versió més acceptada és que la unió dels receptors provoca el reclutament de Dvl al complex, creant-se un lloc d'unió per Axina. L'Axina reclutada ve acompanyada de GSK3 β que inicia la fosforilació dels motius PPPSPxS de LRP5/6, que continua CK1 γ . Aquesta fosforilació crea més llocs d'unió per Axina-GSK3 β . Es passaria així a la fase d'extensió, on més molècules d'Axina són reclutades a la membrana i uneixen els dominis PPPSP fosforilats de LRP5/6. De forma paral·lela aquesta activació provocaria la fosforilació de Dvl per CK1 ϵ ,

augmentant l'afinitat de Dvl per FRAT/GBP [184].

Aquest treball demostra que p120ctn/CK1 ϵ són components essencials d'aquesta ruta. La disminució dels nivells de qualsevol de les dues bloqueja la fosforilació de Dvl [Figura 62], un pas necessari per a la transmissió de la senyal de Wnt. La disminució de qualsevol d'aquests dos factors també afecta l'estabilització i acumulació nuclear de β -catenina [Figura 66]. Cal senyalar a més, que p120ctn no només té un paper situant CK1 ϵ a les unions adherents, sinó que també participa en l'activació d'aquesta quinasa. L'absència de p120ctn produeix una reducció de l'activitat d'aquesta quinasa *in vitro* [Figura 61].

Hem observat com la formació dels complexos de les unions adherents és necessària per a l'activació de la ruta de Wnt. La disrupció d'aquests utilitzant un shRNA contra E-cadherina bloqueja l'associació de Dvl amb Fz/LRP6, a la vegada que es bloqueja la seva fosforilació [Figura 63]. Si tenim en compte que la falta de p120ctn o d'E-cadherina bloqueja la fosforilació de Dvl de la mateixa manera que veiem en depleccionar les cèl·lules per CK1 ϵ [183], podem dir que la formació del complex E-cadherina/p120ctn és un element crític per la activació d'aquesta quinasa causada per Wnt.

Quan s'immunoprecipita LRP6 s'observa com Dvl i p120ctn coprecipiten a la vegada amb aquest coreceptor [Figura 63]. Quan Dvl es segueix a temps curts veiem que aquest es troba amb p120ctn entre 15'-30' després de l'estimulació. En aquests punts Dvl conté més quantitat de CK1 ϵ associada i aquesta és més activa [Figura 64 i Figura 65]. Suposem que aquest increment de CK1 ϵ és degut a la presència de p120ctn/CK1 ϵ al complex. En aquest mateix interval de temps es produeix la fosforilació de Dvl que detectem pel retardament electroforètic d'aquesta proteïna. Aquest efecte és dependent de p120ctn; en cèl·lules on els nivells d'aquesta catenina han estat reduïts per la utilització d'un shRNA específic contra aquesta no es detecta cap augment en la quantitat de CK1 ϵ associada a Dvl, ni tampoc el retardament electroforètic d'aquesta [Figura 64]. A més, en absència de p120ctn, la CK1 ϵ associada a Dvl és menys activa [Figura 65]. En punts posteriors als 30' veiem com p120ctn s'ha dissociat de Dvl [Figura 64].

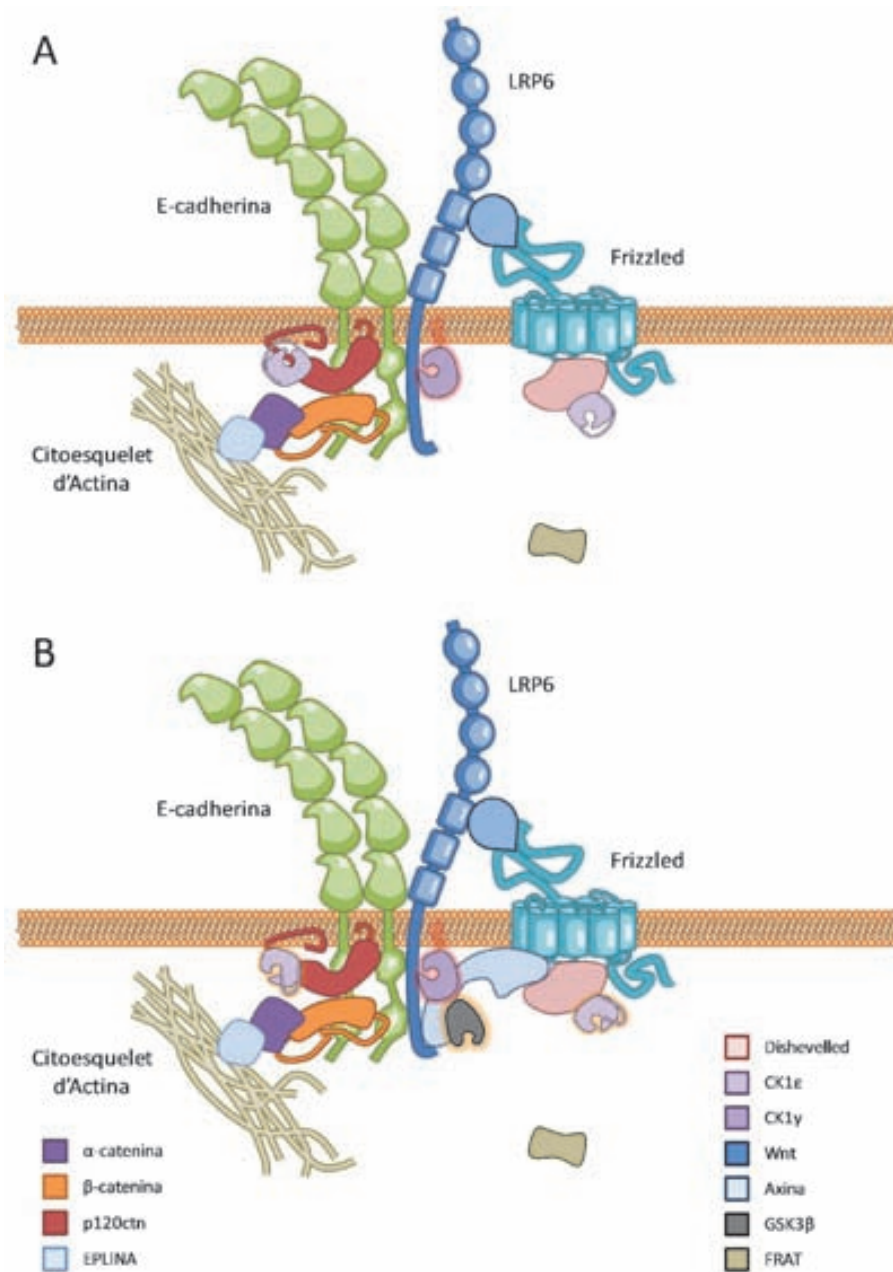


Figura 72: Dvl i Axina/GSK3 són reclutats a la membrana. **A.** La unió de Wnt als seus coreceptors Fz/LRP6 produiria el reclutament de Dvl a la membrana plasmàtica. **B.** La associació de Dvl al complex de recepció de Wnt crea un lloc d'unió a Axina, reclutant aquesta a la membrana plasmàtica juntament amb altres membres del complex de degradació de β -catenina com GSK3 β .

Aquest treball proposa la inclusió de més elements en l'activació de la via de senyalització de Wnt. Inicialment el coreceptor de Wnt LRP6 es troba unit a E-cadherina i al complex de les unions adherents, incloent p120ctn/CK1 ϵ (representat a

la Figura 71). En produir-se l'estimulació per Wnt, LRP6 i Fz s'unirien formant el complex Wnt/Fz/LRP6. La nostra hipòtesi és basa en que després de la formació del complex Wnt/Fz/LRP6 aquest continua ancorat a les unions adherents, on trobaríem p120ctn/CK1 ϵ en un estat inactiu. Aquesta quinasa esdevindria activa per un canvi conformacional, que alliberés el seu centre catalític del bloqueig realitzat pel seu domini autoregulator, o per l'activació d'una serina/treonina fosfatasa. Aquesta es podria trobar inactiva en el mateix complex i esdevindria activa després de l'estimulació per Wnt, o es reclutaria en les primeres fases. Això passaria en els 15 primers minuts, coincidint amb l'arribada de Dvl a la membrana. Axina/GSK3B es reclutaria posteriorment al crear Dvl un lloc d'ancoratge a la membrana (representat en la Figura 72).

Dvl seria fosforilat per p120ctn/CK1 ϵ ; hem observat que la quantitat de CK1 ϵ associada a Dvl quan p120ctn no és present, és menor i menys activa. No descartem que si hi ha una fosfatasa involucrada en l'activació de CK1 ϵ aquesta també activi la quinasa que es troba unida a Dvl de forma constitutiva. A la vegada, p120ctn/CK1 ϵ fosforilaria el domini citoplasmàtic d'E-cadherina, separant els dos complexos al bloquejar aquesta fosforilació la unió a LRP6. Aquesta fosforilació en serines del domini citoplasmàtic d'E-cadherina contribuiria a l'increment de la β -catenina lliure [63]. p120ctn seria fosforilada també per CK1 ϵ i s'alliberaria de la E-cadherina, podent realitzar llavors la retirada del Kaiso nuclear unit a Tcf4 (representat en la Figura 73).

L'associació entre p120ctn i Dvl pot estar mitjançada per Frodo, una proteïna coneguda per interaccionar a la vegada amb ambdues. A Frodo se li atribueix la funció d'incrementar l'estabilitat de p120ctn al citoplasma. No sabem si aquesta proteïna intervé en aquest punt, però Frodo ha estat relacionat amb un increment de la retirada del Kaiso nuclear per part de p120ctn, facilitant aquest procés [240].

Com s'ha esmentat anteriorment, s'ha anomenat *fase d'iniciació* a aquest reclutament de quinases al complex de recepció del senyal. Aquesta Axina reclutada ve acompanyada de GSK3B que inicia la fosforilació dels motius PPPSPxS que continua CK1 γ . En aquest punt és on es produiria la *fase d'extensió*, els dominis PPPSPxS fosforilats atraurien més Axina/GSK3B. Aquesta s'ancoraria als complexos de la

membrana i formaria, junt amb Dvl, els feixos paral·lels a la membrana plasmàtica anomenats *signalosomes* [177].

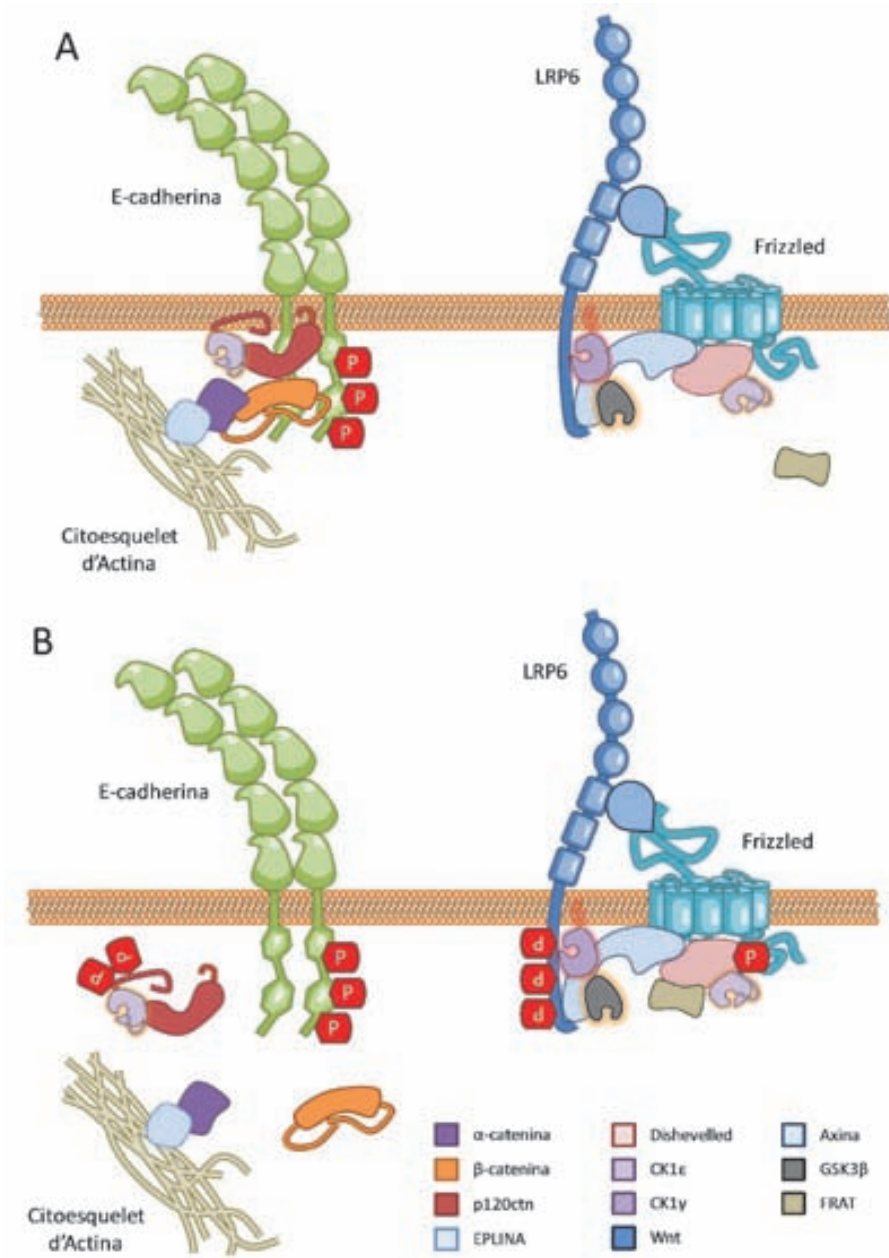


Figura 73: Les proteïnes dels complexos són fosforilades per CK1 i GSK3. **A.** Al activar-se CK1 ϵ aquesta fosforila E-cadherina separant-els complexos d'adhesió del complex Fz/LRP6. **B.** p120ctn i β -catenina es separen dels complexos d'adhesió degut a la fosforilació de CK1 ϵ sobre p120ctn i el domini citoplasmàtic de E-cadherina respectivament. GSK3 β i CK1 γ fosforilen el domini citoplasmàtic de LRP6 creant nous llocs d'ancoratge per Axina. Dvl també resulta fosforilat per CK1 ϵ ; aquesta fosforilació s'ha vist que incrementa l'afinitat de FRAT per Dvl.

En aquest punt es creu que el complex de degradació de β -catenina estaria ja completament inactiu. S'ha correlacionat la inhibició de GSK3B amb la conservació dels motius PPPSPxP del coreceptor LRP6, i s'ha descrit que aquests dominis fosforilats tenen la capacitat d'inhibir la GSK3B reclutada a la membrana plasmàtica [180, 181]. Un mecanisme paral·lel per inactivar la GSK3B podria ser el reclutament de FRAT/GBP a la membrana per part de Dvl, que un cop ha estat fosforilat per CK1 incrementa l'afinitat per aquest inhibidor de GSK3 [184]. Així doncs aquest reclutament de Dvl/FRAT al complex de degradació podria produir-se a la mateixa membrana plasmàtica (representat en la Figura 74).

La CK1 ϵ també s'ha vist implicada en la regulació del complex de degradació de β -catenina. La fosforilació de membres del complex (APC, Axina, i β -catenina) per aquesta quinasa causa la dissociació d'aquest, especialment dissociant la fosfatasa PP2A [252]. La desfosforilació causada per PP2A té la funció oposada, mantenir els membres d'aquest complex units per desfosforilació d'algun dels components [148] [253]. No es coneix amb detall quins membres del complex són els substrats d'aquestes desfosforilacions. El reclutament d'Axina a la membrana plasmàtica en activar-se Wnt, podria causar la desestabilització del complex de degradació de β -catenina. Per tal de veure això caldria estudiar la fosforilació de l'Axina unida a LRP6 i si es manté la integritat del complex de degradació un cop reclutada a la membrana. També s'ha descrit PP1 unida a Axina, la desfosforilació l'Axina per PP1 provoca l'alliberament de GSK3B del complex de degradació [150].

El model proposat en el nostre treball és novedós ja que proposa que una fracció dels complexos de les unions adherents es troba unida al complex de recepció del senyal de Wnt. L'activació per Wnt provocaria, a més de l'estabilització de β -catenina al citoplasma, l'alliberament de la β -catenina present a la fracció de complexos d'adhesió que interaccionen amb el complex de recepció de Wnt. A més, l'alliberament simultani de p120ctn provocaria una resposta doble al nucli; retirar el repressor transcripcional Kaiso unit a Tcf4 i facilitar la translocació de β -catenina per promoure l'expressió dels gens regulats per Tcf4/ β -catenina.

