

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut
Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida
Universitat Pompeu Fabra

**Mecanisme d'Activació de Fibronectina i LEF1 per
Snail1 durant la Transició Epiteli-Mesènquima.**

Memòria presentada per:

Cristina Agustí Benito

per a optar al grau de doctora
pel Departament de Ciències Experimentals i de la Salut,
Universitat Pompeu Fabra
Barcelona, 2007

Tesi Doctoral realitzada a la Unitat de Recerca en Biologia Cel·lular i
Molecular de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica

Josep Baulida,
Director de la tesi

Antonio García de Herreros,
Tutor de la Tesi

Cristina Agustí,
Doctoranda

Dipòsit legal: B.42905-2007
ISBN: 978-84-691-1208-3

***“Cuando teníamos todas las respuestas
nos cambiaron las preguntas”***

Escrit per una mà anònima a una paret del centre de Quito
i citat per Eduardo Galeano al seu llibre
“Patatas arriba, la escuela del mundo al revés”

A la Luísa,
en Nacho
i en Josep

Amb vosaltres la realitat sempre supera la ficció

I com no,
al Dr. Benito, el meu avi
Per contagiàr-me una mica de la seva passió per la ciència

Introducció

1. La transició epitelial mesènquima	8
2. Rellevància fisiològica de la EMT.	12
2.1. Desenvolupament	12
2.2. Càncer	13
3. Mecanismes moleculars en la EMT.	15
3.1. Vies de senyalització que intervien en la transició epitelial mesènquima (EMT).	15
3.2. El factor de transcripció Snail.	23
3.2.1. Funcions moleculars de Snail	26
3.2.2. Snail participa en processos de desenvolupament i càncer.	30
3.3. L'E-Cadherina.	34
3.3.1. Les unions adherents.	35
3.3.2. Mecanismes moleculars regulats per l'E-Cadherina.	37
4. La β-Catenina i la seva funció com a activador transcripcional.	38
4.1. L'activació de la transcripció gènica a partir del complex β-Catenina/TCF.	44
4.1.1. La β -Catenina en l'homeòstasi i en tumors de l'epiteli de còlon.	47
4.2. L'activació de la transcripció gènica a partir del complex β-Catenina/SOX.	51
5. L'activació transcripcional associada a $NF\kappa B$.	53

Objectius

Snail com a activador transcripcional.	61
---	-----------

Material i Mètodes

1. Cultius cel·lulars	64
2. Constructes	67
2.1. Snail i els seus mutants.	67
2.2. Altres constructes.	71
2.4. Promotors.	73
3. Preparació de proteïnes de fusió amb GST.	75
4. Transfeccions transitòries.	79
5. Anàlisi de l'activitat dels promotors (Assaigs Reporter)	80
6. Anàlisi dels nivells de RNA.	81
6.1. RT-PCR Semi-quantitativa.	81
6.2. RT-PCR quantitativa.	82
6.3. Assaigs de Southern Blot.	84
7. Assaig de BOPA (Biotinilated Oligonucleotide Precipitation Assay).	85

8. Assaigs d'interacció proteïna-proteïna. _____	86
8.1. Interacció directa de proteïnes recombinants purificades. _____	86
8.2. Assajos d'Overlay. _____	88
8.3. Assajos de Dot-blot. _____	88
8.4. Pull-Down. _____	89
8.5. Co-immunoprecipitació. _____	89
9. Electroforesi de proteïnes i Western blot. _____	90
10. Assajos de localització subcel·lular de proteïnes per immunofluorescència. ____	92
11. Immunoprecipitació de cromatina (ChIP). _____	94
12. Immunohistoquímiques. _____	96

Resultats

1. Snail activa l'expressió de gens mesenquimals. _____	98
1.1. Snail fa augmentar els nivells de RNA de Fibronectina i LEF1. _____	99
1.2. Snail activa l'activitat de promotor dels marcadors mesenquimals Fibronectina i LEF1. _____	102
2. L'activació de Fibronectina i LEF1 mediada per Snail és independent de les caixes E. _____	104
3. L'E-Cadherina inhibeix l'activació de gens mesenquimals mediada per Snail. _	107
3.1. L'activació de Fibronectina i la repressió de l'E-Cadherina provocades per Snail, són concomitants. _____	107
3.2. L'expressió d'E-Cadherina reprimeix la inducció de l'expressió de Fibronectina i LEF1 mitjançada per Snail. _____	109
3.3. En absència d'E-Cadherina Snail encara pot activar l'expressió de Fibronectina i LEF1. _____	112
4. L'efecte inhibidor de l'E-Cadherina depèn de la β -Catenina. _____	113
4.1. Snail disminueix la quantitat de β -Catenina associada a E-Cadherina. _____	115
4.2. Snail activa la transcripció mitjançada per β -Catenina i TCF4. _____	116
4.3. L'activació de la transcripció mitjançada per β -Catenina/TCF4 correlaciona amb els mutants de Snail que conserven l'activitat repressora. _____	119
4.4. L'expressió de Snail provoca la localització nuclear de β -Catenina. _____	120
4.5. L'E-Cadherina segresta a la β -Catenina als contactes cèl·lula-cèl·lula, indiferentment de si les cèl·lules expressen Snail o no. _____	122
4.6. La β -Catenina és necessària per a l'activació de Fibronectina i LEF1 provocada per Snail. _____	123
5. La β -Catenina pot unir-se al promotor de Fibronectina. _____	128
5.1. La β -Catenina pot interaccionar amb el promotor de Fibronectina. Aquesta interacció està regulada per l'E-Cadherina. _____	128

5.2. El factor de transcripció TCF no són necessaris per a l'activació de gens mesenquimals mitjançada per Snail. _____	131
5.3. Els factors de transcripció SOX7 i/o SOX9 podrien intervenir en l'activació de gens mesenquimals induïda per Snail. _____	136
5.3.1. SOX7 i SOX9 potencien l'activació de la transcripció de gens mesenquimals induïda per Snail. _____	138
6. <i>Snail modula la unió de la β-Catenina amb els seus partners.</i> _____	142
7. <i>El Snail i la β-Catenina interaccionen.</i> _____	145
7.1. El Snail i la β -Catenina co-localitzen en cèl·lules SW480-ADH. _____	145
7.2. El Snail i la β -Catenina interaccionen directament in vitro. _____	147
7.3. S'ha detectat co-expressió de Snail i β -Catenina cèl·lules de tumors de còlon humans. _____	153
8. <i>Snail activa la transcripció induïda per NFκB. Aquesta activació és inhibida per l'E-Cadherina.</i> _____	154
8.1. Snail activa la transcripció mitjançada per NF κ B. _____	156
8.2. La subunitat p65 de NF κ B s'uneix al promotor de Fibronectina _____	158
8.3. L'E-cadherina interacciona i reté la subunitat p65 de NF κ B als contactes cèl·lula-cèl·lula. _____	159
 <i>Discussió</i>	
1. <i>Snail activa la transcripció de gens marcadors mesenquimals en totes les línies cel·lulars estudiades.</i> _____	165
2. <i>El mecanisme d'activació i de repressió de gens per Snail tenen requeriments diferents.</i> _____	168
3. <i>La repressió de l'E-Cadherina és necessària però no suficient per a que es produeixi l'activació gènica mediada per Snail.</i> _____	169
4. <i>La β-Catenina participa en l'activació de gens mesenquimals induïda per Snail.</i> _____	171
5. <i>La β-Catenina forma part d'un complex activador in vivo, amb el promotor de Fibronectina, diferent a la via canònica.</i> _____	176
6. <i>Snail i la β-Catenina interaccionen, pot aquesta interacció ser rellevant per a l'activació de gens mesenquimals?</i> _____	181
7. <i>E-Cadherina controla també l'activitat del factor de transcripció NFκB.</i> _____	186
9. <i>Model de l'activació de gens marcadors mesenquimals per Snail.</i> _____	190
<i>Bibliografia</i> _____	203
<i>Abreviatures</i> _____	245
<i>Agraïments</i> _____	246

Introducció

1.La transició epiteli mesènquima

L'anomenada transició epiteli-mesènquima (EMT, de l'anglès "Epithelial-Mesenchymal transition") fa referència al canvi molecular i en conseqüència fenotípic que pateixen certes cèl·lules epitelials en resposta a diferents senyals, i que les indueix a adoptar una morfologia mesenquimal. Les cèl·lules experimenten canvis tant en l'arquitectura com en el comportament cel·lular, que es veuen reflectits en les diferències en la morfologia, l'arquitectura cel·lular, l'adhesió i la capacitat de migració (Thiery, 2002;Thiery and Sleeman, 2006).

Les cèl·lules epitelials es troben formant capes, sovint una monocapa, on les cèl·lules es distribueixen en una disposició uniforme. Les cèl·lules estan unides les unes amb les altres mitjançant estructures especialitzades de la membrana plasmàtica com ara les unions estretes ("tight junctions"), les unions adherents ("adherent junctions") i els desmosomes (Fig. I1) A més, les cèl·lules epitelials tenen una polarització apico-basolateral que ve determinada per la distribució de molècules d'adhesió com les Cadherines i algunes Integrines, l'organització de les unions cèl·lula-cèl·lula com l'anell lateral, l'organització del citoesquelet d'actina i la presència de la làmina basal a la base de la capa de cèl·lules. Aquesta forta adhesivitat interna permet que la monocapa epitelial delimiti un espai tridimensional i li doni definició estructural i rigidesa mecànica. En condicions normals, les cèl·lules epitelials no es desenganxen i no migren, tot i

que tenen certa capacitat motriu, ja que poden migrar sense travessar la làmina basal (Thiery and Sleeman, 2006; Hay, 1995).

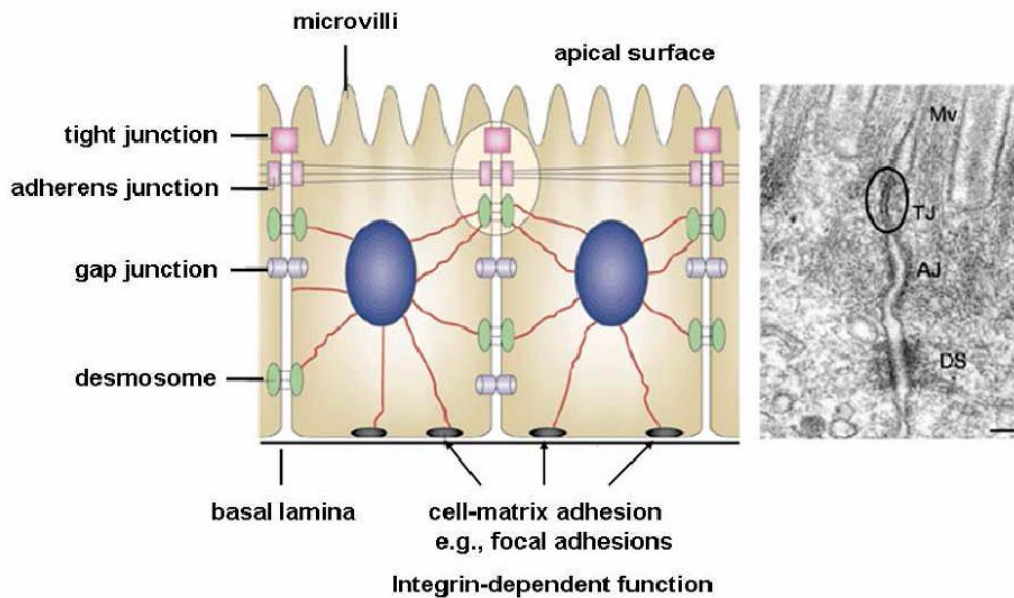


Figura I1. Estructura de les cèl·lules epitelials. Les cèl·lules epitelials presenten polaritat apico-basal, amb una cara apical i unides a la làmina basal. En la Figura I s'esquematitzen els diferents tipus d'unió cèl·lula-cèl·lula, assenyalats a la dreta en una fotografia presa amb microscopi electrònic.

Les cèl·lules mesenquimals, d'altra banda, no formen capes de cèl·lules organitzades, no tenen la mateixa polaritat i organització apico-basolateral que les cèl·lules epitelials. Estan més separades les unes de les altres, tenen una forma més allargada i la seva polaritat és front-cua. Formen contactes amb les cèl·lules veïnes però aquestes són focals, que són més febles que les seves homòlogues epitelials. Les cèl·lules no estan associades a la làmina basal, la qual cosa permet una major capacitat migratòria. En cultiu, les cèl·lules mesenquimals tenen una morfologia fibroblastoide mentre que les cèl·lules epitelials creixen formant clusters de cèl·lules que mantenen les adhesions amb les cèl·lules veïnes.

Així doncs, en el procés de canvi que transforma una cèl·lula epitelial en una de mesenquimal, la EMT, les cèl·lules experimenten un canvi d'un fenotip polaritzat i epitelial a un d'altament motriu i fibroblastoide que inclou alteracions en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula, en la interacció cèl·lula-substrat, en la degradació de la matriu extracel·lular i en la reorganització del citoesquelet. Tots aquests canvis fan augmentar la seva capacitat migratòria i invasiva, així com també la resistència a l'anoikis/apoptosi, de manera que permeten que la cèl·lula es desplaci a teixits llunyans (Huber et al., 2005).

A nivell molecular, aquests canvis fenotípics es tradueixen en la baixada de marcadors epitelials, com l'E-Cadherina, la Desmoplaquina i la Citoqueratina, i en la pujada de marcadors mesenquimals, com ara la N-Cadherina, la Vimentina i la Fibronectina, la localització nuclear de β -Catenina, i l'augment en la producció de factors de transcripció tals com Snail, Slug, Twist, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2, i/o E47 (Lee et al., 2006). A nivell cel·lular aquest procés inclou dos passos diferents associats a la pèrdua total de la polaritat cel·lular epitelial: 1). Davallada en l'adhesió intercel·lular (per dissociar-se de les capes cel·lulars epitelials) i 2). Increment en la motilitat (per migrar cap a teixits connectius).

Però, tot i que la EMT engloba un ampli espectre de canvis intercel·lulars i intracel·lulars, no sempre es poden observar tots durant una transició, de manera que es poden obtenir diferents "subtipus" de la EMT. Aquestes EMT poden ser induïdes per diferents agents o combinacions d'aquests, són sovint dependents d'un model cel·lular en particular, poden ser reversibles, i poden induir o reprimir la progressió del programa d'expressió gènica de la cèl·lula epitelial vers una gran diversitat de fenotips (Huber et al., 2005). Entre tots

aquests possibles canvis que tenen lloc durant la EMT, podem definir que té lloc una “EMT completa” quan el fenotip cel·lular és fibroblastoide, les cèl·lules han perdut l'expressió de l'E-Cadherina i hi ha un guany de la Vimentina. Aquesta EMT és la que més es relaciona amb la invasió local i la metastasi (Grunert et al., 2003).

En el desenvolupament d'aquesta tesi ens hem centrat en l'estudi de dos gens marcadors mesenquimals que s'indueixen durant la EMT com Fibronectina i LEF1. La Fibronectina és el component majoritari de la matriu extracel·lular. És una glicoproteïna multifuncional i ubiqua que promou l'adhesió cel·lular. Controla diferents vies intracel·lulars i influencia varies funcions de la cèl·lula, entre d'altres la migració i l'adquisició de la capacitat invasiva (Silletti et al., 1998). L'augment de l'expressió de Fibronectina i la seva secreció en cèl·lules de melanoma, s'ha relacionat amb la promoció de la migració cel·lular (Bittner et al., 2000; Carr et al., 2003). Pel que fa a LEF1 (de l'anglès Lymphoid Enhancer Factor-1), és membre de la família de factors de transcripció que contenen el domini HMG (High Mobility Group) , aquests medien la transducció de senyal de la via de WNT. El factor LEF1 pot interaccionar al nucli amb la β -Catenina i induir l'expressió del gens relacionats amb la EMT (Thiery, 2003). A més d'unir-se a la β -Catenina, LEF1 pot interaccionar amb les proteïnes Smad i formar un complex i activar la transcripció de gens implicats en EMT d'una forma independent de β -Catenina (Nawshad and Hay, 2003b). El factor de transcripció LEF1, per tant, està directament relacionat amb la transició epiteli-mesènquima.

2. Rellevància fisiològica de la EMT.

Així doncs, la EMT és el mecanisme de canvi pel qual cèl·lules epitelials (immòbils, adherides entre elles i a la matriu extracel·lular) generades en una regió particular es poden dissociar de l'epiteli i migrar com a cèl·lules individuals per dirigir-se a diferents localitzacions. Aquests tipus de processos tenen lloc tant en fases clau del desenvolupament embrionari com en diferents processos patològics, com la fibrosi i la progressió tumoral.

2. 1. Desenvolupament

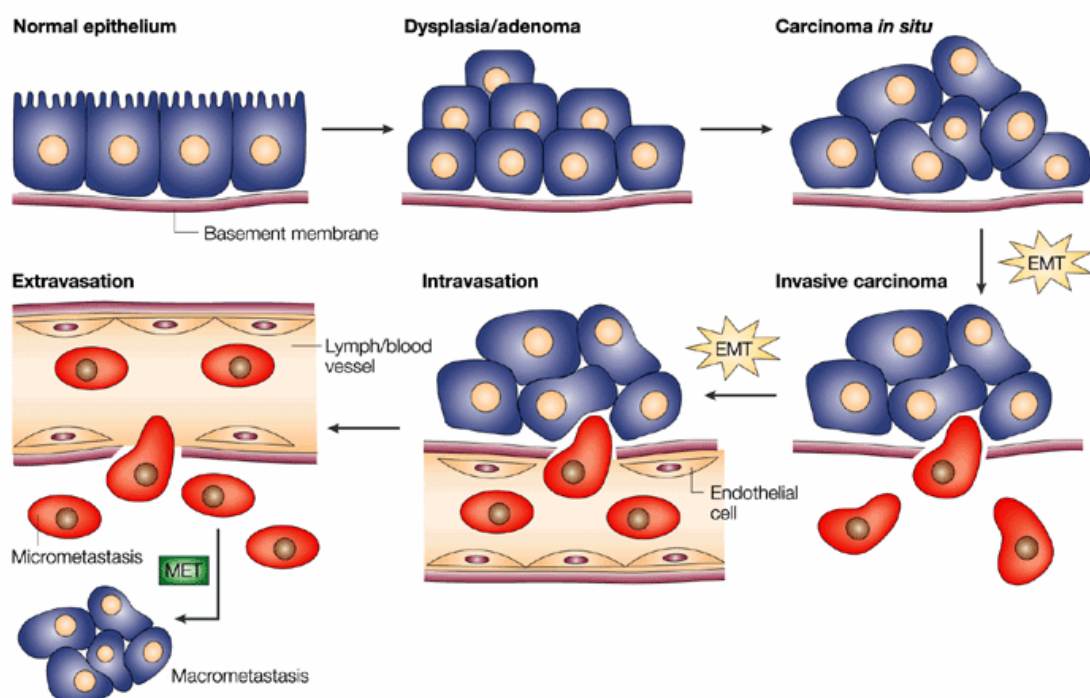
Durant el desenvolupament embrionari, l'ectoderma és el teixit més primerenc i forma capes de cèl·lules fortament unides entre elles per les unions adherents. Aquestes capes de cèl·lules epitelials contigües estan unides fermament a una matriu extracel·lular situada inferiorment i que conté Col·lagen IV i Laminina, coneguda com a membrana o làmina basal (Hay, 2005). El primer moment en què té lloc un procés de la EMT és, quan en l'estadi de blàstula, l'endoderma presumptiu s'invagina i es delamina per donar lloc a cèl·lules mesenquimals migradores en el procés de gastrulació. La migració d'aquestes cèl·lules de l'epiblast permetrà la formació de l'endoderma i del mesoderma (Wolpert, 1998). Així doncs, durant el desenvolupament dels metazous la EMT és requerida per als moviments morfogenètics subjacents a la formació de l'endoderma parietal i la gastrulació, però també durant la formació d'una

àmplia gamma d'òrgans i teixits, tals com la cresta neural, el cor, el sistema mucoesquelètic, estructures craneofacials i el sistema nerviós perifèric (Thiery, 2002).

2.2. Càncer

Diverses observacions donen suport a la idea que la EMT té un paper important en la progressió tumoral, ja que és molt evident que les cèl·lules pateixen canvis fenotípics que els permeten abandonar una capa epitelial organitzada i iniciar un procés metastàtic que conduirà a l'extensió de la malaltia (Savagner, 2001). Les metàstasis tumorals tenen lloc al final d'una sèrie de passos seqüencials que comprenen: el creixement tumoral local, on les cèl·lules epitelials acaben formant un carcinoma; la invasió i transmigració a través de les membranes basals i del teixit hoste no tumoral; intravasació cap als vasos sanguinis; disseminació i supervivència dins el corrent sanguini; extravasació, i restabliment en llocs distants del tumor primari. En alguns tumors la EMT és transitòria, té lloc en els fronts d'invasió de carcinomes primaris metastàtic, i pot ser revertida després de l'establiment de la metàstasi, on les cèl·lules pateixen una transició mesènquima-epiteli (MET, de l'anglès mesenchymal-epithelial transition) (Figura I2). Durant aquesta progressió cap a competències metastàsiques, les cèl·lules dels carcinomes perden les característiques epitelials i adquireixen patrons d'expressió gènica i propietats mesenquimals. De forma concomitant hi ha canvis en les propietats d'adhesió i s'activen la proteòlisi i la motilitat, de manera que les cèl·lules tumorals són capaces de

migrar i establir tumors secundaris en altres teixits distants, iniciant, així, un nou focus tumoral. Tot i això, també s'ha suggerit que l'adquisició de marcadors i propietats mesenquimals durant la progressió tumoral simplement reflecteix inestabilitat genòmica i que la EMT no succeeix en tumors (Tarin et al., 2005). Respecte a aquesta hipòtesi, s'ha argumentat que és poc probable que els patrons d'expressió gènica, complexos i coordinats requerits perquè cèl·lules tumorals facin metàstasi, puguin aparèixer per mutacions a l'atzar com a resultat de la inestabilitat genòmica, i que de fet és més probable que la inestabilitat genòmica canviï l'expressió de factors importants que regulen la EMT (Thiery and Sleeman, 2006).



Nature Reviews | Cancer

Figura I2 : La EMT en l'aparició i progressió del carcinoma. En aquesta figura s'observen els passos que tenen lloc quan un epiteli normal es transforma i pateix una transició epitelimesènquima durant la progressió tumoral, que permet que les cèl·lules transformades migrin cap a altres teixits i formin metàstasi (Thiery, 2002).

3. Mecanismes moleculars en la EMT.

La EMT és un procés dinàmic que engloba moltes vies de regulació entrecreuades, així com altres esdeveniments intracel·lulars i intercel·lulars. Els mecanismes moleculars que regulen la EMT es solapen considerablement amb aquells que controlen l'adhesió cel·lular, la invasió, la motilitat, la supervivència i la diferenciació. Estudis en cultius cel·lulars *in vitro* mostren les constatacions següents: 1) Hi ha molts activadors extracel·lulars que inicien la EMT, 2) Existeix un entrecreuament entre les diferents vies de senyalització que activen i reprimeixen la EMT i 3) La majoria de vies que activen la EMT tenen "finals de ruta" comuns, com pot ser la regulació a la baixa d'E-cadherina o l'expressió de certs gens associats a les EMT, com ara Snail (Thiery and Sleeman, 2006; Venkov et al., 2007). Per altra banda, estudis *in vivo* demostren la importància del context fisiològic i com cada EMT en particular és regulada per un grup concret d'activadors i repressors (Zavadil and Bottinger, 2005).

3.1. Vies de senyalització que intervenen en la transició epitelial mesènquima (EMT).

Michael Stoker i Michael Perryman van descobrir al 1985 que els sobrenedants que provenien de cultius de fibroblasts contenien una activitat anomenada *scatter* que produïa dit efecte sobre cèl·lules epitelials Mardin-Darby Canine Kidney (MDCK), això va obrir noves portes a l'estudi en el camp de la EMT. A

principis dels anys 90, l'anomenat factor *scatter* va resultar ser el factor de creixement dels hepatòcits (HGF), lligand del receptor c-met (Stoker and Perryman, 1985; Thiery, 2003).

Els inductors inicials de la EMT tant poden ser factors de creixement solubles (HGF, TGF β ,...) (Nakamura et al., 1989; Stoker and Perryman, 1985), com components de la matriu extracel·lular (Col·lagen, àcid Hialurònic) (Zoltan-Jones et al., 2003).

La majoria dels factors de creixement senyalitzen a través de l'activació dels seus receptors específics presents en la superfície cel·lular. Factors de creixement com el factor de creixement tumoral (TGF α), el factor de creixement epidèrmic (EGF) o els factors de creixement fibroblàstics (FGFs), transdueixen la seva senyal a través de l'activació de les vies dels receptors tirosina quinasa (RTKs) que a la seva vegada, transmeten la seva senyal, almenys en part, mitjançant l'activació de la via de Ras-MAPK (Rommel and Hafen, 1998) i la via de senyalització PI3K/Akt (Grande et al., 2002). Si bé la ruta Ras-MAPK s'ha implicat en EMT, per si sola no seria suficient per desencadenar-la. Així, s'ha descrit una cooperació entre la via de senyalització de TGF β i de Ras per tal d'induir la EMT (Janda et al., 2002). El receptor del factor TGF β forma un complex amb les proteïnes Smad2 i Smad3, aquestes es fosforilen i dit complex transloca al nucli on s'uneix a les seqüències dels promotors dels gens que activa. La majoria de gens diana de TGF β tenen la seva transcripció controlada de forma dependent de Smad3 (Massague and Wotton, 2000). La sobre expressió de Smad2 i Smad3 en cèl·lules epitelials mamàries provoca una EMT (Valcourt et al., 2005), aquestes dues proteïnes juguen un rol

importantíssim en la EMT dependent de TGF β associada a la progressió tumoral i la metàstasi (revisat per (Zavadil and Bottinger, 2005)). Tant TGF β com altres estímuls estan involucrats en la inducció de la EMT activant la quinasa ERK2, integrada en la via de senyalització de les MAPKs.

La matriu extracel·lular també pot induir la EMT, aquesta inducció es dona a través de la senyalització per integrines i la seva quinasa associada anomenada ILK, molècula que pot transmetre la seva senyalització a nucli a través de l'activació per fosforilació d'Akt (Tan et al., 2001), un factor que també pot ser regulat per les vies de senyalització dels RTKs (Cruet-Hennequart et al., 2003; Gary et al., 2003). Per això, es considera que la molècula ILK juga un important paper en el *crosstalk* entre les vies de senyalització induïdes pels RTKs i les induïdes per les integrines. Se sap que Akt és capaç de fosforilar la quinasa (IKK) responsable de fosforilar l'inhibidor de NF κ B (I κ B) alliberant d'aquesta manera el factor transcripcional que es pot translocar al nucli i realitzar la seva funció activadora (Ozes et al., 1999). El factor NF κ B és un factor de transcripció heterodimèric implicat en la modulació de diverses funcions cel·lulars bàsiques incloent el manteniment de la EMT (revisat per (Basseres and Baldwin, 2006)).

La EMT és un mecanisme complex i s'ha de tenir en compte que tots aquests estímuls i vies s'entrecreuen, i, sovint, diverses vies actuen a la vegada en un mateix moment. Per exemple, el factor soluble WNT estabilitza β -Catenina que es translocar al nucli i interacciona amb factors de transcripció TCF/LEF i activa una sèrie de gens relacionats amb la EMT (Thiery, 2003). El factor de transcripció LEF1 (de l'anglès Lymphoid-enhancing factor 1), per tant, està

directament relacionat amb la EMT. A més d'unir-se a la β -Catenina, LEF1 pot interaccionar amb les proteïnes Smad i formar un complex i activar la transcripció de gens implicats en EMT d'una forma independent de β -Catenina (Nawshad and Hay, 2003a).

La resposta a tots aquests senyals dóna lloc a l'activació de reguladors transcripcionals (com ara Snail o Slug) que modulen els canvis en els patrons d'expressió gènica associats a la EMT i que comporten el desmembrament dels complexos d'unió cèl·lula-cèl·lula i els canvis en el citoesquelet que tenen lloc durant la EMT. El factor de transcripció Snail s'ha definit com a *master gene* de la EMT, la seva expressió ectòpica és suficient per a provocar una EMT completa en cèl·lules epitelials en cultiu (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). S'han identificat alguns factors transcripcionals de tipus bHLH que estan implicats en la pèrdua de l'expressió de l'E-Cadherina i que també s'expressen en el mesoderm embrionari, són els anomenats Zeb-1 (δ EF1) (Grootclaes and Frisch, 2000); 2000 Guaita et al., 2002), Zeb-2 (o SIP1) (Comijn et al., 2001b), E47 (Perez-Moreno et al., 2001) i Twist (Yang et al., 2004).

Zeb-1, o també anomenada δ EF1 o AREB6, va ser caracteritzada per primera vegada com a una proteïna amb dits de zinc amb la capacitat d'unir-se a seqüències de tipus caixa E donant lloc a una repressió transcripcional que regula la diferenciació dels limfòcits (Genetta et al., 1994). Zeb-2, o SIP1 (Postigo and Dean, 2000) s'expressa amb alts nivells en les cèl·lules premigratòries de la cresta neural, cèl·lules que pateixen un procés de TEM, donant lloc d'aquesta manera a l'inici de la formació del tub neural; moment en que aquestes cèl·lules presenten una pèrdua de l'expressió de l'E-Cadherina

(Eisaki et al., 2000). S'ha demostrat que, Zeb-1, Zeb-2 tenen la capacitat d'unir-se a caixes E i reclutar el corepressor CtBP per reprimir d'aquesta manera l'expressió de l'E-Cadherina (Comijn et al., 2001). Estudis anteriors del nostre grup han demostrat que Zeb-1 pot reprimir l'expressió d'E-Cadherina i MUC1 encara que no exerceix una repressió tant potent com la realitzada per Snail, tot i això, l'expressió de Zeb-1 persisteix després que Snail sigui regulat a la baixa, per tant, Zeb-1 és un bon candidat per mantenir la repressió en algunes línies cel·lulars tumorals (Guaita et al., 2002).

E47 és una proteïna del tipus bHLH, es va identificar com un altre repressor transcripcional capaç d'interaccionar amb les caixes E del promotor de l'E-Cadherina, mitjançant un anàlisi d'*screening* (cribatge) amb l'assaig de *one-hybrid* (simple-híbrid) amb llevats. En el desenvolupament embrionari primerenc existeix una relació inversa entre l'expressió d'E47 i l'E-Cadherina. Estudis realitzats sobre una línia cel·lular epitelial que expressava de forma estable i ectòpica E47, van demostrar que la sobreexpressió d'aquest factor transcripcional donava lloc a un fenomen de EMT, amb una disminució de l'expressió de l'E-Cadherina i un augment de l'expressió i de la reorganització d'alguns marcadors mesenquimals (Pérez-Moreno et al., 2001).

Twist és un factor transcripcional de tipus bHLH que intervé en la cascada de senyalització que inicia el desenvolupament del mesoderm durant la gastrulació (Castanon and Baylies, 2002). Es van fer experiments d'expressió ectòpica d'aquest regulador transcripcional en cèl·lules epitelials de ronyó de gos i en cèl·lules epitelials de mama humanes immortalitzades en cultiu, i es va veure que la sobreexpressió de Twist induïa, de forma força potent, una EMT de les

dues línies cel·lulars. La transició morfològica d'aquestes cèl·lules epitelials cap a una aparença fibroblàstica anava acompanyada per un efecte de *scattering* (dispersió), per l'adquisició de característiques migratòries, per un guany de marcadors mesenquimals cel·lulars (com són la Fibronectina, la Vimentina, un "estirament" dels filaments d'actina, i N-Cadherina) i per una pèrdua de marcadors epitelials (E-Cadherina, α - i γ -catenina). Sembla ser que Twist podria estar implicat en la regulació a la baixa de l'E-Cadherina a través de les caixes E, però encara queda per determinar si la interacció de Twist amb aquestes caixes és directa o indirecta (Yang et al., 2004).

La regulació del factor transcripcional Snail ha estat la més estudiada. Molècules senyalitzadores tals com EGF, FGF, HGF, TGF β , BMPs, WNTs, i Notch (veure figura I3), poden activar Snail en diferents contextos cel·lulars (De Craene et al., 2005c).

De totes les vies que augmenten l'expressió de Snail, l'activada pels membres de la superfamília de TGF β ha estat la més ben caracteritzada, tant *in vivo* com *in vitro* i en diferents sistemes: en hepatòcits (Spagnoli et al., 2000;Valdes et al., 2002) en el tancament del paladar (Martinez-Alvarez et al., 2004), en cèl·lules epitelials (Peinado et al., 2003a) i mesotelials (Margetts et al., 2005) i durant el desenvolupament de la pell en ratolí (Jamora et al., 2005). *In vitro* s'ha vist que la inducció de l'expressió de Snail mediada per TGF β 1 depèn de l'activitat de PI3K i MAPK, molt probablement a través de l'activació de Ras en el cas d'aquesta última (Peinado et al., 2003b). En alguns casos TGF β 1 pot cooperar amb altres inductors, com Raf (Janda et al., 2002), FGF2 (Peinado et

al., 2003), H-Ras (Janda et al., 2002) o Notch (Grego-Bessa et al., 2004; Timmerman et al., 2004).

In vivo s'ha descrit que la via de FGF, mitjançant el receptor FGFR1, és necessària per a l'expressió de Snail durant el procés de gastrulació en ratolins (Ciruna and Rossant, 2001).

L'EGF pot induir Snail, i per tant la EMT, promovent l'endocitosi de l'E-Cadherina dependent de caveolines (Lu et al., 2003). Un altre membre de la família EGF, Cripto, també s'ha vist implicat en l'expressió de Snail. Cèl·lules provinents dels tumors i les hiperplàsies derivades de ratolins que expressen Cripto en la glàndula mamària, han patit una EMT i presenten nivells elevats de Snail (Strizzi et al., 2004).

Altres factors i estímuls que poden activar Snail són la hipòxia (Imai et al., 2003a) per via del factor autocrí de motilitat (AMF) (Tsutsumi et al., 2004), VEGF (Yang et al., 2006), la via de Sonic Hedgehog mitjançant Gli-1 (Li et al., 2006), les espècies reactives d'oxigen (ROS) (Radisky et al., 2005), l'hormona anomenada pèptid associat a l'hormona paratiroidea (PTHrP) (Veltmaat et al., 2000), la via de WNT (Yook et al., 2005; Yook et al., 2006), les BMP i les integrines (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005).

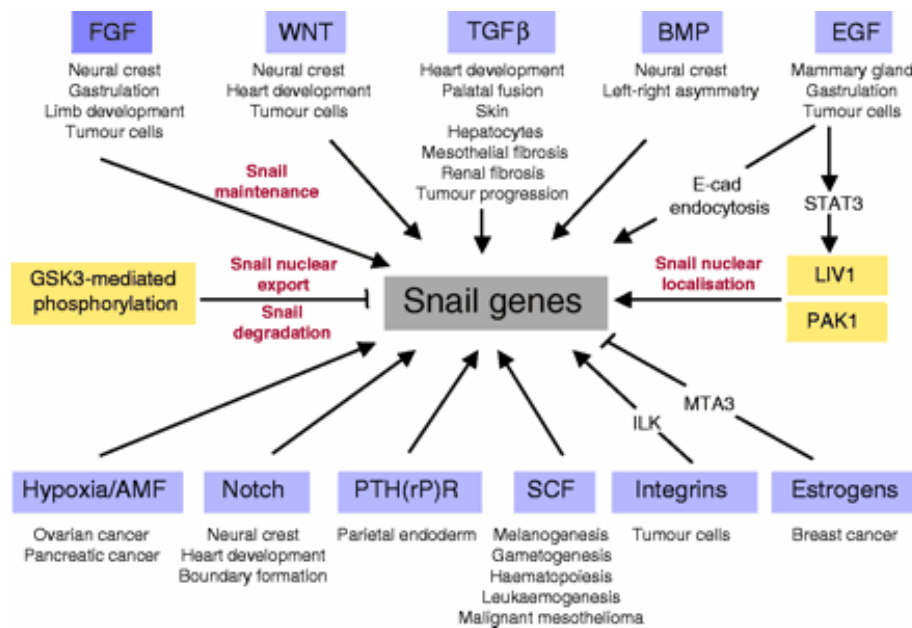


Figura I3. Vies involucrades en la regulació de Snail. Esquema on es mostren els diferents estímuls capaços de regular l'expressió de Snail (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005).

La via dels receptors d'estrògens (ER) també està implicada en la regulació de Snail, en aquest cas inhibint-ne la seva expressió per mitjà de la seva diana MTA3, un membre del complex Mi-2/NuRD que participa en la repressió transcripcional de Snail (Fujita et al., 2003a).

Recentment, s'ha descrit que el factor de transcripció proximal CARG box-binding factor-A (CBF-A), induït per les vies descrites anteriorment com a activadores de la EMT (WNT, TGFβ, FGF2 i ILK), es podria unir formant un complex amb la KRAB-associated protein (KAP-1) aquest complex es translocaria al nucli i s'uniria a les seqüències consens anomenades Fibroblast Transcription Site (FTS-1) del promotor proximal que activa la Fibroblast-Specific Protein 1 (FSP-1) (Venkov et al., 2007). S'ha constatat que la FSP-1 col·labora en la EMT i la seva expressió és necessària per a que es produeixi

(Okada et al., 1997). A més, gens com Snail, Twist, LEF1 i β -Catenina presenten seqüències FTS-1 als seus promotors.