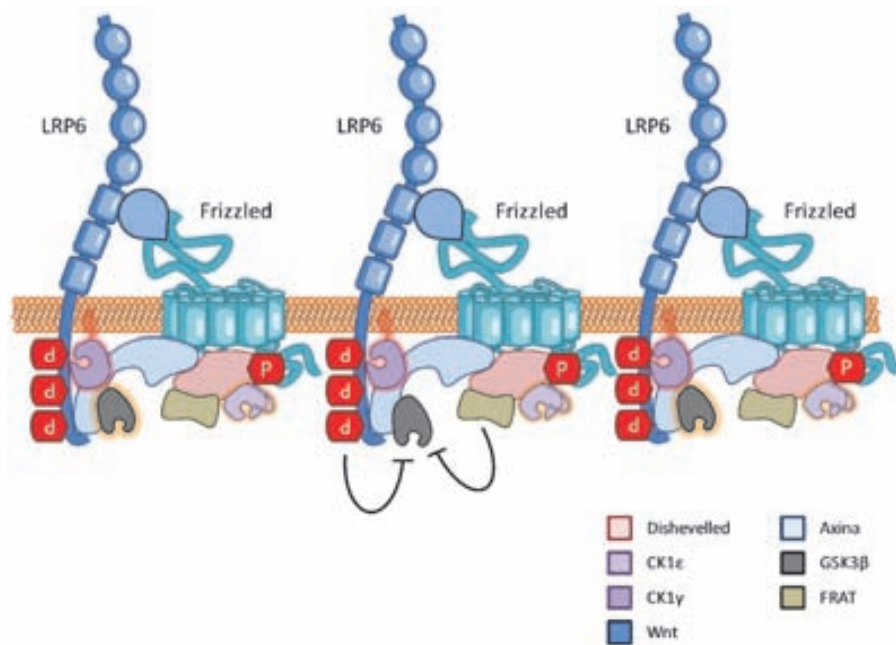


Figura 74: Formació dels signalosomes i inhibició de GSK3B. La inhibició de GSK3B es produiria, segons els models establerts, pel seu reclutament a la membrana per part d'Axina. Aquest fet la posaria en contacte amb els dominis citoplasmàtics fosforilats de LRP6 i FRAT; a ambdues proteïnes se'ls hi ha atribuït efectes inhibidors sobre aquesta quinasa.

La idea de trobar una fracció del complex de les unions adherents unida a un altre complex multiproteic de membrana ja ha estat demostrada pel complex γ -secretasa [254]. En aquest cas p120ctn uneix Nicastina, un dels membres d'aquest complex. A p120ctn ja se li ha atribuït un paper protegint l'E-cadherina de la proteòlisi provocada per aquest complex [57]. Cal replantejar però, si és p120ctn la que regula l'activitat d'aquest complex sobre E-cadherina. Al fragment citoplasmàtic de les cadherines proteolitzades pel complex γ -secretasa se'ls hi ha atribuït un paper senyalitzador al nucli [255, 256]. Algun autor veu l'entrada al nucli del fragment citosòlic d'E-cadherina enllaçat amb un increment de la entrada de p120ctn i una desrepressió de l'activitat mitjançada per Kaiso [257]. Aquests autors però descriuen una associació cooperativa p120ctn/CTF2/Kaiso (*Cadherin Terminal Fragment 2*), i els nostres resultats indiquen una competició entre aquestes dues proteïnes per p120ctn [Figura 19].

La p120-catenina és una proteïna pleiotròpica a la qual se li atribueixen noves funcions dia a dia. En el nostre treball se li atribueix una nova funció com a

component essencial de la ruta de Wnt junt amb CK1 ϵ , imprescindible en la iniciació de la transmissió del senyal de Wnt. A la vegada s'ha contribuït a clarificar com es produeix la regulació de la interacció p120ctn/Kaiso, lligant-la a l'activació de gens de la via canònica de Wnt, ja que la p120ctn que s'allibera de la membrana disromp la unió de Kaiso amb Tcf4, retirant la inhibició de Kaiso sobre aquest factor i restablint l'ancoratge de Tcf4 al DNA.

V. CONCLUSIONS

1. La p120-catenina es fosforila per CK1 ϵ en les Ser268/Ser269. Aquesta fosforilació bloqueja la unió amb l'E-cadherina, a la vegada que incrementa la unió amb el repressor transcripcional Kaiso.
2. La quinasa CK1 ϵ interacciona de forma constitutiva amb p120ctn entre els residus 234-390.
3. L'estimulació per Wnt3a activa CK1 ϵ i promou la fosforilació de la Ser268 de p120ctn, disminuint la interacció de p120ctn amb E-cadherina. p120ctn es deslocalitza de la membrana al citoplasma i promou l'export nuclear del Kaiso unit a Tcf4, alliberant així la repressió de Kaiso sobre Tcf4 i permetent la unió de Tcf4 al DNA. p120ctn no modifica la unió de Kaiso al DNA metilat.
4. E-cadherina/p120ctn/CK1 ϵ interaccionen amb el coreceptor de Wnt, LRP6. L'associació del complex de les unions adherents amb LRP6 es realitza a través d'E-cadherina. La pèrdua d'E-cadherina causa una localització aberrant de p120ctn al citoplasma, insensibilitzant-la a l'estímul de Wnt.
5. La dissociació de la unió E-cadherina/LRP6 és promoguda per Wnt en un procés dependent de p120ctn i de CK1 ϵ . p120ctn és necessària per a l'activació de CK1 ϵ , i la fosforilació del domini intracel·lular de l'E-cadherina per CK1 provoca la pèrdua d'interacció amb LRP6.
6. En cèl·lules deficientes per p120ctn o CK1 ϵ es bloqueja la fosforilació de Dvl i l'estabilització dels nivells de β -catenina, dos esdeveniments imprescindibles per l'activació de la via canònica de Wnt.

VI. MATERIALS I MÈTODES

1. Organismes i condicions de cultiu

1.1. Cultius bacterians

1.1.1. Soques bacterianes

En aquest treball s'utilitzen diferents soques segons si es vol obtenir DNA o proteïna:

- Per obtenir DNA utilitzem la soca DH5α de *E. Coli*.

Genotip: *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

- Per obtenir proteïna recombinant amb alta eficiència utilitzem la soca *E. coli* BL21 DE3 RIL. S'han de mantenir amb cloramfenicol per conservar els plasmidis que contenen.

Genotip: *B F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]*

(Conté tRNA: ArgU (AGA, AGG), ileY (AUA), leuW (CUA) clonats dins pACYC184)

1.1.2. Medi de cultiu bacterià

Pel creixement de la soca bacteriana varem utilitzar LB (*Luria Broth*), un medi ric, en forma líquida o sòlida (LB i LB-Agar respectivament). El medi s'esterilitza amb un autoclau (121°C, 20 min). Per la selecció dels bacteris transformats s'afegeix antibiòtic al medi, a una concentració final depenent de l'antibiòtic a utilitzar (veure Taula 1).

En el cas del medi sòlid, s'ha d'afegir l'antibiòtic un cop aquest s'ha autoclavat i quan la temperatura del medi es inferior als 50°C per evitar-ne la degradació. Immediatament s'aboca sobre plaques de Petri en ambient estèril, i es deixa solidificar en aquesta mateixa atmosfera (sota flama o campana de flux laminar).

S'emmagatzema a 4°C fins a tres mesos.

	LB
Ampicil·lina	150 mg/L
Kanamicina	30 mg/L
Cloramfenicol	50 mg/L

Taula 1: Concentració d'antibiòtics en medi LB

Les condicions per fer el cultiu de bacteris en LB són 37°C sense agitació pel medi sòlid, i amb agitació en medi líquid (110-220 rpm). Les condicions d'emmagatzemament de les colònies un cop transformades són a 4°C durant 4-6 setmanes per medi sòlid, i d'anys a -80°C pel medi líquid complementat amb 15% glicerol.

LB: 0,5% p/v extracte de llevat, 1% p/v bacto-triptona, 170 mM NaCl, pH 7,0

LB-Agar: 0,5% p/v extracte de llevat, 1% p/v bacto-triptona, 170 mM NaCl, 1,5% d'agar, pH 7,0

1.1.3. Preparació de cèl·lules competents

Protocol cèl·lules ultracompetents [258]

Per preparar les cèl·lules competents es fa una estria en plaques de LB-Agar del glicerinat stock de bacteris i es deixa créixer 16h a 37°C. Un cop crescudes, es pica una colònia que es deixa créixer 12h a 37°C/220 rpm en 5 ml de medi LB. Seguidament, s'inoculen 2 ml dels bacteris en 250 ml de medi SOB i es creix a 18°C fins a absorbància òptica a 600 nm de 0,6 (12-24h).

En aquest punt les cèl·lules es mantenen en gel 10' i seguidament es centrifuguen 10' a 2500 xg/4°C. Es resuspenen les cèl·lules amb cura en 80 ml de TB fred, mantenint-les en gel 10' més. Es centrifuguen 10' a 2500 xg/4°C i resuspenen en 20 ml de TB fred. Per últim s'afegeix dimetilsulfòxid (DMSO; Sigma) a concentració final del 7% i es mantenen en gel 10'. Es fan alíquotes de 250 µl abans de congelar en nitrogen líquid i emmagatzemar a -80°C.

LB: 0,5% p/v extracte de llevat, 1% p/v bacto-triptona, 170 mM NaCl, pH 7,0

LB-Agar: 0,5% p/v extracte de llevat, 1% p/v bacto-triptona, 170 mM NaCl, 1,5% d'agar, pH 7,0

SOB: 2% p/v bacto-triptona, 0,5% p/v extracte de llevat, 150 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 6,7-7,0

TB: 10 mM Pipes, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, ajustar el pH a 6,7 abans d'afegir el MnCl₂, esterilitzat per filtració

Protocol amb RbCl₂

Aquest protocol presenta menys eficiència que l'anterior, però és molt més ràpid i ideal per passar les construccions de soques utilitzades pel clonatge del DNA, com les DH5 α , a soques utilitzades per la producció de proteïna recombinant, les BL21. És recomanable utilitzar cèl·lules competents BL21 fresques per fer els stocks a partir dels quals produïrem les proteïnes recombinants.

Per preparar les cèl·lules competents es fa una estria en plaques de LB-Agar del glicerinat stock de bacteris i es deixa créixer 16h a 37°C. Un cop crescudes, es pica una colònia que es deixa créixer 12h a 37°C/220 rpm en 5 ml de medi LB. Seguidament, s'inoculen 2 ml dels bacteris en 50 ml de medi LB i es creix a 37°C fins a absorbància òptica a 600 nm de 0,3-0,5.

Es recull la suspensió de cèl·lules i es manté en gel 10-15'. Seguidament es centrifuguen 5' a 3000 rpm/4°C i el precipitat es resuspèn amb cura fins a obtenir un aspecte homogeni amb 4 ml de Tampó 1. S'afegeixen 12 ml més de Tampó 1 i es deixa 15' en gel (1/3 volum inicial de cultiu). Finalment es centrifuga 5' a 3000 rpm/4°C i es resuspèn amb cura en 4 ml de Tampó 2 (1/12'5 del volum inicial). En tot moment s'ha de mantenir les cèl·lules a 4°C.

S'utilitzen directament per transformar el DNA, o bé les aliquotem en eppendorfs que prèviament hem reservat a 4°C en volums de 250 μ l, guardant-les posteriorment a -80°C.

LB: 0,5% p/v extracte de llevat, 1% p/v bacto-triptona, 170 mM NaCl, pH 7,0

LB-Agar: 0,5% p/v extracte de llevat, 1% p/v bacto-triptona, 170 mM NaCl, 1,5% d'agar, pH 7,0

Tampó1: 100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂·4H₂O, 35 mM Acetat de Potassi pH 7,5, 10 mM

CaCl₂·2H₂O, 15% (p/v) glicerol, ajustar amb àcid acètic 0,2 M a pH 5,8 i esterilitzar per filtració utilitzant filtres de 0,22 µm

Tampó 2: 10 mM MOPS pH 6,8, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂·2H₂O, 15% (p/v) glicerol, ajustar amb NaOH fins a pH 6,8 i esterilitzar per filtració utilitzant filtres de 0,22 µm

1.2. Línies cel·lulars eucariotes

1.2.1. Línies cel·lulars utilitzades

- **SW480/SW480 shRNA-p120ctn:** Línia cel·lular humana d'adenocarcinoma de colon. Es troben en estadi tumoral Duke's B. Tenen un fenotip epitelial i creixen en adherència. Presenten una mutació en el gen APC (*adenomatous polyposis coli*) que provoca una acumulació de β-catenina. Les shRNA-p120ctn són clons estables seleccionats on s'ha integrat un plasmidi codificant un shRNA específic contra aquesta proteïna. Aquests clons han estat generats al laboratori del Dr. Eduard Batlle.
- **NIH3T3:** Línia cel·lular embrionària de ratolí. Fenotip fibroblàstic i creixement en adherència.
- **HEK-293T:** Línia cel·lular humana embrionària de ronyó. Tenen un fenotip epitelial i creixen en adhesió. Han estat transformades amb l'Adenovirus 5.
- **L-Cells/L-Cells Wnt3a:** Línies cel·lulars derivades de la línia L-M(TK-) Cells, procedents teixit connectiu subcutani de ratolí. Tenen un fenotip fibroblàstic i creixen en adhesió. Les Wnt3a són clons estables seleccionats on s'ha integrat un plasmidi codificant per aquest factor.
- **HT29 M6:** Línia cel·lular humana d'adenocarcinoma de colon. Tenen un fenotip epitelial i creixen en adherència.
- **IEC-18:** Línia cel·lular d'ili de rata. De fenotip epitelial i creixement adherent.
- **HCT-116:** Línia cel·lular humana de carcinoma de colon. Cèl·lules amb fenotip epitelial i de creixement adherent.

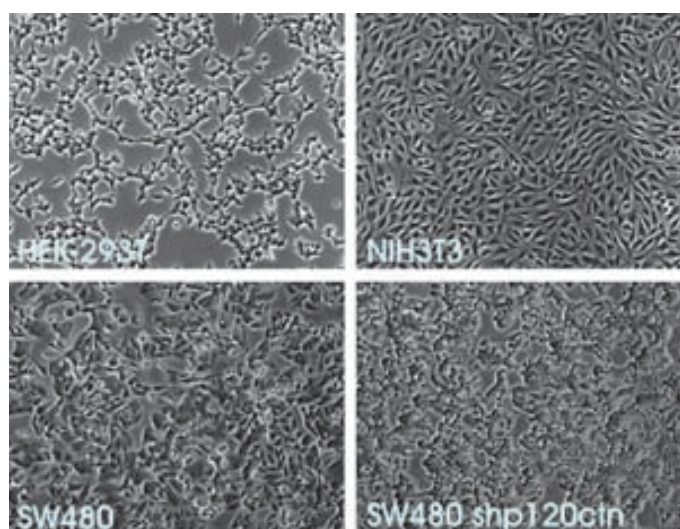


Figura 75: Principals línies cel·lulars utilitzades en aquest treball.

1.2.2. Manteniment dels cultius cel·lulars

Les diferents línies cel·lulars es mantenen amb D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Reactiva) amb 10% de sèrum de fetus boví (*Fetal Calf Serum*, FCS) (Biological Industries) en flascons T-30/75. Aquest medi és complementat amb piruvat sòdic, glutamina, aminoàcids no essencials i penicil·lina/estreptomicina com a antibiòtics (Promega, Gibco, Reactiva). Es creixen les cèl·lules a 37°C amb 5% de CO₂.

Quan les cèl·lules arriben a la confluència, s'elimina el medi rentant amb PBS i es tracten amb PBS-tripsina/EDTA uns 5' (Gibco). Es recullen les cèl·lules en suspensió en un flascó i s'elimina la tripsina del medi centrifugant 5' a 900 rpm i decantant el sobrenedant. Les cèl·lules es resuspenen en medi fresc i es sembra una alíquota en un flascó.

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

PBS-tripsina/EDTA: 0,5 mg/ml tripsina, 0,2 mg/ml EDTA.4Na, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

1.2.3. Recompte de cèl·lules

Per determinar el nombre de cèl·lules que conté la suspensió un cop

tripsinitzada, s'utilitza un microscopi òptic i una cambra de Neubauer. Aquesta cambra ens permet comptabilitat les cèl·lules presents en una suspensió i calcular la concentració de cèl·lules que tenim. S'addiciona Trypan Blue (Sigma) a la barreja de la càmera per controlar la integritat de les cèl·lules, descartant sempre els cultius que presenten tincions positives superiors al 5%.

Trypan Blue-PBS: 0,4% (p/v) Trypan-Blue, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

1.2.4. Congelació/descongelació/emmagatzemament

Per conservar les cèl·lules durant un període llarg de temps, es resuspenen de 2-5.10⁶ cèl·lules en 900 µl de D-MEM + 10% FCS i es posen en un criotub, on prèviament hem introduït 100 µl de DMSO. El criotub es congela en un *Cryo 1°C Freezing Container* (NALGENE™) omplert amb isopropanol dins d'un congelador de -80°C, permetent una disminució gradual de -1°C/min. de la temperatura fins a -80°C. Finalment es dipositen en un banc de nitrogen líquid.

Per la descongelació de la línia cel·lular, un cop extreta del banc de nitrogen líquid, aquesta es posa en un bany a 37°C per arribar ràpidament a aquesta temperatura. Quant el medi està gairebé descongelat es recull i dilueix en 10 ml D-MEM + 10% FCS. Aquest es centrifuga i decanta per eliminar el DMSO, es resuspèn i sembra el sediment restant en un flascó.

1.2.5. Selecció de línies cel·lulars

Algunes de les línies cel·lulars utilitzades contenen plasmidis que els hi confereixen característiques especials que volem conservar. Aquest plasmidis contenen el gen de resistència a un antibiòtic concret. Per tal de mantenir la població que expressa el plasmidi com a població majoritària s'ha afegit al medi l'antibiòtic necessari en les concentracions adequades (Taula 2).

Per aconseguir una expressió uniforme d'una construcció transfectada de forma transitòria en una línia cel·lular també s'ha utilitzat la selecció per antibiòtics. S'ha transfectat un plasmidi que, a més d'expressar la nostra proteïna, codifica una resistència a un antibiòtic de selecció. En aquest cas, un cop passades 24h de la

transfecció, s'ha afegit l'antibiòtic al medi; afegint-lo també en una placa control sense transfectar. Quan les cèl·lules de la placa control han mort a causa de l'antibiòtic, s'ha assumit que la població restant en la placa transfectada expressava la construcció d'interès i s'ha procedit a realitzar els diferents experiment amb les plaques transfectades.

	D-MEM
G418	0,4 µg/ml
Puromicina	1 µg/ml
Puromicina (selecció de poblacions transfectades)	2-4 µg/ml

Taula 2: Concentració d'antibiòtics en cultiu cel·lular per selecció.

1.2.6. Obtenció de medi condicionat amb Wnt3a

Aquest medi condicionat, així com el seu control, s'han obtingut de L-cells Wnt3a i L-cells parentals. El manteniment de la línia cel·lular s'ha realitzat en condicions normals, afegint selecció de puromicina en les L-cells Wnt3a per tal de mantenir la expressió d'aquesta característica.

Per obtenir el medi es sembra una desena part de les cèl·lules en suspensió en plaques de petri, sense antibiòtic de selecció per no afectar a les cèl·lules que volem estimular amb el medi condicionat posteriorment. Al cap de 4 dies es recull el sobrenedant de les plaques (1er lot) i es substitueix per medi fresc . Al cap de 3 dies es recull el sobrenedant (2on lot). S'eliminen les cèl·lules sembrades en aquestes plaques ja que han crescut massa i ja no són útils. Els dos lots es centrifuguen per eliminar les partícules cel·lulars que s'hagin després del cultiu i s'ajunten. Aquest medi es pot guardar a 4°C durant setmanes, o a -20°C durant mesos.

2. Mètodes d'obtenció, manipulació i anàlisis del DNA

2.1. Tècniques d'obtenció de DNA plasmídic

2.1.1. Transformació

Utilitzem una soca adequada d'*E. coli* competent (acabades de preparar o descongelades lentament a 4°C a partir d'alíquotes mantingudes a -80°C; apartat 1.1.3). Es barregen 0,1 ml de bacteris competents amb el DNA en ambient estèril, i es deixa 30' a 4°C. Seguidament es procedeix a fer un xoc tèrmic posant els bacteris 1' 30" a 42 °C, seguit de 2' a 4°C. S'afegeix 0,9 ml de LB (sense antibiòtic) i s'incuba 1h a 37°C/220 rpm per permetre que els bacteris desenvolupin la resistència a l'antibiòtic que hem incorporat amb el vector. Passat el temps es centrifuga 5' a 3000 rpm per descartar volum de medi, i es sembra el sediment (uns 100 µl) sobre plaques de LB-Agar + antibiòtic, que s'incuba a 37°C 16h.

Cada colònia aïllada que s'obté prové d'una sola *E. coli* que ha incorporat el vector, ja que ha guanyat la resistència a antibiòtic. Es pot comprovar la colònia mitjançant una digestió amb enzims de restricció i posterior electroforesis en gel d'agarosa, comprovant la mida de l'insert (Veure apartat 2.2.2.).

LB: 0,5% p/v extracte de llevat, 1% p/v bacto-triptona, 170 mM NaCl, pH 7,0

LB-Agar: 0,5% p/v extracte de llevat, 1% p/v bacto-triptona, 170 mM NaCl, 1,5% d'agar, pH 7,0

2.1.2. Extracció del DNA plasmídic

A partir d'un cultiu líquid saturat de bacteris, podem aïllar el seu DNA plasmídic per ser digerit, subclonat, transformat o transfectat. En aquest treball per obtenir aquest DNA, amb diferents graus de puresa i rendiment, s'han utilitzat els kits comercials *WizardR Plus SV Minipreps* (Promega) o *Maxipreps* (Quiagene) seguint les seves instruccions.

2.2. Tècniques de modificació del DNA

2.2.1. Esquema bàsic

El primer pas per expressar proteïnes recombinants, tant en cèl·lules procariotes com en eucariotes, és obtenir un DNA que puguem utilitzar per a les varies aplicacions experimentals. Cal doncs dissenyar plasmidis adequats per a aquestes aplicacions que continguin el DNA del gen d'interès.

Aquest fragment de DNA es pot obtenir de varies maneres, en aquest treball s'han obtingut a partir de subclonatges d'altres vectors o modificacions en construccions ja existents. Es segueix el següent esquema general:

1. Alliberació del gen del vector original
 - Digestió/PCR
2. Preparació del fragment de DNA i del vector destí
 - Digestió/Correcció d'extrems/Desfosforilació del Vector
3. Inserció del fragment en el vector (Lligació)
4. Amplificació de la construcció resultant
5. Identificació/Comprovació del producte final

2.2.2. Digestió del DNA

El DNA que volem subclonar és digerit amb enzims de restricció. Els enzims i els tampons són subministrats per Promega, Amersham i New England Biolabs. La quantitat de DNA a digerir oscil·la entre 500 ng i 5 µg, en un volum final de 20 a 100 µl. La quantitat d'enzim, de tampó i la temperatura a utilitzar van ser en cada cas els especificitats pel fabricant, en un temps de reacció de 1 a 2h.

2.2.3. Amplificació de fragments de DNA per PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*, PCR) s'ha usat en aquest treball per extreure fragments de DNA dels plasmidis on els teníem

clonats, afegint les dianes necessàries durant el procés d'elongació pel correcte clonatge en altres vectors.

Les reaccions s'han realitzat en un volum final de 50 µl partint de 100-300 ng de DNA. S'ha utilitzat 1-2,5 unitats de la polimerasa *Platinum^R PfxDNA Polymerase* (Invitrogen) amb els tampons i reactius subministrats en aquest kit. S'ha afegit a la barreja els oligonucleòtids encebadors i els desoxiribonucleòtids trifosfat (dNTPs; Invitrogen) a concentracions finals 0,2 µM i 0,3 µM respectivament. En els oligonucleòtids s'han afegit les modificacions necessàries pel posterior clonatge en el vector final.

Tots aquests elements es barregen i s'introdueixen en un termociclador (Perkin-Elmer) que realitza uns cicles d'oscil·lació de temperatura consecutius:

1. pas previ a 95°C durant 2' per desanellar completament el DNA i activar la polimerasa, ja que la *Pfx* té *hot-start*
 2. a 95°C 15" per desanellar el DNA
 3. a 50-55°C durant 30" per permetre l'anellament dels encebadors al DNA
 4. a 68°C durant 1'/kb per dur a terme l'elongació de les cadenes
- * els passos 2, 3 i 4 es repeteixen de 20-30 cicles per aconseguir l'amplificació exponencial del fragment de DNA entre els dos encebadors
5. un ultim pas a 68°C durant 2' per permetre l'elongació dels fragments incomplets

Aquestes són les condicions estàndard, on en cada cas particular es poden veure modificades per aconseguir un rendiment i especificitat adequats de la reacció de PCR. Els paràmetres modificables són la concentració de Mg²⁺, la temperatura d'hibridació dels encebadors i el temps d'elongació, entre altres.

2.2.4. Pas d'extrems cohesius a roms. *Klenow*.

En algun dels casos els fragments de DNA digerits amb extrems cohesius necessiten tenir extrems roms per poder lligar-los en un vector concret. El pas d'extrems cohesius a roms s'ha fet amb la polimerasa *Klenow* (New England Biolabs).

En aquest cas es va omplir amb aquesta polimerasa aquells nucleòtids que estaven desaparellats després d'una digestió prèvia. La reacció te lloc a 37°C durant 1h barrejant de 3-4 µg de DNA, 2 µl de Klenow (10 u) i 25 µM de dNTPs en un volum final de 50 µl de tampó de polimerasa.

2.2.5. Purificació de bandes en gel d'agarosa

Els fragments de DNA de mides diferents, procedents d'una digestió, són separats electroforèticament. S'utilitza un gel d'agarosa 1% en TAE. Per aïllar el fragment d'interès es talla la banda i es purifica amb el kit *GFX™PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham) seguint el seu protocol de purificació del DNA a partir de bandes en gels d'agarosa.

TAE: 40 mM Tris-acetat, 0,1 mM EDTA, pH 8,3

2.2.6. Desfosforilació dels vectors

La desfosforilació s'utilitza per evitar la relligació del vector sobre si mateix, i té major importància quan tenim els dos extrems roms o cohesius compatibles. A 2,5 µg de vector digerit, s'afegeix 0,5 unitats de fosfatasa alcalina intestinal bovina (*calf intestinal phosphatase*, CIP) (New England Biolabs) per µg de DNA, dissolta amb el tampó adequat proporcionat per la casa comercial. S'incuba durant 60' a 37°C. S'aïlla el DNA de la barreja utilitzant el kit *GFX™PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham) seguint el seu protocol de purificació de DNA a partir d'una solució. El DNA es resuspèn en TE.

TE: 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA

2.2.7. Lligació

Una vegada tenim el vector linearitzat i desfosforilat, i el producte a clonar amb dianes compatibles amb el vector als extrems, es passa a realitzar la lligació. Es barreja una relació molar 3:1 insert:vector en un medi que contingui tampó de lligació (amb 1 mM d'ATP) i 1 unitat de *T4-DNA Lligase* (Roche). S'incuba durant 16h a 16°C.

2.2.8. Mutagènesis dirigida

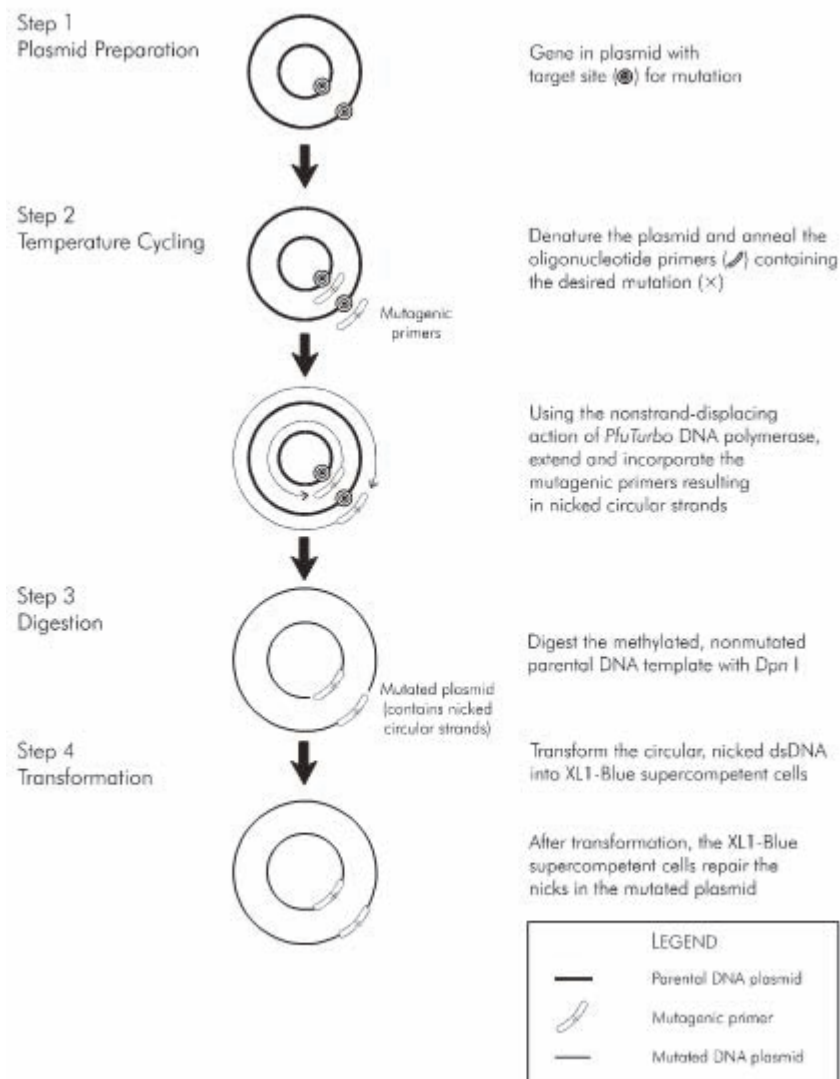
Alguns dels mutants d'aquest treball s'han obtingut per mutagènesis dirigida. En aquest procés s'utilitzen dos oligonucleòtids complementaris que anellen en la regió on volem introduir la mutació. En aquests oligonucleòtids s'introdueix ja la mutació desitjada per tal que quedi incorporada als nous fragments que produïrem per PCR, seguint el següent esquema:

- Es desnaturalitza el plasmidi i s'anellen els oligonucleòtids
- Utilitzant la polimerasa *Platinum^R PfxDNA Polymerase* (Invitrogen), en condicions de PCR a temps llargs, elonguem tot el plasmidi a partir dels oligonucleòtids, obtenint noves cadenes circulars amb un nick i amb la mutació ja incorporada
- Digerim el plasmidi parental amb DpnI (New England Biolabs), un enzim que digereix i talla exclusivament les cadenes metilades, procedents de cultiu de bacteris, sense reconèixer les noves cadenes generades per PCR
- Transformem els nous plasmidis obtinguts per PCR en cèl·lules competents. Aquestes cèl·lules ja repararan els nicks que contenen aquests.

Els oligonucleòtids sentit utilitzats per aquestes construccions es mostren a la Taula 3.

	Seqüència (5'a3')
p120ctn S268A/S269A	GTTCGAGTAGGTGGAGCCGCTGTGGACCTGCATCGT
p120ctn S268D/S269D	GTTCGAGTAGGTGGAGACGATGTGGACCTGCATCGT

Taula 3: Oligonucleòtids sentit utilitzats per mutagènesis dirigida



Esquema de la tècnica *QuickChange Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene)

2.3. Tècniques d'anàlisi del DNA

2.3.1. Anàlisi en gels d'agarosa

Per a l'anàlisi i la identificació de fragments de DNA s'han utilitzat gels d'agarosa convencionals en condicions no desnaturitzants. Depenent de la mida dels fragments a analitzar s'han utilitzat concentracions d'agarosa d'entre el 1-2% en TAE. El tampó TAE s'ha utilitzat com a tampó d'electroforesis i s'ha utilitzat la tinció per Bromur d'Etidi (BrEt; Sigma) per a la detecció de les bandes de DNA (incloent-ne en el

gel 5 µg/ml). L'estimació de la mida dels fragments s'ha fet per comparació amb un marcador de pes molecular conegut, *DNA 1 kb Ladder* (New England Biolabs).

TAE: 40 mM Tris-acetat, 0,1 mM EDTA, pH 8,3

2.3.2. Seqüenciació del DNA

Es va utilitzar el *dRhodamine terminator Cycle Sequencing Kit* (Perkin Elmer) utilitzant oligonucleòtids pròxims a la zona a analitzar.

3. Mètodes d'expressió i purificació de proteïnes

3.1. Proteïna recombinant en procariotes

A partir d'una colònia de *E. coli* transformada amb un plasmidi pGEX-6P on hem introduït la proteïna desitjada, es creix una petita alíquota 16h a 37°C/220 rpm en LB-ampicil·lina. A continuació es fa una dilució 1:100 del cultiu en el mateix medi i es manté a 37°C/220 rpm fins a assolir una densitat òptica a 600 nm de 0,6 (aquest valor ens indica que el cultiu es troba en la fase exponencial del seu creixement). En aquest punt s'indueix l'expressió dels productes codificats el en pGEX-6P afegint 0,1 mM de IPTG (isopropil β-D-tiogalactòsid) mantenint les mateixes condicions de creixement. Després de 2h d'inducció es centrifuguen les cèl·lules a 8000 rpm/4°C durant 10'.