Cal recordar que tots aquests estímuls i vies s'entrecreuen, i uns o altres estaran actius depenent de l'entorn fisiològic de cada moment.

3.2.El factor de transcripció Snail.

Snail va ser identificat inicialment en una recerca a gran escala de gens essencials per al desenvolupament en *Drosophila*. Des d'aleshores s'han descrit homòlegs a diversos grups d'animals: vertebrats, anèlids, insectes, mol·luscs, nematodes, procordats (Nieto, 2002), aus, amfibis, peixos i mamífers (Hemavathy et al., 2000). Fins ara s'han descrit més de 50 membres de la família en metazous (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005b; Nieto, 2002).

Tots ells tenen una organització similar, es componen d'una regió carboxi-terminal altament conservada que conté de quatre a sis dits de zinc i d'una regió amino-terminal molt més divergent. Els dits corresponen al tipus C2H2 i funcionen com a motius d'unió al DNA (Knight and Shimeld, 2001).

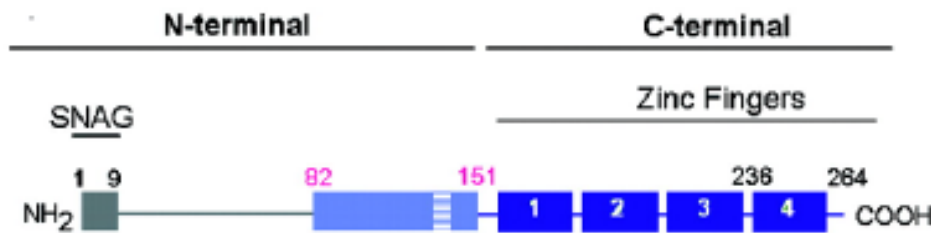


Figura I4: Diagrama de la proteïna Snail. S'han descrit dues regions diferents en aquesta proteïna: el domini C-terminal d'unió al DNA (aa 152 a 264; color blau fosc) i el domini N-Terminal regulador (aa 1 a 151; colors gris i blau clar).

Pel que fa a l'estructura del factor Snail1 (veure Fig. I4), la part C-Terminal conté quatre dits de zinc. A l'extrem N-Terminal, en mamífers, s'hi troba el domini SNAG (gris), que és essencial per a la repressió, i un subdomini situat entre els residus 82 i 151 de la seqüència de Snail de ratolí que és la regió més conservada de l'extrem N-Terminal, excloent el domini SNAG. Aquest subdomini conté una seqüència d'export nuclear (NES) i una regió adjacent sensible a fosforilació (Dominguez et al., 2003).

Gràcies a diversos experiments de transfecció realitzats amb diferents promotors, es va demostrar que el lloc d'unió consens per als factors de la família Snail està format per un core de sis parells de bases, 5'-CAGGTG-3' (Mauhin et al., 1993). Aquesta seqüència és idèntica a l'anomenada caixa E que està descrita com a lloc d'unió consens dels factors de transcripció bHLH, per tant, les proteïnes Snail poden competir amb aquests factors per la seva unió a la seqüència específica del DNA (Kataoka et al., 2000). Unint-se a les caixes E, els membres de la família Snail poden actuar com a repressors transcripcionals (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). Però la capacitat repressora de Snail no només depèn de la regió carboxi-terminal. En vertebrats

aquesta activitat és dependent del domini anomenat SNAG (Grimes et al., 1996), que consta dels set primers aminoàcids de la proteïna i que és necessari per al reclutament de deacetilases d'histones (Peinado et al., 2004). En altres organismes, com ara en *Drosophila*, Snail té un domini d'unió al cofactor CtBP, amb el qual interacciona per a desenvolupar la seva tasca com a repressor transcripcional (Nibu et al., 1998). Tant el domini SNAG en vertebrats com el domini d'unió a CtBP en *Drosophila*, es troben en la regió aminoterminal de la proteïna, que com he dit anteriorment, és una regió no conservada entre les diferents espècies. Així doncs, es proposa que la capacitat repressora de Snail està evolucionablement conservada, però pot usar diferents mecanismes, ja sigui reprimint directament mitjançant el domini SNAG, usant un cofactor (CtBP), o bé de les dues maneres en conjunció (Nieto, 2002).

A més a més del domini SNAG, l'extrem N-Terminal conté una seqüència d'export nuclear (NES). La fosforilació d'una seqüència rica en serines adjacents fa aquesta NES accessible al transportador CRM1 i facilita la translocació de la proteïna del nucli al citoplasma. Conseqüentment, la fosforilació de Snail disminueix l'activitat repressora sobre l'E-Cadherina (Domínguez et al 2003). Dins de la regió rica en serines, recentment, han estat descrits dos subdominis: un motiu d'export nuclear i un segon motiu de destrucció, ambdós dominis són fosforilats per la GSK-3 β . La fosforilació del primer motiu es dona a dins del nucli i fa que la proteïna es transloqui cap al citoplasma, mentre que el segon motiu, és fosforilat un cop està Snail al citosol i marca la proteïna per a la destrucció per al proteasoma (Zhou et al., 2004a).

Per tal de classificar els diferents membres de la família Snail, es van realitzar estudis filogenètics comparant les seqüències de les regions de dits de zinc presents en els diferents membres de la família. Aquests poden variar en número, de quatre a sis, depenent de la família i de l'espècie, però, per a què la proteïna sigui funcional, en són requerits un mínim de quatre (Fuse et al., 1994; Nakayama et al., 1998). S'ha proposat una divisió del que seria la superfamília de Snail en dos grups filogenètics de gens separats però relacionats: Snail i Scratch. Els membres d'aquestes dues famílies tenen seqüències conservades comunes que els engloba dins la superfamília de Snail, però també en tenen d'específiques que en permeten la classificació en una de les dues famílies (Manzanares et al., 2001; Nieto, 2002).

En mamífers hi ha tres membres de la família Snail (Snail, Slug i Smuc) i dos de la família Scratch (Scratch1 i Scratch2 Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005)). A més a més, en humans, s'ha descrit l'existència d'un retrogen de Snail (Locascio et al., 2002; Paznekas et al., 1999).

3.2.1. Funcions moleculars de Snail

Diferents experiments demostren que altres gens a part d'E-Cadherina són regulats per Snail, i que no es poden considerar un efecte secundari a la pèrdua d'E-Cadherina, ja que la seva transfecció no és suficient per revertir el fenotip mesenquimal altre cop cap a epitelial (Cano et al., 2000).

Per a que es produeixi una EMT completa, apart de la disrupció de les unions adherents, s'han de trencar els altres tipus de contactes que presenten les

cèl·lules epitelials, a més, també s'han de regular altres gens relacionats amb l'adhesió cel·lular, la migració, en promoure canvis en la forma de la cèl·lula, en el moviment cel·lular i la capacitat d'invasió. La EMT va acompanyada d'una repressió de la proliferació cel·lular i un augment de la supervivència cel·lular. S'ha constatat que Snail és imprescindible per a una correcta EMT, ja que regula gens implicats en tots aquests processos. Recentment han aparegut dos estudis d'expressió diferencial en cèl·lules que expressen o no Snail, un en cèl·lules de carcinoma de còlon que expressen hSnail de forma induïble (De Craene et al., 2005a), i l'altre en cèl·lules MDCK (ronyó de gos) estables per a Snail (Moreno-Bueno et al., 2006). Tot i que aquests treballs presenten poques similituds en els gens que es veuen regulats per Snail, atribuïbles al diferent disseny experimental i la plataforma d'*arrays* emprada, confirmen la implicació de Snail en la regulació de gran diversitat de gens. Aquests gens es troben implicats en diversos processos cel·lulars, on entre d'altres cal destacar l'adhesió cel·lular, la diferenciació epitelial, el metabolisme cel·lular, el cicle cel·lular i la transducció de senyals. La figura I5 mostra, a modus de resum, els diferents gens diana de Snail.

Així mateix, s'ha comprovat que membres de la família de Snail són capaços de regular els tres tipus d'unió que formen les cèl·lules epitelials: les unions adherents, les unions estretes i els desmosomes, que constitueixen el que podríem anomenar complex juncional epitelial (Ikenouchi et al., 2003). Les unions adherents són modificades regulant a la baixa l'E-Cadherina (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). Respecte a les unions estretes, en cèl·lules EpH4 estables per Snail, s'ha observat que els nivells de proteïna Claudina-3 i

Ocludina són indetectables (Ikenouchi et al., 2003). Tot i que la majoria de treballs han descrit que la repressió de l'Ocludina té lloc a nivell transcripcional, certs autors han suggerit que Snail podria tenir també un efecte a nivell post-transcripcional (Ohkubo and Ozawa, 2004). Pel que fa als desmosomes, s'ha constatat que la presència de Slug causa una baixada de Desmoplaquina i Desmogleïna, i una deslocalització o reordenament dels filaments de Citokeratina en cèl·lules NBT-II (Savagner et al., 1997).

Snail no només actua directament sobre proteïnes de les unions entre cèl·lules, sinó que també regula a la baixa el nivell d'altres proteïnes típicament epitelials com la Citoqueratina-18 (Guaita et al., 2002; Ikenouchi et al., 2003) i MUC-1 (Guaita et al., 2002). Altres dianes de Snail com a repressor transcripcional són el Receptor de Vitamina D (Palmer et al., 2004), la subunitat beta de la Na/K-ATPasa, relacionada amb la motilitat cel·lular (Espineda et al., 2004), la p53 (Kajita et al., 2004), la CDK4 i les Ciclines D1 i D2, relacionades les tres darreres amb l'aturada de la proliferació cel·lular (Vega et al., 2004), que és un pas imprescindible per a que es doni la EMT.

A més a més, diferents treballs mostren la capacitat de Snail d'activar gens, tot i que no ha estat determinat encara si aquesta activitat és directa o bé està mitjançada per altres proteïnes o factors. Exemples de gens regulats a l'alça per Snail són els marcadors típicament mesenquimals Vimentina (Cano et al., 2000) i Fibronectina (Guaita et al., 2002), ambdues proteïnes implicades en l'adhesió al substrat i importants doncs per a la migració cel·lular; els factors de transcripció LEF1 i ZEB1 (Guaita et al., 2002), les proteases de la matriu extracel·lular, que permetran a la cèl·lula una major motilitat i el factor Wnt3a.

Snail també promou la supervivència cel·lular, per tant actua reprimint gens que promouen l'apoptosi i activant-ne d'altres que protegeixen a la cèl·lula d'aquesta (Vega et al., 2004).la inhibeixen.

Així com el mecanisme utilitzat per Snail per reprimir l'expressió dels deus gens diana, a partir de la interacció amb les caixes E, ha estat àmpliament estudiada; no es tenen coneixement sobre com Snail és capaç de promoure l'activació de l'expressió de gens mesenquimals. Per tant, a l'inici de la realització d'aquest treball ens vam proposar entendre quin era el mecanisme pel qual Snail activava l'expressió de gens durant la EMT.

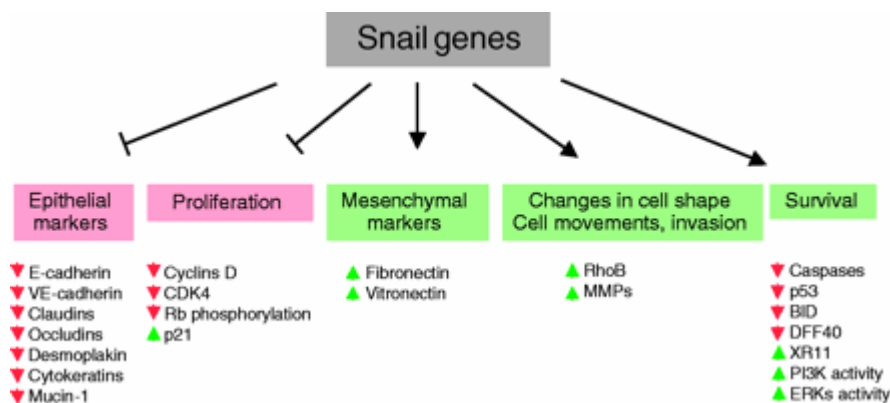
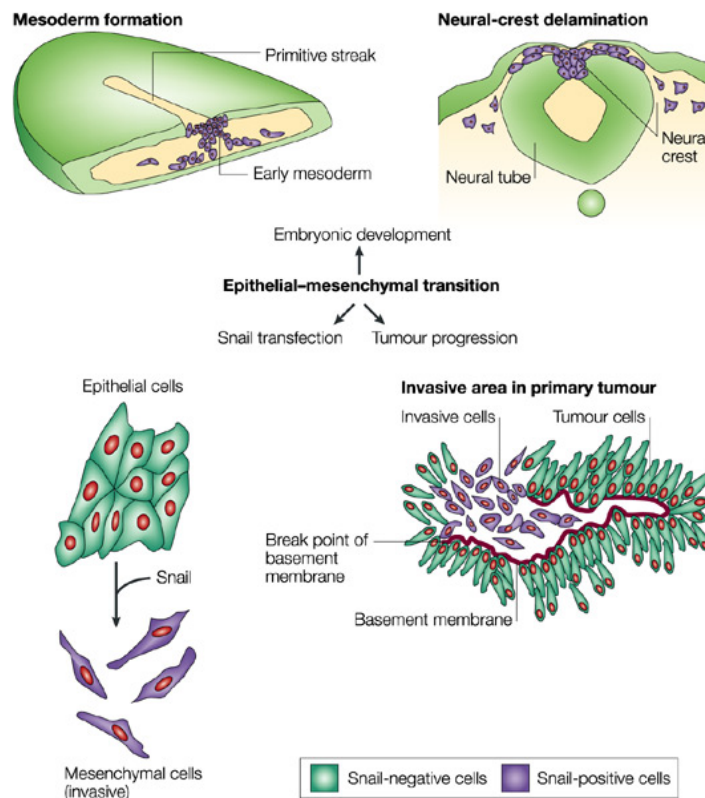


Figura 15. Gens diana de Snail. Esquema on es resumeix sobre quines proteïnes actua Snail, quines activa i quines reprimeix (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005).

Així doncs, sembla que un gran nombre de proteïnes els gens de les quals són diana per Snail, ajuden a desenvolupar el seu paper central en la inducció de la EMT. En tot cas el gen diana "estrella" en aquesta funció és l'E-Cadherina que, com ja he dit abans, és essencial en el manteniment de la integritat cel·lular i la seva desaparició és indispensable perquè cèl·lules epitelials perdin el seu fenotip polaritzat i esdevinguin mesenquimals, amb capacitats migratòries i invasives.

3.2.2. Snail participa en processos de desenvolupament i càncer.

Tal com he comentat en apartats anteriors, la EMT és un procés que té gran rellevància en el desenvolupament embrionari i en la progressió tumoral. Com podem veure en la Figura I6, els gens de la família de Snail s'expressen en la majoria dels processos de EMT estudiats, ja sigui durant la formació del mesoderma, la delaminació de la cresta neural, com en tumors invasius i en cèl·lules en cultiu, que pateixen la transició (Nieto, 2002).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura I6. Snail induïx la transició epiteli-mesènquima durant el desenvolupament embrionari i la progressió tumoral. La EMT induïda per Snail té lloc durant el desenvolupament embrionari, més concretament durant la formació del mesoderma i la delaminació de la cresta neural, i durant processos tumorals. L'expressió de Snail en cèl·lules epitelials en cultiu també produeix una EMT equivalent a la que succeeix en els altres casos mostrats en la figura (Nieto, 2002).

3.2.2.1. Desenvolupament

Els membres de la família de Snail tenen un paper important en la morfogènesi de diferents animals vertebrats i invertebrats durant el desenvolupament embrionari, on s'han vist implicats en la formació de diferents teixits. Inicialment Snail es va identificar en *Drosophila* com un gen essencial en la formació del mesoderma. Estudis posteriors d'expressió i funció van evidenciar el seu paper especificador en el mesoderma prospectiu, on reprimeix l'expressió de gens neuroectodèrmics, com ara rhomboid i single-minded (Nieto, 2002). Sembla que, en totes les espècies on s'han descrit homòlegs de Snail, el paper d'aquest gen en l'especificació del mesoderma es troba conservat (Nieto, 2002). Alguns autors han suggerit que la funció de Snail està més relacionada amb la regulació de l'adhesió i els moviments cel·lulars que amb la de determinar el destí cel·lular (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005). De fet, ratolins deficientes per a Snail moren en l'estadi de gastrulació i mostren deficiències en la EMT, on la capa mesodèrmica formada és capaç d'expressar certs marcadors mesenquimals. Però les cèl·lules presenten polaritat apico-basal i unions adherents, es a dir, la no presència de Snail fa que no es reprimeixi l'E-Cadherina, fet que s'ha vist essencial per a una correcta entrada en la gastrulació (Carver et al., 2001;van de et al., 2002c). Els mutants KO de Snail en *Drosophila* mostren el mateix defecte en l'estadi de gastrulació: els embrions amb pèrdua de funció mostren defectes en la invaginació del mesoderma presumptiu i retracció de la banda germinal (Hemavathy et al., 2000).

En vertebrats, Snail no només s'expressa durant la formació del mesoderma, sinó que també s'ha vist que participa en el desenvolupament de la cresta

neural. En pollastre i *Xenopus*, les espècies on més s'han estudiat els gens de la família (Snail i Slug), s'ha vist que Slug participa tant en l'especificació com en el desenvolupament d'aquesta cresta neural (del Barrio and Nieto, 2002; Nieto, 2002). Durant aquest procés, les cèl·lules, tant si són del tub neural com del mesoderma, es delaminen i migren, aquest procés implica un canvi fenotípic on les cèl·lules epitelials prenen un fenotip mesenquimal i poden migrar. Snail participa en aquest procés d'EMT. En ratolí, en canvi, el paper de Snail i Slug en la formació de la cresta neural és més controvertit (Murray and Gridley, 2006).

A més a més, s'ha constatat que Snail participa en altres processos que tenen lloc durant el desenvolupament, com ara la diferenciació de condrocits en ratolí, on regula l'expressió del Col·lagen tipus II i de l'Agrecà (Seki et al., 2003); la divisió asimètrica en neuroblasts (Ashraf and Ip, 2001) i l'establiment de l'asimetria dreta-esquerra en el desenvolupament d'embrions de ratolins (Murray and Gridley, 2006). Snail també participa en la morfogènesi del pèl, expressant-se en les cèl·lules de l'epiteli que perden l'expressió d'E-Cadherina i s'invaginen per formar els bulbs fol·liculars (Jamora et al., 2005), i en el tancament del paladar, que dona lloc a una correcta separació entre les cavitats nasal i bucal (Martinez- Alvarez et al., 2004). Tots aquests experiments s'han realitzat analitzant els nivells d'RNA de Snail1. A nivell de proteïna, s'ha constatat l'expressió de Snail en embrions de ratolí està restringida al mesoderm a estadis primerencs del desenvolupament. Posteriorment es detecta una expressió més alta de Snail1 als condrocits i a les cèl·lules mesenquimals dèrmiques adjacents als fol·licles pilosos (Franci et al., 2006).

3.2.2.2. Càncer.

Com ja he mencionat anteriorment, la inducció de la EMT constitueix el primer pas en la cascada metastàsica, i diverses observacions apunten a una relació entre l'aparició de Snail i una baixada d'expressió d'E-Cadherina que duu a aquesta EMT necessària per a la progressió tumoral cap a metàstasi. *In vitro* s'ha observat que la transfecció de Snail en cèl·lules d'origen tumoral que expressen E-Cadherina dóna lloc a que aquesta proteïna es perdi i que s'indueixi la EMT (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). Aquest fenomen també es dóna en diverses línies cel·lulars derivades de carcinomes hepatocel·lulars (Jiao et al., 2002a), així com en les derivades de melanomes (Poser et al., 2001). *In vivo* també s'ha observat aquesta correlació inversa en els tumors induïts a ratolins (Cano et al., 2000), en tumors gàstrics humans (Pena et al., 2006; Rosivatz et al., 2002), en cèl·lules de carcinomes de mama (Blanco et al., 2002; Elloul et al., 2005; Fujita et al., 2003b; Yokoyama et al., 2001) de còlon (Palmer et al., 2004; Pena et al., 2005), d'ovari (Elloul et al., 2005), hepatocel·lulars (Jiao et al., 2002b; Sugimachi et al., 2003), de cèl·lules esquamoses orals (Yokoyama et al., 2001) i en melanomes (Poser et al., 2001). Aquesta correlació inversa, fins ara observada a nivell de mRNA, comença a ser confirmada a nivell de proteïna (Franci et al., 2006).

Però el paper de Snail en la progressió tumoral no es limita a la repressió de la transcripció de l'E-Cadherina, sinó que, tal i com succeeix durant el desenvolupament embrionari, també és el responsable de la davallada i de l'augment de l'expressió d'altres proteïnes importants, tant durant el procés d'EMT com en les altres funcions que se li atribueixen (apoptosi,

supervivència...). Aquestes altres funcions permeten a les cèl·lules adquirir propietats migratòries i invasives a través de canvis en el citoesquelet, la inducció de metal·loproteïnases i protecció en front la mort cel·lular induïda per la pèrdua de factors de supervivència o bé per estímuls proapoptòtics. La resistència a la mort cel·lular mediada per Snail proporciona a les cèl·lules un avantatge selectiu a les cèl·lules per migrar i colonitzar altres teixits, és a dir, formar metàstasis (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005).

3.3. L'E-Cadherina.

Tal com hem vist a l'apartat anterior, s'ha observat, *in vitro*, una correlació directa entre la pèrdua de l'E-Cadherina i la pèrdua del fenotip epitelial, i un revertiment parcial o total del fenotip mesenquimal i invasiu si s'expressa constitutivament o ectòpicament l'E-Cadherina (Navarro et al., 1991; Vleminckx et al., 1991). *In vivo* també s'ha comprovat com hi ha una pèrdua en l'expressió de l'E-Cadherina en les EMT que tenen lloc durant el desenvolupament (formació de l'endoderma parietal en ratolí i durant la gastrulació en *Drosophila*, pollastre i ratolí) i processos patològics (Thiery, 2002). Aquesta correlació directa s'observa tan en línies cel·lulars, com en tumors.

Per tant la EMT requereix la regulació a la baixa de l'E-Cadherina. Durant la progressió tumoral, l'E-Cadherina pot ser silenciada de maneres diferents, ja sigui per control post-traducciona l o per regulació a la baixa de la seva

expressió, que pot tenir lloc per mutacions somàtiques, per hipermetilació del promotor i/o, com succeeix en la major part de vegades, per repressió transcripcional directa (Peinado et al., 2004).

La rellevància de l'E-Cadherina ve donada per la seva funció central en les unions adherents.

3.3.1. Les unions adherents.

L'E-Cadherina és la molècula d'adhesió prototípica de les unions adherents (AJ, de l'anglès "Adherent Junctions"). Aquestes unions juguen un paper central en l'arquitectura cel·lular ja que són necessàries per a la formació de les unions intercel·lulars i l'establiment de la polaritat cel·lular. Com podem veure en la Figura 17, l'E-Cadherina és una molècula transmembrana encarregada d'establir unions homotípiques dependents de calci entre cèl·lules veïnes. Quan es produeix aquesta interacció, a la part intracel·lular de l'E-Cadherina s'hi uneixen varies proteïnes com ara la β -Catenina, la Plakoglobina (proteïna molt semblant a la β -Catenina) i la p120. Tant la Plakoglobina, com la β -Catenina interaccionen alhora amb l'E-cadherina i l' α -Catenina, una proteïna que regula la polimerització dels filaments i els feixos d'actina del citoesquelet cel·lular (Aberle et al., 1994). De fet l' α -catenina interacciona amb proteïnes que s'uneixen directament a l'actina, com la Vinculina, l' α -Actinina, l'Espectrina, la ZO-1, l'Afadina i proteïnes que regulen l'assemblatge del l'actina, com les Formines (revisat a (Weis and Nelson, 2006)). Fins fa ben poc s'havia pensat

que el complex equimolar E-Cadherina/ β -Catenina/ α -Catenina interaccionava amb el citoesquelet d'actina. Weis i Nelson van desmentir aquest model i van demostrar que l' α -Catenina només interacciona amb els feixos d'actina quan es troba formant un homodímer. El domini de dimerització de l' α -Catenina es solapa amb el domini d'interacció amb la β -Catenina, per tant, l' α -Catenina no pot unir β -Catenina i actina al mateix temps (Yamada et al., 2005). Els homodímers d' α -Catenina tenen un paper rellevant en la regulació de la dinàmica del citoesquelet, ja que suprimeixen la polimerització dels filaments d'actina, inhibint, per competició, a Arp2/3. Aquesta inhibició redueix la ramificació i l'activitat lamel·lipoidal de l'actina, i promou la formació de feixos. Recentment, en un estudi realitzat en MDCK, s'ha determinat que l' α -Catenina és essencial pel manteniment de la funcionalitat de les unions adherents (Capaldo and Macara, 2007). No està clar com es dona l'associació entre el complex E-Cadherina/ β -Catenina amb el citoesquelet d'actina, hi ha varies proteïnes candidates com la Nectina que es troba a les AJ i el seu domini citoplasmàtic s'uneix a la 1-Afadina que interacciona amb l' α -Catenina i l'actina a la vegada (Pokutta et al., 2002).

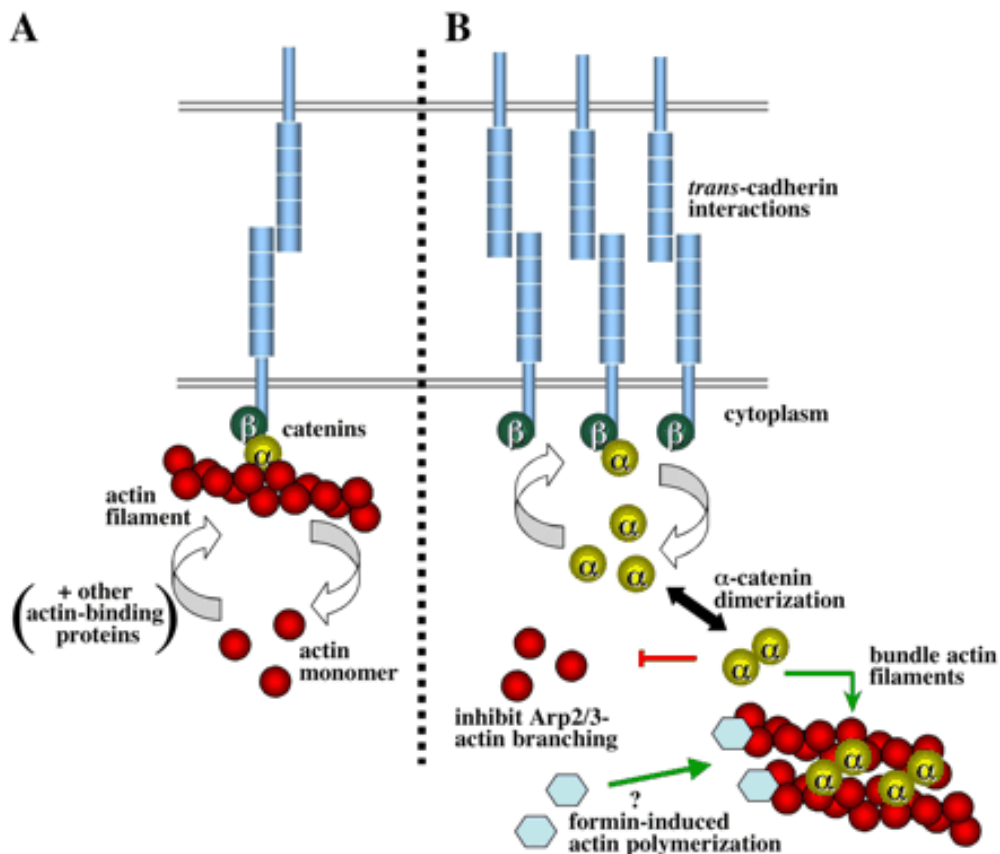


Figura 17. Les unions adherents (AJ). Models de com el complex E-Cadherina/β-Catenina s'uneix al citoesquelet d'actina. A: Model basat en que l'α-Catenina s'uneix a la β-Catenina i a l'actina al mateix temps. **B:** Model proposat per Weis and Nelson (Yamada et al., 2005). En la seva part intracel·lular, l'E-Cadherina es troba unida a la β-Catenina, que s'uneix a un monòmer d'α-Catenina. L'elevada concentració local d'α-Catenina permet la formació d'homodímers els quals s'uneixen a l'actina i antagonitzen amb Arp2/3. Esquema de (Weis and Nelson, 2006). En tots dos models, l'E-Cadherina forma complexos homotípics entre molècules de dos cèl·lules veïnes.

3.3.2. Mecanismes moleculars regulats per l'E-Cadherina.

La disminució de l'expressió d'E-Cadherina dóna lloc a la pèrdua de les unions adherents i de la unió intercel·lular dependent de calci (tal com he explicat anteriorment). La disrupció dels contactes provoca canvis moleculars que

alteren varies vies de senyalització cel·lular com la cascada de les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Ara et al., 2000), l'activitat de la *Small* GTPasa RhoA (Noren et al., 2003), la senyalització ILK per reducció de la integrina $\alpha5\beta1$ (Wu et al., 2006), la senyalització per β -Catenina/TCF (Gottardi et al., 2001; Stockinger et al., 2001), NF κ B (Kuphal et al., 2004; Kuphal and Bosserhoff, 2006), entre d'altres. Nosaltres ens hem centrat en dues: l'efecte de la inhibició de l'expressió d'E-Cadherina sobre la β -Catenina i sobre el factor de transcripció NF κ B, ja que s'han relacionat amb el fenotip mesenquimal i hem pogut demostrar la seva implicació en l'activació de gens.

4. La β -Catenina i la seva funció com a activador transcripcional.

La β -Catenina és una proteïna de 92 kD que va ser purificada mitjançant co-immunoprecipitació amb E-Cadherina en cèl·lules epitelials de *Xenopus* (Aberle et al., 1996). Forma part de la superfamília "Armadillo", que rep el nom del seu homòleg en *Drosophila*, el gen de polaritat segmental armadillo, el primer que es va descriure d'aquesta família (Riggelman et al., 1989). Tots els membres d'aquesta família comparteixen un domini central característic anomenat domini armadillo a través del qual poden interaccionar amb un gran nombre de molècules.

La β -Catenina té una funció vital en dos processos cel·lulars: d'una banda, com element estructural a la membrana cel·lular, i d'altra banda, en la regulació gènica a dins del nucli. La doble funció de la β -Catenina, així com la seva regulació per degradació (veure és endavant), està modulada per la capacitat de la β -Catenina d'interaccionar amb un nombre elevat de proteïnes (vegeu Fig. I8).

La β -Catenina s'estructura en tres dominis: un domini central rígid anomenat armadillo de 550 aminoàcids, flanquejat per dues seqüències més flexibles: una d'uns 150 aminoàcids (domini N-Terminal), i l'altra d'uns 100 aminoàcids (extrem C-Terminal) (vegeu figura I8).

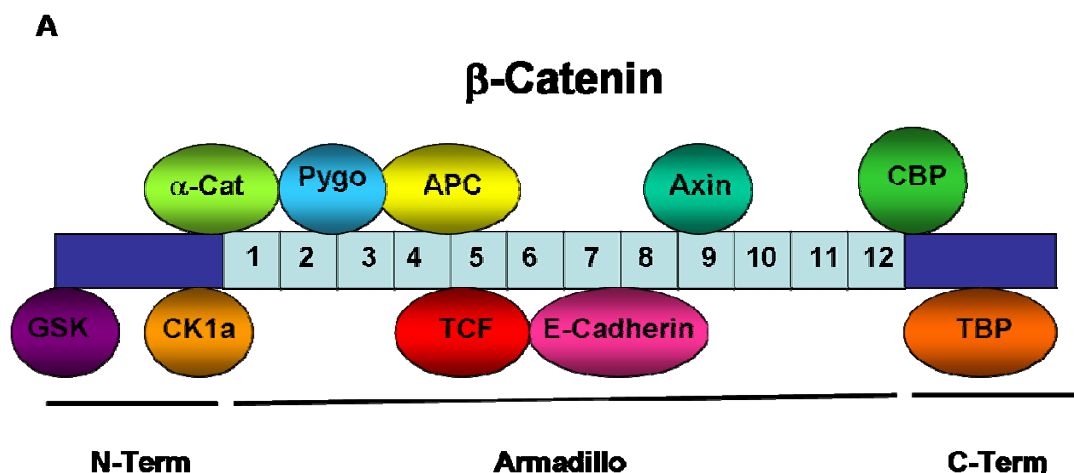


Figura I8. Representació esquemàtica dels dominis de la β -Catenina. En blau clar estan representats les repeticions armadillo i en blau més fosc els extrems terminals.

L'extrem N-Terminal conté la zona d'unió a α -Catenina (Aberle et al., 1994), així com els llocs de fosforilació en serina per la GSK3 β (Yost et al., 1996) que determina l'estabilitat de la proteïna. A més, la fosforilació de la tirosina 142 d'aquest domini de la β -Catenina per les quinases fer/Fyn impossibilita la

interacció d'aquesta amb la α -Catenina (Miravet et al., 2003; Piedra et al., 2003).

L'extrem C-Terminal és molt acídic i moltes proteïnes de la maquinària transcripcional interaccionen en aquest domini: la proteïna d'unió a la caixa TATA (TBP) (Hecht et al., 1999), la pontina (Bauer et al., 1998), Teashirt (Gallet et al., 1999), varies proteïnes de la família SOX (Zorn et al., 1999); (Akiyama et al., 2004), SMAD4 (Nishita et al., 2000) o la CREB (Miyagishi et al., 2000; Takemaru and Moon, 2000). Aquest domini és essencial per a la transcripció mitjançada per factors de transcripció de la família TCF/LEF (Behrens et al., 1996; Rubinfeld et al., 1995) i se l'ha denominat com domini transactivador (van de et al., 1997b). De fet, l'extrem C-Terminal, unit a LEF1, és suficient per a promoure la transactivació de gens (Hsu et al., 1998).

El domini central o domini armadillo, cristal·litzat pel grup del Dr. Weis (Huber et al., 1997) compren de l'aminoàcid 141 fins al 664. Es tracta d'una unitat molt estable i rígida formada per 12 repeticions, imperfectes, de 42 aminoàcids cada una. L'estructura cristal·lina revela que cada repetició consisteix en tres petites hèlix alpha, denominades H1, H2 i H3, excepte per a la repetició 7, a la que li falta una hèlix H1. Aquestes tres hèlixs formen amb les hèlixs adjacents una superhèlix d'hèlixs. Els dominis armadillo són dominis d'interacció proteïna-proteïna i en el cas de la β -Catenina, d'unió a múltiples lligands tals com l'E-Cadherina, TCF/LEF, APC i axina, amb els que forma complexos mutualment excloents. Per tant, β -Catenina utilitza la mateixa superfície per a unir-se a varis cofactors. Els extrems N i C-Terminal també interaccionen amb aquest domini armadillo i modulen la interacció d'aquest amb els seus *partners*. La deleció de

l'extrem N-Terminal bloqueja la unió de l'E-Cadherina a les repeticions armadillo, en canvi, la unió d' α -Catenina a dit extrem facilita la interacció de l'E-Cadherina a la β -Catenina (Castano et al., 2002). D'altra banda, la interacció entre β -Catenina i l'E-Cadherina està també modulada per la fosforilació de la tirosina 654 de la última repetició del domini armadillo de la β -Catenina, aquesta fosforilació disminueix la unió amb l'E-Cadherina i estimula la interacció de la β -Catenina amb la TATA Binding Protein (TBP) (Piedra et al., 2001).

La primera funció que se li va atribuir a la β -Catenina va ser la de proteïna estructural constituent de les unions adherents, actuant de pont entre l'E-Cadherina i l' α -Catenina. Tal com s'ha explicat en l'apartat 2.2, en aquets tipus d'unions, el domini citoplasmàtic de l'E-cadherina interacciona amb les repeticions armadillo. A la mateixa vegada, l'extrem N-Terminal de la β -Catenina interacciona amb la α -Catenina.

A part de formar part de les unions adherents, la β -Catenina té una funció addicional. Quan no està unida a la E-Cadherina i tampoc a l' α -Catenina, pot translocar-se al nucli, i exercir de coactivador transcripcional. Per a aquest funció és necessària la interacció de la β -Catenina amb proteïnes que s'uneixen al DNA com (TCF, SOX...) i amb unir-se a components de la maquinària transcripcional (TBP, CBP...).

El pas de la β -Catenina al nucli està finament regulat per l'estabilitat de la β -Catenina lliure al citoplasma. És en aquest pas on la interacció amb el producte del gen APC juga un paper clau, ja que aquest és necessari per a que la β -

Catenina lliure sigui fosforilada en l'extrem amino-terminal i posteriorment degradada via proteasoma.