Depenent de la solubilitat de la proteïna, procedirem a seguir una lisis diferent:

1. *Proteïnes solubles*: El sediment es resuspèn en PBS. A continuació, es lisen els bacteris sotmetent la barreja a sonicació durant períodes alternats de sonicació/repòs de 30". S'afegeix Tritó X-100 (Sigma) a una concentració final de l'1% per ajudar a solubilitzar les proteïnes. Es centrifuga a 10.000 rpm/4°C durant 10' i es descarta el sediment (conté fragments de membrana i altres restes cel·lulars).
2. *Proteïnes poc solubles*: El sediment es resuspèn en STE + 0,1 µg/ml lisozima i es deixa reposar 15' a 4°C. S'afegeix Sarcozyl 1% final i es vorteja 1'. A continuació es sotmet la barreja a sonicació durant períodes alternats de

sonicació/repòs de 30". S'afegeix Tritó X-100 (Sigma) a una concentració final de l'1% i es centrifuga a 10000rpm/4°C durant 20'. Es descarta el sediment. S'afegeix un 2% més de Tritó X-100 i es vorteja 2' més.

Per a purificar la proteïna d'interès s'incuba el sobrenedant (barreja de proteïnes bacterianes amb la que hem induït amb el *tag* GST) amb un volum 1:100 (v:v) de resina *Glutathione-Sepharose-4B* (Pharmacia). Aquesta resina duu glutatió unit a la superfície permetent així una unió específica al *tag* GST. S'aconsegueix així en un sol pas de cromatografia la retenció a la resina de la proteïna d'interès. Per descartar la resta de proteïnes es renta la resina varies vegades amb PBS.

En aquest punt podem escollir si volem obtenir la proteïna sola o la proteïna de fusió amb el *tag* GST. Els diferents passos són:

1. *Per obtenir la proteïna unida a GST:* la resina s'incuba amb tampó d'elució de glutatió (*glutathion elution buffer*, GEB). S'aconsegueix així separar la GST del glutatió unit a la resina (aquesta proteïna té més afinitat pel glutatió reduït que per l'oxidat unit a la resina). Per eliminar tot el glutatió del medi es posa el sobrenedant en un sac de diàlisi, i es dialitza durant 20h a 4°C canviant repetidament el tampó de diàlisi que utilitzem.
2. *Per obtenir la proteïna sense GST:* s'incuba amb el tampó de tall de la *PreScission Protease* (PSP) (Amersham-Pharmacia). S'afegeix 1 unitat de PSP per cada 50 µg de proteïna de fusió i es manté la barreja a 4°C de 4 a 16h en agitació.

Finalment recollim el sobrenedant i el conservem a -20 °C amb 50% de glicerol. Per determinar el grau de puresa de les proteïnes recombinants (unides a GST o en forma lliure) es va utilitzar l'electroforesi monodimensional en gels de poliacrilamida seguit d'una tinció de Comassie (Apartat 4.1.1. Electroforesi de gels de poliacrilamida. SDS-PAGE (Laemmli)). Comparant després per densitometria amb un escàner GS-700 (Bio-Rad) la intensitat de les bandes d'interès amb quantitats conegudes d'albumina sèrica bovina (BSA) (Sigma).

LB: 0,5% p/v extracte de llevat, 1% p/v bacto-triptona, 170 mM NaCl, pH 7,0

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

STE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

GEB: 20 mM glutatió reduït (SIGMA), 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 100 mM NaCl

Tampó de diàlisi: 25 mM Tris pH 8,3, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA i 1 mM DTT

Tampó de tall de la PSP: 50 mM Tris pH 7,8, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA

3.2. Expressió i obtenció de proteïnes en línies cel·lulars

3.2.1. Transfeccions transitòries

Es sembren de $0,25-1 \cdot 10^5$ cèl·lules/cm² en plaques de mida adient a l'experiment a realitzar. Les cèl·lules s'incuben entre 16-24h fins a aconseguir una confluència entre 50-80%. Segons el tipus cel·lular i la seva dificultat en la transfecció utilitzem un dels protocols següents.

PEI: El PEI (polietilenamina linear de 25 kDa; Polysciences, Inc.) proporciona una transfecció adequada en moltes línies cel·lulars, però en algunes línies molt resistents a la transfecció aquest mètode no obté rendiments adequats. La quantitat de DNA que s'utilitza va en funció de la mida de la placa (inicialment 0,4 µg de DNA per cm²) i de la línia cel·lular a transfectar. Es barreja en un tub 125 µl de medi D-MEM sense antibiòtics ni sèrum per cada µg de DNA. Sobre aquesta barreja es posen 10 µl de PEI per cada µg de DNA i es vorteja uns 15". Es deixa reposar a temperatura ambient 20' i s'afegeix a la placa. Degut a la toxicitat d'aquest producte en algunes línies cel·lulars és recomanable canviar el medi entre 6-12h després de la transfecció. Després de 12-72h temps suficient per permetre l'expressió dels productes d'interès, es procedeix a recuperar les cèl·lules.

PEI: 1 mg/ml PEI en H₂O miliQ, ajustar a pH 7,0 amb HCl i esterilitzar per filtració amb filtres de 0,22 µm

Lipofectamina 2000: Seguint les instruccions del fabricant, per cada cm² de superfície de la placa on tinguem sembrades les cèl·lules es barregen 0,4 µg de DNA amb 25 µl d'Opti-MEM^R (Life Technologies). Paral·lelament es prepara una segona solució amb 1 µl de LipofectamineTM2000 (InvitrogenTM) en 25 µl Opti-MEM^R també per cada cm². Després d'un temps d'incubació de 5', es barregen les dues solucions i la

barreja de transfecció resultant s'incuba 20 minuts més a temperatura ambient. Es substitueix el medi de les plaques sembrades per Opti-MEM^R + 10% FCS i s'afegeix a les cèl·lules la barreja de transfecció. Passades de 3-5h es canvia el medi de les plaques per D-MEM + 10% FCS fresc. Després de 12-72h, temps suficient per permetre l'expressió dels productes d'interès, es procedeix a recuperar les cèl·lules.

3.2.2. Preparació d'extractes cel·lulars

Per extreure les proteïnes de les cèl·lules hem utilitzat diferents tipus d'extractes depenent de les nostres necessitats. Les plaques amb el cultiu de cèl·lules són rentades amb PBS. Un cop retirat el PBS, s'afegeix tampó de lisi sobre aquestes (la quantitat depèn de la superfície de la placa). Es fa un scraping de les plaques i el lisat es recull en un eppendorf. La continuació es segueix un dels següents protocols.

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

Extractes tipus Kemler: Per aconseguir una lisis suau, i extreure majoritàriament les proteïnes solubles, conservant la majoria d'interaccions proteiques, s'utilitza tampó de lisi tipus Kemler. S'homogeneïtzen els extractes amb xeringa per tal de trencar els nuclis i es centrifuguen 15' a 12000 rpm després de mantenir-los 10-30' en agitació a 4°C.

Tampó de lisis tipus Kemler: 25 mM Tris pH 7,6, 210 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0,1% Nonidet-40, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 3 mM aprotinina, 10 mM leupeptina, 10 mM pepstatina, 1 mM PefaBlock, 1 mM NaF, 2,5 mM β-glicerolfosfat, 0,5mM Va³⁺

Extractes NP-40: Per a obtenir una lisis més forta utilitzem entre un 0,25-1% de NP-40. En aquest es solubilitza més quantitat de proteïnes de membrana i citoesquelet, depenent de la quantitat de detergent. Els extractes s'homogeneïtzen amb xeringa i es mantenen 10' en agitació a 4°C. Posteriorment es centrifuguen 10' a 14000 rpm.

Tampó de lisis NP-40: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4), 0,25-1% Nonidet-40, 3 mM aprotinina, 10 mM leupeptina, 10 mM pepstatina, 1 mM PefaBlock, 1 mM NaF, 2,5 mM β-glicerolfosfat, 0,5mM Va³⁺

Extractes RIPA: Per aconseguir una lisis més forta i extracció de gairebé totes les proteïnes cel·lulars, conservant només les interaccions més fortes, s'utilitza el tampó de lisi tipus RIPA. S'homogeneïtza amb xeringa i centrifuga 10' a 14000 rpm.

Tampó de lisis RIPA: 25 mM Tris pH 7,6, 210 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% Nonidet-40, 0,5% deoxicolat sòdic, 0,1% SDS, 3 mM aprotinina, 10 mM leupeptina, 10 mM pepstatina, 1 mM PefaBlock, 1 mM NaF, 2,5 mM β -glicerolfosfat, 0,5mM Va^{3+}

Extractes totals SDS 1%: Per aconseguir de solubilitzar la totalitat dels components cel·lulars, utilitzem un tampó amb SDS a una concentració final de l'1%. Un cop les cèl·lules han estat lisades, aquestes adquireixen una consistència mucosa degut al DNA. S'escalfen els extractes 5' a 95°C i s'homogeneïtzen amb una xeringa, repetint el procés fins que el moc hagi desaparegut totalment. Finalment es centrifuga 10' a 14000 rpm. Si després de centrifugar encara queda sediment es repeteix el procés d'escalfament i homogeneïtzació.

Tampó de lisis 1% SDS: 25 mM Tris pH 7,6, 210 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% SDS, 3 mM aprotinina, 10 mM leupeptina, 10 mM pepstatina, 1 mM PefaBlock, 1 mM NaF, 2,5 mM β -glicerolfosfat, 0,5mM Va^{3+}

Extractes amb digitonina: Aquest és un detergent que manté la integritat de les proteïnes de membrana, així doncs l'utilitzem quan volem treballar amb els complexos de membrana el més íntegres possible. S'homogeneïtzen els extractes amb xeringa i es deixen 10' en gel. Es centrifuguen 10' a 14000 rpm.

Tampó lisis digitonina 1%: 25 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% digitonina, 3 mM aprotinina, 10 mM leupeptina, 10 mM pepstatina, 1 mM PefaBlock, 1 mM NaF, 2,5 mM β -glicerolfosfat, 0,5mM Va^{3+}

3.2.3. Subfraccionament cel·lular

Per tal d'extreure proteïna de compartiments cel·lulars concrets, s'han realitzat diferents subfraccionaments cel·lulars segons el que es volia analitzar.

Nuclis separats de citoplasma i membrana: Es renta la placa amb PBS i s'afegeix tampó A (100/300 µl per placa de 60/100 mm). Es recull el lisat pipetejant suaument i es deixa 10' en gel. S'afegeix 1/30 part de volum de Tritó X-100 al 10% i es vorteja 30". Es centrifuga 1' a 11000 rpm/4°C. Es guarda el sediment i es recull el sobrenedant. En aquest punt el sobrenedant es compon de membranes més citoplasmes. Es fa una segona centrifugació d'1' a 11000 rpm/4°C i es descarta el sediment. Al sobrenedant resultat s'afegeix 0,11 volums de tampó B i s'incuba 30' a 4°C en agitació. Es centrifuga 15' a 15000 xg/4°C i el sobrenedat es considera citosol + membranes. Si es vol separar posteriorment les membranes del citosol s'ha d'ultracentrifugar a 100000 xg. El sediment reservat anteriorment es renta (x3) amb el mateix volum de tampó A que hem fet servir per la lisi 1' a 11000 rpm/4°C. Es resuspèn aquest en 1/5 part del volum inicial amb tampó C. Aquest s'homogeneïtza amb xeringa i s'incuba 30' a 4°C en agitació. Es centrifuga 15' a 15000 xg/4°C i es descarta el sediment resultant. El sobrenedant es considera els nuclis. Cal tenir en compte que el citoesquelet no és soluble en aquest protocol i queda contaminant els nuclis. Per carregar parts equivalents de compartiments cel·lulars es carrega 5 vegades més de citoplasma que de nuclis, ja que aquests han estat resuspesos en 1/5 part del volum.

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

Tampó A: 10 mM Hepes-KOH pH 7,8, 1,5 mM MgCl₂, 10mM KCl, 3 mM aprotinina, 10 mM leupeptina, 10 mM pepstatina, 1 mM PefaBlock, 1 mM NaF, 2,5 mM β-glicerolfosfat, 0,5mM Va³⁺

Tampó B: 0,3 M Hepes-KOH pH 7,8, 1,4 M KCl, 30 mM MgCl₂, 3 mM aprotinina, 10 mM leupeptina, 10 mM pepstatina, 1 mM PefaBlock, 1 mM NaF, 2,5 mM β-glicerolfosfat, 0,5mM Va³⁺

Tampó C: 20 mM Hepes-KOH pH 7,8, 25% (p/v) glicerol, 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 3 mM aprotinina, 10 mM leupeptina, 10 mM pepstatina, 1 mM PefaBlock, 1 mM NaF, 2,5 mM β-glicerolfosfat, 0,5mM Va³⁺

Citoplasma separat de membrana i nuclis: Es renta la placa amb PBS i es recullen les cèl·lules en un falcon amb una rasqueta. Es centrifuguen les cèl·lules 5' a 3000 rpm i es decanta el PBS. Es resuspèn el sediment amb tampó de lisis tipus Kemler, sense homogeneïtzar amb xeringa per tal de no trencar els nuclis. Es manipula tot a 4°C i es mantenen les cèl·lules en gel durant 30'. Es centrifuga 15' a

12000 rpm/4°C. El sobrenedant es considera el citosol, tot i que la part més soluble de la membrana pot ser-hi present. El sediment es resuspèn amb tampó RIPA i s'homogeneïtza amb xeringa per tal de trencar els nuclis. Es manté tota la manipulació a 4°C i es centrifuga 10' a 14000 rpm/4°C. El sobrenedant es considera els nuclis + membrana + citoesquelet. El sediment resultant es descarta.

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

Tampó de lisis tipus Kemler: 25 mM Tris pH 7,6, 210 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0,1% Nonidet-40, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 3 mM aprotinina, 10 mM leupeptina, 10 mM pepstatina, 1 mM PefaBlock, 1 mM NaF, 2,5 mM β-glicerolfosfat, 0,5mM Va³⁺

Tampó de lisis RIPA: 25 mM Tris pH 7,6, 210 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% Nonidet-40, 0,5% deoxicolat sòdic, 0,1% SDS, 3 mM aprotinina, 10 mM leupeptina, 10 mM pepstatina, 1 mM PefaBlock, 1 mM NaF, 2,5 mM β-glicerolfosfat, 0,5mM Va³⁺

4. Tècniques per a l'estudi de proteïnes

4.1. Tècniques electroforètiques

4.1.1. Electroforesi de gels de poliacrilamida. SDS-PAGE (Laemmli)

Per tal d'analitzar les proteïnes recombinants obtingudes en els cultius i els resultats dels experiment realitzats es va utilitzar l'electroforesi unidimensional en gels de poliacrilamida, seguint el mètode de Laemli.

S'utilitzen gels de 1,5 mm de gruix amb el sistema *Mini-Protean III/Tetra* (Bio-Rad) amb un percentatge d'acrilamida entre el 7,5-16% en el gel separador. La concentració d'acrilamida al gel apilador es del 4%. Es va mantenir una relació acrilamida:bis-acrilamida de 37,5:1 en tots els casos. A les mostres se'ls afegeix tampó de carrega i es bullen 5'. El gel es va córrer a voltatge constant en tampó Tris-Glicina-SDS (TGS10X; Bio-Rad). El marcador de pes molecular utilitzat és el *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad).

Si es volen visualitzar directament les mostres es fa una tinció submergint el gel 30' en una solució de *Comassie Brilliant Blue* en agitació. Posteriorment es fan rentats del gel amb una tampó per destenyir i posteriorment amb aigua fins a deixar només les bandes de proteïna tenyides, eliminant tot el fons del gel.

Tampó de càrrega: Tris 100 mM pH 6,8, 4% glicerol, 2% SDS, 0,06% 2-B-mercaptoetanol

Comassie Brilliant Blue: 0,1% de Comassie Brilliant Blue, 40% metanol i 10% d'àcid acètic

Tampó de destenyir: 10% àcid acètic, 40% metanol

4.1.2. Electrotransferència i immunodetecció. Western Blot

Les proteïnes resoltes per SDS-PAGE s'electrotransfereixen a un filtre de PVDF (*Immobilon-P Tranfer Membrane* 0,45 μ M; Millipore) en una càmera de transferència humida (Bio-Rad) a 100 mV durant 60'-90' en tampó de transferència (depenent del % del gel de poliacrilamida i de la mida de la proteïna).

La membrana es bloqueja amb 1% BSA o 5% de llet descremada en TBS/TTBS durant 1h a temperatura ambient, segons els requeriments dels anticossos a utilitzar. A continuació s'incuba la membrana amb un anticòs primari adequat, en la dilució descrita pel fabricant, durant 1-4h a temperatura ambient o 16h a 4°C.