Aquesta fosforilació de la β -Catenina es porta a terme en un complex multiproteic format per APC, la proteïna acobladora Axina que recluta la quinasa GSK3 β i la CKI α (Behrens et al., 1998; Hart et al., 1998). Com a resultat de la interacció amb aquest complex, la β -Catenina és fosforilada inicialment en la serina 45 per la CKI α i posteriorment, de manera seqüencial per la GSK3 β en les serines 41, 37 i 33 (Liu et al., 2002). Com a conseqüència d'aquesta fosforilació la β -Catenina és poliubiquitinitzada per la ubiquitin lligasa β -Trcp i posteriorment degradada pel proteasoma (revisat a (Zhou and Hung, 2005a).

La fosforilació i degradació de la β -Catenina està controlada per la via canònica de senyalització de WNT (Figura I9), una ruta que intervé en processos de creixement cel·lular, diferenciació, organogènesi i oncogènesi (Zhou and Hung, 2005b; Gordon and Nusse, 2006).

Els factors WNTs són una família de glicoproteïnes de secreció solubles (s'han descrit 14 tipus en mamífers) d'uns 300-400 aminoàcids.

Els receptors de WNT es diuen Frizzled, aquets tenen 7 hèlix transmembrana, una regió extracel·lular per on interaccionen amb els factors WNT i un extrem citoplasmàtic amb dominis d'interacció PDZ.

Com a resposta a WNT s'hiperfosforila Dishevelled (Dsh), la qual pot interaccionar amb Frizzled a través dels dominis PDZ. A la membrana Dsh també s'uneix a l'Axina i aquesta interacció provoca que GSK3 β es desacobli del complex APC/Axina/ β -Catenina. En aquestes condicions, β -Catenina no pot

ser fosforilada i per tant s'estabilitza un pool citoplasmàtic de β -Catenina (Bienz, 2005).

La translocació de la β -Catenina al nucli es dona per un procés independent de importines/carioferines (Fagotto et al., 1998). S'han descrit dos proteïnes que semblen ser necessàries per a la localització nuclear de la β -Catenina: Legless (lgs; Bcl9-2 en humans) i Pygopus (Pygo) (Kramps et al., 2002).

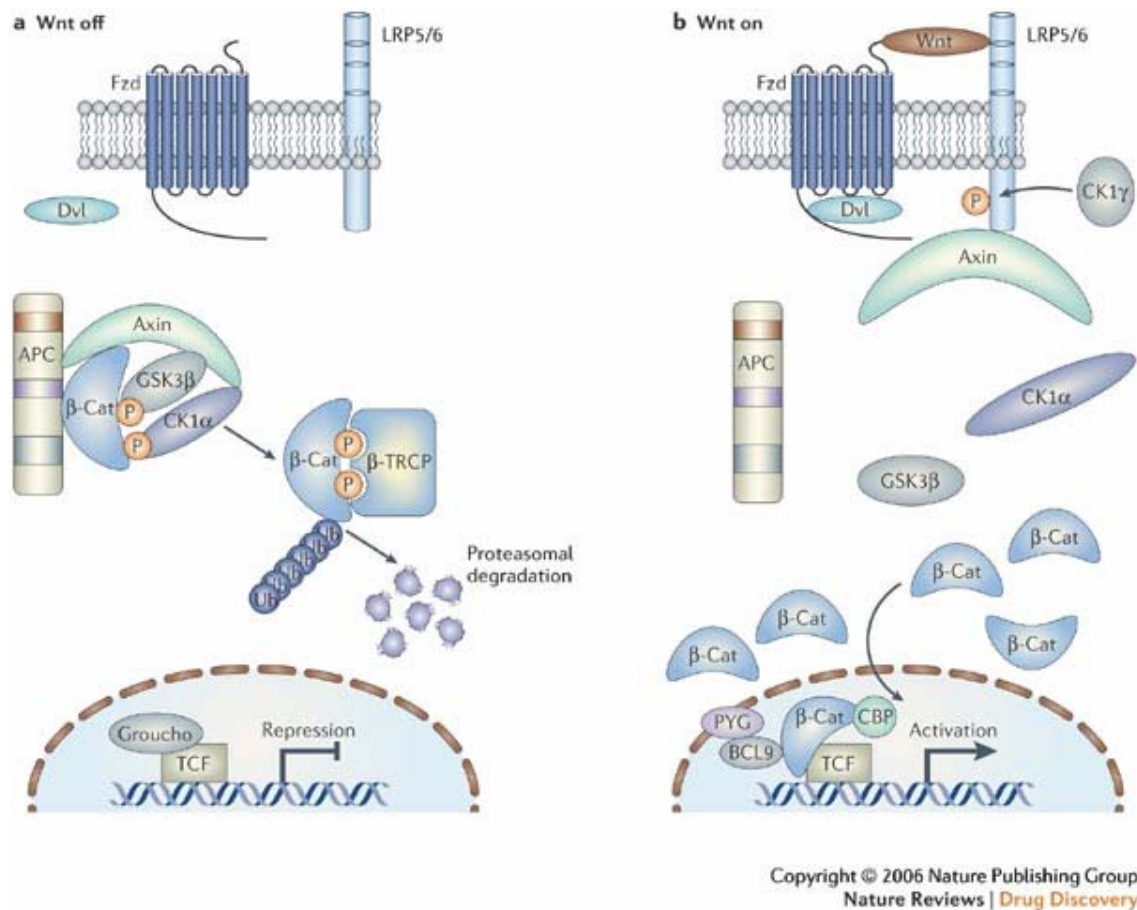


Figura I9. Esquema de la via canònica de senyalització de WNT. A: Representació en absència dels factors WNT. **B:** Representació en presència de WNT(Barker and Clevers, 2006).

4.1. L'activació de la transcripció gènica a partir del complex β -Catenina/TCF.

Una vegada al nucli, la β -Catenina pot interaccionar a través del domini armadillo amb membres de la família TCF, en la ruta clàssica de l'activació gènica mediada per β -Catenina (Behrens et al., 1996; Miller et al., 1999). Aquests factors de transcripció pertanyen a la superfamília de proteïnes amb dominis HMG (de l'anglès High Mobility Group) i van ser identificades inicialment per la seva implicació en la diferenciació de les cèl·lules T (Oosterwegel et al., 1991). Encara que per ells mateixos són capaços d'interaccionar amb el DNA pels dominis HMG, necessiten interaccionar pel seu extrem amino-terminal amb coactivadors com la β -Catenina per activar l'expressió de gens implicats en proliferació i diferenciació (vegeu taula 1) (revisat a (Bienz and Clevers, 2000), una llista completa dels gens activats pel complex β -Catenina/TCF4 es pot trobar a la següent direcció: <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>.

En absència de la via de senyalització canònica de WNT, a nivell nuclear, els factors de transcripció TCF poden interaccionar també amb els corepressors CtBP i Groucho i a través d'un mecanisme en el que intervien la histona deacetilasa (HDAC), reprimeixen la transcripció gènica (Cavallo et al., 1998).

Gen	Funció	Referència
c-Myc	Proliferació	(He et al., 1998)
Ciclina D1	Proliferació	(Tetsu and McCormick, 1999)
TCF1	Diferenciació	(Roose et al., 1999)
PPARdelta	Proliferació/ Diferenciació	(He et al., 1999)
c-jun	Diferenciació/Proliferació	(Mann et al., 1999c)
Fra-1	Diferenciació/Proliferació	(Mann et al., 1999b)
ITF-2	Proliferació/ Diferenciació	(Kolligs et al., 2002)
Gastrina	Proliferació	(Koh, 2002)
VEGF	Proliferació	(Zhang et al., 2001)
SOX9	Proliferació/ Diferenciació	(Blache et al., 2004b)
BMP4	Diferenciació	(Kim et al., 2002a)
Slug	EMT	(Conacci-Sorrell et al., 2003)
Axina-2	Feed back regulador β -Catenina/Snail	(Jho et al., 2002; Yook et al., 2006)
CD44	Adhesió	(Wielenga et al., 1999)
EphB	Repulsió/Adhesió	(Battle et al., 2002)
Claudina-1	Adhesió	(Miwa et al., 2001)
uPAR	Adhesió/Migració/Invasió	(Mann et al., 1999a)
Matrisilina	Invasió/Migració	(Brabletz et al., 1999; Crawford et al., 1999b)

Taula 1. Gens activats directa/indirectament pel complex β -Catenina/TCF. No totes les funcions associades als gens activats han estat demostrades.

Un dels papers essencials de la β -Catenina en el complex amb TCF és reclutar altres coactivadors transcripcionals (com CBP/P300) i complexos remodeladors de la cromatina (com SWI/SNF i Histones de-acetilases) als promotors dels gens sensibles. Un component essencial d'aquest complex transcripcional és la TBP (de l'anglès TATA Binding Protein), que interacciona amb dos dominis diferents de la β -Catenina necessaris per a l'activació (Hecht et al., 1999).

Donada la naturalesa oncogènica de les diferents dianes del complex β -Catenina/TCF no és sorprenent que la β -Catenina sigui considerada un oncogen (Nusse and Varmus, 1982; Rubinfeld et al., 1997), mentre que l'Axina i l'APC, són considerats supressors tumorals (Kinzler et al., 1991).

La majoria dels gens activats pel complex β -Catenina/TCF estan relacionats amb la proliferació i la supervivència que són importants pel manteniment de les cèl·lules progenitores en diferents teixits (veure més endavant), tot i que també hi ha algun gens lligat a la migració, l'adhesió i al feedback regulador.

Del primer grup podem destacar dos particularment rellevants, la Ciclina D1 i c-myc, també s'activen TCF1, PPARdelta, c-jun, Fra-1, ITF-2, Gastrina i VEGF, tots ells estan relacionats amb la proliferació cel·lular i el manteniment del fenotip desdiferenciat. β -Catenina/TCF també activen l'expressió de SOX9, aquest s'expressa en el fons de les criptes de l'epiteli del còlon i s'ha comprovat que reprimeix la transcripció de CDX2 i MUC2, dos gens implicats en la diferenciació intestinal. Per tant, contribuiria al manteniment de l'estat proliferatiu de la cripta (Blache et al., 2004a).

Els gens implicats en la migració i l'adhesió estan relacionats amb processos més tardans de la tumorigènesi. Així, el complex β -Catenina/TCF activa el factor de transcripció Snail2 (també conegut com Slug) que, com he comentat anteriorment, intervé en la repressió de l'E-Cadherina (Conacci-Sorrell et al., 2003). El complex β -Catenina/TCF també activa gens com la proteasa Matrisilina o CD44 que s'han relacionat amb invasió (Crawford et al., 1999a). Que el complex β -Catenina/TCF activi un determinat grup de gens o un altre depèn del context cel·lular en el que es trobi.

4.1.1. La β -Catenina en l'homeòstasi i en tumors de l'epiteli de còlon.

La via canònica de senyalització de WNT i consegüentment la β -Catenina, juguen un paper clau en l'homeòstasi de diferents teixits com l'intestí prim, el fol·licle pilós, el sistema hematopoètic, els ossos i el còlon, entre d'altres (Clevers, 2006). L'epiteli del còlon és un bon exemple (Fig. 19). La β -Catenina solament és detectable al fons de les criptes de l'epiteli (Batlle et al., 2002; Bienz and Clevers, 2000; van de et al., 2002c). Aquests autors sostenen que les cèl·lules del fons de les criptes anomenades *stem cells* o cèl·lules progenitores, es mantenen en un estat proliferatiu gràcies a la secreció de factors WNT per part de les cèl·lules mesenquimals o epitelials de la part inferior de la mucosa sota de la cripta (van de et al., 2002c). Les cèl·lules proliferatives migren de manera contínua cap a la part apical de la cripta (cap a la llum intestinal). Durant aquesta migració l'activitat β -Catenina/TCF és inhibida i es produeix una sortida del cicle cel·lular, paral·lelament a una activació del programa gènic propi de cada tipus cel·lular diferenciat. El final del trajecte es dona amb l'apoptosi i posterior desprendiment de les cèl·lules cap a la llum intestinal (revisat per (Lamprecht and Lipkin, 2002). La part esquerra de la figura 110 mostra la senyalització de la via de WNT mediada per β -Catenina/TCF en un epiteli de colon sa.

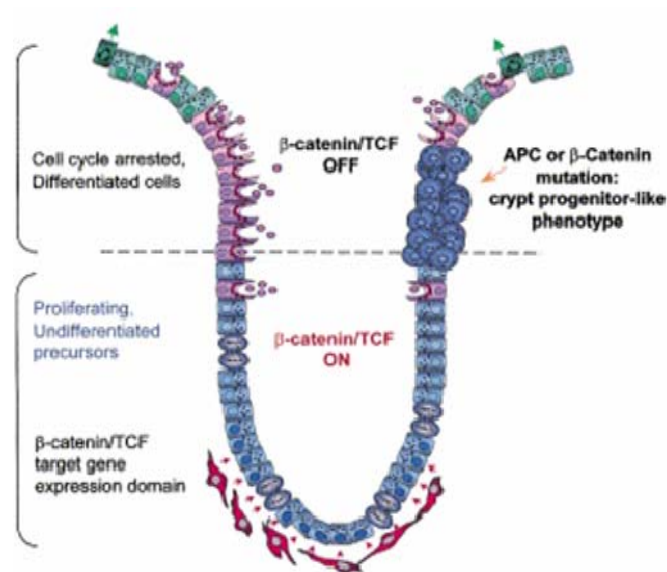


Figura I10. Paper de la via de WNT, mediada per β -Catenina/TCF en els primers passos de la tumorigènesi colorectal. Model proposat per Van de Wetering i col·laboradors .

La part dreta de la figura I10 mostra els primers passos de la tumorigènesi colorectal. Quan les cèl·lules de la cripta incorporen una mutació en l'APC, la β -Catenina, l'Axina o la Conductina, esdevenen independents de les senyals fisiològiques i no poden apagar la senyal mediada per β -Catenina/TCF. En conseqüència, mantenen el fenotip progenitor de les cèl·lules del fons de la cripta a la superfície de l'epiteli i proliferen i s'acumulen en la zona anomenada ACF (de l'anglès Aberrant Cript Foci) (Van de et al., 2002). Les ACF progressen cap a la formació de pòlips, adenomes i finalment, en carcinomes invasius.

En la majoria de càncers colorectals (un 85%), les alteracions moleculars són derivades de la pèrdua de funció de la proteïna APC (revisat a (Bienz and Clevers, 2000). Al 15% restant de tumors que mostren APC wt, s'hi detecten mutacions puntuals en la β -Catenina, que canvien una o més d'una de les quatre serines/treonines de l'extrem N-Terminal que poden ser fosforilades per

GSK3 β (Morin et al., 1997), també es troben mutacions en la Conductina i l'Axina. En concordança, és possible detectar β -Catenina nuclear a la totalitat d'adenocarcinomes (Brabletz et al., 2005b; Brabletz et al., 2005a). Durant aquest procés, els tumors mostren subàrees diferents pel que fa a la proliferació/aturada del cicle cel·lular, a la diferenciació epitelials *versus* EMT. A més de l'heterogeneïtat espacial, també es detecta una heterogeneïtat temporal, durant la progressió d'adenoma a carcinoma hi ha un increment en la β -Catenina que es localitza al nucli de la cèl·lula. A l'inici de la progressió, hi ha una lleugera localització nuclear de la β -Catenina en algunes àrees de l'adenoma i cap al final de la progressió s'assoleix un màxim en les cèl·lules que pateixen EMT en la interfase cèl·lules tumorals-cèl·lules hoste (Brabletz et al., 2005b). En el model proposat per Brabletz et al., durant la progressió distingiríem dos tipus de cèl·lules tumorals, les SCS (de l'anglès Stationary Cancer Stem Cells), que són cèl·lules proliferants sense capacitat motriu que s'acumulen en ACFs i inicien la formació del tumor, i les MCS (de l'anglès Migrating Stem Cells) que a més de proliferar, poden migrar (Brabletz et al., 2005b) i que correspondrien a les cèl·lules del front de migració. L'elevada senyalització per β -Catenina nuclear seria requerida pels dos tipus de cèl·lules, encara que el conjunt de gens activats seria diferent.

El primer grup de gens diana de WNT, els relacionats amb proliferació i supervivència s'expressen en estadis molt primerencs de la progressió, en les SCS, i resten activats durant tota ella. En canvi, els gens diana relacionats amb la EMT, s'activen de forma transitòria, més tardanament, sobretot a les MCS dels fronts d'invasió del tumor, coincidint amb una elevada acumulació nuclear

de β -Catenina. Aquests gens són regulats a la baixa en les cèl·lules diferenciades dels carcinomes i en metàstasis després d'un procés de transició mesènquima-epiteli (Brabletz et al., 2005b; Brabletz et al., 2005a). Per tant, en el cas dels tumors, la β -Catenina permet definir en quines zones s'estan produint processos de transició epiteli-mesènquima que permeten la invasió de les cèl·lules tumorals (Brabletz et al., 2005b; Brabletz et al., 2005a).

El perquè d'aquesta expressió heterogènia dels gens diana del complex β -Catenina/TCF no es coneix, es creu que hi intervenen altres factors, altres vies de senyalització, que estan actives a les cèl·lules MCS i no a les cèl·lules SCS, que aporten la capacitat d'induir 'expressió de gens relacionats amb la EMT

L'alteració de la β -Catenina no solament s'ha relacionat amb processos de tumorigènesi al còlon (Bienz and Clevers, 2000), sinó també, en l'endometri (Fukuchi et al., 1998), a les glàndules mamàries (Michaelson and Leder, 2001) i a la pròstata (Chesire et al., 2002), entre d'altres.

L'acció pleiotròpica de la β -Catenina ha fet que la interferència selectiva de la seva activitat transcripcional sigui considerada com una diana prometedora per a l'acció de compostos amb activitat antitumoral (Kim et al., 2002b; Lepourcelet et al., 2004; Barker and Clevers, 2006).

4.2. L'activació de la transcripció gènica a partir del complex β -Catenina/SOX.

Els factors de transcripció de la família SOX, com els factors de transcripció TCF, també pertanyen a la superfamília de factors de transcripció que tenen dominis HMG (de l'anglès High Mobility Group). Es tracta d'una família de proteïnes que s'expressen àmpliament tan durant el desenvolupament embrionari, com en el l'individu adult i s'han associat a un gran nombre de funcions. Així, existeixen evidències de que estan implicades en l'establiment de la pluripotència cel·lular (Avilion et al., 2003; Kim et al., 2003), en la mort cel·lular, la supervivència i la proliferació (Akiyama et al., 2002; Honore et al., 2003); en la determinació de la forma cel·lular (Akiyama et al., 2002; Stolt et al., 2003) i en la diferenciació terminal (Peirano et al., 2000; Stolt et al., 2002). Molts processos del desenvolupament de l'embrió depenen de les proteïnes SOX, com la formació del blastocist, la gastrulació, la formació del sistema nerviós i l'hematopoètic, l'esquelet, les gònades, la melsa, el cor, els vasos sanguinis i els melanòcits (revisat per (Bowles et al., 2000; Wegner, 1999).

Els 20 membres d'aquesta família es classifiquen en 8 grups (A-H) segons l'homologia de les seves seqüències (Schepers et al., 2002).

Tots els membres interaccionen amb el DNA mitjançant el domini HMG, aquest està altament conservat en tots els membres de la família, i tots ells reconeixen un lloc d'unió similar. Els factors SOX interaccionen amb altres proteïnes, ja siguin factors de transcripció, proteïnes adaptadores, proteïnes necessàries per a la translocació nuclear i, fins i tot, poden dimeritzar amb altres membres de la

mateixa família (Wilson and Koopman, 2002). La interacció amb els *partners* es pot donar tan pel domini HMG com fora d'ell. Aquestes proteïnes poden actuar com a activadors i com a repressors transcripcionals, segons el *partners* que s'expressi en cada tipus cel·lular particular.

La β -Catenina pot interaccionar amb la subfamília F que conté els factors SOX1, 7, 17 i 18. La interacció es dona per un domini transactivador situat al domini C Terminal (Zorn et al., 1999) i per les repeticions armadillo de la β -Catenina. S'ha constatat que la β -Catenina pot unir-se a SOX17 i activar l'expressió de gens de l'endoderma independentment de TCF4 (Sinner et al., 2004). També pot interaccionar amb SOX7 i interferir en l'activitat β -Catenina/TCF4 (Takash et al., 2001).

A més dels membres de la subfamília F, la β -Catenina pot unir-se amb SOX9 que pertany a la subfamília E i també té un domini transactivador a C-Terminal, aquesta interacció amb SOX9 competeix amb la interacció amb TCF4 i s'ha vist que és indispensable per a la diferenciació dels condròcits (Akiyama et al., 2004). A més, SOX9 juga un paper central en la formació de la cresta neural i la subseqüent EMT. Ratolins que tenen aquest factor de transcripció mutat presenten una disminució del nombre de cèl·lules de la cresta neural (Cheung et al., 2005). SOX9 activa directament el promotor de Snail2, aquesta activació és possible gràcies a una interacció directa amb Snail2, amb el qual coopera sinèrgicament per a que es produeixi aquesta activació (Sakai et al., 2006).

A més de SOX i TCF, s'han descrit altres proteïnes que poden interaccionar amb la β -Catenina i activar la transcripció unint-se al promotor de gens diana.

Entre d'altres, trobem els factors FOXO que, sota estrès oxidatiu, interaccionen amb β -Catenina, aquesta interacció és necessària per a que s'activi sod-3, gen requerit per a la resistència al dany oxidatiu (Essers et al., 2005). La β -Catenina és essencial per a la regulació gènica induïda per FSH/cAMP a l'ovari, ja que també pot unir-se a SF-1 (Steroidogenic factor-1) i el complex format per les dues proteïnes interacciona amb el promotor de CYP19A1 i l'activa (Parakh et al., 2006). Un altre *partner* de la β -Catenina és el receptor d'andrògens que interacciona amb el domini armadillo de la β -Catenina i augmenta, així, la seva activitat transcripcional (Yang et al., 2002).

Recentment, també s'ha descrit que HIF-1 (de l'anglès Hypoxia Inducible Factor) competeix amb TCF4 per a unir-se a β -Catenina. Aquest complex β -Catenina/HIF-1 interacciona amb el DNA dels promotors dels gens diana de HIF i media la seva activació (Kaidi et al., 2007).

5. L'activació transcripcional associada a NF κ B.

El factor de transcripció NF κ B (de l'anglès Nuclear Factor κ B) juga un paper rellevant en el control de l'inici i de la progressió del càncer. NF κ B i les seves proteïnes reguladores com la IKK (I κ B quinasa) són activats pels productes de varis oncògens.

NF κ B és un factor de transcripció heterodimèric format per proteïnes que comparteixen un domini, anomenat Rel, de dimerització i d'unió al DNA situat a l'extrem N-Terminal.

En mamífers, la superfamília NF κ B està formada per dos subfamílies NF κ B i la Rel, la subfamília Rel inclou: RelA (p65), RelB i c-Rel; i la subfamília NF κ B: p50/p105 i p52/p100 (Gilmore, 2006b). Els membres de la subfamília NF κ B generalment actuen com a repressors transcripcionals, a no ser que formin heterodímers amb membres de la subfamília Rel.

Diversos elements activen els factors NF κ B: 1) l'exposició a citoquines com TNF α (Israel et al., 1989; Osborn et al., 1989), TNF β (Messer et al., 1990) i IL-1 (Kida et al., 2005; Osborn et al., 1989); 2) factors de creixement com EGF (Biswas et al., 2000), HGF (Kaibori et al., 2004; Shen et al., 1997; Yao et al., 2004), IGF-1 (Liu et al., 2001), TGF α (Lee et al., 1995), TGF β -2 (Lu et al., 2004); 3) exposició a diversos tipus d'estrès com radiació ultraviolada (Stein et al., 1989), ferides (Haas et al., 1998), hipòxia (Greenberg et al., 2006) i estrès oxidatiu (Schreck et al., 1991); entre d'altres. Es pot trobar una informació més detallada sobre els inductors de la via de NF κ B a la pàgina: <http://www.nf-kb.org>.

L'activitat dels factors NF κ B està finament regulada per la interacció amb les proteïnes inhibidores I κ B, existeixen varies I κ Bs (I κ B α , I κ B β , I κ B γ ...) amb diferents afinitats per a cada dímer NF κ B. Les I κ B estan alhora regulades per fosforilació i proteòlisi. A la majoria de cèl·lules, NF κ B es troba inactiu, unit a I κ B al citoplasma. S'han descrit dues vies d'activació de NF κ B: la via canònica

(Fig. I11) i la no canònica. El pas previ inicial en ambdós vies és l'activació de la I κ B quinasa (IKK), constituïda per dos subunitats catalítiques, la IKK α i la IKK β i la subunitat NEMO (de l'anglès NF κ B Essential Modulator). L'activació de NF κ B és el resultat de la fosforilació de l'inhibidor I κ B i conseqüent alliberació de NF κ B que entra al nucli i promou l'activació dels seus gens diana (Gilmore, 2006c).

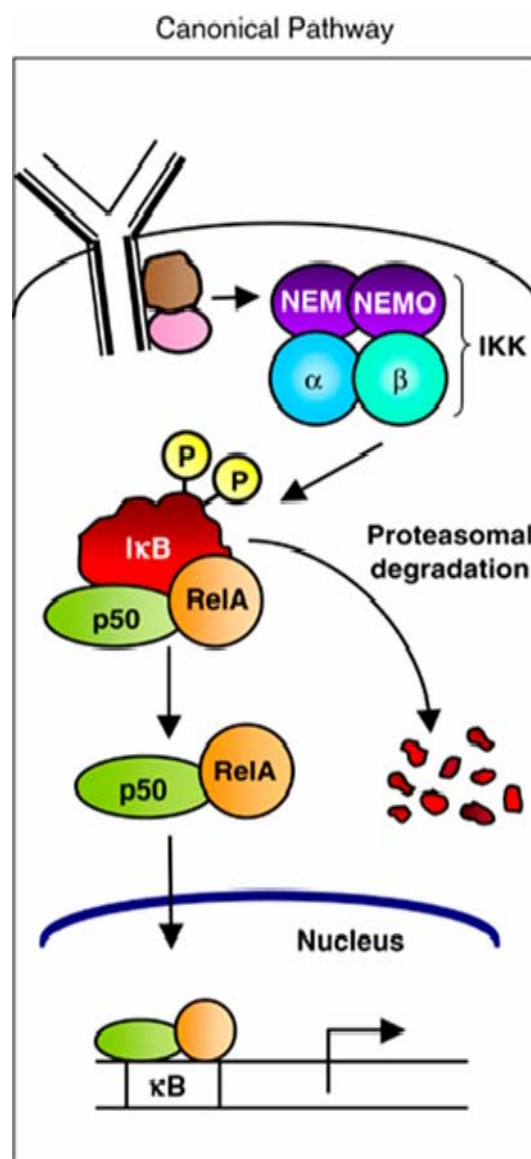


Figura I11: Esquema de la via canònica de NF κ B. A partir de (Gilmore, 2006a).

NF κ B està implicat en la modulació de diverses funcions cel·lulars bàsiques com la diferenciació, el creixement cel·lular, la resposta inflamatòria i la resposta immune. Inicialment el NF κ B es va demostrar que era requerit per a la resposta inflamatòria, activant a citoquines com IL-1, IL-6, TNF α i IFN- γ (Ghosh et al., 1998). Posteriorment, s'ha relacionat també NF κ B, amb supervivència, invasió, angiogènesi i metàstasi (revisat per (Basseres and Baldwin, 2006) (Fig. I12).

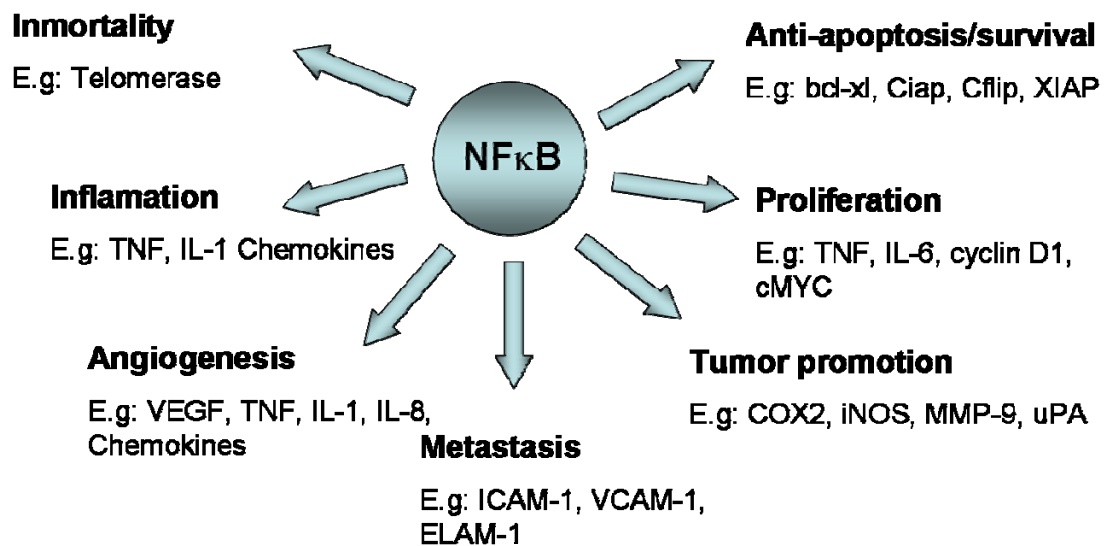


Figura I12: Esquema de les dianes de NF κ B. A partir de (Aggarwal, 2004).

La invasió tumoral està modulada per diversos gens regulats per NF κ B, incloent metal·loproteases de la matriu extracel·lular com la MMP-9 (Bond et al., 1998; Farina et al., 1999), i incloent també, l'activador de plasminògen uPA (Novak et al., 1991). L'angiogènesi també pot ser regulada per NF κ B, aquest activa l'expressió factors de creixement com TNF i VEGF (Loch et al., 2001; Yu et al., 2004). El factor NF κ B promou la supervivència de les cèl·lules atorgant

un efecte antiapoptòtic, mitjançant l'activació de gens com c-Myc, Ciclina D1 i diverses interleuquines (revisat a (Aggarwal, 2004). NF κ B intervé també en la metastasi, activant les molècules d'adhesió VCAM-1 i ELAM-1 (Van de et al., 1994). La sintasa induïda per òxid nítric (iNOS), que s'ha relacionat amb l'habilitat de les cèl·lules per a fer metastasi, està modulada, també per NF κ B. Recentment, s'ha vist que NF κ B necessari per a l'inici i el manteniment de la transició epitelial-mesènquima (Huber et al., 2004b) i s'ha proposat que els repressors de l'E-Cadherina Snail i Twist poden ser gens diana de NF κ B (Bachelder et al., 2005; Kang and Massague, 2004). A més, NF κ B d'activar Snail i Twist, pot reprimir l'expressió d'E-Cadherina, de Desmoplaquina i de Citoqueratina 5/6, així com induir l'expressió de Vimentina, mitjançant l'activació de ZEB-1 i ZEB-2 en cèl·lules tumorals de mama (Chua et al., 2007).

NF κ B presenta semblances amb la β -Catenina pel que fa a la seva regulació. Ambdues proteïnes s'han relacionat amb l'inici i en la progressió tumoral i la seva activitat és regulada per l'E-Cadherina. Així, en el cas de NF κ B també s'ha descrit que la pèrdua de l'expressió d'E-Cadherina induïx un augment de l'activitat de NF κ B nuclear en cèl·lules de melanoma humà, i que quan es re-expressa E-Cadherina en aquestes mateixes cèl·lules, es dona una regulació a la baixa de l'activitat NF κ B. Així, l'expressió d'un RNA antisentit de Snail provoca un augment d'E-Cadherina i una disminució de la quantitat d'NF κ B unit al DNA i de la seva activitat transcripcional (Kuphal et al., 2004; Kuphal and Bosserhoff, 2006). El mecanisme pel qual l'E-Cadherina regula l'activitat NF κ B no està clar. Si bé diversos autors proposen la participació de la β -Catenina

(Kuphal et al., 2004; Kuphal and Bosserhoff, 2006), altres autors proposen que la interacció indirecta entre β -Catenina i NF κ B resulta en una inhibició de l'activació transcripcional mediada per NF κ B.

A més de la regulació per E-Cadherina, β -Catenina i NF κ B comparteixen que ambdues molècules són regulades per proteòlisi controlada per factors externs que modulen l'entrada de les dues proteïnes en el nucli. Com hem vist, la fosforilació de la β -Catenina pel complex APC-Axina-GSK3 β determina la seva degradació via proteasoma. L'activitat del factor NF κ B també està regulada per fosforilació i degradació via proteasoma, el NF κ B és segrestat al citoplasma per I κ B, contràriament al que passa amb la β -Catenina, la fosforilació d' I κ B per les IKK promou la degradació via proteasoma d' I κ B i consegüentment l'activació de NF κ B.

S'ha descrit el *cross-talk* entre les vies que modulen la transcripció de gens per β -Catenina i NF κ B a diferents nivells. Com he comentat anteriorment, s'ha descrit que la β -Catenina interacciona amb les subunitats p65 i p50 de NF κ B i com a resultat d'aquesta interacció es dona la inhibició de l'activitat NF κ B (Deng et al., 2002b). Altres estudis han constatat que l'expressió de GSK3 β fa disminuir els nivells de NF κ B (Deng et al., 2004; Steinbrecher et al., 2005), indicant que les dues vies podrien estar regulades per efectors comuns. Finalment, Lamberti i col·laboradors demostren que la IKK β (I κ B quinasa β) és capaç d'activar tan a NF κ B, com a la β -Catenina (Lamberti et al., 2001).

Els resultats que presentem en aquest treball apunten a que l'activació simultàniament de les dues vies podria ser rellevant per l'activació d'un grup específic de gens.

Objectius

Snail com a activador transcripcional.

Tal com s'ha comentat en apartats anteriors, l'expressió de Snail provoca una transició epiteli-mesènquima, tant en condicions fisiològiques, com en models de sobreexpressió ectòpica. El mecanisme molecular inclou: la repressió de l'expressió d'E-Cadherina induïda per Snail, fet que és imprescindible per a que sigui possible la EMT. Tot i això, la repressió d'E-Cadherina, per si sola, no és suficient per a que les cèl·lules passin de tenir un fenotip epitelial a un més mesenquimal (Thiery, 2002). Estudis anteriors del nostre grup i d'altres (Guaita et al., 2002; Cano et al., 2000), van demostrar que juntament amb la repressió de l'E-Cadherina i altres marcadors epitelials com la Citoqueratina 18 i MUC-1; Snail era capaç d'activar l'expressió de gens marcadors mesenquimals com ara la Fibronectina, la Vimentina, LEF1 i ZEB1. Altres autors han constatat la funció activadora de Snail sobre Rho GTPases i diverses metal·loproteases (revisat a (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005a).

Així com el mecanisme utilitzat per Snail per reprimir l'expressió dels seus gens diana, a partir de la interacció amb les caixes E, ha estat àmpliament estudiada; no es tenen coneixement sobre com Snail és capaç de promoure l'activació de l'expressió de gens mesenquimals.

Per tant, a l'inici de la realització d'aquest treball ens vam proposar entendre quin era el mecanisme pel qual Snail activava l'expressió de gens durant la EMT.

Els objectius que ens vam proposar van ser:

- Caracteritzar amb detall el mecanisme d'activació de Snail sobre diferents marcadors mesenquimals, prenent com a referència Fibronectina i LEF1.
- Caracteritzar el possible efecte inhibidor de l'E-Cadherina sobre l'activació mitjançada per Snail.
- Implicació de la β -Catenina i NF κ B en l'activació promoguda per Snail.

Materials i Mètodes

1.Cultius cel·lulars

Totes les línies cel·lulars utilitzades van ser mantingudes en medi modificat de Dulbecco (DMEM, Life technologies), suplementat amb penicil·lina/estreptomicina, glutamina i 10% de sèrum fetal boví. Es van mantenir a 37°C en una atmosfera humida al 5% de CO₂. Les línies epitelials són immortalitzades o provenen de tumors primaris d'humans, ratolí i rata, de diverses localitzacions: MDCK (epiteli tubular renal de gos), HT29- M6 (adenocarcinoma de còlon humà, seleccionada partir de la línia parental HT29 amb metrotexat a una concentració de 10⁻⁶ M, amb un fenotip mucosecretor), SW480 (adenocarcinoma de còlon humà), RWP1 (carcinoma ductal de pàncrees humà) i LS174T (cèl·lules epitelials de còlon humà).

La generació de clons estables per a l'expressió de mmSnail-HA a partir de les línies parentals **HT-29 M6** i **MDCK**, es van obtenir al nostre laboratori i ja es van descriure prèviament (Batlle et al., 2000). Les línies estables HT29-M6 SNA1 i SNA2 corresponen a dos clons obtinguts a partir de la transfecció estable d'un vector d'expressió regulat per tetraciclina (*tet-off*) contenint el cDNA de Snail de ratolí etiquetat a l'extrem 3' amb la seqüència de l'hemaglutinina (HA). Aquest promotor induïble deixa de ser funcional a l'afegir Doxiciclina (2 µg/ml) al medi de cultiu. Les línies estables MDCK SNA1 i MDCK SNA3 corresponen a dos

clons obtinguts a partir de la transfecció estable amb el constructe pIRES-neo m-Snail-HA.