Anticòs primari	Organisme	Epítop	Dilució	Casa Comercial
CK1 α	Goat	C-terminal	1/500	Santa Cruz
CK1 ϵ	Mouse	248-414	1/2000	BD Transduction Labs
Dvl-2	Rabbit	623-697	1/500	Santa Cruz
E-cadherina	Mouse	735-883	1/2500	BD Transduction Labs
GST	Goat	-	1/2000	Amersham
HA, clon 3F10	Rat	-	1/1000	Roche
hTcf4	Mouse	N-terminal	1/1000	Upstate
Kaiso	Mouse	103-584 / Kaiso Δ ZF	1/1000	Upstate/Abcam
Lamina B1	Rabbit	400-500	1/1000	Abcam
LRP5/6	Rabbit	437	1/250	Acris
Myc, clon 9E10, hibridoma	Mouse	-	1/100	Cedit pel Dr. Gabriel Gil

Anticòs primari	Organisme	Epítóp	Dilució	Casa Comercial
p120ctn	Rabbit	C-terminal	1/50 (IF)	Santa Cruz
p120ctn-pS268	Mouse	P-Ser268	1/1000	Cedit pel Dr. Albert Reynolds
p120ctn, clon 98	Mouse	790-911	1/1000	BD Transduction Labs
Piruvat Quinasa	Goat	-	1/2000	Sigma
α -catenina	Mouse	729-906	1/500	BD Transduction Labs
β -Actina	Mouse	N-terminal	1/5000	Sigma
β -catenina	Mouse	696-750	1/1000	BD Transduction Labs

Taula 4: Anticossos primaris utilitzats.

Es fan 3 rentats de 10' amb TTBS per eliminar l'excés d'anticòs i s'incuba l'anticòs secundari (anti-IgG conjugat amb HRP -peroxidasa de rave-) de 1-1,5h a temperatura ambient.

Anticòs secundari	Dilució	Casa Comercial
Immunopure Goat anti-Mouse IgG-HRP	1/10000	Pierce
Peroxidase-conjugated Goat anti-Rabbit IgGs	1/2000	Dako
Peroxidase-conjugated Rabbit anti-Goat IgGs	1/2000	Dako
Peroxidase-conjugated Rabbit anti-Rat IgGs	1/1000	Dako

Taula 5: Anticossos secundaris utilitzats.

Es realitzen uns últims rentats de 10' amb TTBS per eliminar les restes d'anticòs secundari. Es revela utilitzant el kit *ImmobilonTM Western Chemiluminiscent HRP Substrate* (Millipore) i pel·lícules fotogràfiques (Kodak), seguint les instruccions del fabricant. Per la quantificació de proteïna, les pel·lícules fotogràfiques es van analitzar en un densitòmetre G-700 (Bio-Rad). Alternativament per al revelat d'algun dels anticossos s'ha utilitzat el sistema *Snap i.d.* (Millipore).

En el cas de realitzar revelats consecutius en una mateixa membrana, aquesta s'ha estripat durant 20' a 55°C amb tampó d'stripping i procedit a rebloquejar de nou i

a incubar amb els anticossos corresponents.

Tampó de transferència: 20mM Tris, 150 mM glicina, 20% metanol

TBS: 25 mM Tris pH 7,5, 136 mM NaCl, 4 mM KCl

TTBS: 0,1% Tween, 25 mM Tris pH 7,5, 136 mM NaCl, 4 mM KCl

Tampó d'stripping: 2% SDS, 100 mM β-mercaptoetanol, 62,5 mM Tris-HCl pH a 6,8

4.2. Assaig d'interacció proteïna-proteïna

4.2.1. Assaigs d'unió amb proteïnes recombinants

Els diferents assaigs d'interacció es duen a terme incubant les quantitats indicades de les diferents proteïnes recombinants en un volum final de 200 µl tampó de binding durant 25'-30' a 25°C.

Els complexos formats s'aïllen afegint 20 µl de resina efectiva Glutatió-Sefarosa 4B (Sigma), que reté específicament la GST, incubant 25' a 25°C. Seguidament es renta la resina 3 cops amb 750 µl de tampó de binding per eliminar les restes de proteïna lliure, no unida a la resina a través de GST. Els complexos retinguts per la resina es solubilitzen afegint tampó de carrega d'electroforesis i bullint les mostres 4'.

Els complexos solubilitzats s'analitzen per electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE), i posteriorment el gel es transfereix a una membrana de PVDF per ser analitzat per *Western Blot*. En tots els casos es realitzen controls amb la proteïna GST sola per eliminar la possible associació inespecífica a la GST.

Tampó de càrrega: Tris 100 mM pH 6,8, 4% glicerol, 2% SDS, 0,06% 2-β-mercaptoetanol

Tampó de binding: 50 mM Tris pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 3 mM MgCl₂, 0,1% (p/v) Tritó X-100, Inhibidors de proteases i fosfatases

4.2.2. Assaigs de Pull-Down

Els assaigs de *Pull-Down* es van realitzar incubant les quantitats indicades de proteïna recombinant amb una quantitat fixa d'extractes cel·lulars, en un volum final de 500 µl en tampó de lisis corresponent durant 45' a 25°C o 2-16h a 4°C.

Els complexos formats s'aïllen afegint 20 µl de resina efectiva Glutatió-Sefarose 4B (Sigma) 25'/25°C o 45'/4°C. Seguidament es renta la resina 3 cops amb 750 µl de

PBS + 0,1-0,5% NP-40 per eliminar les restes de proteïna lliure, no unida a la resina a través de GST. Els complexos proteics s'elueixen directament amb tampó de carrega, i posteriorment s'analitzen per *Western Blot*. En tots els casos es realitzen controls amb la proteïna GST sola per eliminar la possible associació inespecífica a la GST.

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

Tampó de càrrega: Tris 100 mM pH 6,8, 4% glicerol, 2% SDS, 0,06% 2-B-mercaptoetanol

4.2.3. Assaigs de Coimmunoprecipitació

En aquests assaigs es purifiquen les proteïnes endògenes a partir d'extractes cel·lulars i s'analitza l'associació o modificació de les diverses proteïnes d'interès. Per fer-ho, s'incuben de 250-750 µg d'extractes cel·lulars amb 1 µg/ml de l'anticòs corresponent, en un volum final de 250-750 µl en tampó de lisis durant 2-16h a 4°C en agitació. Es centrifuga el material insoluble 2' 14000 rpm/4°C i es descarta el sediment. El sobrenedant s'incuba durant 90' a 4°C amb 20 µl de proteïna G-sefarosa (Sigma).

Quan s'ha utilitzat un anticòs d'hibridoma procedent de sobrenedant de cultiu cel·lular, primer s'incuba aquest sobrenedant amb 20 µl de proteïna G-sefarosa (Sigma) 90' a 4°C en agitació per tal d'unir prèviament l'anticòs a la resina. Es renta (x2) amb 750 µl de PBS i posteriorment s'incuba aquesta resina amb els extractes cel·lulars.

El material immunoprecipitat es renta (x3) amb 750 µl de PBS + 0,1-0,5% NP-40. Els complexos proteics s'elueixen directament amb tampó de carrega i s'analitzen per *Western Blot*.

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

Tampó de càrrega: Tris 100 mM pH 6,8, 4% glicerol, 2% SDS, 0,06% 2-B-mercaptoetanol

4.3. Assaigs d'interacció proteïna-DNA

4.3.1. Assaigs BOPA

Els *Biotinylated Oligo Pull-down Assay* (BOPA) permeten veure la interacció d'una proteïna amb una sonda de doble cadena de DNA que tenim marcada amb biotina.

Podem partir tant d'extractes com de proteïna recombinant.

El primer pas a realitzar és l'anellament dels oligonucleòtids per obtenir el DNA de doble cadena on s'uniran les proteïnes. Els dos oligonucleòtids sintetitzats de cadena senzilla es posen a 1 µg/µl amb tampó d'anellament. Al menys un d'aquests ha d'anar marcat amb biotina per a la posterior purificació. Aquesta solució s'escalfa a 70°C i es deixa refredar lentament a temperatura ambient. Un cop anellats es guarden a -20°C.

Es barregen 250 ng d'oligonucleòtid amb una quantitat coneguda d'extractes totals o proteïna recombinant en tampó BOPA. S'afegeix Poly[dl:dC] (*Poly[deoxyinosic deoxycytidylic] àcid sodium salt*; Sigma) en excés (5 vegades la quantitat d'oligonucleòtid) per tal de disminuir la unió inespecífica de la proteïna a l'oligonucleòtid. S'incuba 45' a 4°C en agitació orbital. S'afegeixen 10 µl de Streptavidina-Agarosa (Sigma) rentada amb PBS + 0,1% NP-40 i s'incuba 30' en les mateixes condicions. Es realitzen 3 rentats finals amb PBS + 0,1% NP-40. Els complexos proteics s'elueixen directament amb tampó de carrega, i posteriorment s'analitzen per *Western Blot*.

	Seqüència (5'a3')	Modificacions
Myc s	CTCTTGATCAAAGCGCGG	5' Biotina
Myc as	CCGCGCTTTGATCAAGAG	-
S100A4 s	CAGCAGCCGCGCCCAACGCTGGGA	5' Biotina
S100A4 as	TCCCAGCGTTGGGCGCGGCTGCTG	-
Me-S100A4 s	CAGCAGCMGMGCCCAAMGCTGGGA	5' Biotina
Me-S100A4 as	TCCCAGMGTTGGGMGMGGCTGCTG	-

Taula 6: Característiques dels oligonucleòtids utilitzats pels assaigs BOPA. S'ha marcat en negreta la regió reconeguda pels factors de transcripció. M = Me-C, s = sentit, as = antisentit.

Tampó d'anellament: 40 mM Tris Hcl pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl

Tampó BOPA: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 10% (p/v) glicerol, 0,3 mg/ml BSA

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

Tampó de càrrega: Tris 100 mM pH 6,8, 4% glicerol, 2% SDS, 0,06% 2-B-mercaptoetanol

4.4. Assaig de fosforilació

4.4.1. Utilitzant una quinasa recombinant

La funció d'aquests assaigs és obtenir una fosforilació en una proteïna recombinant que tenim purificada, utilitzant una quinasa comercial/recombinant també purificada. Aquesta proteïna fosforilada que obtenim amb aquests assaigs pot ser el punt de partida per altres experiments (ex: *pull-down*, assaig d'interacció *in vitro*, etc.).

Els assaigs de fosforilació es realitzen en un volum final de 50 µl en tampó de fosforilació complementat amb 0,1 mM ATP. S'afegeix a la reacció la proteïna substrat recombinant i la quinasa amb quantitat suficient per produir la fosforilació en temps que fem l'experiment a la temperatura definida per cada quinasa. S'ha de tenir en tot moment la concentració d'inhibidors de proteases i fosfatases adjunts en els tampons.

En aquest punt aturem la reacció afegint tampó de càrrega i bullint. Les proteïnes s'analitzen per *Western Blot*.

Per tal d'utilitzar les mostres com a punt de partida per a un altre experiment, continuarem amb el procediment diluint-les en tampó per tal d'aturar la reacció. Si la proteïna conté el tag GST, la solució es pot portar a un volum de 200 µl amb tampó de binding, s'afegeixen 40 µl de resina Glutatió-Sefarose 4B (Sigma) al 50% en PBS i s'incuba 25' a 25°C per retenir la proteïna recombinant. Es descarta el sobrenedant, rentem i purifiquem la proteïna a partir de la resina.

Tampó de càrrega: Tris 100 mM pH 6,8, 4% glicerol, 2% SDS, 0,06% 2-B-mercaptoetanol

Tampó de binding: 50 mM Tris pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 3 mM MgCl₂, 0,1% (p/v) Tritó X-100, Inhibidors de proteases i fosfatases

Tampó TEST (CK1): 9 mM MgCl₂, 0,55 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1 mM DTT, 27,8 mM β-glicerolfosfat, Inhibidors de proteases

	CK1δ C-terminal truncated (SIGMA)
Temperatura	30°C
Temps	45'
Concentració reacció (mU/pmol substrat)	20-100 mU
Substrat	2-10 pmols
Volum	25-50 µl
Procedència	Recombinant E. Coli

Taula 7: Condicions de fosforilació

4.4.2. Utilitzant una quinasa purificada de línies cel·lulars

Per tal de realitzar un experiment de fosforilació a partir d'una quinasa provinent d'extractes cel·lulars, hem de immunoprecipitar aquesta quinasa amb un anticòs específic o a partir d'un *tag* si aquesta ha estat prèviament transfectada.

Un cop rentada la resina, es fa un rentat extra amb tampó de fosforilació per tal de canviar les concentracions d'electròlits presents en el sediment amb la resina per les adequades per l'assaig de fosforilació. S'afegeix al tub el tampó de fosforilació, suplementat amb 0,1 mM d'ATP, amb la proteïna recombinant a fosforilar i procedim com a l'apartat 4.4.1.

4.5. Tècniques de microscòpia òptica

4.5.1. Preparació del cobreobjectes, fixació amb paraformaldehid al 4% i muntatge en portaobjectes

Prèviament a la realització d'un estudi per microscòpia, hem de fer créixer les cèl·lules sobre cobreobjectes que després puguem muntar sobre portaobjectes i traslladar al microscopi. Per tal de fer-ho, tractem els cobreobjectes 10' amb etanol al 70% per esterilitzar-los. Seguidament es fan dos rentats amb PBS per eliminar les restes d'etanol i s'introdueixen en plaques amb el medi de cultiu ja posat, procurant fixar-los al fons, abans de sembrar les cèl·lules.

Per fixar les cèl·lules per la posterior observació al microscopi hem utilitzat paraformaldehid (PFA). Un cop el cultiu ha adquirit les condicions que volem observar, recollim els cobreobjectes de la base de les plaques amb pinces, i fem dos rentats amb PBS per eliminar les restes de medi. Seguidament es submergeixen els cobreobjectes de 15'-20' en una solució de PFA al 4% en PBS per tal de fixar les cèl·lules, i s'eliminen les restes d'aquest amb tres rentats amb PBS.

Per tal d'observar les mostres al microscopi hem de muntar aquests cobreobjectes sobre els portaobjectes. Hem utilitzat un medi de muntatge amb Mowiol (Calbiochem), aquest s'estén sobre el portaobjectes directament, evitant deixar bombolles, i es posa el cobreobjectes a sobre. Es guarda a 4°C 16h i solidifica per si sol. No necessita de lacat per segellar-lo.

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

Mowiol: 10% mowiol, 25% (p/v) glicerol, 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 0,02% azida sòdica

4.5.2. Localització de proteïnes de fusió amb GFP

Utilitzem aquesta tècnica per veure la localització de proteïnes que introduïm en la cèl·lula marcades amb un *tag* fluorescent. Es pot utilitzar per seguir proteïnes que no podem distingir amb els anticossos de la proteïna endògena, o per les quals no tenim anticòs, entre altres aplicacions.

Les cèl·lules a estudiar es sembren 24h abans de la transfecció en plaques de 24 pous, sobre cobreobjectes estèrils. Aquestes es transfecten amb les construccions que expressen proteïnes de fusió fluorescents (Vector phrGFP) i es deixa expressar la construcció 24-48h. Passat aquest temps es recuperen els cobreobjectes i es fixen amb paraformaldehid al 4%.

Un cop el medi de muntatge ha solidificat s'observen les cèl·lules en un microscopi confocal, excitant els fluorocroms amb el làser de 514nm (phrGFP).

4.5.3. Immunofluorescència

La immunofluorescència és una tècnica que permet estudiar la localització d'una proteïna utilitzant un anticòs específic. Aquesta es pot utilitzar tant per estudiar

proteïnes endògenes, com marcades amb un *tag* i transfectades prèviament.

Les cèl·lules a estudiar es sembren en plaques de 24 pous, sobre cobreobjectes estèrils. Un cop aquestes han estat tractades adequadament per l'experiment a realitzar, o han adquirit les característiques que volem estudiar, es passa a fixar-les amb PFA. Un cop fixades, per tal de permetre la unió dels anticossos amb les proteïnes a estudiar, hem de permeabilitzar les membranes. Per fer-ho s'han utilitzat diferents tractaments segons l'anticòs i la localització de la proteïna a estudiar.

- *Tritó X-100*: s'utilitza una solució de 0,1-0,5% de tritó X-100 en PBS. Permet veure la majoria de les proteïnes. Es submergeixen els cobreobjectes 5' en aquesta solució.
- *SDS*: s'utilitza una solució a l'1% de SDS en PBS. Es una permeabilització forta, permet accedir a proteïnes nuclears i de membrana millor que l'anterior. Pot donar problemes amb alguns anticossos. Es submergeixen els cobreobjectes 10' en aquesta solució.
- *Metanol*: s'utilitza metanol al 100%. Permet realitzar una fixació i permeabilització a la vegada, ja que al precipitar les proteïnes també obre porus a la membrana. No cal fixar prèviament amb PFA. Es submergeixen els cobreobjectes 5' en metanol al 100% a -20 °C.