L'expressió estable d'mSnail, en els clons HT29-M6 SNA1 i SNA2, es conserva gràcies a la presència dels antibiòtics G418 (neomicina; GIBCO) i Higromicina (Invitrogen) a una concentració final de 500 µg/ml i 200 µg/ml en el medi, respectivament. En canvi, per a mantenir l'expressió estable de Snail en els clons MDCK SNA1 i SNA3, els medis de cultiu eren complementats amb només l'addició de G418 a una concentració final de 500 µg/ml.

La línia **SW480-ADH** correspon a una subpoblació de la línia SW480 amb un fenotip adherent, caracteritzada pel nostre laboratori juntament amb el laboratori del Dr. Muñoz (Instituto de Investigaciones Biomédiques, CSIC, Madrid). Els clons que sobreexpressaven E-Cadherina i Snail van ser obtinguts al laboratori de Madrid. Per obtenir-los es van transfectar cèl·lules SW480-ADH amb pcDNA3 i pBATEM (cedit pel Dr. M. Takeichi, de la universitat de Kioto, Japó) (Nose et al., 1988), utilitzant Lipofectamine Plus Kit de GIBCO amb. Els clons estables els van aconseguir seleccionant amb medi que contenia 2 mg/ml de G418 i van ser analitzats per Western Blot i immunofluorescència. Posteriorment, els clons que expressaven més E-Cadherina van ser transfectats mitjançant retrovirus amb el cDNA de Snail de ratolí, etiquetat a l'extrem 3' amb la seqüència que codifica per 12 aminoàcids de l'hemaglutinina (HA) del virus influenza, clonat en el vector retroviral pRV-IRES/gfp a les cèl·lules E-cadherina/Snail, i el vector buit pRV-IRES/gfp a les E-cadherina.

La línia **LS174T** i els clons LS174T *tet/on* pel siRNA de β -Catenina i pel mRNA de Δ TCF4, van ser cedits pel Dr. H. Clevers del Center for Biomedical Genetics, Utrecht, The Netherlands. Aquests clons induïbles per al siRNA de la β -Catenina, s'havien obtingut tal com es descriu a (van de et al., 2003b), per doble transfecció amb el repressor Tet (PCDNA6TR, Invitrogen) i pTER- β -Catenina, i posterior selecció amb Zeocina. En els nostres experiments la línia parental LS174T que expressava el repressor Tet va ser utilitzada com a control. Els clons LS174T que expressaven establement el mRNA del dominant negatiu de TCF4 estan descrits a (van de et al., 2002c). Van utilitzar -REx system (Invitrogen), seguint les indicacions del fabricant.

A partir d'aquestes línies es van desenvolupar, al nostre laboratori, nous clons transfectant amb pcDNA3-Snail-IRES-neo o pSnail-IRES-hrGFP-2a, utilitzant Lipofectamine Plus Kit de GIBCO. Les cèl·lules transfectades es van seleccionar en medi que contenia 300 μ g/ml de G418 (GIBCO) o per FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) respectivament. Els clons individuals es van aïllar i es van fer créixer en condicions estàndard.

La línia **RWP1** que expressava establement Snail va ser generada per en Niko Herranz del nostre laboratori. Aquesta línia la va obtenir transfectant pcDNA3 buit o que incloïa el cDNA de mmSnail, utilitzant Lipofectamine Plus Kit de GIBCO. Les cèl·lules transfectades es van seleccionar en medi que contenia 300 μ g/ml de G418 (GIBCO).

Les cèl·lules **SW480** expressaven establement Snail i SOX7 o SOX9 es van obtenir transfectant pIRES Snail Higromicina i pcDNA3 buit o que incloïa el cDNA de SOX7 o de SOX9, utilitzant Lipofectamine Plus Kit de GIBCO. Les cèl·lules positives es van seleccionar durant tres setmanes amb 250 µg/ml de Geneticina i d'Higromicina.

Es van utilitzar altres línies cel·lulars durant el desenvolupament d'aquest estudi, encara que les dades no es mostren en aquest tesi doctoral, com la línia LoVo, HTC116, CaCO2, entre d'altres.

2.Constructes

2.1.Snail i els seus mutants.

El **mmSnail** va ser clonat pel Dr. Batlle del nostre laboratori, tal i com és descrit en Batlle et al., 2000, per RT-PCR (kit One-Step RT-PCR System, Invitrogen, amb Platinum Taq polimerasa) a partir d'1 µg de RNA total de cèl·lules NIH-3T3 mitjançant oligonucleòtids específics per a les zones 5' i 3' a partir de la seqüència exposada al GenBank (Snail:gi: 675558). L'ATG d'inici es conservava, mentre el codó de Stop s'eliminava, per tal de mantenir la fusió amb l'etiqueta HA. Les dianes BglII i EcoRV es van afegir als extrems 5' i 3',

respectivament. L'oligonucleòtid 5' inclou una seqüència Kozak (5'CCACC3') que precedeix el codó ATG d'inici, per a millorar-ne la traducció.

Posteriorment del mmSnail, es van fer subclonacions per obtenir els plàsmids **pSnail IRES GFP**, **pSnail-IRES-Higro**. Per aconseguir el pSnail.hr-Snail-IRES-GFP-2a, es va digerir el plàsmid pIRES.hr GFP-2a amb SphI, es va realitzar un *Fill-in* i es va digerir amb BamHI, el plàsmid pcDNA3 Snail es va digerir amb BamHI i EcoRV i es va lligar el constructe. El pIRES-SNA-HA-Higromicina va ser realitzat per la Dra. Dave del nostre laboratori, el mmSnail va ser clonat amb EcoRV i NotI.

Tots els mutants (N i C Terminal, Snail D28, Snail –Ser, Snail 1-82, Snail-LA, Snail-SA i Snail-SD) van ser realitzats pel Dr. Domínguez i la Dra. Montserrat, estan descrits a (Dominguez et al., 2003).

La meitat **N-Terminal** (SNA(1-151)) descrita a (Dominguez et al., 2003) es va obtenir eliminant la meitat carboxiterminal i aprofitant la diana BgIII situada al nucleòtid 455 de mmSnail i la diana BamHI del MCS de peGFP-C1 (clontech), i relligada posteriorment.

La meitat N-terminal fou reclonada a pGEX-6P1 (Promega) mitjançant les dianes BamHI que hi havia allí.

La meitat **C-Terminal** (SNA(152-264)) per expressió en cèl·lules eucariotes fou clonada per amplificació del cDNA sencer amb oligonucleòtids específics on el

sentit anellava en els 18 parells de bases a partir de la diana BgIII (nucleòtid 455) i incloïa la seqüència kozak i el codó d'inici ATG.

El Snail sense l'últim dit de zinc (**Snail Δ 28** (1-236)) es va amplificar per PCR d'alta fidelitat i oligonucleòtids específics. L'oligonucleòtid antisentit 3' anellava a la seqüència de mmSnail evitant l'últim dit de zinc (aminoàcids 237-264), i a l'extrem 3' s'hi va afegir una diana EcoRV per poder posar l'etiqueta HA en pauta. La seqüència era: 5'CCGGATATCCGTATCTCTTCACATC3'.

El mutant **Snail –Ser** (deleció del domini ric en Serines) es va fer mitjançant la lligació de les meitats N (1-90) i C-terminals (121-264) fora de la regió rica en Serines, afegint una diana SacI a l'oligonucleòtid antisentit de l'extrem N-terminal (5'CAATGAGCTCAGCTCTACGGCCTTGGGGCTCTCCCGCAG3') i al sentit de l'extrem C-terminal (5'CCGTTAGAGCTCCGCCGAGGCCTTCATC3'). La fusió d'ambdues dianes SacI afegeix dues Serines a la molècula, que es va considerar poc significatives, donada la deleció. Per tant, la nova seqüència aminoacídica en aquesta regió va ser 5'KAVELSSAEAFI3', quan l'esperada eliminant selectivament el domini sense afegir dianes hauria estat 5'KAVELTLEAEAFI3'.

El fragment **Snail 1-82**: va ser obtingut per PCR amb primers específics ja descrits anteriorment per ambdós extrems.

El mutant puntual **SNA-LA** (mutació al senyal d'export), es va obtenir per amplificació per PCR d'alta fidelitat sobre pcDNA3-mmSnail-HA mitjançant dos oligonucleòtids complementaris en seqüència. El LA sentit era: 5'GGCCAACTTCCCAAGCAGGCGGCCAGGGCCTCGGTGGCCAAGGACCCC CAG3'. El LA antisentit era: 5'CTGGGGGTCTTGGCCACCGAGGCCCTGGCCGCCTGCTTGGGAAGTTG GCC3'. Es va seguir el protocol del sistema Quick-Change (Stratagene) amb petites modificacions.

En els mutants Serines-a-Alanines (**SNA-SA**) i Serines-a-Aspartats (**SNA-SD**), per tal de mutar la totalitat de serines (però no la Treonina 119) presents en el domini ric en serines, es va fer la síntesi dirigida de dos nous dominis (Sigma-Genosys). Els oligonucleòtids, complementaris, engloben els nucleòtids 268 a 350 de la seqüència de Snail a ratolí. Per mantenir la pauta de lectura en els nous constructes, es varen afegir nucleòtids addicionals a la seqüència sintètica (C a 5', i CT a 3'). Els codons codificants per serines havien estat canviats per codons modificats que codifiquessin per alanines o aspartats, selectivament, i es va mantenir la resta de la seqüència original i només en un cas es va modificar un dels codons per un homòleg per tal d'evitar la creació d'un codó de stop no desitjat. Les dues cadenes complementàries sintetitzades per a cada mutant es van anellar mitjançant desnaturalització a 94° per 5' i renaturalització progressiva a temperatura ambient en un tampó amb Tris 10 mM, pH 7.4, i EDTA 1 mM. Els extrems 5' dels oligonucleòtids estaven fosforilats. Els dominis sintètics obtinguts eren de marges roms. Es van insertar

en el constructe Snail D90-120, després d'obrir la diana Sacl central a la deleció amb l'enzim EcoICRI, isosquizòmer que talla pel mateix punt però deixa extrems roms. Això permetia afegir un nou domini ric en serines, ara mutat, sense alterar massa la proteïna, afegint únicament una nova leucina: 5'VELS-nou domini sintètic-LSAEA3'.

El mutant **$\Delta 7$** va ser realitzat pel Dr. Batlle (Batlle et al., 2000), a aquest mutant li manquen els primers 7 aminoàcids de l'extrem N-Terminal. Es va obtenir afegint una nova seqüència consens Kozak (5'-CCACC) seguida d'un codó d'inici.

El mutant **P2A** també va ser realitzat pel Dr. Batlle (Batlle et al., 2000), aquest mutant té mutat el segon aminoàcid de l'extrem N-Terminal, la prolina que estava en posició 2 es va canviar a una alanina. Es va utilitzar el kit Quickchange Site Directed Mutagenesis (Stratagene).

2.2. Altres constructes.

VP16-TCF4:

La preparació del plàsmid que conté la quimera VP16-cDNA de TCF4 es va generar en el nostre laboratori per la Dr. Puig. Es va obtenir el cDNA codificant de VP16 a partir d'un constructe anterior, VP16-Snail prèviament referenciat a E. Batlle, 2000. Aquesta regió es va fusionar en pauta amb el domini d'unió a

DNA del TCF4. Aquesta fusió fou subclonada de nou al vector pcDNA3 (Invitrogen).

ΔTCF4:

El DNA codificant per el domini N-Terminal truncat del gen TCF4 humà, va ser obtingut pel Dr. Batlle i referenciat a (Baulida et al., 1999), es va amplificar per PCR a partir de dos EST (Image clones ye89d06 i y188b10) solapades i es va clonar en pcDNA3 (Invitrogen).

Els oligos utilitzats van ser: 5'-GGCGGATCCACCTGGAAAACCTCCTC-3' i 5'-ATCCTTCTAAAGACTTGGTGACGAG-3' per y188b10. Els dos productes de PCR es van obtenir anellant a partir de la seqüència solapada i amplificant-la fins a obtenir el fragment de DNA que contenia la diana BamHI i la seqüència Kozak a l'extrem 5' i una diana EcoRV a l'extrem 3'.

APC:

El vector que contenia el cDNA d'APC humana va ser cedit per Dr. K. Kinzler (John Hopkins University, Baltimore, MD, USA).

VP16-Rel:

La fusió VP16-Rel es va generar en el nostre laboratori en mans del Dr. Domínguez i es troba referenciat a (Barbera et al., 2004). Es va obtenir el DNA codificant de VP16 a partir d'un constructe anterior, VP16-Snail prèviament referenciat a Batlle et al, 2000. Aquesta regió es va fusionar en pauta amb el domini d'homologia Rel del factor de transcripció NFκB, subunitat p65 (a partir

del constructe p65-pcDNA3 que va ser cedit pel Dr. M. Fresno de la UAM, Madrid). Aquesta fusió va ser subclonada de nou al vector pcDNA3.

cDNA de SOX7 humà:

Es va clonar el cDNA de SOX7 en pcDNA3-his-Myc, a partir del constructe cedit pel Dr. Akihido Okuda del Research Center for Genomic Medicine (Saitama, Japó).

cDNA de SOX9 humà:

El plàsmid pcDNA-SOX9-5'UT-FLAG va ser cedit pel Dr. Bort de la Universitat Pompeu Fabra de Barcelona, descrit anteriorment a Lefevre et al. 1997. Conté el cDNA humà de SOX9 amplificat per PCR entre el codó següent al quart ATG (codó 27) i el codó stop.

2.4. Promotors.

Promotor de Fibronectina:

El promotor de Fibronectina es va descriure anteriorment a Dominguez et al. 2003. Es va obtenir per PCR a partir de DNA genòmic d'HT29-M6 amb la polimerasa d'alta fidelitat Pfx (Invitrogen) i els nucleòtids: 5'-ACACAAGTCCAGCCACTCCC-3' (-637/-616) i 5'-TTGCTGAGCCTGCCTGCCTCTTG-3' (+105/+83); contenint els llocs de restricció MluI i XhoI per PGL3 basic (Promega). Posteriorment també es va subclonar en PXP2. Es va comprovar per seqüenciació.

PLEF1 wt i mutat:

El promotor humà de LEF1 també es va descriure a Dominguez et al. 2003. Es va obtenir de la mateixa manera que l'anterior amb els nucleòtids: 5'-CTTGTCTCCAAAGAGCG-3' (-1874/-1858), contenint el lloc de restricció KpnI a 5', i 5'-TGGCGCAGAGTTCCGG-3'(+43/+58). El producte purificat per PCR es va clonar en les dianes KpnI i SmaI de PGL3 i es va comprovar per seqüenciació.

La mutació de la caixa E-Box d'aquest promotor es va mutar de 5'-CACCTG-3' a 5'-AACCTA-3, seguint el protocol per mutagènesi dirigida Quick-Change d'Stratagene, amb el primer sentit: 5'-GCAGTGGGAGGCGCAGCCGCTAACCTACGGGGCAGGGCGCGGAG-3'.

TOP i FOP:

Ambdós reporters van ser cedits pel Dr. H. Clevers del Center for Biomedical Genetics, Utrecht, The Netherlands. TOP és un reporter sintètic que inclou el promotor mínim de c-Fos i quatre llocs d'unió a TCF4. FOP, en canvi conté el mateix promotor mínim i els quatre llocs d'unió a TCF4 mutats.

NF3:

El constructe reporter NF3CONA va ser cedit pel Dr. Manuel Fresno del Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM) de Madrid. Aquest plàsmid incorpora al vector pGL3 bàsic un multímer de tres caixes consens de resposta a factors de la família NF κ B.

P300 Snail:

El fragment del promotor de Snail humà -869/ +59 es va aïllar en el nostre laboratori pel Dr. E. Batlle. El promotor de Snail es va clonar en el vector pGL3 basic (Promega) mitjançant les dianes KpnI i HindI II. A partir d'aquí, el Dr. D. Domínguez, va realitzar una sèrie de delecions successives fins al fragment -194/ + 59 utilitzant oligonucleòtids específics des del punt de delecio, i als quals se'ls hi va afegir una diana KpnI + 4 pb de seqüència flanquejant a l'extrem 5' per a permetre la digestió de la diana amb l'enzim de restricció pertinent.

3. Preparació de proteïnes de fusió amb GST.

Totes les proteïnes de fusió de Snail es van obtenir dels constructes clonats en pcDNA3 que van ser digerits i clonats de nou en pGEX-6P-1 (Promega).

La proteïna de **β -Catenina** va ser realitzada pel Dr. Jose Piedra del laboratori de la Dra. Duñach de la Universitat Autònoma de Barcelona, la va obtenir a partir del cDNA de β -Catenina aa 1-781 cedit pel Dr. R. Kemler. Es va digerir amb BamHI i es va clonar en pGEX-6P-3 (Promega) obert amb BamHI.

La proteïna de la fracció citosòlica de **l'E-Cadherina** (aa 1-472) també va ser realitzada pel Dr. Jose Piedra, la va obtenir per PCR amb oligonucleòtids

específics que contenen les dianes EcoRI i Sall. Es va clonar en pGEX-6P-2 (Promega).

El cDNA de **TBP** humana es va amplificar per PCR a partir de cèl·lules HT29-M6 amb els oligos següents: 5'-TAAGGATCCACCATGGATCAGAACAACAGCC-3' (232-251) i 5'-CCCGATATCACGTCGTCTTCCTGAAT-3' (1250-1231). L'amplicò es va clonar en pGEX-6P-1 (Promega) amb BamHI i EcoRV.

TBP (Full length)



Figura M1: Proteïna recombinant GST-TBP. Fotografia del gel de poliacrilamida al 10%, en condicions desnaturalitzants, tenyit amb Comassie Blue.

El cDNA de **P300 (826-1704)** humà es va amplificar per PCR a partir de cèl·lules HT29-M6 amb els oligos següents: 5'-CTTGGATCCACCATGGAGAAACTAGGCCTTGGC-3' (6312-6332) i 5'-CTTGATATCTTTGGCCTGCTGTAGTCG-3' (6678-6660). L'amplicó es va clonar amb BamHI i EcoRV en pGEX-6P-2 (Promega).

CBP/P300 (826-1704)



Figura M2: Proteïna recombinant GST-CBP (826-1704). Fotografia del gel de poliacrilamida al 10%, en condicions desnaturalitzants, tenyit amb Comassie Blue.

La purificació de les proteïnes de fusió es va portar a terme en cultius a mitjana escala. S'inoculava un subcultiu de 20 ml crescut en medi LB (Luria-Bertani) durant la nit a 37°C, a un volum major de 180 ml de LB. Al cap de dues hores, s'afegia IPTG (isopropil-1-tio-βDgalactopiranosid) a una concentració final de 0.1 M per induir l'expressió de la proteïna. El cultiu es va mantenir en fase d'inducció durant tres hores.

Es varen prendre mostres de la mostra prèvia a la inducció i després d'aquesta. El cultiu es va centrifugar 10 min a 4000xg a 4°C. El pellet va ser resuspès en PBS fred. En l'obtenció de la proteïna de fusió GST-mSnail(1-264), al PBS se li afegí 0.1 mg/ml de lisozima i 1.5% de sarkosyl per tal de solubilitzar la proteïna. Després de la lisi dels bacteris per sonicació en gel, en 5 polsos de 10 segons a mitja potència (35%), es va afegir Tritó X100 a una concentració final de l'1%. Es deixava el lisat durant 30 minuts a 4°C en rotació constant, per tal de solubilitzar la proteïna.

Després de centrifugar l'extracte durant 5 minuts a 20000xg i temperatura ambient o bé 20 minuts a 4°C i 10000xg, es recuperava el sobrenedant d'on es purificava (en cultius a gran escala) per cromatografia d'afinitat a través d'una

columna amb resina amb Glutatió conjugat (GS4B, Amersham). S'incubava el sobrenedant amb la resina durant 30 minuts a temperatura ambient en rotació, o bé durant 16 hores a 4°C). Després de tres rentats amb PBS fred (10 cops el volum de la columna en el cas dels cultius a gran escala), la proteïna era alliberada de la columna amb 1 ml d'un tampó a pH 8.0 en presència de Glutatió ((50 mM Tris-Cl, pH 8.0, +10 mM Glutatió per a la majoria de proteïnes de fusió); o bé un tampó amb 100 mM Glutatió per eluir la fusió GST-mSnail (1-264), que incloïa 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 250 mM EDTA, i 0.02% Tween 20, donada la baixa eficiència d'elució d'aquesta fusió); o finalment amb 6M urea per eluir la fusió GST-mSnail(1-151), especialment difícil d'obtenir).

Per el·luir la proteïna s'afegien 350 µl de tampó d'elució 1X durant deu minuts, es recuperava el sobrenedant després d'una breu centrifugació de dos minuts a temperatura ambient i 14000 rpm. L'el·luït de la proteïna es dialitzava, per eliminar el glutatió, durant tota la nit a 4°C en TBS (2 l), en una membrana de diàlisi de porus petit, per després concentrar-la mitjançant la deshidratació amb polietilenglicol 4000 sòlid durant uns minuts.

En els casos en que es volia prescindir de la GST, la proteïna de fusió no s'el·luïa, la proteïna unida a la resina era sotmesa a una proteòlisi mitjançada per la proteasa PreScission (Pharmacia Biotech. S'afegien 40 µl (80 U) de proteasa per cada mil·lilitre de glutatió sefarosa que portava unida la proteïna, s'incubava unes 16 hores a 4°C amb un tampó 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 150 mM Na Cl, 1 mM EDTA i mM dithiothreitol.

La concentració de proteïna de fusió als eluïts es quantificava visualment per comparació amb una corba de concentracions de BSA, en un gel de poliacrilamida, després de tenyir les proteïnes del gel amb blau de Coomassie.

4. Transfeccions transitòries.

Es sembraven de $2-4 \cdot 10^6$ cèl·lules en plaques de 10 cm de diàmetre i de $7-10 \cdot 10^6$ cèl·lules en plaques de 15 cm de diàmetre. Es deixaven a 37°C unes 16 hores fins a arribar a un 50-70% de confluència.

Totes les transfeccions es van realitzar utilitzant el sistema Lipofectamine-Plus Reagent d'Invitrogen en medi OptiMEM (Invitrogen). La barreja de transfecció es deixava sobre les cèl·lules de quatre a sis hores (segons el tipus cel·lular i si ja havien estat transfectades o no), per després rentar-les i afegir medi DMEM amb 10% de sèrum fetal boví. En funció del tipus d'assaig el temps d'expressió era variable. Generalment unes 48 hores.

La quantitat de DNA, Plus i Lipofectamina utilitzats per a cada transfecció era variable depenent de la superfície del pou a transfectar i el tipus cel·lular, i d'acord amb les instruccions del fabricant i protocols establerts al nostre grup.

5. Anàlisi de l'activitat dels promotors (Assaigs Reporter)

Les cèl·lules RWP1 i SW480-ADH es sembraven en plaques de 24 pous, 60.000 cèl·lules per pou; en el cas de les MDCK es sembraven 120.000 cèl·lules per pou. Es transfectava de 50 a 200 ng de promotor i fins a 500 ng per cèl·lules MDCK. A més; es transfectaven amb diferents quantitats creixents dels factors de transcripció dels quals volíem conèixer el seu comportament, que anaven des d'un mínim de 1 ng, fins a un màxim de 500 ng. Amb d'altres cèl·lules de difícil transfecció, com les MDCK, s'augmentava la quantitat de DNA al doble.

Totes les transfeccions i co-transfeccions esmentades anteriorment incloïen el plàsmid Renilla Reniformis (pRTK-Luc o pRSV-Luc de Promega) per normalitzar l'eficiència de les transfeccions. Les activitats de la luciferasa Firefly (Luc) i la luciferasa Renilla (Rluc) es van mesurar en un luminòmetre utilitzant el Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) 48 hores després de transfectar d'acord amb les instruccions de la casa comercial. L'activitat Luc es normalitzava per l'activitat Rluc. En tots els experiments, la quantitat total de DNA transfectat es va estandarditzar amb el vector buit. Sistemàticament es feien duplicats o triplicats de cada transfecció i els experiments es repetien com a mínim tres vegades.

6. Anàlisi dels nivells de RNA.

L'extracció de RNA es va realitzar seguint el protocol estàndard descrit a Guaita et al. 2002, o mitjançant el kit: Gene Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich).

6.1. RT-PCR Semi-quantitativa.

Tots els anàlisi de RT-PCR semi-quantitativa es van realitzar a partir de 0.5-1 µg provenint de RNA total purificat i utilitzant el kit SuperScript One-Step RT-PCR i la Platinum Taq polimerasa (Invitrogen). Els productes de la RT-PCR es separaven en un gel d'agarosa de 1,5 % d'agarosa/Tris-Actetat-EDTA.

Els oligonucleòtids sens/antisens utilitzats van ser:

hsE-Cadherina: 5'-TTCCTCCCAATACATCTCCCTTCACAGCAG-3' (1977-2006) i 5'-CGAAGAAACAGCAAGAGCAGCAGAATCAGA-3' (2287-2316).

hsFibronectina: 5'-GTGCCTGGGCAACGGA-3' (922-938) i 5'-CCCGACCCTGACCGAAG-3' (1554-1571).

hsLEF1: 5'-ACTGCGCCACGGACGAG-3' (704-720) i 5'-GAGAGGATGGACCGCATGG-3' (1098-1116).

mmSnail: 5'-TTCCAGCAGCCCTACGACCAG-3' (104-125) i 5'-GCCTTTCCCACTGTCCTCATC-3' (290-310).

hsCiclofilina A: 5'-ATGGTCAACCCACCGTG-3' (45-62) i 5'-TGCAATCCAGCTAGGCATG-3' (690-708).

mmHPRT (Hipoxantina Guanina Fosforibosil Transferasa):	5'-
GGCCAGACTTTGTTGGATTTG-3' (556-576)	i 5'-
TGCGCTCATCTTAGGCTTTGT-3' (679-699).	
hsSOX1:	5'-TACAAGTACCGGCCGCG-3' (412-421) i 5'-
CTCCGAGTTCACCAGAGAGC-3' (1004-1023).	
hsSOX7:	5'-TACAAGTACCGGCCGCG-3' (413-421) i 5'-
GCTACAGTGGAGAGGGCTTG-3' (822-841).	
hsSOX17:	5'-TACAAGTACCGGCCGCG-3' (607-621) i 5'-
AGACCTGCGGCGTAGCTGTAG-3'.	
hsSOX18:	5'-TACAAGTACCGGCCGCG-3' (564-580)i 5'-
GATGCACGCGCTGTAATAGA-3' (1237-1256).	
hsSOX9:	5'-CCCCAACGCCATCTTAAGG-3' (969-983) i 5'-
GTCGGTGGGCCCTGGGATT-3' (1061-1079).	
ΔTCF4:	5'-CCACCATGGAAAACCTCGGCAGAG-3' (404-421) i 5'-
CATCTGGAGATAGGTTTCGGGCGGTGGGCGT-3' (672-700).	
TCF4:	5'-CCACCATGCCGCAGCTGAACGGCGGT-3' (2075-2095) i 5'-
CATCTGGAGATAGGTTTCGGGCGGTGGGCGT-3' (672-700).	

6.2. RT-PCR quantitativa.

Tots els anàlisi de RT-PCR quantitativa es realitzaven a partir de 0,25 ng de RNA total purificat, l'extracció es feia amb el kit Gen Elute Mammalian Total RNA kit (Sigma). Per a la quantificació s'utilitzava el kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Quiagen). La RT-PCR i l'obtenció de les dades es va realitzar

amb ABI PRISM 7900HT. Totes les quantificacions es normalitzaven amb controls interns de Ciclofilina o HPRT. El valor de quantitat relatiu per a cada gen analitzat s'expressava com a $2^{-(Ct-Cc)}$ (Ct i Cc són les mitges de les diferències dels triplicats dels cicles obtinguts després de normalitzar amb Ciclofilina A o HPRT). Els parells d'oligonucleòtids (sens/antisens) utilitzats eren els següents:

hs-E-cadherina: 5'-TTCCTCCCAATACATCTCCCTTCACAGCAG-3' (1977-2006) i 5'-CGAAGAAACAGCAAGAGCAGCAGAATCAGA-3' (2287-2316).

hsCiclofilina A: 5'-ATGGTCAACCCACCGTG-3' (45-62) i 5'-TGCAATCCAGCTAGGCATG-3' (690-708).

mmHPRT: 3'-GGCCAGACTTTGTTGGATTTG-5' (556-576) i 3'-TGCGCTCATCTTAGGCTTTGT-5' (679-699).

hsLEF1: 5'-CGAAGAGGAAGGCGATTTAG-3' (786-806) i 5'-GTCTGGCCACCTCGTGTC-3' (859-877).

hsFibronectina: 5'-AGCAAGCCCGGTTGTTATG-3' (408-427) i 5'-AACCAACGCATTGCCTAGGT-3' (476-491).

hsSOX7: 5'-ACGCCGAGCTCAGCAAGAT-3' (294-312) i 5'-TCCACGTACGGCCTCTTCTG-3' (347-366).

hsSOX9: 5'-CCCCAACGCCATCTTAAGG-3' (969-983) i 5'-GTCGGTGGGCCCTGGGATT-3' (1061-1079).

c-myc: 5'-CAGGACCCGCTTCTCTGAAA-3' (480-499) i 5'-ATAGTTCCTGTTGGTGAAGCTAACG-3' (581-605).

6.3. Assaigs de Southern Blot.

Els Southern blots es van fer seguint un protocol estàndard. Es va purificar el RNA total dels clons HT29-M6 per extracció amb isociocianat de guanidina. Es van realitzar RT-PCR amb 500 µg de RNA amb oligonucleòtids específics i es van separar posteriorment en un gel d'agarosa al 1,5%, el nombre de cicles es va ajustar per a cada gen, de manera que la quantitat d'amplicó estava just en el límit de detecció per Bromur d'etidi. Aquest gel es va desnaturalitzar durant 30 minuts amb 0,5 M de NaOH i 1M de NaCl. Després es va neutralitzar, 30 minuts més, amb una solució 0,5 M de Tris-HCl (pH 7,4) i 3 M NaCl. Els gels es van transferir a una membrana Zeta-probe (Bio-Rad) durant tota la nit per acció de capil·laritat. Al dia següent els DNAs es van *cross-linkar* a la membrana utilitzant el GS Gene Linker (Bio-Rad) i es van hibridar amb una sonda marcada radioactivament amb [α -32P]dCTP (Rediprime II, Amersham Biosciences) utilitzant una solució PressHyb (CLONTECH).

La sonda de DNA de Ciclofilina A es va amplificar per PCR a partir de DNA genòmic de cèl·lules HT-29 M6 utilitzant els oligonucleòtids específics. Les sondes per Fibronectina, LEF1 i E-Cadherina es van obtenir per amplificació per RT-PCR, amb oligonucleòtids específics, de RNA total de cèl·lules SW480-ADH.

Les bandes específiques es van visualitzar per autoradiografia utilitzant Hyperfilm MP (Amersham Biosciences).

7. Assaig de BOPA (Biotinilated Oligonucleotide Precipitation Assay).

Les sondes es va amplificar per PCR a partir de miniprep del cDNA del promotor de LEF1 wt o amb la caixa E mutada (vegeu apartat Promotors) amb oligonucleòtids que contenen una molècula de Biotina a l'extrem 5'. Les seqüències dels oligos eren: 5'-TCCCTTGTCTCCAAAGAGCG-3' (844-863) i 5'-TCCCGGCGGCTCTGTAATC-3' (2701-2683).

S'incubaven 100 ng de proteïna recombinant GST o GST-Snail durant tota la nit a 4°C en rotació amb 4 µg de sonda biotinilada del promotor de LEF1 wt o amb la caixa E mutada. La reacció també incloïa 20 µg de poly dl-dC (Amersham) i Binding buffer (20 mM HEPES (pH 7,6), 150 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10% glicerol, 0,3 mg/ml de BSA i 0,5% NP40). Al dia següent es va afegir a cada mostra 5 µl totals de Streptavidin-Conjugated Magnetic Beads (Biolabs)) i es van incubar 10 minuts en rotació a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps es van sotmetre les mostres a un iman per precipitar les *magnetic beads*, es va descartar el sobrenedant i es van rentar amb 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA i 300 mM NaCl. Seguidament es van resuspendre les mostres amb 25 µl de SB1x, es van bullir durant 5 minuts a 95° c i es van resoldre en un gel d'acrilamida-SDS al 12% El gel es va transferir a una membrana de nitrocel·lulosa (PROTAN®) i posteriorment, aquesta membrana, es va analitzar mitjançant la tècnica de Western blot (WB) utilitzant anticossos contra HA (Roche) (per visualitzar Snail).

8. Assaigs d'interacció proteïna-proteïna.

Durant l'elaboració d'aquest treball s'han realitzat diferents assajos d'interacció entre proteïna que es poden classificar en quatre grups:

Interacció directa: unió de proteïnes recombinants amb purificació per cromatografia d'afinitat.

Overlay/Dot blot: unió de proteïnes recombinants en nitrocel·lulosa.

Pull-Down: incubació d'una proteïna recombinant amb extractes cel·lulars totals amb purificació per cromatografia d'afinitat.

Co-immunoprecipitació: purificació selectiva d'una proteïna endògena d'un extracte cel·lular per analitzar la seva associació amb altre proteïnes cel·lulars d'interès.

8.1. Interacció directa de proteïnes recombinants purificades.

En aquesta tècnica es mesura la capacitat de dues proteïnes recombinants de coprecipitar com a indicador d'interacció entre elles. Després d'una incubació de dues proteïnes, una amb GST i l'altra sense, s'analitza si la que no té GST coprecipita també amb la glutatió sefarosa.

El protocol que es seguia es descriu a continuació amb el següent exemple:

Per estudiar quin fragment de Snail interaccionava amb la β -Catenina vam realitzar el següent assaig (*Binding in vitro*). Primerament vam unir

covalentment proteïna recombinant de β -Catenina, a qui se li s'havia tallat amb preScission (Amersham Pharmacia) la seqüència codificant per la GST, a sefarosa (CNBr-activated Sepharose 4B, 6 mg de proteïna per ml de resina 50% V/V, seguint les indicacions del fabricant). Per a realitzar l'assaig de *binding* incubàvem de 3 a 21 ng de proteïna recombinant de Snail (o bé GST sola com a control d'una possible interacció inespecífica amb la *sepharose*) amb 5 μ l de la proteïna recombinant de β -Catenina unida a la resina *sepharose*. La reacció es realitzava en un volum final de 200 μ l en tampó de Binding (3 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1 mM DDT, 150 mM NaCl i 0,1% Tritó X-100), la incubació es feia a 4°C durant 1 hora en rotació. Després es rentava la resina amb tampó de Binding per eliminar la proteïna no unida. Els complexos retinguts es solubilitzaven afegint tampó de càrrega d'electroforesi SB1X (a partir de SB5X: 20% glicerol, 10% SDS, 500 mM Tris-HCL (pH 6,8), 0,32% β -mercaptoetanol i 20 mg Bromofenol Blue) i bullint les mostres 5 minuts a 95°C. Per analitzar el Snail recombinant que s'havia unit a la β -Catenina, les mostres es corrien en un gel d'acrilamida-SDS al 12%. El gel es transferia a una membrana de nitrocel·lulosa (PROTAN®) i posteriorment, aquesta membrana, es s'analitzava mitjançant la tècnica de Western blot (WB) utilitzant anticossos contra GST (Amersham).

8.2. Assajos d'Overlay.

En aquesta tècnica es mesura la capacitat d'una proteïna recombinant de quedar retinguda en una membrana on hi ha 'altra proteïna recombinant transferida.

Quantitats creixents (30, 300 ng) de les proteïnes recombinants dels diferents mutants de Snail es separaven per SDS-PAGE al 12%. El gel es transferia a una membrana de nitrocel·lulosa (PROTAN®). Aquesta membrana es bloquejava amb una solució a l'1% BSA en TBS-T (25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 136 mM NaCl i 4 mM KCl i 0,2% Tween-20) i s'incubava en una solució de 10 mg/ml de β -Catenina recombinant sense GST, en TBS-T i 0,1% de BSA durant 90 minuts a temperatura ambient. Després es feien tres rentats de 10 minuts amb TBS-T a temperatura ambient per eliminar la proteïna no unida i posteriorment s'analitzava la β -Catenina que s'havia unit a la membrana incubant amb anti β -Catenina (BD Transduction Lab). També incubàvem la membrana amb anti GST (Amersham-Pharmacia Biotech) per comprovar la quantitat de proteïna de Snail que havíem carregat.

8.3. Assajos de Dot-blot.

L'experiment es realitzava igual que un assaig d'overlay amb la diferència que les proteïnes recombinants dels diferents mutants de Snail no es separaven per SDS-PAGE sinó que es carregaven directament a una membrana de

nitrocel·lulosa (PROTAN®) prèviament hidratada amb l'ajuda d'una bomba de buit.