Un cop permeabilitzades les membranes, es fan tres rentats amb PBS per tal de retirar la solució permeabilitzadora ja que pot interferir en la unió dels anticossos. Seguidament bloquegem amb TBS-5% llet o TBS-3% BSA, depenent de l'anticòs, 1h a temperatura ambient.

Es retira el bloqueig, es renta molt bé si s'ha bloquejat amb TBS-5% llet, i es prepara una dilució adient per fer immunofluorescències de l'anticòs primari en TBS-3% BSA. Es posa una gota de 20 µl sobre Parafilm™ i el cobreobjectes a sobre amb la gota tocant a les cèl·lules. S'incuba des de 1h a temperatura ambient fins a 16h a 4°C depenent de les característiques de cada anticòs. En aquest punt hem d'afegir els controls d'anticòs, on posem duplicats dels cobreobjectes en les mateixes condicions però amb solucions sense anticòs primari.

Acabada la incubació es renten els cobreobjectes amb TBS unes 4-5 vegades. Es

preparen dilucions d'anticossos secundaris marcats amb fluoròfors amb les dilucions marcades pel fabricant, i es procedeix com a la incubació amb l'anticòs primari. S'incuba els anticossos 1h a temperatura ambient. Durant i a partir d'aquest pas s'han de protegir els cobreobjectes de la llum per tal d'evitar la degradació dels fluoròfors conjugats als anticossos secundaris.

Es renta 4-5 vegades els cobreobjectes amb TBS i es procedeix al muntatge sobre els portaobjectes. Alternativament en aquest treball, per tal de veure els nuclis de la cèl·lula s'han tenyit aquests amb DAPI (500 ng/ml en PBS) 5', rentant 2-3 vegades amb PBS abans de procedir al muntatge.

Un cop el medi de muntatge ha solidificat s'observen les cèl·lules en un microscopi confocal, excitant els fluorocroms amb el làser adient per als fluoròfors utilitzats.

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

TBS: 25 mM Tris pH 7,5, 136 mM NaCl, 4 mM KCl

4.6. Assaigs reporters

Per tal d'analitzar l'activitat transcripcional dels elements regulats per β -catenina/Tcf4 s'han utilitzat els plasmidis TOP-FLASH/FOP-FLASH. El plasmidi TOP-FLASH conté un promotor sintètic amb tres còpies de la seqüència d'unió del Tcf4 al DNA i un promotor mínim del gen Fos controlant l'expressió de la Luciferasa de *Firefly*. El FOP-FLASH conté els mateixos elements però les caixes d'unió a Tcf4 han estat mutades.

Es sembren les cèl·lules en plaques de 96 pous i es transfecten amb aquests plasmidis. Com a control s'afegeix a la barreja el plasmidi pTK-Renilla, que conté el gen de la Luciferasa de *Renilla* sota el control del promotor de la Timidina Quinasa, un promotor constitutivament actiu.

Posteriorment a la trasfecció les cèl·lules es lisen amb el Kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega). L'activitat de les luciferases s'ha llegit amb el luminòmetre FB-12 (Berthold Detection Systems). L'activitat relativa de les luciferases de *Firefly* i *Renilla* ens donen la diferència d'activitat transcripcional entre els gens

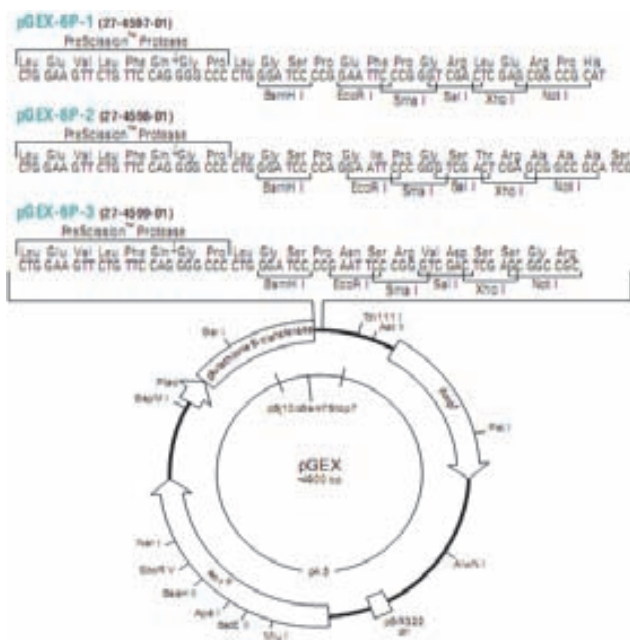
induïbles regulats per Tcf4/LEF i els d'expressió constitutiva, per evitar les diferències de resultats degudes a la variació en l'eficiència de la transfecció entre les diferents mostres. Cada punt es fa per quadruplicat i s'expressa la mitjana i la desviació estàndard.

5. Vectors i construccions emprades

5.1. Descripció dels vectors utilitzats

5.1.1. Vector pGEX-6P (Amersham-Pharmacia)

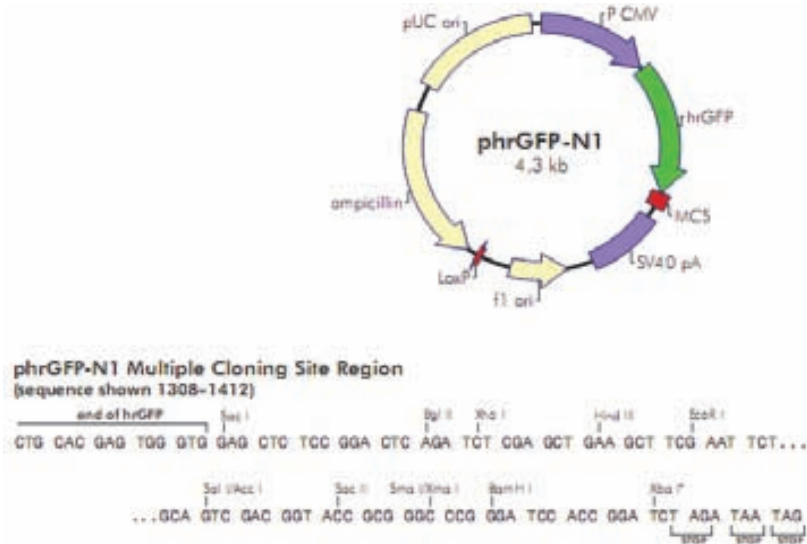
Aquest vector va ser usat com a vehicle d'expressió de les proteïnes recombinants, en les tres pautes de lectura, permetent expressar el producte clonat com a proteïna de fusió amb GST (Glutatió-S-Transferasa). Conté el promotor Tac, que permet una alta expressió de forma induïble químicament per IPTG (isopropil β -D-tiogalactosid), i confereix resistència a ampicil·lina. Conté un lloc de reconeixement per la proteasa *PreScission Protease* (PSP) (Amersham-Pharmacia) per poder tallar entre la GST i la proteïna desitjada un cop purificada la proteïna de fusió.



Mapa del vector pGEX-6P.

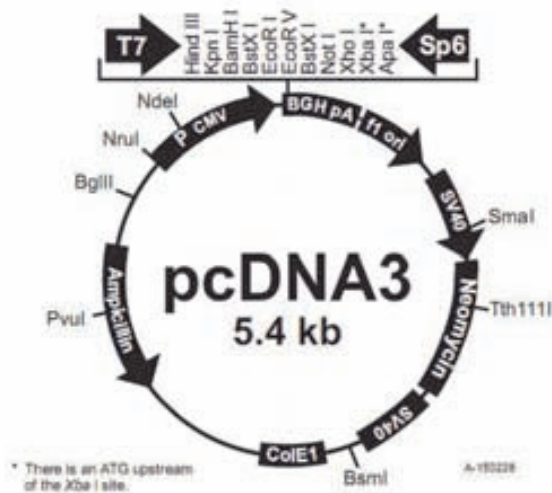
5.1.2. Vectors d'expressió en eucariotes

- **phrGFP.N1 (Stratagene)**: permet fer proteïnes de fusió amb hrGFP. Aquest plasmidi és resistent a ampicil·lina i d'expressió constitutiva; la proteïna ha estat humanitzada per minimitzar els problemes d'expressió/degradació.



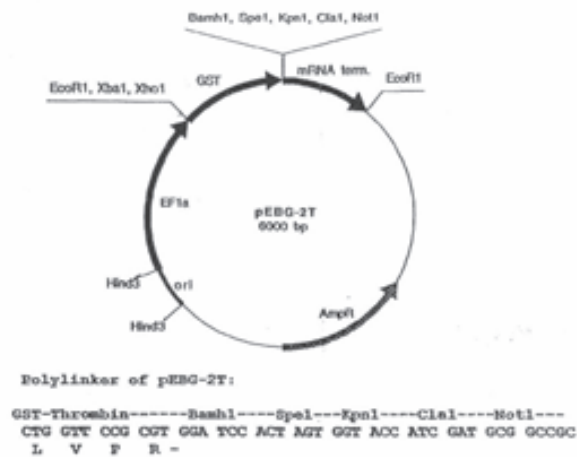
Mapa del vector phrGFP.

- **pcDNA3 (Invitrogen)**: permet expressar proteïnes en cèl·lules eucariotes sense o amb Tag (Myc/His/HA) depenent de la variant de vector utilitzada. Aquest plasmidi és d'expressió constitutiva i conté resistència a ampicil·lina i neomicina.



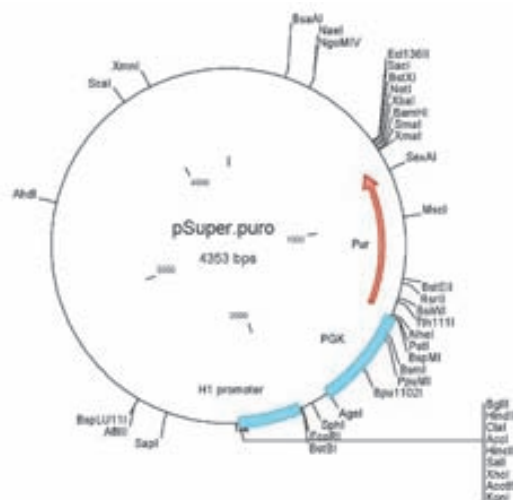
Mapa del vector pcDNA3.

- **pBEG-2T** (cedit pel Dr. José Miguel Lizcano): permet fer proteïnes de fusió amb GST d'expressió en cèl·lules eucariotes, per poder-les detectar o purificar per al seu posterior estudi. Aquest plasmidi és d'expressió constitutiva i conté la resistència a ampicil·lina.



Mapa del vector pBEG-2T.

- **pSUPER** (Oligoengine): permet expressar shRNAs en cèl·lules eucariotes, per tal de disminuir els nivells d'una proteïna endògena contra la qual s'han dissenyat els shRNAs. Utilitzem un derivat que conté el gen de resistència a puromicina per tal de poder seleccionar les cèl·lules transfectades que expressen el shRNA.



Mapa del vector pSUPER-Neo.

5.2. Construccions Utilitzades

Construcció	Obtenció
cytoE-cadherin.pGEX-6P3 (aminoàcids 732-883)	Extret de pBATEM2 (E-cadherina completa) per PCR incorporant dianes BamHI/EcoRI i clonat dins pGEX-6P3 obert amb BamHI/EcoRI.
hTcf4E-HA.pcDNA3	Extret de hTcf4E.pdHAT per PCR incorporant dianes BamHI/EcoRV i clonat dins pcDNA3-HA obert amb BamHI/EcoRV.
Kaiso.pEBG-2T	Extret de Kaiso.pGEX per digestió amb BamHI/NotI i clonat dins pEBG-2T obert amb BamHI/NotI
Kaiso.pGEX-6P	Cedit pels Dr. Garcia de Herreros (IMIM)
Myc-Dvl1.pcDNA3	Cedit pels Drs. Bigas/Espinosa (IMIM)
p120ctn(1-347).pGEX-6P1	Extret de p120ctn(1-911).pGEX-6P3 per PCR incorporant dianes EcoRI/EcoRV i clonat dins pGEX-6P1 obert amb EcoRI/EcoRV
p120ctn(1-390).pGEX-6P3	Extret de p120-p120ctn(1-911).pGEX-6P3 per PCR incorporant dianes EcoRI/XhoI i clonat dins pGEX-6P3 obert amb EcoRI/XhoI
p120ctn(1-911).pGEX-6P1	Extret de p120ctn(1-911).pcDNA3 per digestió amb EcoRI/NotI i clonat dins pGEX-6P3 obert amb EcoRI/NotI.
p120ctn(102-648).pGEX-6P3	Extret de p120ctn(1-911).pGEX-6P3 per digestió amb EcoRI/XhoI i clonat dins pGEX-6P3 obert amb EcoRI/XhoI
p120ctn(102-911).pEBG-2T	Extret de p120ctn(102-911).pGEX-6P3 per PCR incorporant dianes KpnI/NotI i clonat dins pEBG-2T obert amb KpnI/NotI
p120ctn(102-911).pGEX-6P1	Extret de p120ctn(1-911).pGEX-6P3 per PCR incorporant dianes EcoRI/SacII (reomplint l'extrem tallat amb SacII amb la polimerasa Klenow per convertir-lo en rom) i clonat dins pGEX-6P1 obert amb EcoRI/SmaI
p120ctn(102-911).pHRGFP	Extret de p120ctn(102-911).pGEX-6P1 per PCR incorporant dianes EcoRI/SacII i clonat dins pHRGFP obert amb EcoRI/SacII.
p120ctn(102-911)AA.pEBG-2T	Extret de p120ctn(102-911)AA.pGEX per PCR incorporant dianes KpnI/NotI i clonat dins pEBG-2T obert amb KpnI/NotI
p120ctn(102-911)AA.pGEX-6P1	QuickChange PCR sobre p120ctn(102-911).pGEX-6P1

Construcció	Obtenció
p120ctn(102-911)DD.pEBG-2T	Extret de p120ctn(102-911).pGEX per PCR incorporant dianes KpnI/NotI i clonat dins pEBG-2T obert amb KpnI/NotI
p120ctn(102-911)DD.pGEX-6P1	QuickChange PCR sobre p120ctn(102-911)AA.pGEX-6P1
p120ctn(234-911).pGEX-6P1	Extret de p120ctn(1-911).pcDNA3 per digestió amb SmaI/NotI i clonat dins pGEX-6P1 obert amb SmaI/NotI.
p120ctn(350-911).pGEX-6P1	Extret de p120ctn(1-911).pcDNA3 per PCR introduint dianes EcoRI/NotI i clonat dins pGEX-6P1 obert amb EcoRI/NotI.
scrb.pSUPER	Sigma
shRNA-CK1 ϵ .pSUPER	Sigma
shRNA-E-cadherin.pSUPER	Sigma
shRNA-p120ctn.pSUPER	Cedit pel Dr. Eduard Batlle (PCB)

Taula 8: Construccions utilitzades en aquest treball.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Fuchs E, Tumber T, Guasch G (2004) Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116: 769-78.
2. Perez-Moreno M, Fuchs E (2006) Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell* 11: 601-12.
3. Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442-54.
4. Nelson WJ (2003) Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 422: 766-74.
5. Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345-57.
6. Waschke J (2008) The desmosome and pemphigus. *Histochem. Cell Biol* 130: 21-54.
7. Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 285-93.
8. Van Itallie CM, Anderson JM (2006) Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 68: 403-29.
9. Tsukita S, Furuse M (2000) Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149: 13-6.
10. Takeichi M (1977) Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 75: 464-74.
11. Hyafil F, Babinet C, Jacob F (1981) Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* 26: 447-54.
12. Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A (2000) Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci* 113 (Pt 18): 3127-39.
13. Gumbiner BM (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 622-34.
14. Daniel JM, Reynolds AB (1997) Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *Bioessays* 19: 883-91.
15. Sallee JL, Wittchen ES, Burridge K (2006) Regulation of cell adhesion by protein-

- tyrosine phosphatases: II. Cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 281: 16189-92.
16. Nollet F, Berx G, van Roy F (1999) The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 2: 77-85.
 17. Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, et al. (2002) C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296: 1308-13.
 18. Shapiro L, Kwong PD, Fannon AM, Colman DR, Hendrickson WA (1995) Considerations on the folding topology and evolutionary origin of cadherin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6793-7.
 19. Häussinger D, Ahrens T, Sass H, Pertz O, Engel J, et al. (2002) Calcium-dependent homoassociation of E-cadherin by NMR spectroscopy: changes in mobility, conformation and mapping of contact regions. *J Mol Biol* 324: 823-39.
 20. Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R, Engel J (1994) Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem* 223: 1019-26.
 21. Takeichi M (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol* 7: 619-27.
 22. Birchmeier W (1995) E-cadherin as a tumor (invasion) suppressor gene. *Bioessays* 17: 97-99.
 23. Hajra KM, Fearon ER (2002) Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 34: 255-68.
 24. Huber AH, Weis WI (2001) The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 105: 391-402.
 25. Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R, et al. (1994) Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci* 107 (Pt 12): 3655-63.
 26. Huber AH, Nelson WJ, Weis WI (1997) Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90: 871-82.
 27. Choi H, Huber AH, Weis WI (2006) Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *J Biol Chem* 281: 1027-38.
 28. Piedra J, Martinez D, Castano J, Miravet S, Dunach M, et al. (2001) Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 276:

20436-43.