8.4. Pull-Down.

Aquets tipus d'assajos són una aproximació més fisiològica a l'estudi de les interaccions que una proteïna estableix amb la resta de proteïnes cel·lulars. Una proteïna recombinant, que conté GST, és incubada amb un extracte cel·lular i posteriorment pot ser purificada i d'aquesta manera es poden analitzar les proteïnes que s'hagin copurificat amb ella.

Primerament es realitzava un extracte cel·lular total amb tampó RIPA (150 mM NaCl, 1% X-Tritó, 0,5% NaDOC, 0,1% SDS i 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)). Es feia un pre-clearing incubant l'extracte nuclear total amb glutatió-sefarosa per tal d'eliminar la possible unió inespecífica. Posteriorment s'incubaven 5 µg de la proteïna de fusió (GST-TBP o GST-CBP) amb 200 µg d'extracte cel·lular total en un volum total de 200 µg de tampó de Binding, durant 2 hores a 4°C en agitació. Els complexos formats es purificaven i analitzaven de la mateixa manera que a l'apartat Interacció directa de proteïnes recombinants purificades.

8.5. Co-immunoprecipitació.

En aquesta tècnica es mesura la capacitat de dues proteïnes d'un extracte cel·lular de coprecipitar. Primerament es realitzava un extracte cel·lular total

amb tampó RIPA (150 mM NaCl, 1% X-Tritó, 0,5% NaDOC, 0,1% SDS i 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)). Es feia un *pre-clearing* incubant l'extracte nuclear total amb proteïna G-Agarosa (Roche) per tal d'eliminar proteïnes que interaccionen inespecíficament amb la proteïna G-Agarosa. Un cop separada la proteïna G-Agarosa de l'extracte, s'incubaven 500 µg d'extracte cel·lular total amb 2,5 µg d'anticòs anti E-Caherina (BD Transduction Lab) durant 16 hores a 4°C en agitació. S'afegien 40 µl (d'una solució a 50% pes/volum) de proteïna G-Agarosa i es deixava incubar 1 hora a 4°C en agitació. Després es rentava unes 5 vegades amb tampó RIPA. Els complexos proteics s'el·luïen amb tampó de càrrega d'electroforesi (SB1X) i s'analitzaven per Western blot.

9. Electroforesi de proteïnes i Western blot.

L'electroforesi de proteïnes es va realitzar en minigels de poliacrilamida al 10-12%, en condicions desnaturalitzants. Les mostres proteiques havien estat bullides prèviament en tampó de càrrega, o de Laemmli SB1X (a partir de SB5X: 20% glicerol, 10% SDS, 500 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,32% β-mercaptoetanol i 20 mg Bromofenol Blue). Els gels es resolien en un tampó balancejat de Tris i Glicina, en un protocol clàssic.

La immunodetecció de les proteïnes transferides a una membrana de nitrocel·lulosa (PROTAN®) es realitzava amb un protocol de Western blot usual: incubació de 1 hora en solució de bloqueig TBS-T Llet (25 mM Tris-HCl

(pH 7,5), 136 mM NaCl i 4 mM KCl, 0,2% Tween-20 i 5% llet en pols desnatada). Després s'incubava amb l'anticòs primari específic, diluït en solució de bloqueig, durant d'1-4 hores a temperatura ambient o durant tota la nit a 4°C.

Després de tres rentats de 10 minuts a temperatura ambient i abundant solució de bloqueig, es procedia a realitzar la incubació amb l'anticòs secundari conjugat a peroxidasa de rave (HRP), específic contra l'espècie originària del primari, durant 45 minuts i a temperatura ambient, a una dilució d'1: 2000 (en el cas de l'anti Mouse HRP) o 1:1000 (en el cas de l'anti rat HRP) en tampó de bloqueig. Després de nous rentats es revelava la reacció amb un substrat específic per a l'HRP, quimioluminiscent (Enhanced ChemiLuminiscence, ECL, Amersham-Pharmacia) durant un minut, per després exposar diferents temps la membrana a pel·lícules autoradiogràfiques Agfa-Curix o Hyperfilm MP (Amersham Biosciences).

Anticossos utilitzats en els Western Blots i dilucions emprades:

Anticòs	Organisme	Dilució (WB)	Casa Comercial
E-Cadherina clon 36	Ratolí	1:2000	BD Transduction Laboratories
β -Catenina clon 14	Ratolí	1:2000	BD Transduction Laboratories
HA clon 3F10	Rata	1:1000	Roche
GST	Cabra	1:2000	Amersham

10. Assajos de localització subcel·lular de proteïnes per immunofluorescència.

L'assaig es portava a terme en cèl·lules adherides a cobreobjectes de vidre, fixades amb paraformaldehid (PFA) al 4% durant 10 minuts a temperatura ambient, i rentades en PBS 1X (tampó fosfat-salí a partir de PBS 10X: 1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄ i 18 mM KH₂PO₄) tres cops. Després de la fixació les cèl·lules es neutralitzaven amb 5mM NH₄Cl en PBS i després es permeabilitzaven en Tritó X-100 al 0,2% durant cinc minuts, i rentades de nou amb PBS. A continuació, es feia un bloqueig durant una hora amb una solució de BSA a l'1% en PBS. Posteriorment, els cobreobjectes s'incubaven sobre una gota de la dilució de l'anticòs primari en el mateix tampó de bloqueig en una cambra humida i fosca durant tota la nit a 4°C. Després de rentar de nou els cobreobjectes en PBS, s'incubaven amb la dilució de l'anticòs secundari conjugat a fluoresceïna (FITC), rodamina (TRITC) o Alexa número 555 o 647; durant 45 minuts en la mateixa cambra. Un cop rentats els cobreobjectes de nou en PBS, es muntaven en Mowiol (DABCO) o Fluoromount-G (SouthernBiotech).

Per a la contratinció de nuclis s'utilitzava el compost TOP-Ro, a una dilució 1:1000, durant cinc minuts. Les imatges de microscòpia confocal es captaven per un sistema de Microscòpia Confocal Invertida Leica TCS-SP2, amb el software pertinent.

Anticossos utilitzats en les immunofluorescències:

Anticòs Primari	Organisme	Dil·lució	Casa comercial
β -Catenina	Ratolí	1:50	BD Transduction Labs
E-Cadherina	Ratolí	1:1000	BD Transduction Labs
Snail	Conill	1:50	Descrit a (Batlle et al., 2000).
Snail	Ratolí	Sobrenedant Híbridoma CE2 C3	Descrit a (Franci et al., 2006)
P65	Conill	1:100	Santa Cruz
HA	Rata	1:50	Roche

Anticòs Secundari	Organisme	Dilució	Casa comercial
Anti Mouse FITC	Conill	1:40	DAKO
Anti Rabbit TRITC	Porc	1:50	DAKO
Alexa Mouse 647	Ratolí	1:500	Alexa
Alexa Rabbit 555	Conill	1:500	Alexa
Anti Rat-Biotina	Conill	1:200	DAKO
Streptavidina-HRP	Conill	1:200	DAKO

Les immunofluorescències realitzades per veure la co-localització de la β -Catenina i el Snail en les cèl·lules SW480-ADH es van fer seguint una sèrie de modificacions per tal d'amplificar la senyal de Snail. Els cobreobjectes es van fixar, neutralitzar i permeabilitzar seguint el protocol estàndard. Es van incubar amb anti HA durant 16 hores en una cambra humida i fosca a 4°C. Es van rentar amb PBBS i es van incubar 30 minuts amb anti rata conjugat a biotina. Seguidament es van incubar 15 minuts amb estreptavidina conjugada a

rodamina (TRITC). Posteriorment s'incubaven els cobreobjectes amb anti- β -Catenina durant 2h en una cambra humida i fosca a temperatura ambient. Es rentaven amb PBS i s'incubaven amb Alexa Mouse 647 durant 45 minuts en la mateixa cambra. Un cop rentats els cobreobjectes de nou en PBS, es muntaven en Fluoromount-G (SouthernBiotech).

11. Immunoprecipitació de cromatina (ChIP).

$4 \cdot 10^6$ cèl·lules SW480-ADH o $1 \cdot 10^7$ cèl·lules LS174T crescudes en plaques de 15 cm de diàmetre es crosslinkaven amb 1% de formaldehid. Seguidament es lisaven amb tampó de lisi (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA i 1% SDS) durant 10 minuts a temperatura ambient. Després es sonicaven per a generar fragments de DNA de 200 a 1500 pb. Les mostres es diluïen 1:10 (16,7 mM Tris pH 8, 1,2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 1,1% Tritó X-100 i 0,001% SDS) i es feia un pre-clearing amb proteïna G-Agarosa (Roche) unes 3 hores a 4°C, després s'incubaven els lisats amb anti β -Catenina (BD Transduction Lab), anti P65 (Santa Cruz) o amb immunoglobulines de ratolí com a control. Els complexos DNA-Proteïna s'aïllaven amb la proteïna G-Agarosa. Per eliminar la possible unió inespecífica es feien 5 rentats amb quatre tampons diferents (High, Low salt buffer, LiCl Buffer i TE). Seguidament les mostres s'eluíen amb tampó d'elució (100 mM NaCO₃ i 1% SDS) i s'incubaven a 65°C durant 16 hores per desfer el crosslinking. Posteriorment es feia un tractament amb Proteïnasa K i

RNAse i el DNA es purificava amb GFX PCR DNA Gel Band Purification Kit (Amersham) i les regions de promotor de Fibronectina humana es detectaven per PCR (30-35 cicles) amb oligonucleòtids específics: 5'-TCAAGTCCCATATAAGCCCCGG-3' i 5'-GTTGAGACGGTGGGGAGAG-3' corresponent a 70589-68/70317-36 de la seqüència amb número AC012462 del GeneBank. Com a control es van utilitzar els oligonucleòtids: 5'-TCCTTCCCCCAGAATCAATGAA-3' i 5'-GGGAAGCCGAGTGTTTCTCTTCC-3' corresponent a 72512-491/72404-24 de la mateixa seqüència.

En l'assaig per comprovar la unió de P65 al promotor de Fibronectina es va realitzar alguna variant per aïllar els nuclis. Després de crosslinkar es rentaven les cèl·lules amb PBS a 4°C i es lisaven amb un tampó de lisi suau que contenia 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM EDTA, 0,15 NP40 i 10% glicerol. Es rascaven les cèl·lules i es deixaven 5 minuts a 4°C, després es centrifugava durant 15 minuts a 3000 rpm a 4°C. Es descartava el sobrenedant que contenia la fracció citoplasmàtica soluble i el pellet obtingut es lisava amb tampó de lisis (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA i 1% SDS) i es continuava amb el protocol estàndard.

12. Immunohistoquímiques.

Les immunohistoquímiques es van realitzar a partir de talls cara-revers de tumors de còlon humans inclosos en parafina procedents de biòpsies dels banc dels Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital del mar (Barcelona).

Els talls (4 μm) es desparafinaven durant 2 hores a 60°C, seguidament es rehidrataven. Es feia la recuperació antigènica bullint les mostres durant 15 minuts en Tris/EDTA (pH 9,0). L'activitat peroxidasa endògena es bloquejava amb 4% de Peròxid d'hidrogen en PBS, contenint 1,1% d'azida sòdica, durant 15 minuts. Seguidament es rentava varies vegades amb PBS i s'incubaven els talls 1 hora amb PBS que contenia 1% de BSA, per tal d'eliminar la unió inespecífica. La immunodetecció de el Snail es realitzava incubant els talls durant tota la nit amb 10 mg/ml d'anti Snail mAb EC3 a 4°C. Després de rentar amb PBS l'anticòs unit es detectava utilitzant el sistema CSA II (Dako Cytomation, DAKO), seguint les indicacions del fabricant. Els talls van ser contratenyits amb Hematoxilina-Eosina.

Per detectar la β -Catenina, després del bloqueig s'incubaven els talls amb una dilució 1:200 d'anti β -Catenina (BD Transduction Lab) en PBS, durant tota la nit a 4°C. Es rentava amb PBS i s'utilitzava l'anti Mouse Envision (Envision System Peroxidase, DAKO, Glostrup, Denmark) per detectar l'anticòs unit. Els talls van ser contra-tenyits amb Hematoxilina-Eosina.

Resultats

1.Snail activa l'expressió de gens mesenquimals.

L'anomenada transició epiteli-mesènquima (EMT, de l'anglès "Epithelial-Mesenchymal transition") fa referència al canvi molecular, i en conseqüència fenotípic, que pateixen certes cèl·lules epitelials en resposta a diferents senyals, i que les indueix a adoptar una morfologia mesenquimal. Les cèl·lules experimenten canvis tant en l'arquitectura com en el comportament cel·lular, que es veuen reflectits en diferències en la morfologia, l'arquitectura cel·lular, l'adhesió i la capacitat de migració (Hay, 1995). Els membres de la família Snail indueixen la transició epiteli-mesènquima durant el desenvolupament de l'embrió i la progressió tumoral (Nieto, 2002).

Diferents estudis demostren que el factor de transcripció Snail pot actuar com a repressor de gens marcadors de l'epiteli com ara E-Cadherina, Citoqueratina-18, MUC-1 i el Receptor de la Vitamina D (Batlle et al., 2000;Cano et al., 2000;Palmer et al., 2004). Durant la EMT induïda per Snail s'activen gens com la Vimentina, Fibronectina, LEF1 i ZEB1 (Guaita et al., 2002), tot i que no ha estat determinat si aquesta activitat és directa o bé està mitjançada per altres proteïnes o factors induïts o activats per l'expressió de Snail.

1.1. Snail fa augmentar els nivells de RNA de Fibronectina i LEF1.

Es va voler corroborar i quantificar els resultats prèviament obtinguts en la línia cel·lular humana d'origen epitelial HT-29 M6 (Guaita et al., 2002). Vam voler veure si Snail era capaç d'activar l'expressió de gens marcadors típicament mesenquimals com ara Fibronectina i LEF1. Amb aquest objectiu es va realitzar l'anàlisi dels nivells de RNA en clons de dues línies cel·lulars d'origen epitelial on l'expressió estable de Snail indueix un canvi cap a un fenotip mesenquimal, tal com s'havia observat a la línia HT-29 M6. Les cèl·lules RWP1 són d'origen epitelial i pancreàtic i creixen en colònies formant contactes adherents ben definits. Les cèl·lules SW480-ADH són també epitelials i provenen de còlon humà, tot i que també formen colònies, presenten nivells d'E-Cadherina més baixos. En condicions d'elevada confluència els nivells d'E-Cadherina augmenten i els contactes són més forts i madurs. Mentre que els clons RWP1 van ser obtinguts al nostre laboratori, els clons SW480-ADH van ser cedits pel Dr. Muñoz del centre Alberto Sols de Madrid.

En totes dues línies cel·lulars, els clons que expressen establement Snail no formen colònies compactes i tenen un fenotip fibroblastoide (Fig. R1A).

Es va observar que les cèl·lules SW480-ADH que expressen Snail tenien unes dues vegades més quantitat de RNA de Fibronectina i LEF1 que les cèl·lules control (Fig. 1B-Dalt). En les RWP1 aquesta pujada era molt més acusada: unes 8 vegades més RNA de Fibronectina en els clons que expressaven Snail respecte a les cèl·lules control (Fig. 1B-Baix). Pel que fa als nivells de RNA de

LEF1, en les dues línies cel·lulars, les cèl·lules que expressaven Snail mostraven 2 vegades més RNA de LEF1 que les cèl·lules control. En conclusió, en aquestes línies cel·lulars es va poder observar un increment de l'expressió dels gens de Fibronectina i LEF1 en els clons que expressaven Snail respecte als clons control.

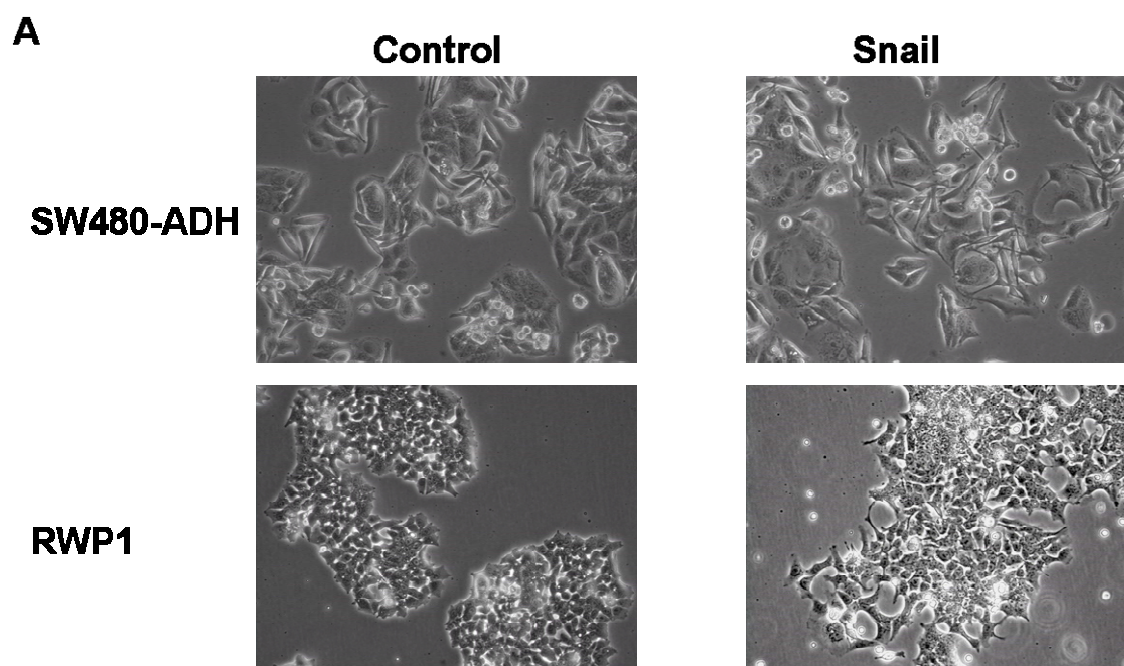


Figura R1. L'expressió de Snail incrementa els nivells de RNA de Fibronectina i LEF1 en cèl·lules SW480-ADH i RWP1. **A:** Aspecte dels clons SW480-ADH i RWP1 que expressen estabament Snail. Fotografies realitzades en un microscopi de contrast de fase a 200X.

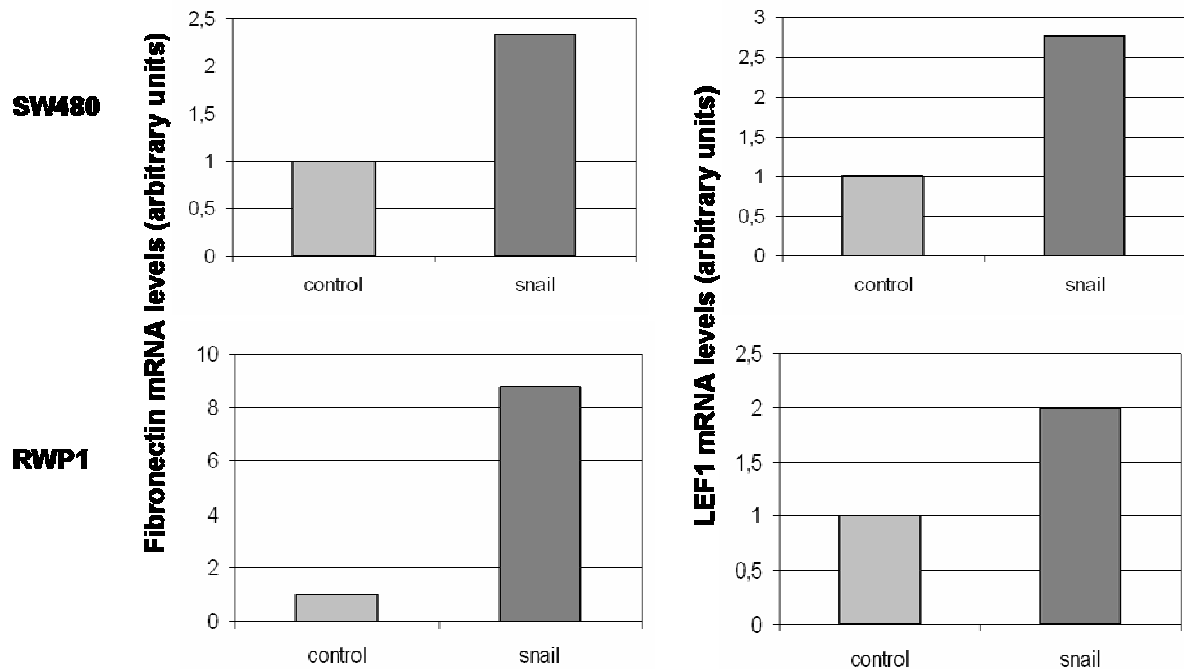
B

Figura R1. L'expressió de Snail incrementa els nivells de RNA de Fibronectina i LEF1 en cèl·lules SW480-ADH i RWP1. B: Nivells de mRNA de Fibronectina i LEF1 dels clons SW480-ADH i RWP1 que expressen establement Snail. Es va extreure RNA de cèl·lules SW480 i RWP1 que expressaven establement Snail o el vector buit i es van analitzar per RT-PCR quantitativa amb oligonucleòtids específics pels gens indicats. Els nivells de RNA eren normalitzats pels nivells d'un RNA control, HPRT, i expressats com l'increment respecte als valors obtinguts en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a un experiment representatiu on cada valor s'ha analitzat per triplicat. La desviació estàndard no superava el 5% en cap cas.

Com es presentarà més endavant, també s'han utilitzat altres línies cel·lulars epitelials i en totes s'ha observat increments de l'expressió de gens mesenquimals, com és el cas de MDCK (ronyó de gos) i LS174T (còlon humà).

1.2. Snail activa l'activitat de promotor dels marcadors mesenquimals Fibronectina i LEF1.

Es va voler veure si l'activació de l'expressió de Fibronectina i LEF1 era deguda a una augment de la transcripció de d'aquets dos gens. Així, clons estables per Snail (en cèl·lules SW480-ADH i MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)) es van transfectar amb promotor de Fibronectina (-341/+265) i amb promotor de LEF1 (-735/+1077), tots dos clonats en PGL3 i descrits anteriorment a (Dominguez et al., 2003). Els clons que expressaven Snail tenien una major activitat d'ambdós promotors, d'unes tres vegades més que els clons control (Fig R2). Resultats similars es van observar en experiments amb expressió transitòria de Snail (veure més endavant) aquí i en altres tipus cel·lulars com RWP1, MDCK i LS174T. Per tant, l'augment dels nivells de RNA és causat, almenys en part, per un increment de la transcripció.

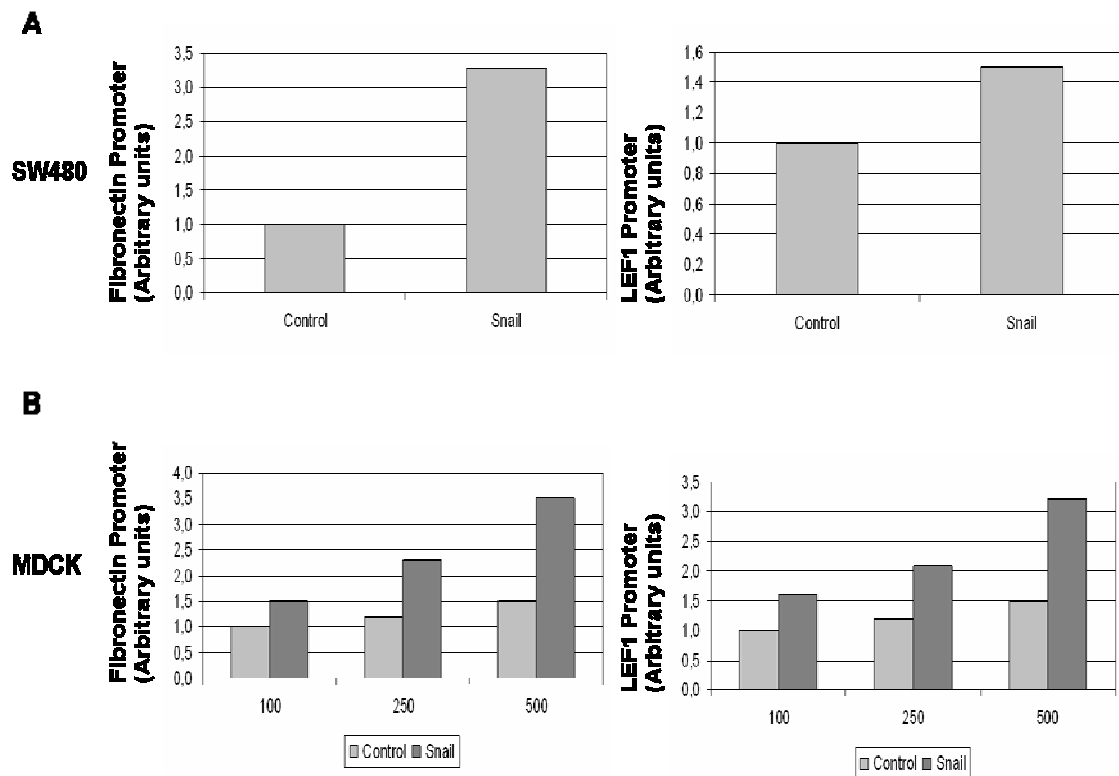


Figura R2. Snail induïx l'activitat dels promotors de Fibronectina i LEF1 humans. A: *Activitat dels Promotors de Fibronectina i LEF1 en cèl·lules SW480-ADH que expressaven establiment Snail.* Les cèl·lules eren transfectades amb 100 ng del vector PXP2 que contenia el gen de la Luc sota control del fragment -341/+265 del promotor Fibronectina humana o el vector PGL3 amb el fragment -735/+1077 del promotor de LEF1 també humà, més 2 ng del vector reporter control (pRL-SV). L'activitat luciferasa s'analitzava 48 hores post-transfecció i era estimada com la relació entre unitats de luciferasa del promotor problema (RLU firefly) i les del promotor control (RLU Renilla): RLU firefly/ RLU Renilla. L'activitat Luc era expressada com l'increment de l'activitat trobada en cèl·lules transfectades amb Snail respecte l'activitat obtinguda en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. La desviació estàndard no superava en cap cas el 5%. **B:** *Activitat dels Promotors de Fibronectina i LEF1 en cèl·lules MDCK que expressaven establiment Snail.* Les cèl·lules MDCK que expressaven establiment Snail eren transfectades amb 100, 250 i 500 ng del vector PGL3 que contenia el gen de la Luc sota control dels mateixos fragments del promotor Fibronectina humana o del promotor de LEF1, i 2 ng del vector reporter control (pRL-SV). Els resultats es van obtenir i expressar com en (A).

2. L'activació de Fibronectina i LEF1 mediada per Snail és independent de les caixes E.

L'activitat repressora del factor de transcripció Snail depèn de la unió d'aquest a les caixes E presents als promotor dels gens diana (Batlle et al., 2000; Nieto, 2002). Vam voler veure si l'activació que exerceix Snail sobre els promotors de Fibronectina i LEF1 es produïa de manera homòloga.

El fragment del promotor de Fibronectina, que hem utilitzat en el nostre estudi, no té cap caixa E, la qual cosa ens va fer pensar que el mecanisme d'activació de Snail no depenia de la unió d'aquest a dites caixes. El promotor de LEF1, en canvi, sí que té una caixa E situada a +53 respecte el principal inici de transcripció. Per tal de veure si la presència d'aquesta caixa era necessària per a l'activació mitjançada per Snail, es va mutar la caixa de 5'-**CACCTG**-3' a 5'-**AACCTA**-3', ja que aquesta mutació impedeix la unió de Snail al promotor d'E-Cadherina (Batlle et al., 2000) i del propi Snail (Peiro et al., 2006). Per comprovar l'eficàcia de la mutació en el nostre cas, es va estudiar si Snail podia interaccionar amb el fragment -735/+1077 del promotor de LEF1 amb la caixa E wt o mutada. Amb aquest objectiu es van realitzar assaigs "BOPA" (Biotinilated Oligonucleotid Precipitation Assay) amb proteïna de fusió GST-Snail, o GST sola, i sonda biotinilada de promotor de LEF1 wt o mutada. Al segon carril de la figura 3A es pot observar que GST-Snail co-precipitava amb la sonda del promotor de LEF1 wt. En canvi, GST-Snail no co-precipitava amb la sonda de promotor de LEF1 que tenia la caixa E mutada (Fig.R3A). Per tant, els resultats demostraven que es pot donar una interacció directa entre la proteïna Snail i la

sonda de promotor de LEF1 i que aquesta interacció depèn de que el promotor tingui íntegre la caixa E.

Tot i això, en assajos reporter, la versió del promotor de LEF1 amb la caixa E mutada, que no interaccionava amb Snail, s'activava encara més per Snail (Fig. R3B). En aquest assaig reporter es pot veure que la co-transfecció amb Snail provocava un augment de l'activitat de promotor de LEF1 wt i del promotor de Fibronectina d'unes dues vegades, tal com havíem vist en assaigs anteriors. Si la co-transfecció es realitzava amb el promotor de LEF1 que tenia la caixa E mutada, la inducció de l'activitat de promotor provocada per Snail era de més de 4 vegades, major que l'aconseguida amb la forma de promotor de LEF1 wt. Per tant, aquest resultat suggereix que les caixes E es relacionen amb repressió i no amb activació. Aquests resultats s'explicarien considerant que el promotor de LEF1 pot estar sotmès a una repressió directe per unió de Snail a la caixa E i a una activació per un altre mecanisme. Aquest fet podria explicar perquè en general, sempre veiem més activació del promotor de Fibronectina, que no té caixes E, que del promotor de LEF1 per Snail en tots els assaigs reporter realitzats durant d'aquest treball.

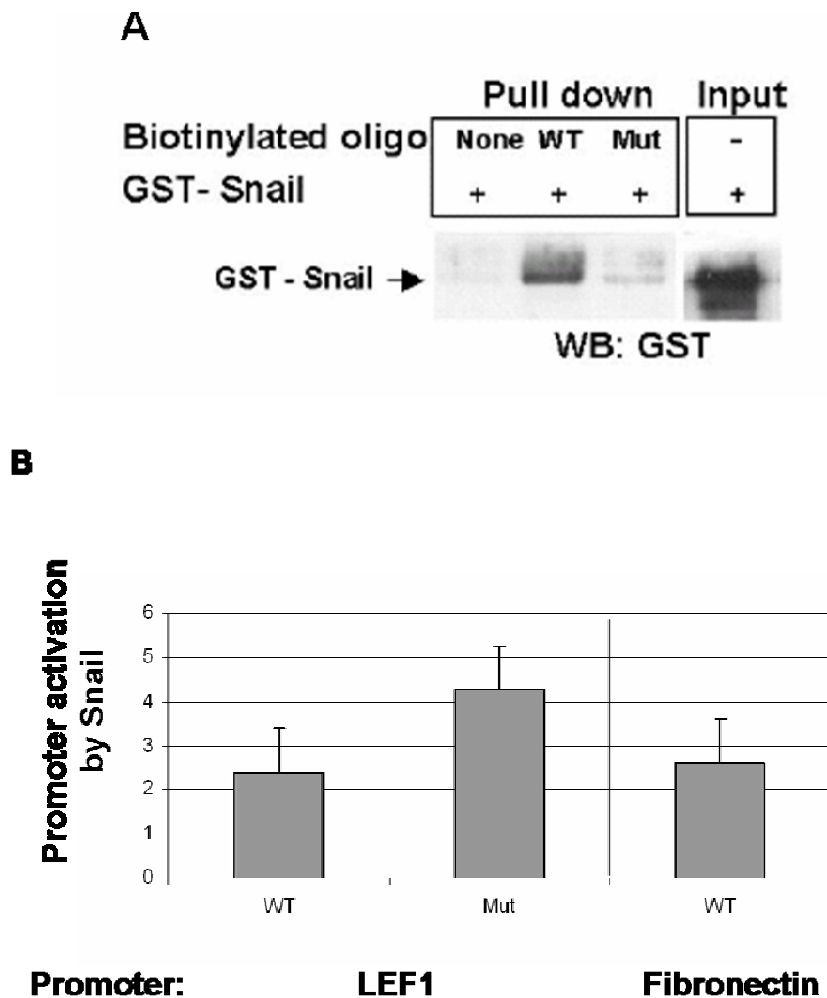


Figura R3. Les caixes E no són necessàries per a l'activació de promotor de LEF1. A: *Snail* s'uneix a la versió del promotor de *LEF1* que té la caixa E wt i no a la versió amb la caixa mutada (de 5'-CACCTG-3' a 5'-AACCTA-3). Es van utilitzar sondes biotinilades, obtingudes per amplificació per PCR, del fragment -735/+1077 del promotor de *LEF1* per a fer un assaig de *pull down* amb proteïna recombinant GST-Snail. Posteriorment es va analitzar el Snail coprecipitat per western blot. **B:** *Snail* activa el promotor de *LEF1* que té la caixa E mutada. Cèl·lules RWP1 van ser co-transfectades amb 100 ng de promotor de *LEF1* amb la caixa E wt o mutada, 5 ng de pRL-TK i 5 ng de Snail o pcDNA3. L'activitat luciferasa s'analitzava 48 hores post-transfecció i era estimada com la relació entre unitats de luciferasa del promotor problema (RLU firefly) i les del promotor control (RLU Renilla): RLU firefly/ RLU Renilla. L'activitat Luc era expressada com l'increment de l'activitat trobada en cèl·lules transfectades amb Snail respecte l'activitat obtinguda en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard.

3.L'E-Cadherina inhibeix l'activació de gens mesenquimals mediada per Snail.

Ja que la unió de Snail a les caixes E dels promotors no pot explicar l'activació transcripcional, l'activació de gens mesenquimals mitjançada per Snail podria ser deguda a una conseqüència de la repressió que realitza Snail sobre l'expressió de l'E-Cadherina.

3.1. L'activació de Fibronectina i la repressió de l'E-Cadherina provocades per Snail, són concomitants.

Si la repressió de l'E-Cadherina desencadenava l'activació gènica, calia que la repressió fos prèvia o concomitant a l'activació. Per comprovar-ho, es va realitzar un assaig de time-course d'expressió de Snail, utilitzant la tècnica del *tet/off*, en cèl·lules epitelials que formen contactes madurs entre elles i que tenen molt poca expressió de Snail endògen. La línia cel·lular utilitzada en aquest estudi prové de la transfecció estable de Snail en una línia cel·lular parental anomenada HT-29 M6. Com les altres línies presentades, aquestes cèl·lules quan expressen establement Snail deixaven de formar colònies i el mostraven un aspecte més allargat (*scattering*). Els clons HT-29 M6 transfectats amb el sistema tet-off poden recuperar el seu fenotip epitelial a l'afegir al medi de cultiu un anàleg de la tetraciclina anomenat doxiciclina, el qual evita l'expressió de Snail (Batlle et al., 2000). Així, després de 20 dies de

tractament les cèl·lules mostraven nivells elevats de RNA d'E-Cadherina, mentre que els nivells de RNA de Fibronectina eren molt baixos (Fig. R4) en comparació a cèl·lules que havien estat 20 dies sense antibiòtic. Per a la realització del *time-course* es va apagar l'expressió de Snail en aquestes cèl·lules mitjançant un tractament amb doxiciclina. Així, se'ls va anar afegint doxiciclina al medi cada dos dies i observàvem que, a mida que s'anava apagant l'expressió de Snail s'indueïa l'expressió d'E-Cadherina i els nivells de RNA de Fibronectina disminuïen (Fig. R4). La reversió entre els nivells de mRNA de Fibronectina i E-Cadherina després de 6 dies de tractament amb doxiciclina eren concomitants, suggerint que els dos esdeveniments podrien estar relacionats. Resultats similars es van obtenir amb LEF1 (dades no mostrades).

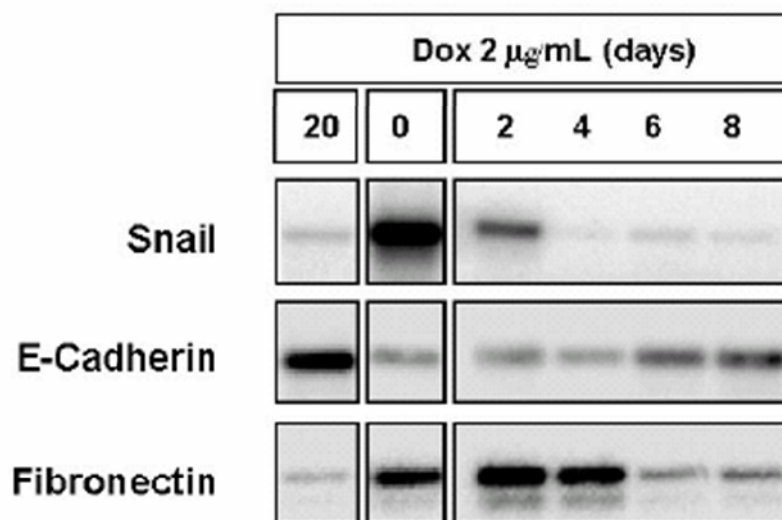


Figura R4. La repressió d'E-Cadherina i l'activació de Fibronectina són concomitants. Els gens indicats van ser analitzats per RT-PCR/Southern blot a partir de cèl·lules HT29-M6 que expressaven establement Snail sota el control d'un sistema "Tet off". A dia zero, s'afegia al medi 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de doxiciclina, el medi es canviava cada dos dies. Als dies indicats s'extreia mRNA i els gens eren analitzats per RT-PCR seguit de Southern blot.