29. Castaño J, Raurell I, Piedra JA, Miravet S, Duñach M, et al. (2002) Beta-catenin N- and C-terminal tails modulate the coordinated binding of adherens junction proteins to beta-catenin. *J Biol Chem* 277: 31541-50.
30. Gottardi CJ, Gumbiner BM (2004) Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol* 167: 339-49.
31. Solanas G, Miravet S, Casagolda D, Castaño J, Raurell I, et al. (2004) beta-Catenin and plakoglobin N- and C-tails determine ligand specificity. *J Biol Chem* 279: 49849-56.
32. Miravet S, Piedra J, Castaño J, Raurell I, Francí C, et al. (2003) Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 23: 7391-402.
33. Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, et al. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382: 638-42.
34. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, et al. (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275: 1784-7.
35. Pokutta S, Drees F, Takai Y, Nelson WJ, Weis WI (2002) Biochemical and structural definition of the l-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin. *J Biol Chem* 277: 18868-74.
36. Koslov ER, Maupin P, Pradhan D, Morrow JS, Rimm DL (1997) Alpha-catenin can form asymmetric homodimeric complexes and/or heterodimeric complexes with beta-catenin. *J Biol Chem* 272: 27301-6.
37. Pokutta S, Weis WI (2000) Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Mol Cell* 5: 533-43.
38. Bakolitsa C, de Pereda JM, Bagshaw CR, Critchley DR, Liddington RC (1999) Crystal structure of the vinculin tail suggests a pathway for activation. *Cell* 99: 603-13.
39. Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ (2005) Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 123: 889-901.
40. Abe K, Takeichi M (2008) EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13-9.

Bibliografia

41. Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI (2005) Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123: 903-15.
42. Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453-65.
43. Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS (1995) Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8813-7.
44. Yang S, Guo X, Debnath G, Mohandas N, An X (2009) Protein 4.1R links E-cadherin/beta-catenin complex to the cytoskeleton through its direct interaction with beta-catenin and modulates adherens junction integrity. *Biochim. Biophys. Acta* 1788: 1458-1465.
45. Gumbiner BM (2000) Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 148: 399-404.
46. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, et al. (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2: 84-9.
47. Shirakihara T, Saitoh M, Miyazono K (2007) Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta. *Mol. Biol. Cell* 18: 3533-3544.
48. Hinck L, Näthke IS, Papkoff J, Nelson WJ (1994) Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* 125: 1327-40.
49. Chen YT, Stewart DB, Nelson WJ (1999) Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 144: 687-99.
50. Huber AH, Stewart DB, Laurents DV, Nelson WJ, Weis WI (2001) The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem* 276: 12301-9.
51. Xiao K, Oas RG, Chiasson CM, Kowalczyk AP (2007) Role of p120-catenin in cadherin trafficking. *Biochim Biophys Acta* 1773: 8-16.
52. Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB (2003) A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* 163: 525-34.
53. Xiao K, Allison DF, Buckley KM, Kottke MD, Vincent PA, et al. (2003) Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in

- microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* 163: 535-45.
54. Ireton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, et al. (2002) A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* 159: 465-76.
 55. Thoreson MA, Reynolds AB (2002) Altered expression of the catenin p120 in human cancer: implications for tumor progression. *Differentiation* 70: 583-9.
 56. Xiao K, Garner J, Buckley KM, Vincent PA, Chiasson CM, et al. (2005) p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol Biol Cell* 16: 5141-51.
 57. Baki L, Marambaud P, Efthimiopoulos S, Georgakopoulos A, Wen P, et al. (2001) Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2381-6.
 58. Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarnier S, et al. (2002) A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J* 21: 1948-56.
 59. Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HEM, et al. (2002) Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* 4: 222-31.
 60. Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA (2004) Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol Biol Cell* 15: 176-88.
 61. Le TL, Yap AS, Stow JL (1999) Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol* 146: 219-32.
 62. Serres M, Filhol O, Lickert H, Grangeasse C, Chambaz EM, et al. (2000) The disruption of adherens junctions is associated with a decrease of E-cadherin phosphorylation by protein kinase CK2. *Exp. Cell Res* 257: 255-264.
 63. Dupre-Crochet S, Figueroa A, Hogan C, Ferber EC, Bialucha CU, et al. (2007) Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol. Cell. Biol* 27: 3804-3816.
 64. Roura S, Miravet S, Piedra J, García de Herreros A, Duñach M (1999) Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 274: 36734-40.
 65. Piedra J, Miravet S, Castaño J, Pálmer HG, Heisterkamp N, et al. (2003) p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol* 23: 2287-97.

66. Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, et al. (2004) Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 18: 2225-30.
67. Hsu K, Fan H, Chen Y, Huang Y, Chen C, et al. (2009) Protein kinase C-Fyn kinase cascade mediates the oleic acid-induced disassembly of neonatal rat cardiomyocyte adherens junctions. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 41: 1536-1546.
68. Hu P, O'Keefe EJ, Rubenstein DS (2001) Tyrosine phosphorylation of human keratinocyte beta-catenin and plakoglobin reversibly regulates their binding to E-cadherin and alpha-catenin. *J Invest Dermatol* 117: 1059-67.
69. Reynolds AB, Roesel DJ, Kanner SB, Parsons JT (1989) Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol Cell Biol* 9: 629-38.
70. Reynolds AB, Herbert L, Cleveland JL, Berg ST, Gaut JR (1992) p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene* 7: 2439-45.
71. Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, et al. (1994) Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 14: 8333-42.
72. Keirsebilck A, Bonn e S, Staes K, van Hengel J, Nollet F, et al. (1998) Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics* 50: 129-46.
73. Mo YY, Reynolds AB (1996) Identification of murine p120 isoforms and heterogeneous expression of p120cas isoforms in human tumor cell lines. *Cancer Res* 56: 2633-40.
74. Seidel B, Braeg S, Adler G, Wedlich D, Menke A (2004) E- and N-cadherin differ with respect to their associated p120ctn isoforms and their ability to suppress invasive growth in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 23: 5532-5542.
75. Yanagisawa M, Huvelde D, Kreinest P, Lohse CM, Cheville JC, et al. (2008) A p120 catenin isoform switch affects Rho activity, induces tumor cell invasion, and predicts metastatic disease. *J. Biol. Chem* 283: 18344-18354.
76. Choi H, Weis WI (2005) Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *J Mol Biol* 346: 367-76.
77. Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, Ireton RC, Wheelock MJ, et al. (2000) Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* 148: 189-202.

78. Daniel JM, Reynolds AB (1995) The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin. *Mol Cell Biol* 15: 4819-24.
79. Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM (1998) The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol* 141: 779-89.
80. Chen X, Kojima S, Borisy GG, Green KJ (2003) p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol* 163: 547-57.
81. Meng W, Mushika Y, Ichii T, Takeichi M (2008) Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell* 135: 948-959.
82. Stehbens SJ, Akhmanova A, Yap AS (2009) Microtubules and cadherins: a neglected partnership. *Front. Biosci* 14: 3159-3167.
83. Pacquelet A, Lin L, Rorth P (2003) Binding site for p120/delta-catenin is not required for Drosophila E-cadherin function in vivo. *J Cell Biol* 160: 313-9.
84. Myster SH, Cavallo R, Anderson CT, Fox DT, Peifer M (2003) Drosophila p120catenin plays a supporting role in cell adhesion but is not an essential adherens junction component. *J Cell Biol* 160: 433-49.
85. Ozawa M, Ohkubo T (2001) Tyrosine phosphorylation of p120(ctn) in v-Src transfected L cells depends on its association with E-cadherin and reduces adhesion activity. *J Cell Sci* 114: 503-12.
86. Cozzolino M, Stagni V, Spinardi L, Campioni N, Fiorentini C, et al. (2003) p120 Catenin is required for growth factor-dependent cell motility and scattering in epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 14: 1964-1977.
87. Alemà S, Salvatore AM (2007) p120 catenin and phosphorylation: Mechanisms and traits of an unresolved issue. *Biochim Biophys Acta* 1773: 47-58.
88. Noren NK, Liu BP, Burridge K, Kreft B (2000) p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* 150: 567-80.
89. Braga VM, Yap AS (2005) The challenges of abundance: epithelial junctions and small GTPase signalling. *Curr Opin Cell Biol* 17: 466-74.
90. Magie CR, Pinto-Santini D, Parkhurst SM (2002) Rho1 interacts with p120ctn and alpha-catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in Drosophila. *Development* 129: 3771-82.

Bibliografia

91. Anastasiadis PZ, Moon SY, Thoreson MA, Mariner DJ, Crawford HC, et al. (2000) Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol* 2: 637-44.
92. Goodwin M, Kovacs EM, Thoreson MA, Reynolds AB, Yap AS (2003) Minimal mutation of the cytoplasmic tail inhibits the ability of E-cadherin to activate Rac but not phosphatidylinositol 3-kinase: direct evidence of a role for cadherin-activated Rac signaling in adhesion and contact formation. *J Biol Chem* 278: 20533-9.
93. Watanabe T, Wang S, Noritake J, Sato K, Fukata M, et al. (2004) Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev Cell* 7: 871-83.
94. Katoh H, Hiramoto K, Negishi M (2006) Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *J Cell Sci* 119: 56-65.
95. Ellis S, Mellor H (2000) Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. *Trends Cell Biol* 10: 85-8.
96. Symons M, Rusk N (2003) Control of vesicular trafficking by Rho GTPases. *Curr Biol* 13: R409-18.
97. Daniel JM, Reynolds AB (1999) The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol* 19: 3614-23.
98. van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, van Roy F (1999) Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7980-5.
99. Kelly KF, Spring CM, Otchere AA, Daniel JM (2004) NLS-dependent nuclear localization of p120ctn is necessary to relieve Kaiso-mediated transcriptional repression. *J Cell Sci* 117: 2675-86.
100. Downing JR, Reynolds AB (1991) PDGF, CSF-1, and EGF induce tyrosine phosphorylation of p120, a pp60src transformation-associated substrate. *Oncogene* 6: 607-13.
101. Cozzolino M, Giovannone B, Serafino A, Knudsen K, Levi A, et al. (2000) Activation of TrkA tyrosine kinase in embryonal carcinoma cells promotes cell compaction, independently of tyrosine phosphorylation of catenins. *J Cell Sci* 113 (Pt 9): 1601-10.
102. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W (1998) Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 13): 1853-65.
103. Mariner DJ, Anastasiadis P, Keilhack H, Böhmer FD, Wang J, et al. (2001) Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120ctn. *J Biol Chem*

- 276: 28006-13.
104. Kim L, Wong TW (1995) The cytoplasmic tyrosine kinase FER is associated with the catenin-like substrate pp120 and is activated by growth factors. *Mol Cell Biol* 15: 4553-61.
 105. Xu G, Craig AWB, Greer P, Miller M, Anastasiadis PZ, et al. (2004) Continuous association of cadherin with beta-catenin requires the non-receptor tyrosine-kinase Fer. *J Cell Sci* 117: 3207-19.
 106. Kanner SB, Reynolds AB, Parsons JT (1991) Tyrosine phosphorylation of a 120-kilodalton pp60src substrate upon epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptor stimulation and in polyomavirus middle-T-antigen-transformed cells. *Mol Cell Biol* 11: 713-20.
 107. Yanagisawa M, Kaverina IN, Wang A, Fujita Y, Reynolds AB, et al. (2004) A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function. *J Biol Chem* 279: 9512-21.
 108. Xia X, Carnahan RH, Vaughan MH, Wildenberg GA, Reynolds AB (2006) p120 serine and threonine phosphorylation is controlled by multiple ligand-receptor pathways but not cadherin ligation. *Exp Cell Res* 312: 3336-48.
 109. Kinch MS, Clark GJ, Der CJ, Burridge K (1995) Tyrosine phosphorylation regulates the adhesions of ras-transformed breast epithelia. *J Cell Biol* 130: 461-71.
 110. Calautti E, Cabodi S, Stein PL, Hatzfeld M, Kedersha N, et al. (1998) Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 141: 1449-65.
 111. Castaño J, Solanas G, Casagolda D, Raurell I, Villagrasa P, et al. (2007) Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA. *Mol Cell Biol* 27: 1745-57.
 112. Roczniak-Ferguson A, Reynolds AB (2003) Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity. *J Cell Sci* 116: 4201-12.
 113. Albagli O, Dhordain P, Deweindt C, Lecocq G, Leprince D (1995) The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ* 6: 1193-1198.
 114. Kelly KF, Otchere AA, Graham M, Daniel JM (2004) Nuclear import of the BTB/POZ transcriptional regulator Kaiso. *J Cell Sci* 117: 6143-52.
 115. Kelly KF, Daniel JM (2006) POZ for effect--POZ-ZF transcription factors in cancer and development. *Trends Cell Biol* 16: 578-587.
 116. Rodova M, Kelly KF, VanSaun M, Daniel JM, Werle MJ (2004) Regulation of the

- rapsyn promoter by kaiso and delta-catenin. *Mol Cell Biol* 24: 7188-96.
117. Daniel JM, Spring CM, Crawford HC, Reynolds AB, Baig A (2002) The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Res* 30: 2911-9.
 118. Prokhortchouk A, Hendrich B, Jørgensen H, Ruzov A, Wilm M, et al. (2001) The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev* 15: 1613-1618.
 119. Park J, Kim SW, Lyons JP, Ji H, Nguyen TT, et al. (2005) Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Dev Cell* 8: 843-54.
 120. Soubry A, van Hengel J, Parthoens E, Colpaert C, Van Marck E, et al. (2005) Expression and nuclear location of the transcriptional repressor Kaiso is regulated by the tumor microenvironment. *Cancer Res* 65: 2224-33.
 121. Prokhortchouk A, Sansom O, Selfridge J, Caballero IM, Salozhin S, et al. (2006) Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer. *Mol Cell Biol* 26: 199-208.
 122. Kim SW, Park J, Spring CM, Sater AK, Ji H, et al. (2004) Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin. *Nat Cell Biol* 6: 1212-20.
 123. Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 20: 781-810.
 124. Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127: 469-80.
 125. Nusse R, Varmus HE (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31: 99-109.
 126. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795-801.
 127. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, et al. (1987) The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50: 649-57.
 128. Miller JR (2002) The Wnts. *Genome Biol* 3: REVIEWS3001.
 129. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, et al. (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423:

- 448-52.
130. Hausmann G, Bänziger C, Basler K (2007) Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 8: 331-336.
 131. Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, et al. (2006) Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev. Cell* 11: 791-801.
 132. Kadowaki T, Wilder E, Klingensmith J, Zachary K, Perrimon N (1996) The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes Dev* 10: 3116-3128.
 133. Hofmann K (2000) A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem. Sci* 25: 111-112.
 134. Galli LM, Barnes TL, Secret SS, Kadowaki T, Burrus LW (2007) Porcupine-mediated lipid-modification regulates the activity and distribution of Wnt proteins in the chick neural tube. *Development* 134: 3339-3348.
 135. van den Heuvel M, Harryman-Samos C, Klingensmith J, Perrimon N, Nusse R (1993) Mutations in the segment polarity genes wingless and porcupine impair secretion of the wingless protein. *EMBO J* 12: 5293-5302.
 136. Bänziger C, Soldini D, Schütt C, Zipperlen P, Hausmann G, et al. (2006) Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* 125: 509-22.
 137. Bartscherer K, Pelte N, Ingelfinger D, Boutros M (2006) Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* 125: 523-33.
 138. Goodman RM, Thombre S, Firtina Z, Gray D, Betts D, et al. (2006) Sprinter: a novel transmembrane protein required for Wg secretion and signaling. *Development* 133: 4901-4911.
 139. Coudreuse DYM, Roël G, Betist MC, Destrée O, Korswagen HC (2006) Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells. *Science* 312: 921-4.
 140. Eaton S (2008) Retromer retrieves wntless. *Dev. Cell* 14: 4-6.
 141. Kimelman D, Xu W (2006) beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25: 7482-7491.
 142. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, et al. (2009) Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9: 489-499.
 143. Spink KE, Polakis P, Weis WI (2000) Structural basis of the Axin-adenomatous

- polyposis coli interaction. *EMBO J* 19: 2270-2279.
144. Eklof Spink K, Fridman SG, Weis WI (2001) Molecular mechanisms of beta-catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC-beta-catenin complex. *EMBO J* 20: 6203-6212.
145. Dajani R, Fraser E, Roe SM, Yeo M, Good VM, et al. (2003) Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex. *EMBO J* 22: 494-501.
146. Sobrado P, Jedlicki A, Bustos VH, Allende CC, Allende JE (2005) Basic region of residues 228-231 of protein kinase CK1alpha is involved in its interaction with axin: binding to axin does not affect the kinase activity. *J. Cell. Biochem* 94: 217-224.
147. Hsu W, Zeng L, Costantini F (1999) Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *J. Biol. Chem* 274: 3439-3445.
148. Seeling JM, Miller JR, Gil R, Moon RT, White R, et al. (1999) Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science* 283: 2089-2091.
149. Su Y, Fu C, Ishikawa S, Stella A, Kojima M, et al. (2008) APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Mol. Cell* 32: 652-661.
150. Luo W, Peterson A, Garcia BA, Coombs G, Kofahl B, et al. (2007) Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex. *EMBO J* 26: 1511-1521.
151. Xing Y, Clements WK, Kimelman D, Xu W (2003) Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex. *Genes Dev* 17: 2753-64.
152. Polakis P (2002) Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect. *Curr Biol* 12: R499-R501.
153. Ha N, Tono-zuka T, Stamos JL, Choi H, Weis WI (2004) Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation. *Mol. Cell* 15: 511-521.
154. Xing Y, Clements WK, Le Trong I, Hinds TR, Stenkamp R, et al. (2004) Crystal structure of a beta-catenin/APC complex reveals a critical role for APC phosphorylation in APC function. *Mol. Cell* 15: 523-533.
155. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, et al. (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382: 225-30.

156. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC (2000) An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407: 535-8.
157. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, et al. (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407: 530-5.
158. Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, et al. (2000) arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 407: 527-30.
159. Kim DH, Inagaki Y, Suzuki T, Ioka RX, Yoshioka SZ, et al. (1998) A new low density lipoprotein receptor related protein, LRP5, is expressed in hepatocytes and adrenal cortex, and recognizes apolipoprotein E. *J Biochem* 124: 1072-6.
160. Brown SD, Twells RC, Hey PJ, Cox RD, Levy ER, et al. (1998) Isolation and characterization of LRP6, a novel member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 879-88.
161. Bhanot P, Fish M, Jemison JA, Nusse R, Nathans J, et al. (1999) Frizzled and Dfrizzled-2 function as redundant receptors for Wingless during *Drosophila* embryonic development. *Development* 126: 4175-86.
162. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X (2004) LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131: 1663-1677.
163. Perrimon N, Mahowald AP (1987) Multiple functions of segment polarity genes in *Drosophila*. *Dev Biol* 119: 587-600.
164. Adler PN (2002) Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell* 2: 525-35.
165. Wallingford JB, Habas R (2005) The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 132: 4421-36.
166. Wharton KA (2003) Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol* 253: 1-17.
167. MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17: 9-26.
168. Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, et al. (2004) A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* 13: 149-56.
169. Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, et al. (2005) Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438:

867-72.

170. MacDonald BT, Yokota C, Tamai K, Zeng X, He X (2008) Wnt signal amplification via activity, cooperativity, and regulation of multiple intracellular PPPSP motifs in the Wnt co-receptor LRP6. *J Biol Chem* 283: 16115-23.
171. Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, et al. (2005) A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438: 873-7.
172. Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, et al. (2001) LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411: 321-5.
173. Yum S, Lee S, Piao S, Xu Y, Jung J, et al. (2009) The role of the Ser/Thr cluster in the phosphorylation of PPPSP motifs in Wnt coreceptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 381: 345-349.
174. Wei Q, Yokota C, Semenov MV, Doble B, Woodgett J, et al. (2007) R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and beta-catenin signaling. *J. Biol. Chem* 282: 15903-15911.
175. Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, et al. (2008) Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135: 367-75.
176. Wong H, Bourdelas A, Krauss A, Lee H, Shao Y, et al. (2003) Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol. Cell* 12: 1251-1260.
177. Bilic J, Huang Y, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat C, et al. (2007) Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 316: 1619-22.
178. Cliffe A, Hamada F, Bienz M (2003) A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. *Curr. Biol* 13: 960-966.
179. Schwarz-Romond T, Fiedler M, Shibata N, Butler PJG, Kikuchi A, et al. (2007) The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat. Struct. Mol. Biol* 14: 484-492.
180. Cselenyi CS, Jernigan KK, Tahinci E, Thorne CA, Lee LA, et al. (2008) LRP6 transduces a canonical Wnt signal independently of Axin degradation by inhibiting GSK3's phosphorylation of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8032-7.
181. Piao S, Lee S, Kim H, Yum S, Stamos JL, et al. (2008) Direct inhibition of GSK3beta by the phosphorylated cytoplasmic domain of LRP6 in Wnt/beta-catenin signaling. *PLoS ONE* 3: e4046.
182. Klimowski LK, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Virshup DM (2006) Site-specific

- casein kinase 1epsilon-dependent phosphorylation of Dishevelled modulates beta-catenin signaling. *FEBS J* 273: 4594-602.
183. Swiatek W, Tsai I, Klimowski L, Pepler A, Barnette J, et al. (2004) Regulation of casein kinase I epsilon activity by Wnt signaling. *J. Biol. Chem* 279: 13011-7.
184. Hino S, Michiue T, Asashima M, Kikuchi A (2003) Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *J. Biol. Chem* 278: 14066-14073.
185. Henderson BR, Fagotto F (2002) The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep* 3: 834-839.
186. Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, et al. (1996) Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech. Dev* 59: 3-10.
187. Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, et al. (2002) Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 109: 47-60.
188. Townsley FM, Cliffe A, Bienz M (2004) Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nat Cell Biol* 6: 626-33.
189. Rosin-Arbesfeld R, Townsley F, Bienz M (2000) The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature* 406: 1009-12.
190. Cong F, Varmus H (2004) Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101: 2882-7.
191. Kriehoff E, Behrens J, Mayr B (2006) Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention. *J. Cell. Sci* 119: 1453-1463.
192. Wu X, Tu X, Joeng KS, Hilton MJ, Williams DA, et al. (2008) Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 133: 340-353.
193. Hoppler S, Kavanagh CL (2007) Wnt signalling: variety at the core. *J. Cell. Sci* 120: 385-393.
194. Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, et al. (1998) *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395: 604-8.
195. Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, et al. (1998) The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395: 608-12.

Bibliografia

196. Daniels DL, Weis WI (2005) Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol* 12: 364-71.
197. van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, et al. (1997) Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 88: 789-99.
198. Städeli R, Hoffmans R, Basler K (2006) Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr. Biol* 16: R378-85.
199. Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, et al. (2002) Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 109: 47-60.
200. Parker DS, Jemison J, Cadigan KM (2002) Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wingless signaling in *Drosophila*. *Development* 129: 2565-76.
201. Thompson B, Townsley F, Rosin-Arbesfeld R, Musisi H, Bienz M (2002) A new nuclear component of the Wnt signalling pathway. *Nat. Cell Biol* 4: 367-73.
202. Städeli R, Basler K (2005) Dissecting nuclear Wingless signalling: recruitment of the transcriptional co-activator Pygopus by a chain of adaptor proteins. *Mech. Dev* 122: 1171-82.
203. Hoffmans R, Städeli R, Basler K (2005) Pygopus and legless provide essential transcriptional coactivator functions to armadillo/beta-catenin. *Curr. Biol* 15: 1207-11.
204. Reya T, Clevers H (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434: 843-50.
205. Vlad A, Röhrs S, Klein-Hitpass L, Müller O (2008) The first five years of the Wnt targetome. *Cell. Signal* 20: 795-802.
206. Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Löhler J, et al. (2005) The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell. Signal* 17: 675-689.
207. Fish KJ, Cegielska A, Getman ME, Landes GM, Virshup DM (1995) Isolation and characterization of human casein kinase I epsilon (CKI), a novel member of the CKI gene family. *J Biol Chem* 270: 14875-83.
208. Graves PR, Roach PJ (1995) Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta. *J Biol Chem* 270: 21689-94.
209. Gietzen KF, Virshup DM (1999) Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase I epsilon. *J Biol Chem* 274: 32063-70.

210. Dahlberg CL, Nguyen EZ, Goodlett D, Kimelman D (2009) Interactions between Casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and two substrates from disparate signaling pathways reveal mechanisms for substrate-kinase specificity. *PLoS ONE* 4: e4766.
211. Rivers A, Gietzen KF, Vielhaber E, Virshup DM (1998) Regulation of casein kinase I epsilon and casein kinase I delta by an in vivo futile phosphorylation cycle. *J. Biol. Chem* 273: 15980-15984.
212. Cegielska A, Gietzen KF, Rivers A, Virshup DM (1998) Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis. *J. Biol. Chem* 273: 1357-1364.
213. Pulgar V, Marin O, Meggio F, Allende CC, Allende JE, et al. (1999) Optimal sequences for non-phosphate-directed phosphorylation by protein kinase CK1 (casein kinase-1)--a re-evaluation. *Eur J Biochem* 260: 520-6.
214. Flotow H, Graves PR, Wang AQ, Fiol CJ, Roeske RW, et al. (1990) Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action. *J Biol Chem* 265: 14264-9.
215. Flotow H, Roach PJ (1991) Role of acidic residues as substrate determinants for casein kinase I. *J Biol Chem* 266: 3724-7.
216. Marin O, Bustos VH, Cesaro L, Meggio F, Pagano MA, et al. (2003) A noncanonical sequence phosphorylated by casein kinase 1 in beta-catenin may play a role in casein kinase 1 targeting of important signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10193-200.
217. Green CL, Bennett GS (1998) Identification of four alternatively spliced isoforms of chicken casein kinase I alpha that are all expressed in diverse cell types. *Gene* 216: 189-95.
218. Burzio V, Antonelli M, Allende CC, Allende JE (2002) Biochemical and cellular characteristics of the four splice variants of protein kinase CK1alpha from zebrafish (*Danio rerio*). *J Cell Biochem* 86: 805-14.
219. Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, et al. (2005) Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438: 867-72.
220. Albornoz A, Yáñez JM, Foerster C, Aguirre C, Pereiro L, et al. (2007) The CK1 gene family: expression patterning in zebrafish development. *Biol Res* 40: 251-66.
221. Price MA (2006) CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev* 20: 399-410.
222. Slusarski DC, Yang-Snyder J, Busa WB, Moon RT (1997) Modulation of embryonic

- intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev. Biol* 182: 114-120.
223. Slusarski DC, Corces VG, Moon RT (1997) Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390: 410-413.
224. Slusarski DC, Pelegri F (2007) Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Dev. Biol* 307: 1-13.
225. Kestler HA, Kühl M (2008) From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* 363: 1333-1347.
226. Strutt D (2003) Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates. *Development* 130: 4501-4513.
227. Seifert JRK, Mlodzik M (2007) Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat. Rev. Genet* 8: 126-138.
228. Wang Y, Nathans J (2007) Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development* 134: 647-658.
229. Hikasa H, Shibata M, Hiratani I, Taira M (2002) The *Xenopus* receptor tyrosine kinase *Xror2* modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development* 129: 5227-5239.
230. Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, et al. (1998) Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet* 19: 379-83.
231. Kim K, Kakitani M, Zhao J, Oshima T, Tang T, et al. (2005) Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* 309: 1256-9.
232. Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destrée O, Kielman M, et al. (2005) Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 129: 626-38.
233. van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, et al. (2005) Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435: 959-63.
234. Xia X, Brooks J, Campos-González R, Reynolds AB (2004) Serine and threonine phospho-specific antibodies to p120-catenin. *Hybrid. Hybridomics* 23: 343-351.
235. Castaño J, Raurell I, Piedra JA, Miravet S, Duñach M, et al. (2002) Beta-catenin N- and C-terminal tails modulate the coordinated binding of adherens junction proteins to beta-catenin. *J. Biol. Chem* 277: 31541-31550.
236. Solanas G, Miravet S, Casagolda D, Castaño J, Raurell I, et al. (2004) beta-

- Catenin and plakoglobin N- and C-tails determine ligand specificity. *J. Biol. Chem* 279: 49849-49856.
237. Xia X, Mariner DJ, Reynolds AB (2003) Adhesion-associated and PKC-modulated changes in serine/threonine phosphorylation of p120-catenin. *Biochemistry* 42: 9195-9204.
238. Vaughan MH, Xia X, Wang X, Chronopoulou E, Gao G, et al. (2007) Generation and characterization of a novel phospho-specific monoclonal antibody to p120-catenin serine 879. *Hybridoma (Larchmt)* 26: 407-15.
239. Mashhoon N, DeMaggio AJ, Tereshko V, Bergmeier SC, Egli M, et al. (2000) Crystal structure of a conformation-selective casein kinase-1 inhibitor. *J. Biol. Chem* 275: 20052-20060.
240. Park J, Ji H, Jun S, Gu D, Hikasa H, et al. (2006) Frigo links Dishevelled to the p120-catenin/Kaiso pathway: distinct catenin subfamilies promote Wnt signals. *Dev Cell* 11: 683-95.
241. Ruzov A, Savitskaya E, Hackett JA, Reddington JP, Prokhortchouk A, et al. (2009) The non-methylated DNA-binding function of Kaiso is not required in early *Xenopus laevis* development. *Development* 136: 729-738.
242. Ruzov A, Hackett JA, Prokhortchouk A, Reddington JP, Madej MJ, et al. (2009) The interaction of xKaiso with xTcf3: a revised model for integration of epigenetic and Wnt signalling pathways. *Development* 136: 723-727.
243. Haÿ E, Laplantine E, Geoffroy V, Frain M, Kohler T, et al. (2009) N-cadherin interacts with axin and LRP5 to negatively regulate Wnt/beta-catenin signaling, osteoblast function, and bone formation. *Mol. Cell. Biol* 29: 953-964.
244. Kinoshita N, Iioka H, Miyakoshi A, Ueno N (2003) PKC delta is essential for Dishevelled function in a noncanonical Wnt pathway that regulates *Xenopus* convergent extension movements. *Genes Dev* 17: 1663-1676.
245. Fukumoto Y, Shintani Y, Reynolds AB, Johnson KR, Wheelock MJ (2008) The regulatory or phosphorylation domain of p120 catenin controls E-cadherin dynamics at the plasma membrane. *Exp Cell Res* 314: 52-67.
246. Miravet S, Piedra J, Miró F, Itarte E, García de Herreros A, et al. (2002) The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin. *J. Biol. Chem* 277: 1884-1891.
247. Spring CM, Kelly KF, O'Kelly I, Graham M, Crawford HC, et al. (2005) The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin. *Exp. Cell Res* 305: 253-265.
248. Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a

- booming present, a brighter future. *Oncogene* 21: 5427-5440.
249. Lopes EC, Valls E, Figueroa ME, Mazur A, Meng F, et al. (2008) Kaiso contributes to DNA methylation-dependent silencing of tumor suppressor genes in colon cancer cell lines. *Cancer Res* 68: 7258-63.
250. Filion GJP, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, et al. (2006) A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol. Cell. Biol* 26: 169-181.
251. Iioka H, Doerner SK, Tamai K (2009) Kaiso is a bimodal modulator for Wnt/beta-catenin signaling. *FEBS Lett* 583: 627-632.
252. Gao Z, Seeling JM, Hill V, Yochum A, Virshup DM (2002) Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99: 1182-1187.
253. Li X, Yost HJ, Virshup DM, Seeling JM (2001) Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in *Xenopus*. *EMBO J* 20: 4122-4131.
254. Kiss A, Troyanovsky RB, Troyanovsky SM (2008) p120-catenin is a key component of the cadherin-gamma-secretase supercomplex. *Mol. Biol. Cell* 19: 4042-4050.
255. Parisiadou L, Fassa A, Fotinopoulou A, Bethani I, Efthimiopoulos S (2004) Presenilin 1 and cadherins: stabilization of cell-cell adhesion and proteolysis-dependent regulation of transcription. *Neurodegener Dis* 1: 184-191.
256. Raurell I, Codina M, Casagolda D, Del Valle B, Baulida J, et al. (2008) Gamma-secretase-dependent and -independent effects of presenilin1 on beta-catenin/Tcf-4 transcriptional activity. *PLoS ONE* 3: e4080.
257. Ferber EC, Kajita M, Wadlow A, Tobiansky L, Niessen C, et al. (2008) A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus. *J. Biol. Chem* 283: 12691-12700.
258. Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.

Abreviacions

APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
BOPA	<i>Biotinylated Oligo Pull-Down Assay</i>
CBD	<i>Catenin Binding Domain</i>
EC	<i>ExtraCelular Domain</i>
GDI	<i>Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GST	<i>Glutathione S Transferase</i>
JMD	<i>JuxtaMembrane Domain</i>
KCS	<i>Kaiso Consensus Sequence</i>
LEF	<i>Lymphoid Enhancement Factor</i>
LMB	<i>LeptoMycin B</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
Me-CpG	<i>Dinucleòtids CG metilats en cisteïna</i>
PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
Poly[dl:dC]	<i>Poly[deoxyInosinic deoxyCytidylic] acid sodium salt</i>
shRNA	<i>short hairpin RiboNucleotid Acid</i>
TBP	<i>TATA Binding Protein</i>
TCF	<i>T-Cell Factor</i>
WRE	<i>Wnt Response Element</i>