3.2. L'expressió d'E-Cadherina reprimeix la inducció de l'expressió de Fibronectina i LEF1 mitjançada per Snail.

Els resultats anteriors suggerien que la repressió de l'E-Cadherina i l'activació de l'expressió de Fibronectina podrien estar relacionats. Per determinar la rellevància de l'E-Cadherina vam sobreexpressar-la i vam analitzar els nivells de RNA de Fibronectina i LEF1 en cèl·lules SW480-ADH que, quan creixen a baixa confluència, expressen nivells baixos d'E-Cadherina i formen pocs contactes amb les cèl·lules veïnes. Vam utilitzar clons amb sobreexpressió ectòpica de Snail, E-Cadherina o ambdós alhora, que vam obtenir del laboratori del Dr. Muñoz del centre Alberto Sols de Madrid. En aquestes cèl·lules els nivells de proteïna d'E-Cadherina eren molt superiors a les cèl·lules SW480 control (Fig. R5A). Tal com hem mostrat en la Figura 1B, les cèl·lules que expressaven Snail mostraven un augment en els nivells de RNA de Fibronectina i LEF1 respecte a les cèl·lules control. L'expressió estable d'E-Cadherina provocava una important reducció de la quantitat de RNA de Fibronectina i LEF1, tant en les cèl·lules control com les que expressaven Snail (Fig. R5B). E-Cadherina i Snail no modificaven però, l'expressió d'un gen control (HPRT) que es va utilitzar per a normalitzar les dades obtingudes. Per confirmar que la disminució de l'expressió de Fibronectina i LEF1 era deguda a una disminució de la transcripció, es van transfectar aquests mateixos clons Snail amb el promotor de Fibronectina o promotor de LEF1. De la mateixa manera que en els nivells de mRNA, les cèl·lules que expressaven establement Snail presentaven major activitat de promotor de Fibronectina i LEF1 que les

cèl·lules control. Quan les cèl·lules expressaven E-Cadherina, tant si eren controls com si expressaven Snail, l'activitat luciferasa depenent dels dos promotors disminuïa dràsticament (Fig. R5C), indicant que l'efecte de l'E-Cadherina també era, almenys en gran part, sobre la transcripció.

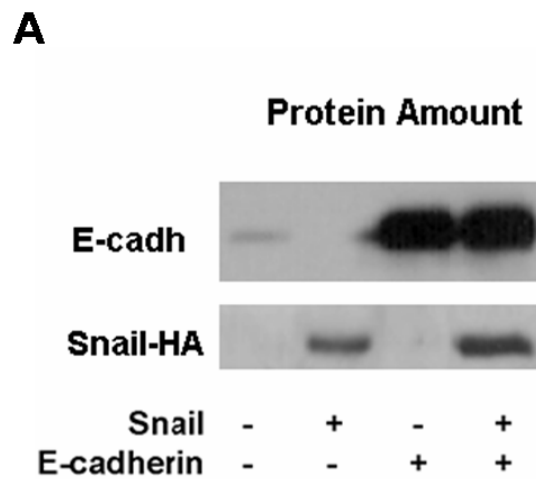


Figura R5. L'expressió de E-Cadherina regula a la baixa els nivells de Fibronectina i LEF1. A: Nivells de proteïna d'E-Cadherina i Snail en els cèl·lules SW480-ADH que expressaven establement Snail. Es va realitzar un Western blot amb anti E-Cadherina i anti HA, a partir d'extractes proteics totals de cèl·lules SW480 Control, Snail, E-Cadherina/Snail i E-Cadherina.

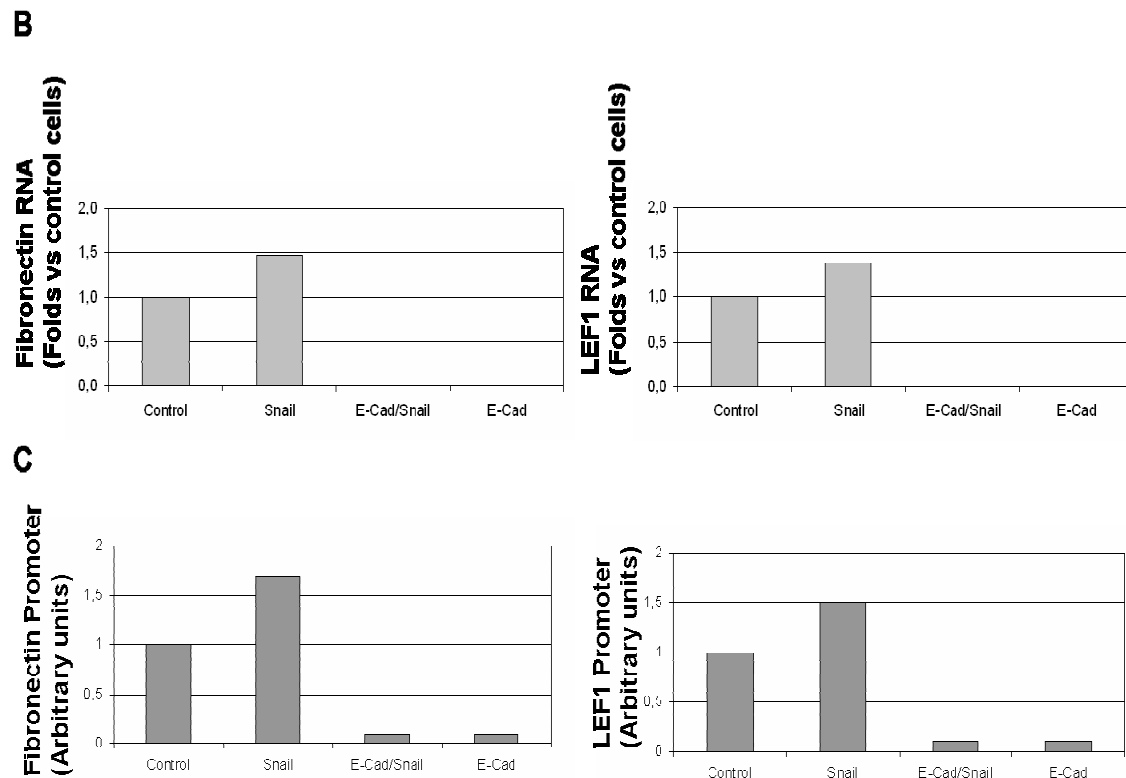


Figura R5. L'expressió de E-Cadherina regula a la baixa els nivells de Fibronectina i LEF1. B: Nivells de mRNA de Fibronectina i LEF1 en els cèl·lules SW480-ADH. Es va extreure RNA de cèl·lules SW480 control o que expressaven Snail, E-Cadherina o E-Cadherina-Snail i es van analitzar per RT-PCR quantitativa amb oligonucleòtids específics pels gens indicats. Els nivells de RNA eren normalitzats pels nivells d'expressió d'un RNA control, ciclofilina A, i expressats com l'increment respecte als valors detectats en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a un experiment representatiu on cada valor s'ha analitzat per triplicat. La desviació estàndard no superava el 5% en cap cas. **C:** Activitat de promotor de Fibronectina i LEF1 en els cèl·lules SW480-ADH. Cèl·lules SW480 control o que expressaven Snail, E-Cadherina o E-Cadherina-Snail van ser co-transfectades amb 100 ng promotor de Fibronectina clonat en PXP2, 150 ng de promotor de LEF1 clonat en PGL3 i 1 ng de pRL-SV40. L'activitat luciferasa s'analitzava 48 hores post-transfecció i era estimada com la relació entre unitats de luciferasa del promotor problema (RLU firefly) i les del promotor control (RLU Renilla): RLU firefly/ RLU Renilla. L'activitat Luc era expressada com a l'increment de l'activitat trobada en cèl·lules transfectades amb Snail respecte l'activitat obtinguda en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. La desviació estàndard no superava el 5% en cap cas.

3.3. En absència d'E-Cadherina Snail encara pot activar

l'expressió de Fibronectina i LEF1.

Ja que la presència d'E-cadherina reprimeix l'expressió de Fibronectina i LEF1 que indueix Snail, vam voler saber si la repressió de l'E-Cadherina era suficient per a explicar l'activació gènica induïda per Snail. Si la baixada d'E-Cadherina fos suficient per reproduir els efectes activadors de Snail, aquest repressor seria incapaç d'activar gens en cèl·lules sense E-Cadherina. En canvi, si Snail, a més de reprimir E-Cadherina, actués sobre algun altre factor, podria activar Fibronectina i LEF1. Així, es van transfectar Snail en cèl·lules LS174T, una línia cel·lular, provinent de carcinoma de còlon humà, on l'E-Cadherina està mutada i per tant, no és funcional (Efstathiou et al., 1999). A l'analitzar els nivells de RNA de Fibronectina i LEF1 en cèl·lules LS174T que expressaven establement Snail vam observar que aquestes mostraven majors nivells de RNA de Fibronectina i LEF1 que les cèl·lules control (Fig. R6).

Per tant, aquest resultat ens van fer pensar, tot i que la repressió de l'E-Cadherina és necessària, hi ha altres factors, que Snail activa amb independència de l'E-Cadherina, que hi estan intervenint. Una possible explicació seria que l'E-Cadherina inactivés aquets factors que d'alguna manera Snail posa en funcionament per a incrementar l'activació de gens mesenquimals.

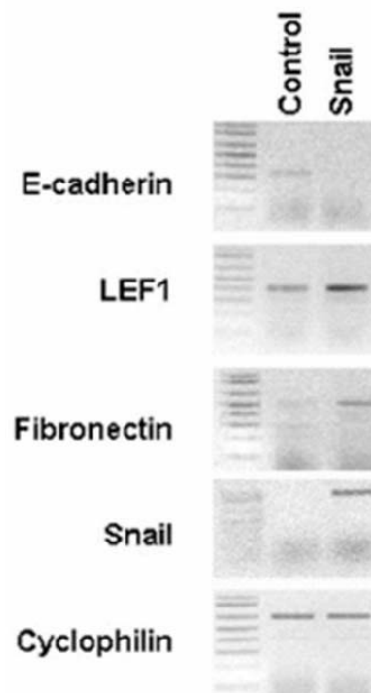


Figura R6. L'expressió de Snail incrementa els nivells de RNA de Fibronectina i LEF1 en cèl·lules SW480 LS174T que no tenen E-Cadherina funcional. Es va extreure RNA de cèl·lules LS174T que expressaven establement Snail o el vector buit i es van analitzar per RT-PCR amb oligonucleòtids específics pels gens indicats.

4. L'efecte inhibidor de l'E-Cadherina depèn de la β -Catenina.

Com hem vist en els apartats anteriors, l'E-Cadherina impedeix l'activació de gens mesenquimals induïda per Snail. La disminució de la quantitat de l'E-Cadherina a la cèl·lula porta a la disrupció dels contactes adherents i, com a conseqüència, a l'alliberació de components dels contactes, com la β -Catenina,

al citosol. En condicions no patològiques aquest pool de β -Catenina citoplasmàtica és ràpidament degradada per complex APC-GSK3 β -Axina2, però en situacions en que la ruta de senyalització WNT està activada, o quan l'APC està mutada (aquesta mutació s'ha detectat en el 85% dels tumors de còlon humans), la β -Catenina no es degrada i pot anar al nucli de la cèl·lula on exerceix de coactivador transcripcional. La concentració elevada de β -Catenina nuclear s'ha relacionat amb els fronts de migració (Brabletz et al., 2005b; Brabletz et al., 2005a) on les cèl·lules han patit una EMT. Per tant, la repressió de l'E-Cadherina mitjançada per Snail podria estar augmentant els nivells nuclears de la β -Catenina i propiciant el seu rol com a coactivador transcripcional.

Un altre factor de transcripció que podria estar implicat en l'activació de gens mesenquimals per Snail i relacionat amb la inhibició de l'expressió de l'E-Cadherina podria ser NF κ B. Estudis anteriors han demostrat que la pèrdua d'E-Cadherina provoca un augment en l'activitat transcripcional mediada per NF κ B (Kuphal et al., 2004; Kuphal and Bosserhoff, 2006), tot i que el mecanisme molecular no està encara tant estudiat com en el cas de la β -Catenina. S'ha descrit que l'activitat NF κ B està lligada a varis processos entre els quals s'inclou la progressió tumoral, la proliferació, la migració i metàstasi. Per tant, també pot ser un bon candidat per a mediar l'efecte de Snail.

4.1. Snail disminueix la quantitat de β -Catenina associada a E-Cadherina.

Per esbrinar si la β -Catenina podria intervenir en l'activació de Fibronectina i LEF1, es va analitzar si l'expressió de Snail canviava la relació de β -Catenina lliure/unida a l'E-Cadherina. Amb aquest objectiu es va realitzar una immunoprecipitació en cèl·lules MDCK que expressaven establement Snail, extractes proteics totals obtinguts amb RIPA es van incubar amb anti β -Catenina i es va analitzar la quantitat d'E-Cadherina que s'havia immunoprecipitat. Tal com mostra la Figura R7, als clons Sna1 i Sna2 que expressen establement Snail es detectava menys E-Cadherina unida a β -Catenina que a les cèl·lules control. Aquesta disminució era deguda probablement a que l'expressió de Snail provocava una davallada important en els nivells de proteïna d'E-Cadherina, tal com s'havia descrit i es reflexa en els Inputs. Com que els nivells totals de β -Catenina no disminueixen en les cèl·lules amb expressió de Snail, podem concloure que l'expressió de Snail augmenta la quantitat de β -Catenina dissociada d'E-Cadherina.

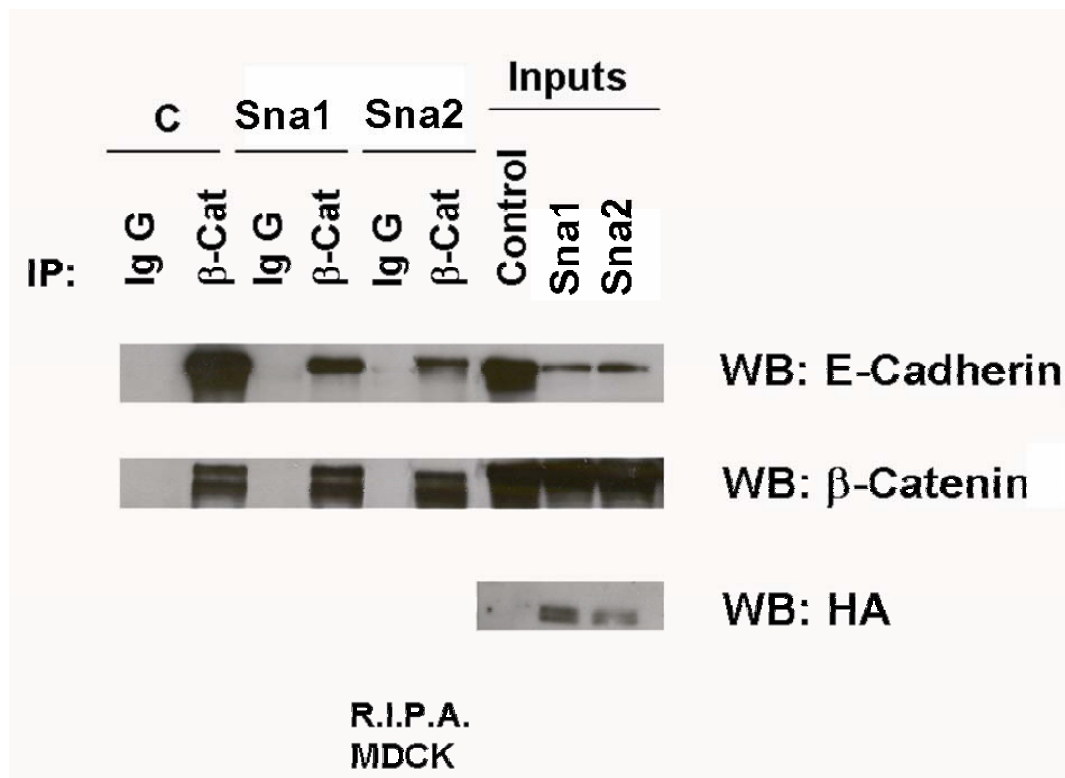


Figura R7. En presència de Snail hi ha menys E-Cadherina unida a β -Catenina. Es van obtenir extractes proteics amb RIPA de cèl·lules MDCK control o que expressaven Snail (Sna1 i Sna2) i es van incubar amb anti β -Catenina. Els immunoprecipitats es van resoldre per SDS-PAGE i es van analitzar els nivells d'E-Cadherina, β -Catenina i Snail (HA) per Western blot.

4.2. Snail activa la transcripció mitjançada per β -Catenina i

TCF4.

Ja que en presència de Snail disminueix la quantitat d'E-Cadherina unida a β -Catenina esperem que augmentin els nivells de β -Catenina citosòlica i/o

nuclear. Es va voler comprovar la transfecció de Snail augmentava la quantitat de β -Catenina al nucli amb capacitat d'activar la transcripció. Amb aquesta finalitat es van transfectar cèl·lules RWP1, que expressaven Snail de forma transitòria, i cèl·lules SW480 que expressaven establement Snail, amb el plàsmid reporter TOP que és sensible a l'activitat transcripcional dependent de β -Catenina/TCF. Aquest reporter consta del gen de la luciferasa sota la regulació d'una zona promotora mínima obtinguda del promotor de c-fos precedida de quatre llocs d'unió a TCF4. El constructe TOP s'activava per Snail de manera dosi dependent (Fig. R8) indicant que en presència de Snail hi ha més β -Catenina amb capacitat d'exercir una funció coactivadora transcripcional. Resultats similars es van obtenir en altres línies cel·lulars com LoVo i HT29 M6 (dades no mostrades).

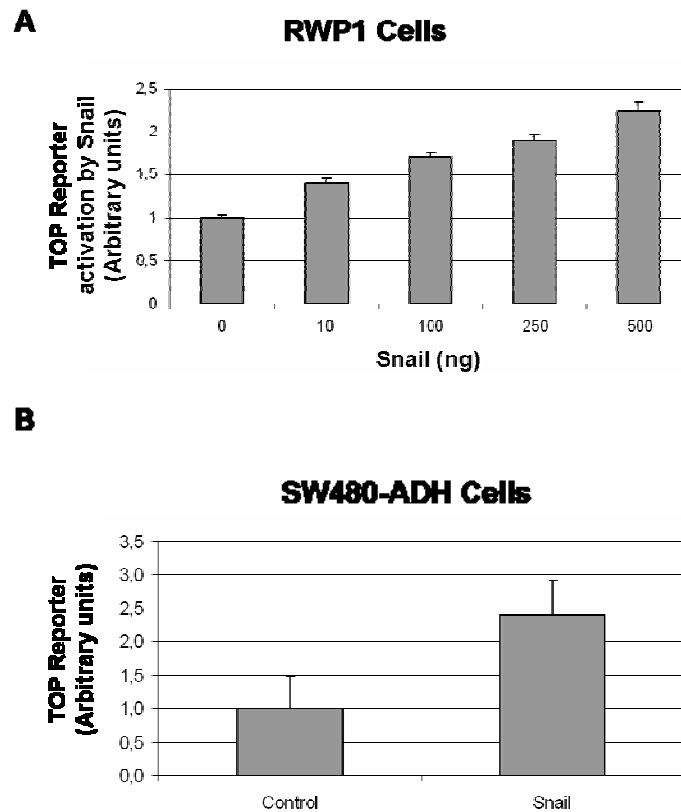


Figura R8. Snail activa la transcripció mitjançada per β -Catenina i TCF4. A: *Activació del reporter TOP per Snail en cèl·lules RWP1.* Cèl·lules RWP1 van ser co-transfectades amb 50 ng promotor del promotor sintètic TOP, quantitats creixents (10, 100, 250 i 500 ng) de Snail o el vector pcDNA3 buit com a control i 1 ng de pRL-SV40. L'activitat luciferasa s'analitzava 48 hores post-transfecció i era estimada com la relació entre unitats de luciferasa del promotor problema (RLU firefly/ RLU Renilla): RLU firefly/ RLU Renilla. L'activitat Luc era expressada com l'increment de l'activitat trobada en cèl·lules transfectades amb Snail respecte l'activitat obtinguda en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error mostren la desviació estàndard. **B:** *Activació del reporter TOP per Snail en cèl·lules SW480.* Cèl·lules SW480 Control i que expressaven establement Snail van ser transfectades amb 50 ng promotor del promotor sintètic TOP i 1 ng de pRL-SV40. Els resultats van ser obtinguts i expressats com a (A).

4.3. L'activació de la transcripció mitjançada per β -Catenina/TCF4 correlaciona amb els mutants de Snail que conserven l'activitat repressora.

Per a que la β -Catenina s'alliberi al citoplasma, es transloqui al nucli i pugui actuar com a activador transcripcional seria necessària la repressió de l'E-Cadherina provocada per Snail. Per confirmar-ho, es van transfectar cèl·lules RWP1 amb diferents mutants de Snail, amb diferent activitat repressora, i es va analitzar l'activació del promotor sintètic TOP (Fig. R9A). Els mutants de Snail P2A (amb el domini SNAG mutat), el Delta 7 (li manca el domini SNAG) i el Delta 28 (li manca l'últim dit de zinc) que no conserven l'activitat repressora (Batlle et al., 2000) (senyalats a la Fig. R9 com a -); no tenen la capacitat d'activar el TOP. En canvi, Snail WT i els mutants LA (sense la seqüència d'export), SA (Serines-a-Alanines) que conserven la capacitat repressora (Dominguez et al., 2003) (senyalats a la Fig. R9 com a +), indueixen l'activitat del reporter TOP. Per tant, d'acord amb els resultat previs, Snail necessitava de la seva capacitat repressora per a poder activar la transcripció mediada per β -Catenina.

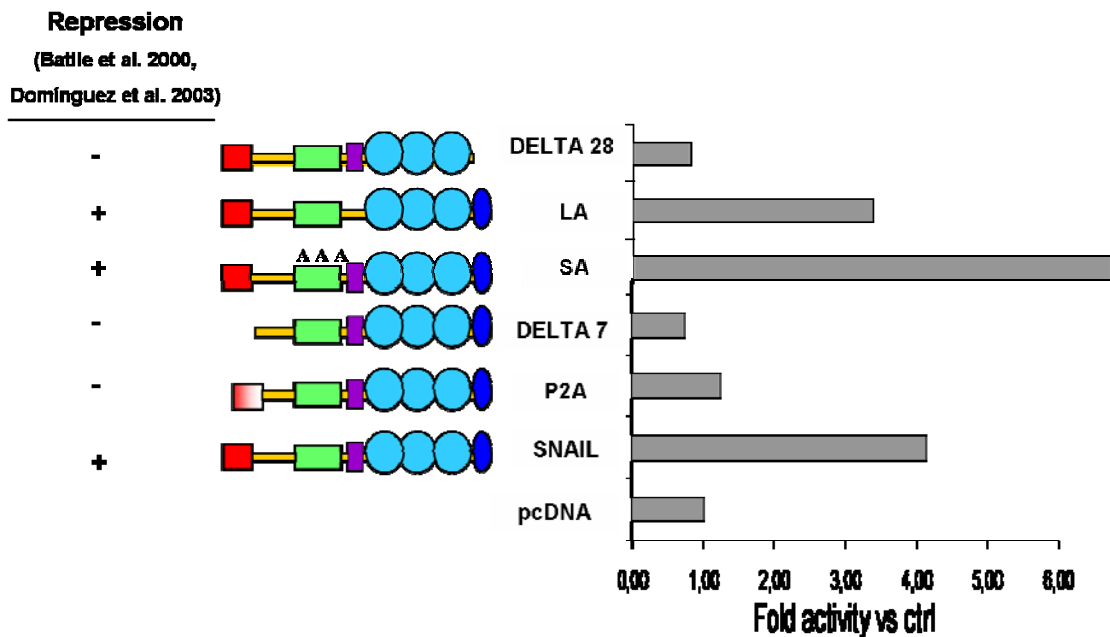


Figura R9. Els mutants de Snail sense activitat repressora no incrementen la transcripció mitjançada per β -Catenina/TCF4. Cèl·lules RWP1 es van co-transfectar amb 50 ng del promotor sintètic TOP, 5 ng de Snail WT, Snail P2A, Snail Delta 7, Snail SA, Snail LA, Snail Delta 28 o el vector pcDNA3 buit com a control i 1 ng de pRL-SV40. L'activitat luciferasa s'analitzava 48 hores post-transfecció i era estimada com la relació entre unitats de luciferasa del promotor problema (RLU firefly) i les del promotor control (RLU Renilla): RLU firefly/ RLU Renilla. L'activitat Luc era expressada com l'increment de l'activitat trobada en cèl·lules transfectades amb Snail respecte l'activitat obtinguda en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. La desviació estàndard no superava el 5% en cap cas.

4.4. L'expressió de Snail provoca la localització nuclear de β -Catenina.

Si Snail activa la transcripció mitjançada per β -Catenina esperàriem que Snail induís la localització nuclear d'aquesta proteïna. Amb aquest objectiu es van realitzar immunofluorescències en els clons SW480-ADH que expressaven

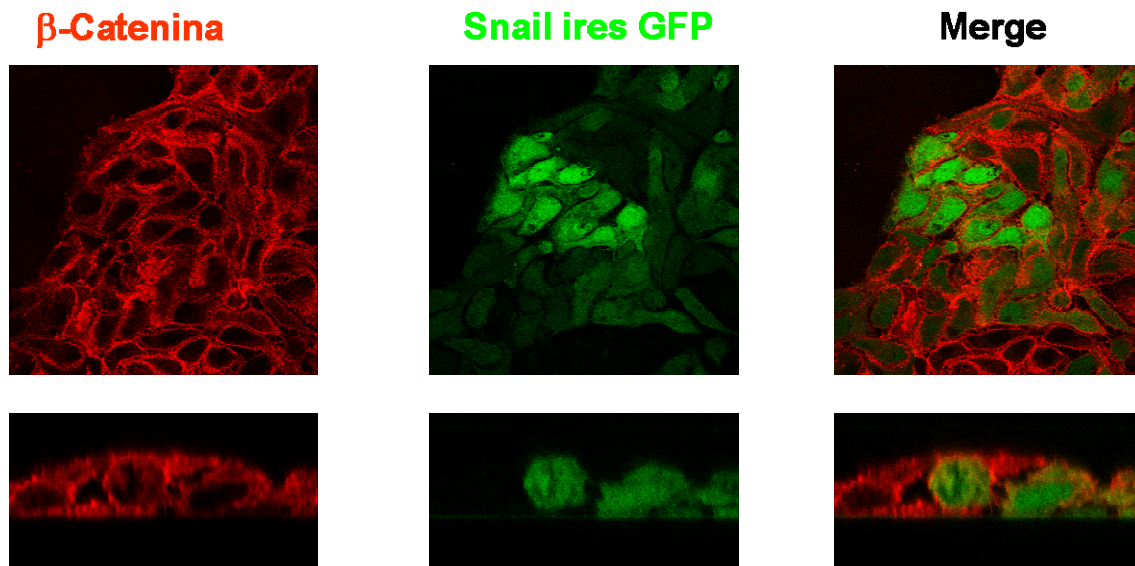
establement Snail. Cal recordar que aquets clons es van obtenir transfectant el plàsmid pSnail-IRES-hrGFP-2a, i seleccionant les cèl·lules verdes per FACS. S'obtenien doncs, cèl·lules verdes que expressaven Snail amb algunes colònies no verdes contaminants que vam utilitzar com a control. Es va immunodetectar la β -Catenina mitjançant un anticòs monoclonal i es va comparar la seva distribució en cèl·lules que expressaven Snail i les que no. Les cèl·lules que no eren verdes presentaven els nuclis buits de β -Catenina mentre que en les cèl·lules que expressaven Snail, i per tant eren verdes; detectàvem un tènue marcatge de β -Catenina al nucli (Fig. R10). Tot i que el marcatge nuclear de la β -Catenina era feble, es pot concluir que Snail indueix un increment de la quantitat de β -Catenina localitzada al nucli de la cèl·lula, ja que la quantitat de β -Catenina nuclear transcripcionalment activa està, sovint, en el límit de detecció per immnufluorescència.



Figura R10. L'expressió de Snail provoca la localització nuclear de β -Catenina. Cèl·lules SW480-ADH que expressaven establement pSnail-IRES-hrGFP-2a (de color verd) i cèl·lules no transfectades, es van fixar amb PFA al 4% i es va immunodetectar β -Catenina (Vermell). Les imatges corresponen a una secció de $1\mu\text{m}$ obtinguda per microscòpia confocal.

4.5. L'E-Cadherina segresta a la β -Catenina als contactes cèl·lula-cèl·lula, indiferentment de si les cèl·lules expressen Snail o no.

Per confirmar si l'expressió d'E-Cadherina impedia l'efecte de Snail retenint la β -Catenina al contactes, es van realitzar immunofluorescències en clons SW480-ADH que expressaven establement Snail i E-Cadherina. Es va immunodetectar la β -Catenina mitjançant un anticòs monoclonal i es va comparar la seva distribució en cèl·lules que expressaven Snail (verdes) i les que no n'expressaven (no verdes). Totes les cèl·lules, tant si expressaven Snail com si no, presentaven els nuclis buits de β -Catenina, aquesta es localitzava als contactes (Fig. R11). És a dir, l'E-Cadherina retenia a la β -Catenina als contactes cèl·lula-cèl·lula impedint, probablement, l'acció transcripcional de la β -Catenina.



SW480-ADH E-Cad/Snail

Figura R11. L'expressió d'E-cadherina provoca un segrestament de la β -Catenina als contactes cèl·lula-cèl·lula. Cèl·lules SW480-ADH transfectades establement amb E-Cadherina (pBATEM2) i pSnail-IRES-hrGFP-2a (de color verd), es van fixar amb PFA al 4% i es va immunodetectar β -Catenina (Vermell). Les imatges corresponen a una secció de $1\mu\text{m}$ obtinguda per microscòpia confocal.

4.6. La β -Catenina és necessària per a l'activació de Fibronectina i LEF1 provocada per Snail.

Sabent que la repressió de l'E-Cadherina per Snail provocava: 1) La disminució de la β -catenina unida a l'E-Cadherina, 2) La translocació al nucli de la β -Catenina i 3) L'increment de la transcripció mitjançada per β -Catenina/TCF4. Es va voler determinar si la β -Catenina era realment necessària per a l'activació de gens mesenquimals. Amb aquesta finalitat, es van portar a terme

experiments on es va depleccionar la β -Catenina cel·lular o bé per expressió d'un RNAi específic o per expressió d'APC.

Primerament, es va analitzar l'activació dels promotors mesenquimals en presència d'APC. Així, es van co-transfectar cèl·lules RWP1, que ja havíem demostrat que eren sensibles a Snail i que es transfecten molt bé, amb promotor de LEF1 o Fibronectina, i el cDNA d'APC, proteïna que provoca la degradació via proteasoma de la β -Catenina. Per a comprovar la funcionalitat de l'APC, vam comprovar els efectes de la transfecció del cDNA d'APC sobre l'activitat del reporter TOP. Tal com mostra la figura R12A, l'expressió d'APC feia disminuir dràsticament l'activitat transcripcional mediada per β -Catenina/TCF, per tant, era funcional. La transfecció d'APC provocava una davallada de l'activació del promotor de LEF1 i de Fibronectina per Snail (Fig. R12B). Aquests resultats suggerien que la degradació de la β -Catenina, provocada per la transfecció amb APC, evitava l'activació d'aquets dos promotors per Snail.

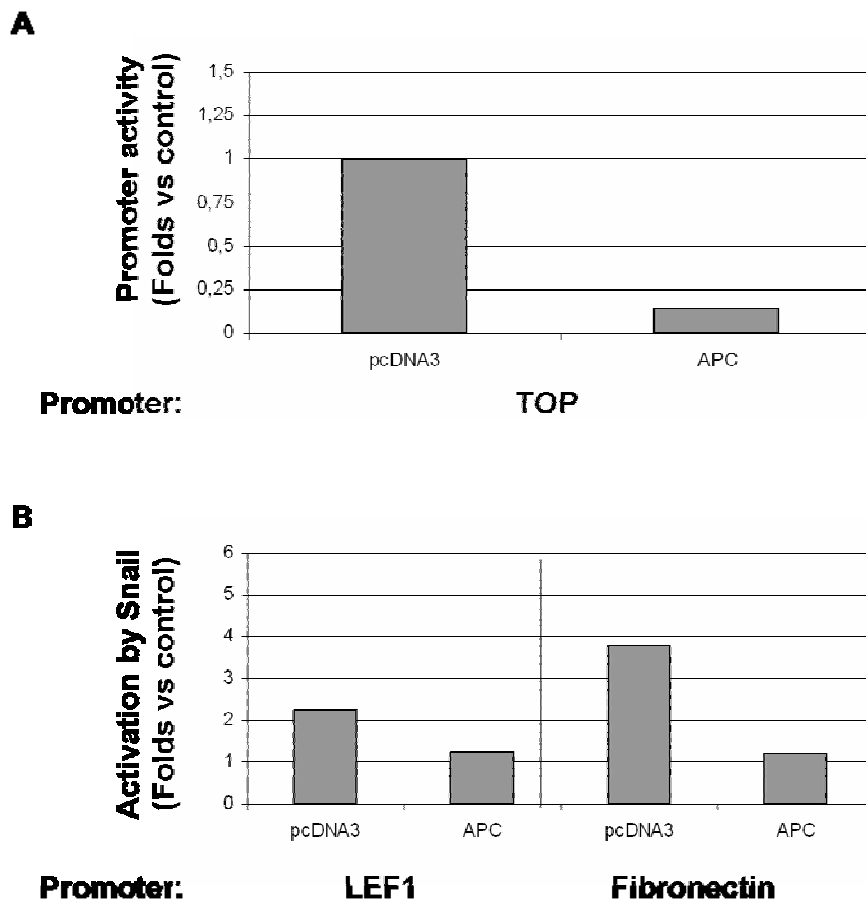


Figura R12. APC elimina l'activació de Fibronectina i LEF1 mitjançada per Snail. A: *Repressió de l'activitat del reporter TOP per APC.* Es van co-transfectar cèl·lules RWP1 amb 25 ng de reporter TOP, 250 ng de pcDNA3 buit com a control o que incloïa cDNA d'APC i 1 ng de pRL-SV40. L'activitat luciferasa s'analitzava 48 hores post-transfecció i era estimada com la relació entre unitats de luciferasa del promotor problema (RLU firefly) i les del promotor control (RLU Renilla): RLU firefly/ RLU Renilla. L'activitat Luc era expressada com a l'increment de l'activitat trobada en cèl·lules transfectades amb Snail respecte l'activitat obtinguda en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. La desviació estàndard no va superar el 5% en cap cas. **B:** *Efecte d'APC sobre l'activació dels promotors de Fibronectina i LEF1 per Snail.* Es van co-transfectar cèl·lules RWP1 amb 100 ng de promotor de PGL3-LEF1 o PGL3-Fibronectina, 250 ng de pcDNA3 buit o que incloïa cDNA d'APC, 25 ng de pcDNA3 Snail SA o pcDNA3 buit i 1 ng de pRL-SV40. Els resultats obtinguts van ser obtinguts i expressats com en (A).

Per verificar si la sensibilitat a l'APC de l'activació de Fibronectina i LEF era dependent de la β -Catenina, es van mesurar els nivells de RNA de LEF1 i Fibronectina en cèl·lules que expressaven Snail i que es podia apagar l'expressió de β -Catenina. Vam aprofitar que les cèl·lules LS174T són sensibles a Snail (Fig.R6 i R13A) i l'existència d'uns clons on l'expressió del siRNA de β -Catenina s'activava quan s'afegia doxiciclina al medi (van de et al., 2003c; van de et al., 2002b). Aquets clons es van transfectar amb Snail i estan caracteritzats a la Figura R13B. A l'afegir doxiciclina al medi, els clons transfectats amb el siRNA de β -Catenina, mostraven nivells de proteïna de β -Catenina inferiors a les cèl·lules no tractades amb doxiciclina. En canvi, en els clons control no s'observava la davallada de β -Catenina.

La depleció de la β -Catenina feia disminuir els nivells de RNA de Fibronectina i LEF1 dels clons que expressaven establement Snail, indicant que el mecanisme que media l'activació de Fibronectina necessita β -Catenina (Fig. R13C). Per descartar un possible efecte inespecífic de l'addició de Doxiciclina es van determinar, com a control, els nivells de RNA de Fibronectina i LEF1 en clons que no expressaven el siRNA de β -Catenina. Apart, com a control de la funcionalitat del siRNA de β -Catenina es van determinar el nivells de RNA de c-myc, que s'ha descrit que és sensible a la β -Catenina en diferents treballs, els nivells d'aquest també disminuïen.

Per tant, es necessitava β -Catenina per a l'activació de Fibronectina i LEF1 induïda per Snail.

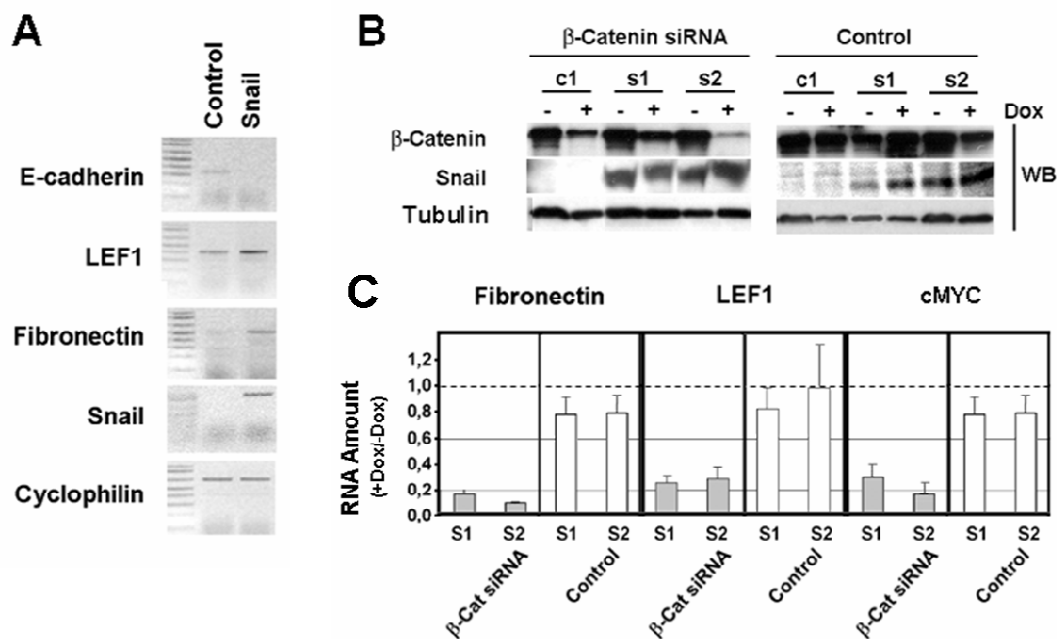


Figura R13. El siRNA de β -Catenina elimina l'activació de Fibronectina i LEF1 induïdes per Snail. **A:** *Snail* indueix l'expressió de *Fibronectina* i *LEF1* i la repressió de l'*E-Cadherina* en cèl·lules LS174T. Es va extreure RNA de cèl·lules LS174T que expressaven establement *Snail* o el vector buit i es van analitzar per RT-PCR amb oligonucleòtids específics pels gens indicats. **B:** *Caracterització dels clons LS174T siRNA β -Catenina tet/on +/- Snail.* Els clons van créixer en medi +/- Doxiciclina (1 μ g/m) durant 6 dies. Passat aquest temps es van obtenir extractes proteics totals amb tampó de lisi 1%SDS i es van analitzar els nivells de proteïna de *Snail*, β -Catenina i tubulina per Western blot. **C:** *L'expressió del siRNA de β -Catenina afecta als nivells de mRNA de *Fibronectina* i *LEF1* en clons LS174T siRNA β -Catenina tet/on Snail.* Els gens indicats van ser analitzats per RT-PCR quantitativa a partir de RNA de clons d'LS174T siRNA β -Catenina tet/on que expressaven *Snail*, en absència o presència de Doxiciclina. Els nivells de RNA eren normalitzats pels nivells d'expressió d'un RNA control, HPRT, i expressats com l'increment respecte als valors detectats en cèl·lules crescudes en medi sense doxiciclina. Els resultats mostrats corresponen a un experiment representatiu on cada valor s'ha analitzat per triplicat. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard. Es mostren els resultats obtinguts en dos clons representatius per cada tipus cel·lular: siRNA i β -Catenina control. Com a control de la funcionalitat del siRNA de β -Catenina es van analitzar també els nivells de mRNA de c-myc.

5. La β -Catenina pot unir-se al promotor de Fibronectina.

Després de constatar que la β -Catenina era requerida per a l'activació de l'expressió de Fibronectina i LEF1, vam voler determinar si la β -Catenina tenia la capacitat d'unir-se als promotors dels gens que activava. La β -Catenina per si sola no pot interaccionar amb el DNA, necessita de l'ajuda de coactivadors com són els factors de transcripció de la família TCF (Bienz and Clevers, 2000) o SOX (Sinner et al., 2004).

5.1. La β -Catenina pot interaccionar amb el promotor de Fibronectina. Aquesta interacció està regulada per l'E-Cadherina.

Primerament es va voler verificar que la β -Catenina formava part d'un complex proteic que interaccionava "in vivo" amb els promotors dels gens estudiats. Per això, es va realitzar un assaig CHIP (de les sigles en anglès Chromatin Immunoprecipitation) a partir d'extractes de clons de SW480-ADH i LS174T que expressaven establement Snail. Es va realitzar una PCR amb els immunoprecipitats obtinguts amb l'incubació dels lisats amb anti β -Catenina o amb IgG de ratolí com a control. Es va detectar que el fragment +39/-265 del promotor de Fibronectina, i no un fragment control de mida similar situat a -2kb

de l'inici de transcripció del mateix promotor coprecipitava específicament amb β -Catenina (Fig. R14A). Resultats similars es van obtenir amb extractes de cèl·lules LS174T que també expressaven establement Snail (Fig. R14B). Per tant, en totes dues línies cel·lulars Snail induïa la formació d'un complex "in vivo", que contenia β -Catenina i el promotor proximal de Fibronectina.

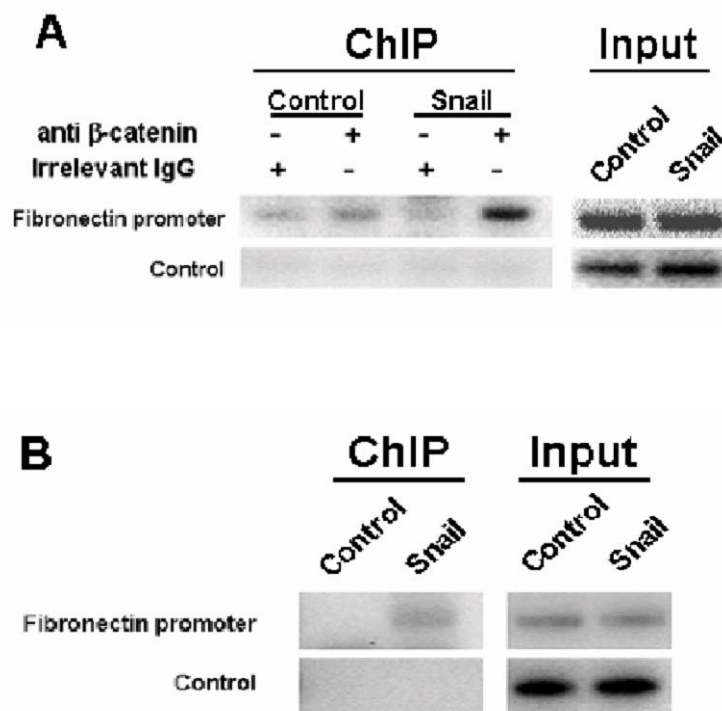


Figura R14. β -Catenina s'uneix al promotor de Fibronectina. **A:** β -Catenina s'uneix al promotor de Fibronectina en cèl·lules SW480-ADH. Cèl·lules SW480-ADH que expressaven establement Snail es van utilitzar per a realitzar un assaig CHIP. Es va immunoprecipitar amb un anticòs monoclonal anti β -Catenina o amb IgG de ratolí com a anticòs irrelevant i es va realitzar una PCR amb primers que corresponien als fragments +39/-265 i -2kb del promotor de Fibronectina. **B:** β -Catenina s'uneix al promotor de Fibronectina en cèl·lules LS174T. L'assaig es va realitzar com a (A).

L'expressió d'E-Cadherina en els clons SW480-ADH que expressaven Snail anul·lava aquesta interacció. Es va realitzar un altre assaig de CHIP en cèl·lules SW480-ADH control, Snail, E-Cadherina i E-Cadherina/Snail. A les cèl·lules que expressaven Snail es detectava més promotor de Fibronectina a l'immunoprecipitat amb anti β -Catenina que a les cèl·lules control. A les cèl·lules que havien estat transfectades amb E-Cadherina deixava de detectar-se el mateix fragment de promotor de Fibronectina (Fig. 15).

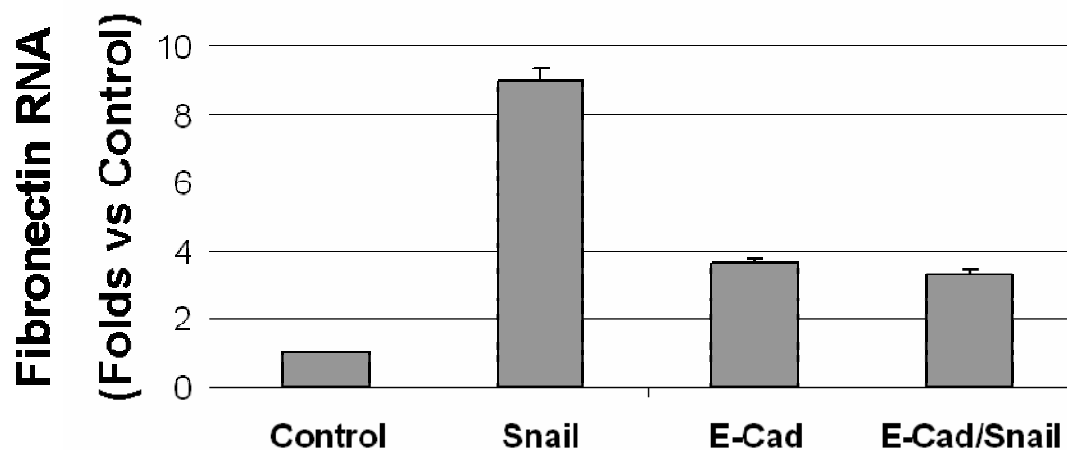


Figura R15: β -Catenina interacciona amb el promotor de Fibronectina, Snail i E-Cadherina modulen aquesta interacció. Cèl·lules SW480-ADH que expressaven establiment Snail, E-Cadherina o E-Cadherina/Snail es van utilitzar per a realitzar un assaig CHIP. Es va immunoprecipitar amb un anticòs monoclonal anti β -Catenina o amb Ig G de ratolí com a anticòs irrellevant i es va realitzar una PCR quantitativa amb primers que corresponien als fragments +105/-255 i -2kb del promotor de Fibronectina. Els nivells de RNA eren normalitzats pels nivells d'expressió d'un RNA control, HPRT, i expressats com a increment respecte als valors detectats en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a un experiment representatiu on cada valor s'ha analitzat per triplicat. Les barres d'error representen a desviació estàndard.

5.2. El factor de transcripció TCF no són necessaris per a l'activació de gens mesenquimals mitjançada per Snail.

Ja que β -Catenina no s'uneix directament al DNA, es va analitzar si membres de la família TCF, els *partners* clàssics de β -Catenina, podrien exercir de proteïna pont com succeeix en un gran nombre de gens activats per β -Catenina. Per a saber si els promotors de Fibronectina i LEF1 eren susceptibles a ser activats per aquest complex β -Catenina/TCF, primerament es van analitzar les seqüències d'ambdós promotors per tal de determinar possibles llocs d'unió pels membres de la família TCF. Mentre que el promotor de LEF1 presentava dos llocs d'unió consens que havien estat demostrats com a funcionals (Hovanes et al., 2000), el promotor de Fibronectina, en canvi, en tenia un que no s'ajustava exactament a la seqüència consens, i que assajos realitzats pel nostre grup, havien demostrat que no era funcional (Fig. R16A).

Per comprovar si els promotors clonats eren sensibles a l'activitat β -Catenina/TCF, es van realitzar una sèrie d'assaigs reporter utilitzant un dominant positiu de TCF: el VP16-TCF4 i també un dominant negatiu: el Δ TCF4. El constructe VP16-TCF4 consta del cDNA de TCF4 fusionat al domini d'activació VP16, mentre que el Δ TCF4 consta del cDNA de TCF4 al qual li manca el domini d'unió a β -Catenina. Tal com mostra la figura 16B, el reporter TOP, que té 4 llocs d'unió a TCF, era activat unes 8 vegades pel dominant positiu VP16-TCF4 i reprimat pel dominant negatiu Δ TCF4, indicant que els dos mutants eren funcionals en el nostre sistema. El promotor de LEF1 es

comportava de manera semblant a TOP, s'activava unes 4 vegades per VP16-TCF4 i l'activitat del promotor es reprimia dràsticament quan es transfectava amb Δ TCF4 i APC. El promotor de Fibronectina, en canvi, es comportava d'una manera diferent, la seva activitat no es veia afectada pel dominant positiu i tampoc pel dominant negatiu de TCF4. Tampoc s'observava cap resposta a la transfecció amb APC. Aquests resultats provaven que el promotor clonat de LEF1 és sensible a β -Catenina/TCF4 mentre que el promotor de Fibronectina no.

Per verificar si eren necessaris els factors TCF per a l'activació de Fibronectina i LEF1 mitjançada per Snail, es van mesurar els nivells de RNA de LEF1 i Fibronectina en cèl·lules que expressaven Snail i que es podia induir l'expressió del dominant negatiu de TCF. Vam aprofitar que les cèl·lules LS174T són sensibles a Snail i l'existència d'uns clons on l'expressió del mRNA de Δ TCF4 s'activava quan s'afegia doxiciclina al medi (van de et al., 2003a; van de et al., 2002a). Aquests clons es van transfectar amb Snail i estan caracteritzats a la Figura R16C. A l'afegir doxiciclina al medi, els clons transfectats amb el mRNA de Δ TCF4, en cèl·lules transfectades amb el mRNA de Δ TCF4, la doxiciclina incrementava específicament només el mRNA de Δ TCF4. En canvi, en els clons control no s'observava cap canvi en els nivells de mRNA de TCF4.

L'expressió del dominant negatiu de TCF4 no feia disminuir significativament els nivells de RNA de Fibronectina i LEF1 dels clons que expressaven establement Snail, indicant que el mecanisme que media l'activació de Fibronectina és independent de TCF (Fig. R16D). Aquest resultat contrastava amb la disminució de l'activació de l'expressió de Fibronectina i LEF1 per Snail

quan s'expressava el siRNA de β -Catenina. Com a control de la funcionalitat del mRNA de Δ TCF4 es van determinar el nivells de RNA de c-myc, gen que s'ha descrit que és sensible a l'activació per β -Catenina/TCF4. Els nivells de mRNA de c-myc disminuïen quan s'expressava el mRNA del dominant negatiu de TCF4.

Per tant descartem que els factors de transcripció TCF facin de pont entre la β -Catenina i els promotors de gens mesenquimals.

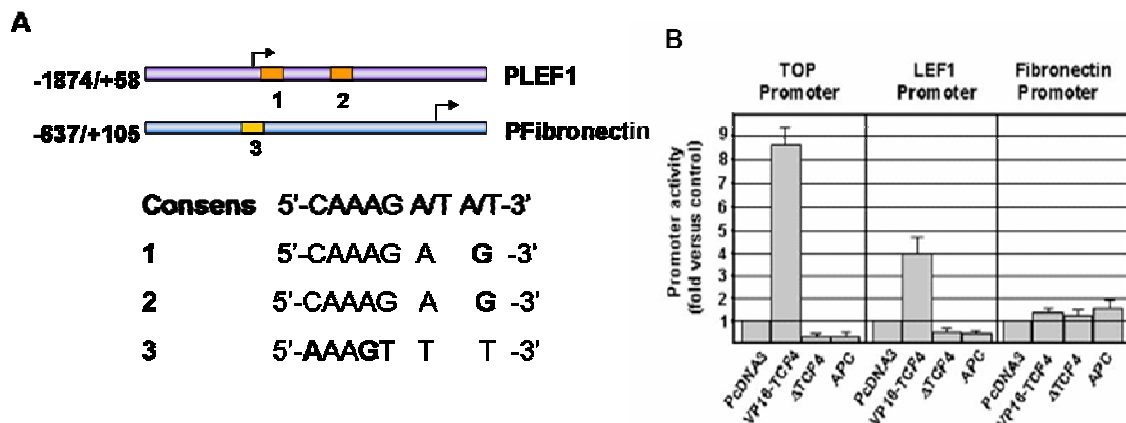


Figura R16: El factor de transcripció TCF4 no és necessari per a l'activació de gens mesenquimals mitjançada per Snail. **A:** Representació esquemàtica del promotors de Fibronectina i LEF1. El promotor de LEF1 presenta dues caixes d'unió a TCF4, mentre que el promotor de Fibronectina en té només una. Les bases que no coincideixen amb el consens estan marcades amb negreta **B:** Efecte de la transfecció dels dominant positiu i negatiu de TCF i APC sobre l'activitat del reporter TOP, i dels promotors de Fibronectina i LEF1. Cèl·lules RWP1 van ser co-transfectades amb el reporter TOP (25 ng), PGL3-Promotor de LEF1 (100 ng) o PGL3-Promotor de Fibronectina (100 ng) i pcDNA3 que contenia VP16-TCF4 (5 ng), Δ TCF4 (250 ng), APC (250 ng) o el vector buit com a control, i 1 ng de pRL-SV40. L'activitat luciferasa s'analitzava 48 hores post-transfecció i era estimada com la relació entre unitats de luciferasa del promotor problema (RLU firefly) i les del promotor control (RLU Renilla): RLU firefly/ RLU Renilla. L'activitat Luc era expressada com l'increment de l'activitat trobada en cèl·lules transfectades amb Snail respecte l'activitat obtinguda en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard.

C

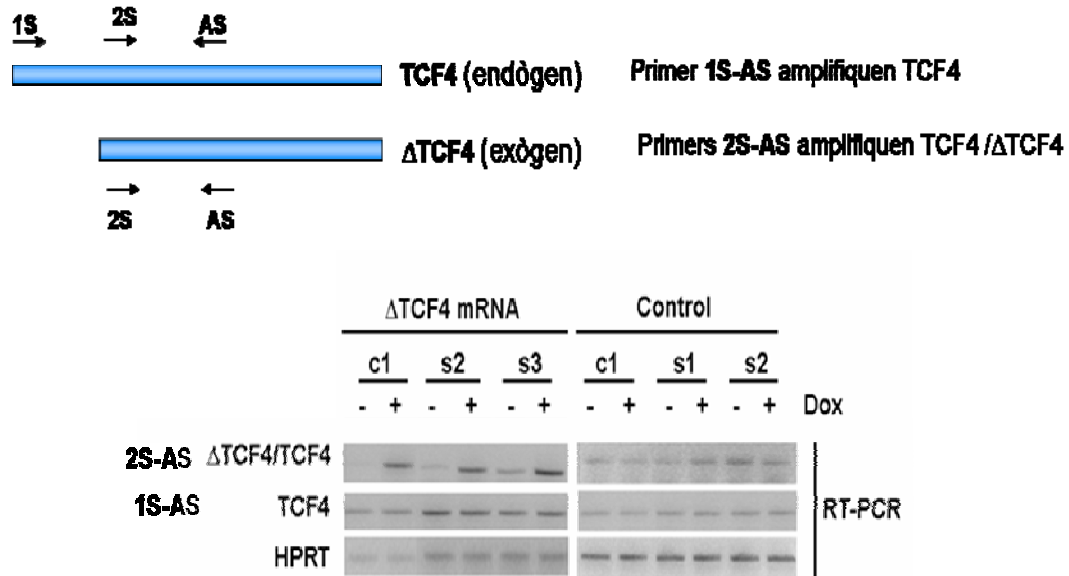


Figura R16: El factor de transcripció TCF4 no és necessari per a l'activació de gens mesenquimals mitjançada per Snail. C: Caracterització dels clons LS174T mRNA Δ TCF4 *tet/on* +/- *Snail*. Els clons van créixer en medi +/- Doxiciolina (1 μ g/m) durant 6 dies. Passat aquest temps es van obtenir extractes proteics totals amb tampó de lisi 1%SDS i es va analitzar mitjançant RT-PCR quantitativa amb primers específics. La parella de primers 1S-AS amplificava el TCF4 endogen *Full Length*, mentre que la parella 2S-AS, a més a més, amplificava el Δ TCF4 exogen. Es van determinar els nivells d'HPRT com a control de càrrega.

D

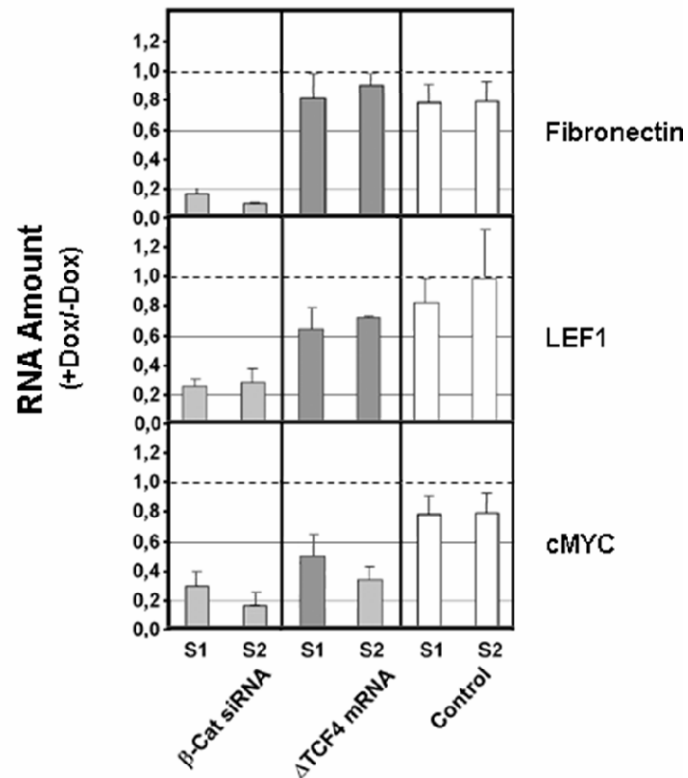


Figura R16: El factor de transcripció TCF4 no és necessari per a l'activació de gens mesenquimals mitjançada per Snail. D: L'expressió del mRNA de Δ TCF4 no afecta als nivells de mRNA de Fibronectina i LEF1. Els gens indicats van ser analitzats per RT-PCR quantitativa a partir de RNA de clons d'LS174T Δ TCF4 *tet/on* que expressaven Snail, en absència o presència de Doxíciclina. També s'inclouen els valors obtinguts en cèl·lules LS174T siRNA β -Catenina *tet/on* (Fig. R13). Els nivells de RNA eren normalitzats pels nivells d'expressió d'un RNA control, HPRT, i expressats com a increment respecte als valors detectats en cèl·lules crescudes en medi sense doxiciclina. Els resultats mostrats corresponen a un experiment representatiu on cada valor s'ha analitzat per triplicat. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard. Es mostren els resultats obtinguts en dos clons representatius per cada tipus cel·lular: siRNA i control. Com a control de la funcionalitat del mRNA de Δ TCF4 es van analitzar també els nivells de mRNA de c-myc.

5.3. Els factors de transcripció SOX7 i/o SOX9 podrien intervenir en l'activació de gens mesenquimals induïda per Snail.

La β -Catenina pot interaccionar també amb els factors de transcripció de la família SOX, concretament amb la subfamília F que conté els factors SOX1, 7, 17 i 18, i SOX9 de la subfamília E. Per tant, vam comprovar si els factors de transcripció SOX7 i SOX9 podien fer de pont entre β -Catenina i els promotors mesenquimals activats per Snail. El primer que es va fer va ser analitzar quins membres de la família F: SOX1, 7, 17 i 18; i SOX9 s'expressaven en les línies cel·lulars utilitzades en el desenvolupament d'aquest estudi (Fig. R17C). Només es va detectar expressió de SOX7 i SOX9 a les nostres línies cel·lulars i els vam escollir com a candidats. Tot i que per demostrar inequívocament que aquets factors podrien fer de pont entre la β -Catenina i els promotors caldrien assajos de co-immunoprecipitació i CHIP, hem acumulat alguns resultats indirectes que suggereixen la possible participació de SOX7 i/o 9 en l'activació gènica per Snail.

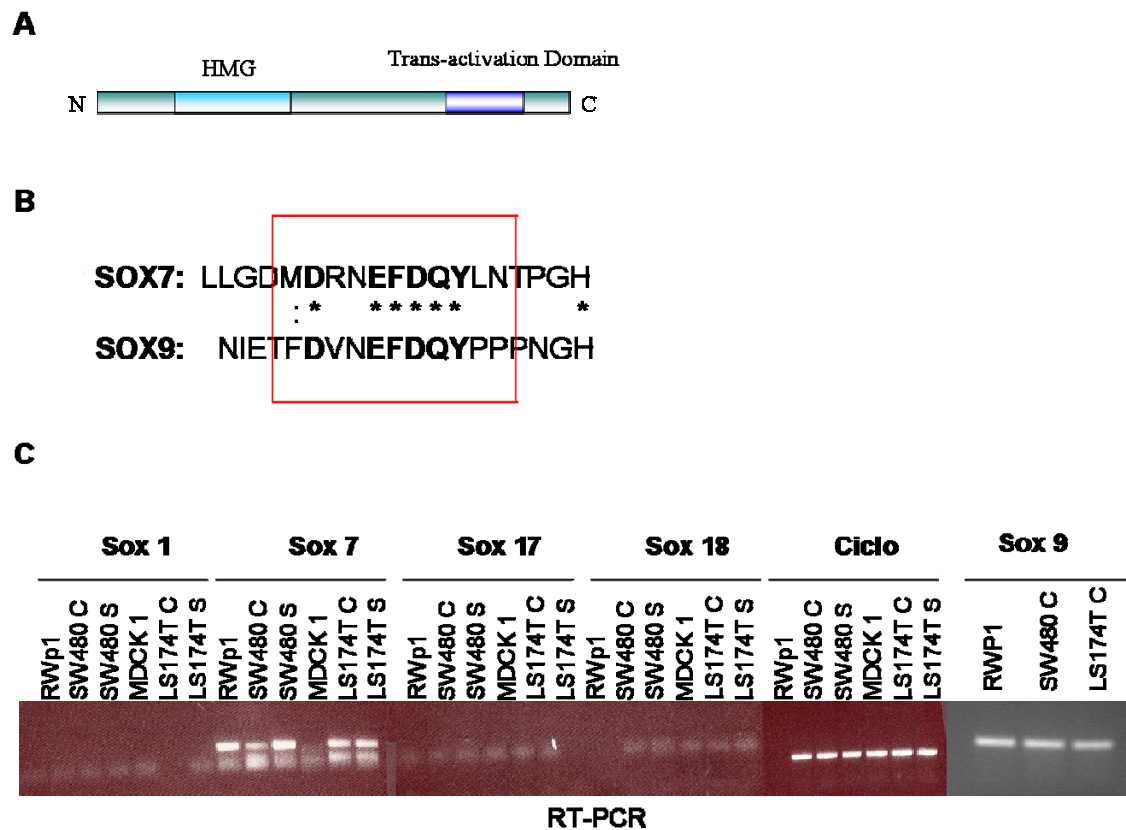


Figura R17: A: Representació esquemàtica de l'estructura de les proteïnes SOX de la família F. Els factors de transcripció SOX de la família F presenten un domini transactivador a la regió C Terminal per on es dona la interacció amb la β -Catenina. **B:** Comparació de les seqüències d'aminoàcids dels dominis transcativadors de SOX7 i SOX9. SOX9, tot i no pertànyer a la subfamília F presenta un domini transactivador molt semblant al que tenen els membres de la subfamília F, que també contenen la seqüència consens d'unió a β -Catenina. **C:** Anàlisi de l'expressió dels membres de la superfamília SOX en difrenst línies cel·lulars. Es va analitzar per RT-PCR l'expressió de diferents gens de la família SOX amb primers específics, a partir d'extractes de RNA de diferents línies cel·lulars que expressaven establement Snail (S) o no (C). El control de càrrega es va realitzar amb primers específics per Ciclofilina A.

5.3.1. SOX7 i SOX9 potencien l'activació de la transcripció de gens mesenquimals induïda per Snail.

Si SOX7 o 9 mediaven la interacció de β -Catenina als promotors s'esperaria que la seva expressió podria augmentar l'efecte induït per Snail. Així, es van realitzar assajos de reporter per veure si la presència d'aquests factors incrementava l'inducció de Fibronectina i LEF1 per Snail. Per començar, es va clonar el cDNA de SOX7 en pcDNA3-his-Myc, a partir del constructe cedit pel Dr. Akihido Okuda del Research Center for Genomic Medicine (Saitama, Japó), i el cDNA de SOX9 en pcDNA3-Flag cedit pel Dr. Bort de la Universitat Pompeu Fabra (Barcelona) (Lefebvre et al., 1997).

Es van co-transfectar cèl·lules RWP1 amb Snail, SOX7 i el promotor de Fibronectina o el promotor de LEF1. Tal com mostra la Figura R18A Snail feia augmentar l'activitat de promotor de Fibronectina i LEF1 i quan es co-transfectava amb Snail i SOX7 l'activació era sinèrgica o additiva.

Es van realitzar els mateixos assaigs reporter transfectant amb SOX9 en comptes de SOX7. La figura R18B mostra com l'activitat dels promotors en presència de SOX9 i Snail era sempre major que amb SOX9 i Snail per separat.

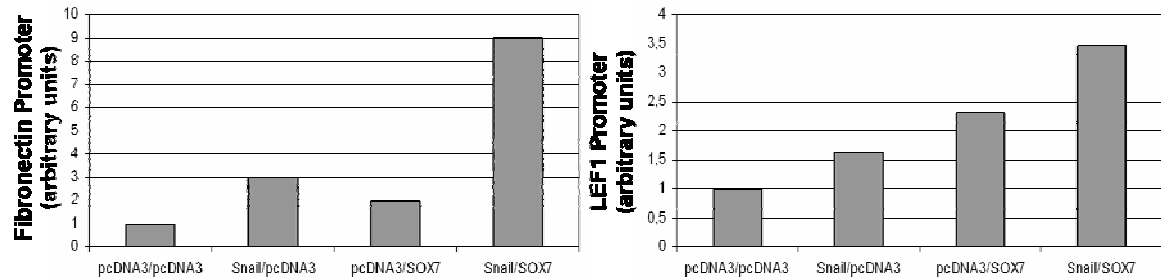
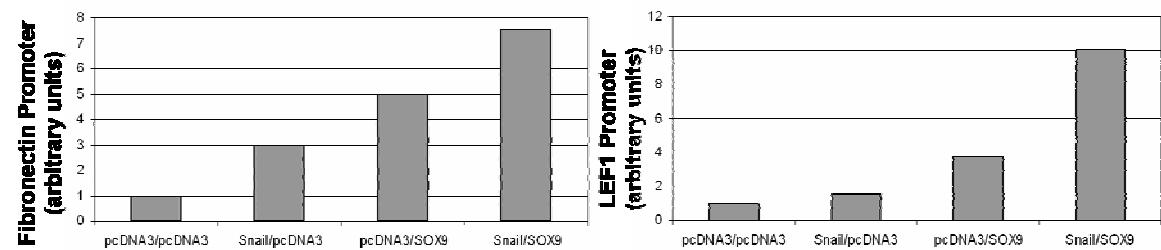
A**B**

Figura R18. SOX7 i SOX9 potencien l'activació de la transcripció de gens mesenquimals induïda per Snail. A: *SOX7 potencia l'efecte activador de Snail sobre els promotors de Fibronectina i LEF1.* Es van realitzar assajos reporter amb cèl·lules RWP1. Es van co-transfectar amb 5 ng de Snail o pcDNA3 buit, 32 ng de SOX7 o pcDNA3 buit, 100 ng de promotor de Fibronectina clonat en PXP2, 150 ng de promotor de LEF1 clonat en PGL3 i 2 ng de pRL-SV40. L'activitat luciferasa s'analitzava 48 hores post-transfecció i era estimada com la relació entre unitats de luciferasa del promotor problema (RLU firefly) i les del promotor control (RLU Renilla): $RLU\ firefly / RLU\ Renilla$. L'activitat Luc era expressada com l'increment de l'activitat trobada en cèl·lules transfectades amb Snail respecte l'activitat obtinguda en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. La desviació estàndard no superava el 5% en cap cas. **B:** *SOX9 potencia l'efecte activador de Snail sobre els promotors de Fibronectina i LEF1.* Es van realitzar assajos reporter amb cèl·lules RWP1. Es van co-transfectar amb 5 ng de Snail o pcDNA3 buit, 32 ng de SOX9 o pcDNA3 buit, 100 ng de promotor de Fibronectina clonat en PXP2, 150 ng de promotor de LEF1 clonat en PGL3 i 2 ng de pRL-SV40. Els resultats van ser obtinguts i expressats com a (A).

Es van comprovar els resultats obtinguts a partir d'assaigs reporter amb l'anàlisi dels nivells de RNA de cèl·lules SW480 que expressaven Snail i SOX7 o SOX9 de forma estable. Aquests clons es van aconseguir transfectant Snail clonat en plres-Hygro i pcDNA3 que incloïa el cDNA de SOX7 o SOX9. Les cèl·lules positives es van seleccionar afegint Geneticina i Higromicina al medi de cultiu. Les cèl·lules que expressaven Snail establement, tal com havíem vist en anteriors experiments, no formaven colònies i tenien una forma més allargada. L'expressió dels cDNA de SOX7 o SOX9 accentuava aquest fenotip més fibroblastoide als clons Snail, mentre que els clons que no expressaven Snail però si SOX7 o SOX9, es detectaven més cèl·lules que creixien de forma individual, separades les unes de les altres (Fig. R19A).

Tal com mostra la Figura R19B, SOX7 per si sol no feia augmentar l'expressió de Fibronectina però potenciava l'augment de l'expressió induït per Snail en unes dues vegades. D'altra banda, SOX9 feia augmentar els nivells de RNA de Fibronectina més de dues vegades tant si es s'expressava conjuntament amb Snail o no (Fig. R19B). Aquets resultats suggerien que SOX7 i SOX9 podrien fer de pont entre la β -Catenina i els promotors de Fibronectina i LEF1, ja que tant SOX7 com SOX9 induïen un augment de l'expressió dels dos gens, potenciant l'efecte activador de Snail.

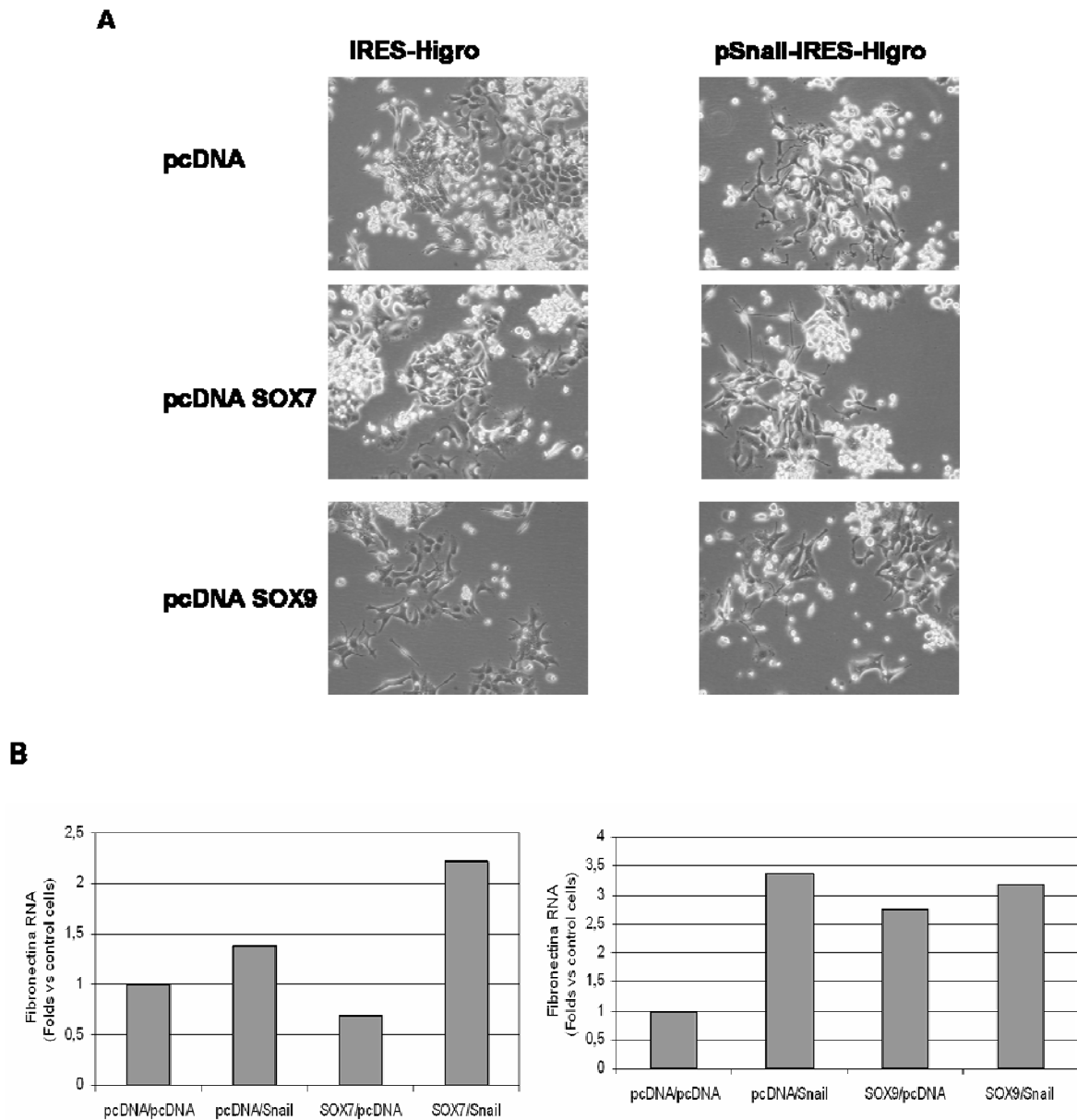


Figura R19. SOX7 i SOX9 fan augmentar els nivells de RNA de Fibronectina. A: Aspecte dels clons SW480 que expressaven Snail i SOX7 o SOX9. Es van co-transfectar cèl·lules SW480-ADH amb 4 µg de pIRES Snail Higromicina i amb 4 µg de SOX7 o SOX9 o el pcDNA3 buit. Les cèl·lules es van seleccionar durant tres setmanes amb Geneticina i Higromicina. Fotografies realitzades en un microscopi de contrast de fase a 200X. **B:** Nivells de RNA de Fibronectina en els clons SW480 +/- Snail i +/- SOX7 o SOX9. Posteriorment es va extreure el RNA i es va analitzar mitjançant RT-PCR quantitativa amb primers específics. Les cèl·lules que expressaven establement SOX7 o SOX9 mostraven 200 vegades més de RNA d'aquests gens que les cèl·lules control (dades no mostrades). Els nivells de RNA eren normalitzats pels nivells d'expressió d'un RNA control, HPRT, i expressats com a increment respecte als valors detectats en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a un experiment representatiu on cada valor s'ha analitzat per triplicat. Les desviacions estàndard no van superar el 5% en cap cas.

6. Snail modula la unió de la β -Catenina amb els seus *partners*.

En aquest moment del treball sabíem que Snail necessitava la β -Catenina per activar gens mesenquimals com Fibronectina i LEF1. Tot i que desconeixíem la proteïna pont, una demostració de que la β -Catenina estaria actuant com a activador seria la de demostrar que l'expressió de Snail podria estar alterant la interacció de la β -Catenina amb coactivadors. Efectivament, per portar a terme l'activació dels gens diana, la β -Catenina interacciona amb diversos elements de la maquinària de transcripció com la TATA Binding Protein (TBP) (Hecht et al., 1999) i la CRE Binding Protein (CBP/P300) (Hecht et al., 2000). Tal com mostra la Figura R20A, la β -Catenina interacciona amb aquests factors per l'extrem C-Terminal, denominat com domini transactivadors (van de et al., 1997a), mentre que la interacció amb la E-Cadherina es dona per les repeticions armadillo, on també s'hi uneixen els factors TCF. L' α -Catenina interacciona pel domini N-Terminal.

Per estudiar com canviava la interacció de la β -Catenina amb els factors que s'uneixen a la zona transactivadora, vam realitzar assajos de co-precipitació amb β -Catenina (*Pull down*) utilitzant les proteïnes de fusió GST-TBP, GST-CBP i GST-E-Cadherina. En el cas de CBP i E-Cadherina la proteïna de fusió contenia només el fragment de la proteïna que s'ha descrit que interacciona amb la β -Catenina, això és el fragment 826-1704 de CBP (Hecht et al., 2000) i el fragment citosòlic de l'E-Cadherina (Kemler, 1993). L'assaig consistia en

incubar les proteïnes de fusió amb extractes de cèl·lules amb o sense expressió ectòpica de Snail, per detectar posteriorment per Western blot la quantitat de β -Catenina que s'unia a les proteïnes de fusió.

La quantitat de β -Catenina que co-precipitava amb GST-CBP o GST-TBP era menor en el lisat de cèl·lules que expressaven Snail (Fig. R20B), justament el contrari del que passava amb la GST-E-Cadherina.

Aquests resultats ens mostraven que en presència de Snail hi havia més β -Catenina disponible per interaccionar amb l'E-Cadherina, i menys β -Catenina disponible per interaccionar amb els coactivadors TBP i CBP, indicant que mentre que la zona d'unió a l'E-Cadherina estava més desocupada, la zona C-Terminal transactivadora on s'uneixen TBP i CBP, estava més ocupada en cèl·lules que expressen Snail.

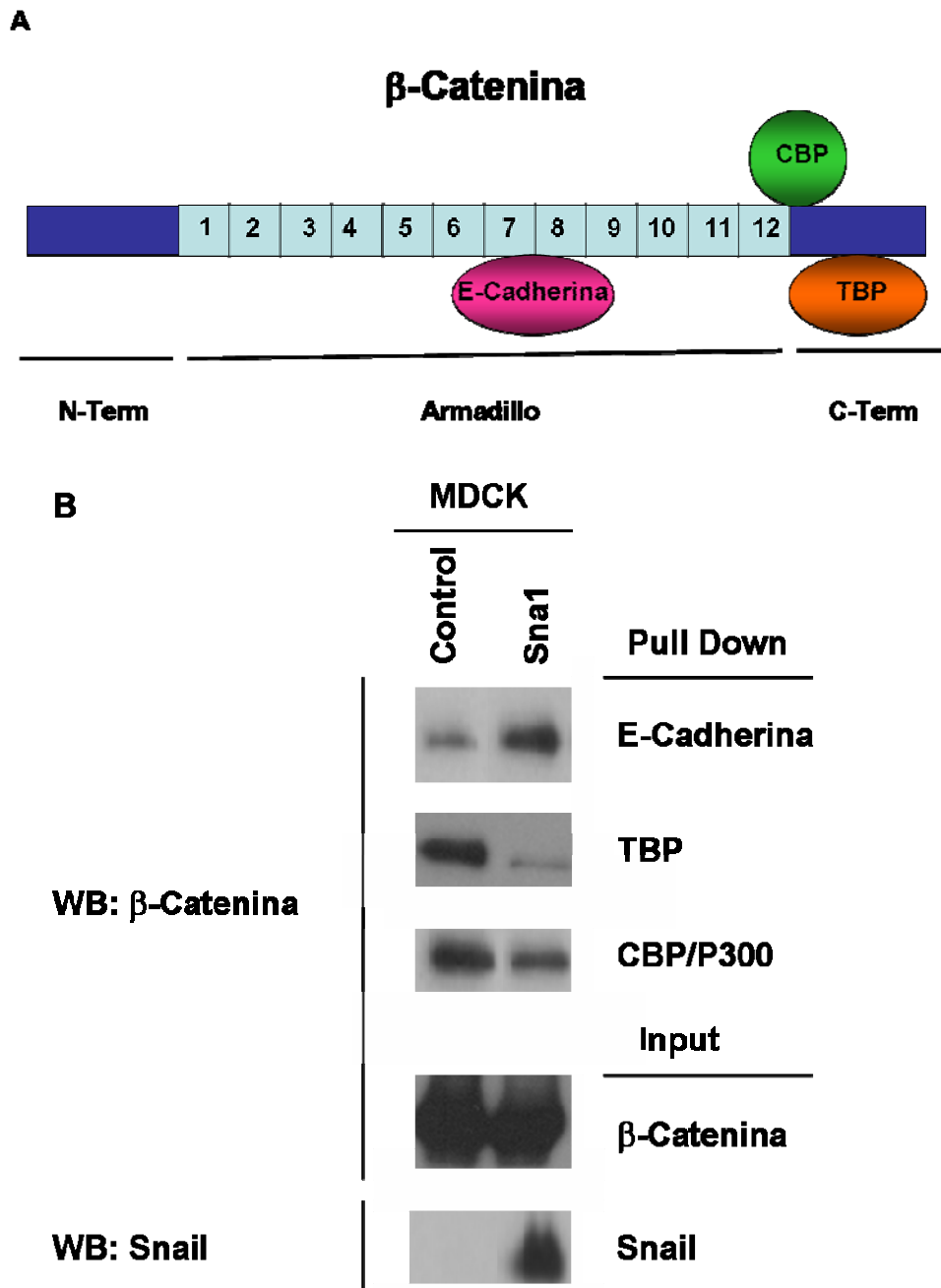


Figura R20. El domini transactivador C-Terminal de la β -Catenina està més ocupat en cèl·lules amb expressió de Snail. **A:** Representació esquemàtica de les proteïnes que interaccionen amb la β -Catenina. La zona C-Terminal uneix preferentment factors de transcripció que participen en l'activació transcripcional, com CBP i TBP. **B:** En presència de Snail el domini C-Terminal de la β -Catenina està més ocupat que en cèl·lules que no expressen Snail. Assaig de Pull down realitzat amb extractes cel·lulars de MDCK que expressaven Snail (Sna1) o no (Control), incubades amb proteïna de fusió GST-E-Cadherina, GST-TBP o GST-CBP. Es va purificar amb glutatió sefarosa i els precipitats es van analitzar per Western Blot per detectar β -Catenina unida a les proteïnes de fusió.

7. El Snail i la β -Catenina interaccionen.

Els resultats obtinguts fins a aquest moment del treball indicaven que: 1). Snail necessitava de la β -catenina per activar l'expressió de gens mesenquimals com la Fibronectina i LEF1, segurament mitjançant la unió de la β -catenina als promotors , i 2). Snail era capaç de modular l'afinitat de la β -catenina pels seus *partners*.

Una hipòtesi que ens vam plantejar, quan sense proposar-nos vam observar que la β -Catenina i el Snail co-localitzaven, per explicar com Snail podia alterar l'afinitat de la β -Catenina, seria que Snail estigués interaccionant amb la β -Catenina, i aquesta interacció desencadenés els canvis necessaris per a la β -Catenina, segurament per un mecanisme que inclou un canvi en les proteïnes que interaccionen amb la β -Catenina i per la seva unió als promotors a aquests gens.

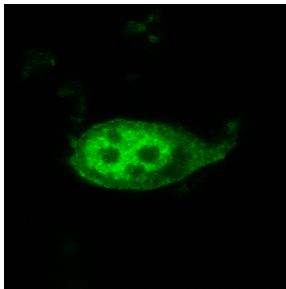
7.1. El Snail i la β -Catenina co-localitzen en cèl·lules SW480-ADH.

Efectivament, quan vam determinar quina era la localització subcel·lular d'ambdues proteïnes (β -Catenina i Snail) per immunofluorescència en cèl·lules SW480-ADH que expressaven transitòria (Fig. R21A) o establiment Snail (Fig.

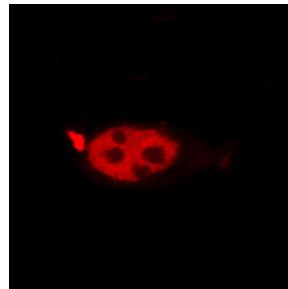
R21B), s'observava una co-localització de les dues proteïnes principalment al nucli.

A

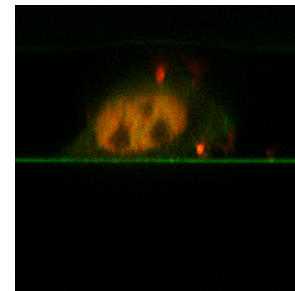
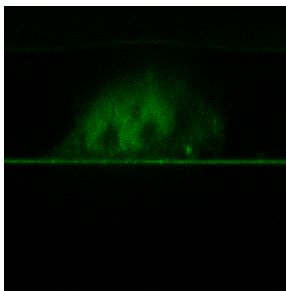
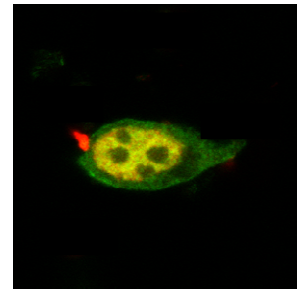
β Catenina



Snail



Merge



SW480-ADH Snail

Figura R21: El Snail i la β -Catenina co-localitzen en cèl·lules SW480-ADH. A: *Immunofluorescències realitzades en cèl·lules SW480-ADH amb expressió transitòria de Snail ectòpic. Cèl·lules SW480-ADH transfectades transitòriament amb pcDNA3 Snail, es van fixar amb PFA al 4% i es va immunodetectar β -Catenina (verd) i el Snail (vermell). Les imatges corresponen a una secció de 1 μ m obtinguda per microscòpia confocal. Les fotografies de la part inferior corresponen a una secció longitudinal.*

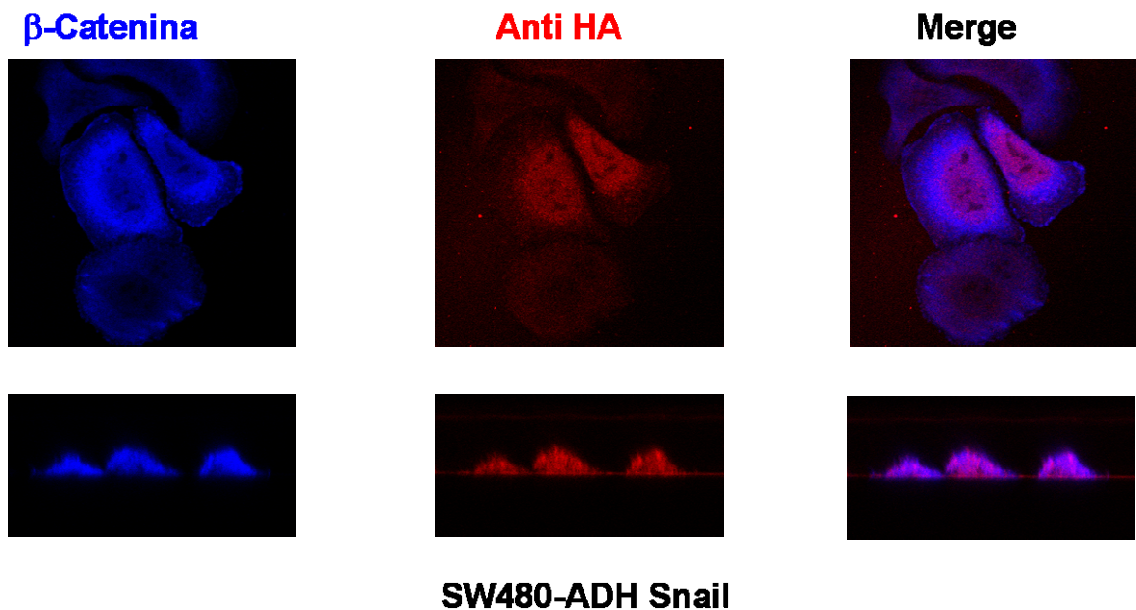
B

Figura R21: El Snail i la β -Catenina co-localitzen en cèl·lules SW480-ADH. B: *Immunofluorescències realitzades en cèl·lules SW480-ADH amb expressió estable de Snail ectòpic. Cèl·lules SW480-ADH transfectades establement amb pcDNA3 Snail-HA, es van fixar amb PFA al 4% i es va immunodetectar la β -Catenina (blau) i el Snail (vermell). Les imatges corresponen a una secció de 1 μ m obtinguda per microscòpia confocal. Les fotografies de la part inferior corresponen a una secció longitudinal.*

7.2. El Snail i la β -Catenina interaccionen directament in vitro.

La co-localització entre el Snail i la β -Catenina ens indicava que, probablement, ambdues proteïnes podrien estar formant part d'un mateix complex. Per confirmar-ho es van realitzar assaigs de co-Immunoprecipitació amb anticossos anti Snail o anti β -Catenina en extractes de cèl·lules que expressaven Snail, ja fos de forma transitòria o estable. De cap dels assaigs

realitzats es van poder extreure resultats concloents al respecte (dades no mostrades).

Com a alternativa als experiments de co-Immunoprecipitació es van realitzar assaigs de *Pull down* per determinar la interacció.

El primer que es va dur a terme van ser assaigs de Binding “in vitro” que ens indicarien que les dues molècules poden interaccionar directament. Es van incubar diferents mutants de Snail recombinants que contenien GST, amb sefarosa a la que vam unir covalentment β -Catenina recombinant (Veure Material i Mètodes). Tal com mostra la Figura R22, els diferents mutants de Snail excepte el fragment que contenia la zona rica en Serines, eren purificats amb la resina que contenia la β -Catenina. Per descartar la possible unió inespecífica de la GST a la β -Catenina es va utilitzar la GST sola com a control a cada experiment. Per tant, aquest resultat suggeria que Snail i β -Catenina podien interaccionar directament i descartàvem la zona rica en Serines com a zona d’unió.

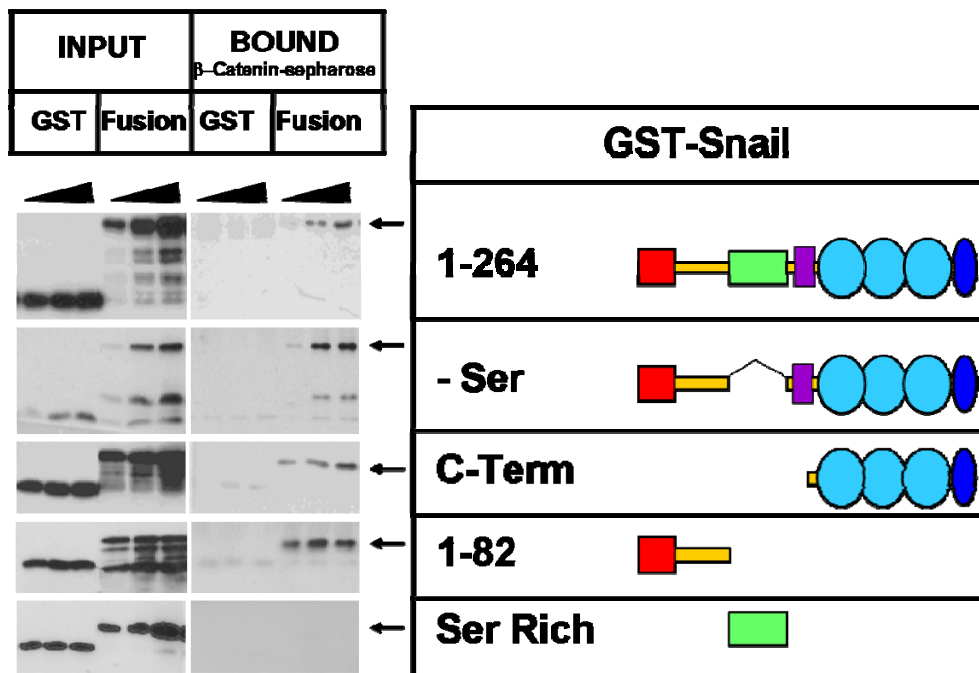


Figura R22. Snail coprecipita amb la β -Catenina *in vitro*. Es van incubar quantitats creixents (3-21 ng) de proteïna de fusió de diferents mutants de Snail: la proteïna sencera (1-264), la proteïna sense la regió rica en serines (-Ser), el fragment C-Terminal (C Term), el fragment 1-82 i el fragment 82-138, que contenia la regió rica en Serines; amb 5 μ l de sefarosa (50% v/v) que té unida covalentment β -Catenina. Es va eluir la resina amb SB1X i es van ressoldre els eluïts per SDS-PAGE i Western blot amb anti GST.

Per corroborar aquets resultats es va realitzar un Overlay. Es van carregar els diferents mutants de Snail, fusionats amb GST, en un gel d'acrilamida i es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa. Posteriorment aquesta membrana es va incubar amb proteïna recombinant de β -Catenina i es va realitzar un Western blot anti β -Catenina per detectar la β -Catenina que havia quedat adherida a la proteïna de Snail que havia estat transferida. Tal com es veu la figura R23, es va detectar β -Catenina a les bandes corresponents a tots els mutants de Snail testats però no es va observar β -Catenina unida a la GST sola.

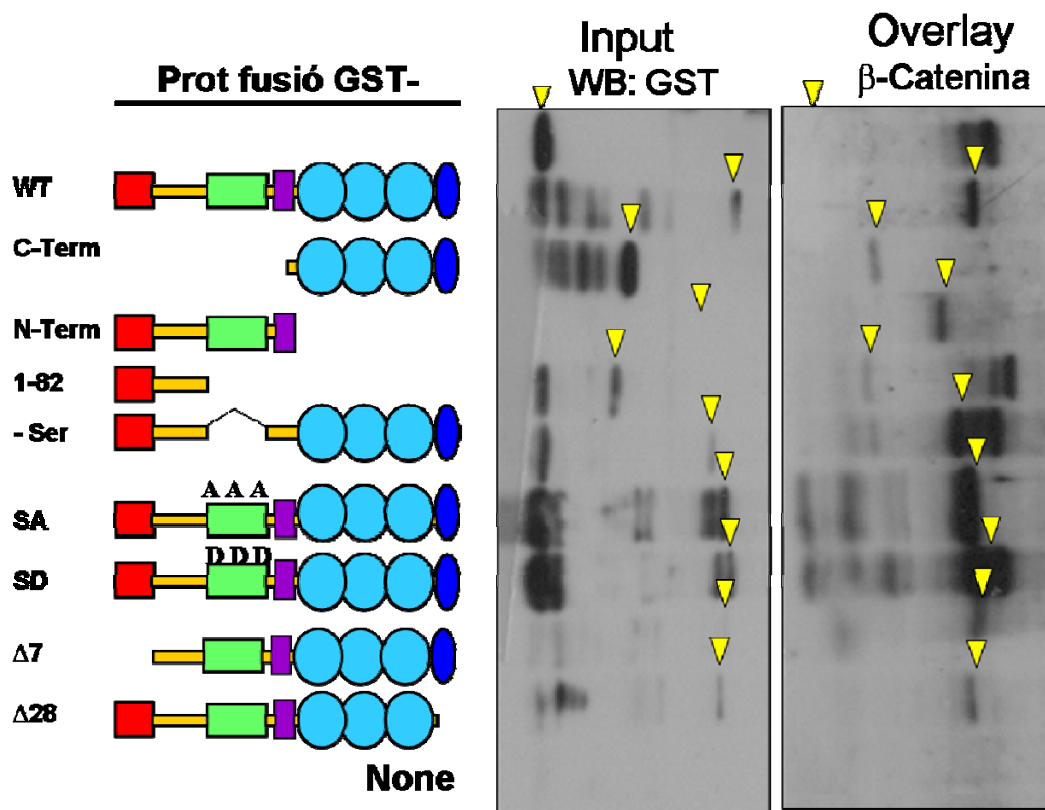


Figura R23. La β -Catenina s'uneix als diferents mutants de Snail per overlay. Proteïnes de fusió amb GST de diferents mutants de Snail que van ser resoltos en un gel d'acrilamida i transferits a una membrana de nitrocel·lulosa, aquesta va ser incubada amb proteïna de fusió β -Catenina que, durant la purificació, se li havia tallat la proteïna GST mitjançant la proteòlisi amb la proteasa Precision. Posteriorment es va detectar la β -Catenina per Western Blot. La quantitat dels mutants de Snail utilitzats en l'assaig es van anitzar per Western Blot anti GST en la mateixa membrana.

En l'assaig d'Overlay però, es modifica l'estructura secundària de les proteïnes dels mutants de Snail ja que s'utilitzaven gels d'acrilamida en condicions desnaturalitzants. Per treballar amb unes condicions una mica menys desnaturalitzants es va realitzar un assaig de Dot Blot. Amb aquest experiment intentàvem que l'estructura secundària s'alterés menys, tot i que s'ha de tenir en compte que les proteïnes recombinants es van generar en un sistema

procariota i per tant no podem saber si el seu plegament s'havia donat igual que es dona en cèl·lules eucariotes.

Les proteïnes recombinants dels diferents mutants de Snail es van carregar en una membrana de nitrocel·lulosa, aquesta membrana es va incubar amb proteïna recombinant de β -Catenina i es va realitzar un Western blot anti β -Catenina per detectar la β -Catenina que havia quedat adherida a la proteïna de Snail que havia estat carregada. Els resultats obtinguts van ser similars a l'experiment d'Overlay, la β -Catenina era capaç d'unir-se als diferents mutants de Snail (Fig. R24).

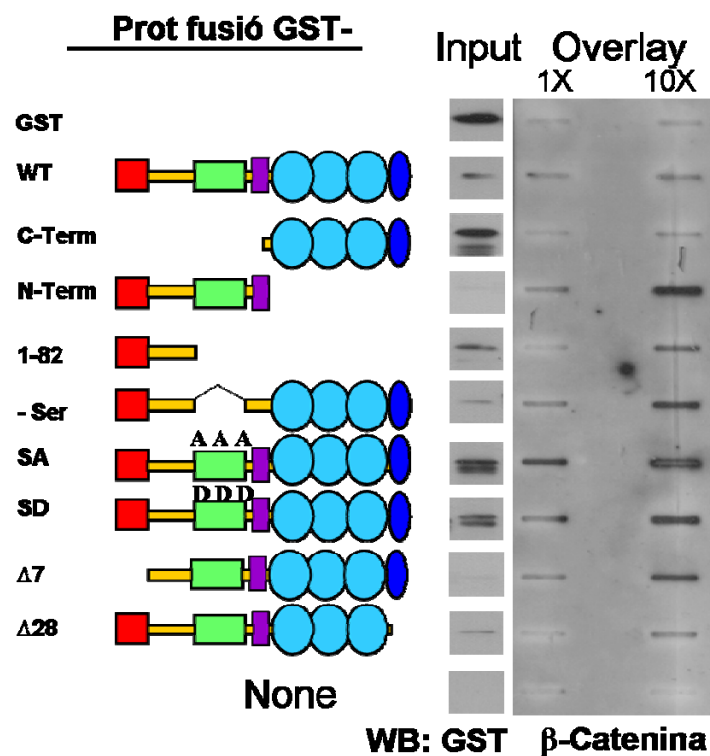


Figura R24: La β -Catenina s'uneix amb els diferents mutants de Snail en un Dot Blot. Proteïnes de fusió amb GST de diferents mutants de Snail van ser carregats en una membrana de nitrocel·lulosa. Aquesta va ser incubada amb proteïna de fusió β -Catenina a la qual se li havia tallat la proteïna GST mitjançant la proteòlisi amb la proteasa Precision durant la purificació. Posteriorment es va detectar la β -Catenina per Western Blot. L'Input mostra els mutants de Snail, detectats per Western Blot anti GST, que es van utilitzats per realitzar l'assaig.

Tots aquets assaigs però, van ser realitzats en condicions “in vitro”. Una aproximació una mica més *in vivo* seria una assaig de *Pull down*. Per realitzar l'assaig de *Pull down*, es van preparar extractes proteics totals amb RIPA de cèl·lules SW480-ADH i es van incubar amb proteïna de fusió GST-Snail, GST-Snail SA i GST-Snail SD. Es van purificar aprofitant l'afinitat de la glutatió sefarosa i els precipitats es van resoldre per SDS-PAGE i es va determinar la β -Catenina que s'hi havia unit. La β -Catenina podia unir-se a les tres formes de Snail i no a la proteïna GST sola (Fig. R25).

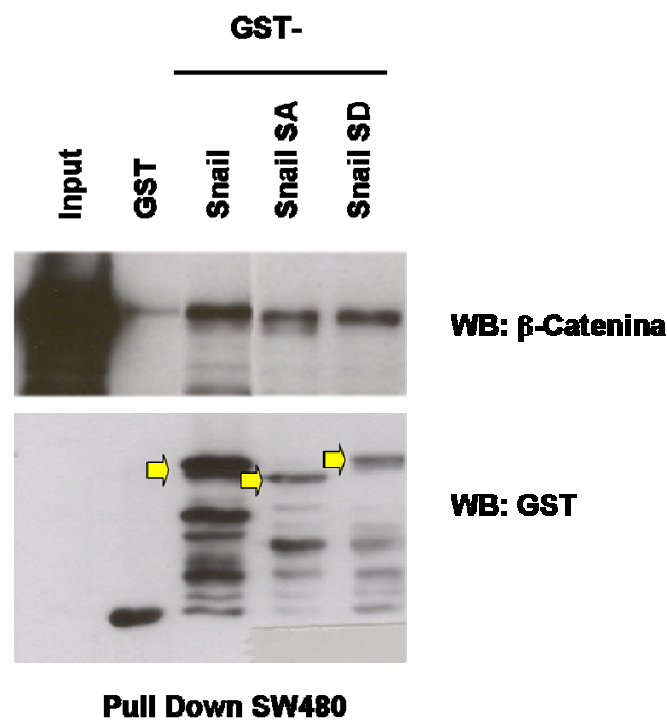


Figura R25: β -Catenina interacciona amb la forma wt de Snail i també amb els mutants SA i SD. Es va realitzar un *Pull down* a partir d'extractes proteics totals de cèl·lules SW480 obtinguts amb RIPA. Es van incubar 200 μ g de lisat amb 5 μ g de proteïna de fusió GST-Snail, GST-Snail SA i GST-Snail SD o GST sola. Es purificar amb Glutatió sefarosa i es va eluir amb SB1X, els eluïts es van resoldre per SDS-PAGE i posteriorment es va detectar la β -Catenina per Western Blot. Per comprovar els mutants de Snail que es van utilitzats per realitzar l'assaig es va realitzar un Western Blot anti GST.

7.3. S'ha detectat co-expressió de Snail i β -Catenina cèl·lules de tumors de còlon humans.

En un estudi anterior realitzat pel nostre grup (Franci et al., 2006), es va veure que Snail s'expressava en teixits adults en condicions patològiques. L'anàlisi de tumors va revelar que Snail es trobava altament expressat en sarcomes i fibrosarcomes i en menor mesura en tumors epitelials. En aquest tipus de tumors, Snail s'expressava en àrees de l'estroma pròximes al tumor i a cèl·lules tumorals disposades al marge d'aquest.

Es va voler estudiar si Snail i β -Catenina s'expressaven a l'hora en cèl·lules tumorals. Amb aquets objectiu es van realitzar immunohistoquímiques a partir de talls cara-revers de carcinomes de còlon humans i es va immunodetectar Snail i β -Catenina. Tot i que un gran número de cèl·lules expressaven Snail i β -Catenina per separat, es van poder veure algunes cèl·lules tumorals que expressaven ambdues proteïnes (Fig. R26).

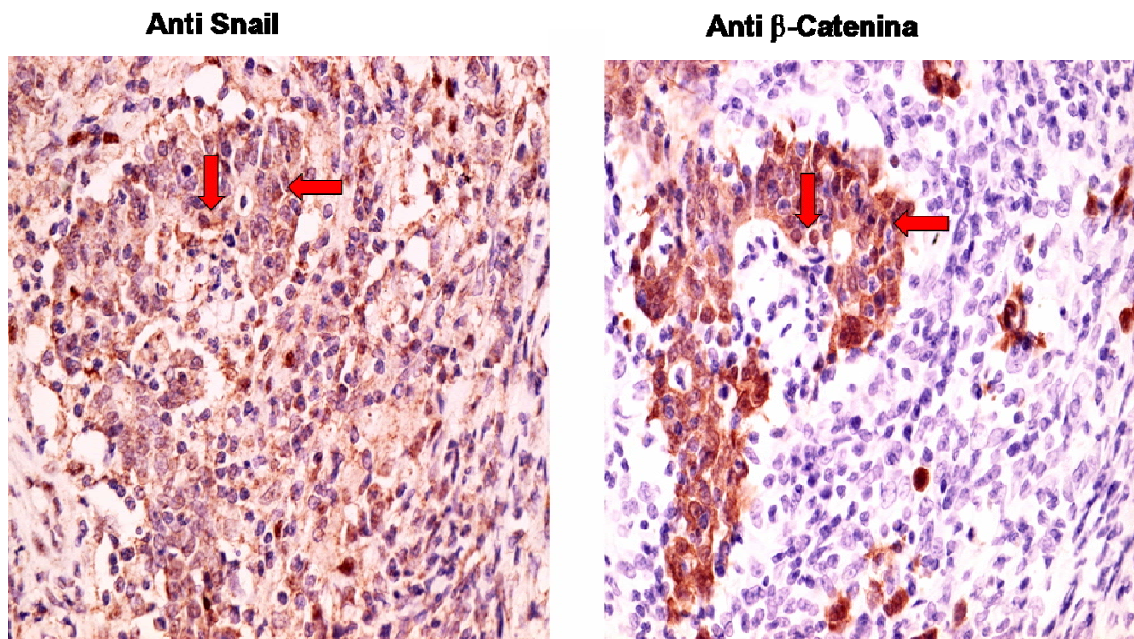


Figura R26. Snail i β -Catenina es coexpressen en cèl·lules tumorals de carcinomes de còlon humans. Es van realitzar talls cara-revers de tumors de còlon humans inclosos en parafina procedents de biòpsies dels banc dels Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital del mar (Barcelona). Es va detectar Snail amb un anticòs monoclonal i el sistema CSA II i la β -Catenina amb un anticòs monoclonal i el sistema Envision. Els talls van ser contra-tenyits amb Hematoxilina-Eosina. Les fotografies es van realitzar a 400X.

8.Snail activa la transcripció induïda per $\text{NF}\kappa\text{B}$. Aquesta activació és inhibida per l'E-Cadherina.

Tal com s'ha introduït anteriorment, un altre factor de transcripció que podria estar implicat en l'activació de gens mesenquimals per Snail i relacionat amb la inhibició de l'expressió de l'E-Cadherina podria ser $\text{NF}\kappa\text{B}$. Estudis anteriors han demostrat que la pèrdua d'E-Cadherina provoca un augment en l'activitat $\text{NF}\kappa\text{B}$

(Kuphal et al., 2004; Kuphal and Bosserhoff, 2006), la qual s'ha relacionat, entre diverses respostes cel·lulars, amb el manteniment de la transició epitelial mesènquima i metàstasi (Huber et al., 2005); (Basseres and Baldwin, 2006). També es coneix que l'expressió de Fibronectina està regulada pel factor de transcripció NF κ B (Chen et al., 2003). Per tant NF κ B podria ser un bon candidat per mitjançar l'activació de gens mesenquimals induïda per Snail.

Per confirmar aquesta hipòtesi primer es va analitzar si Fibronectina i LEF1 eren sensibles a NF κ B en les nostres línies cel·lulars. Així, es va estudiar si l'activador VP16-Rel, constructe químera que conté el domini transactivador de VP-16 seguit del domini d'unió al DNA de NF κ B, Rel; era capaç d'activar els promotors estudiats. Tal com mostra la Figura R27, l'activitat de promotor de Fibronectina i LEF1 augmentava de manera dosi dependent quan es co-transfectava amb aquest activador, indicant que aquests promotors eren efectivament susceptibles de ser activats per NF κ B.

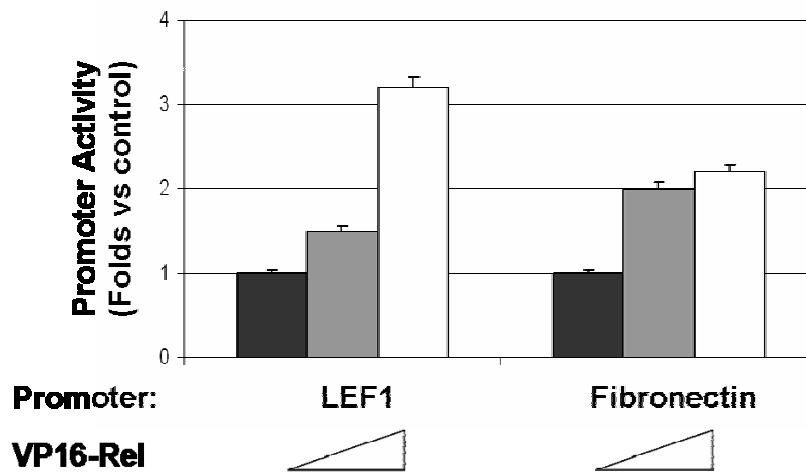


Figura R27: El dominant positiu de NF κ B indueix l'activitat de promotor de Fibronectina i LEF1. Els promotors de Fibronectina i LEF són sensibles a VP16-Rel. Es van co-transfectar cèl·lules SW480-ADH amb quantitats creixents (0, 10 i 25 ng) de VP16-Rel. L'activitat luciferasa s'analitzava 48 hores post-transfecció i era estimada com la relació entre unitats de luciferasa del promotor problema (RLU firefly) i les del promotor control (RLU Renilla): RLU firefly/ RLU Renilla. L'activitat Luc era expressada com a l'increment de l'activitat trobada en cèl·lules transfectades amb Snail respecte l'activitat obtinguda en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error representen la desviació estàndard.

8.1. Snail activa la transcripció mitjançada per NF κ B.

Seguidament es va estudiar si Snail i E-cadherina podien modificar l'activitat NF κ B. Per això es van transfectar cèl·lules SW480-ADH que expressaven establement Snail i E-Cadherina amb un plàsmid amb el gen de la luciferasa controlat per promotor sintètic que responia a NF κ B, aquest plàsmid va ser cedit pel Dr. Manuel Fresno del Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM) de Madrid. Mentre que en les cèl·lules que expressaven Snail l'activitat d'aquest

promotor era dues vegades l'activitat de les cèl·lules control (Fig. R28), en les cèl·lules que expressaven E-Cadherina, tan si expressaven Snail com si no, l'activitat es perdia totalment. Indicant un efecte repressor d'E-Cadherina predominant sobre l'efecte de Snail.

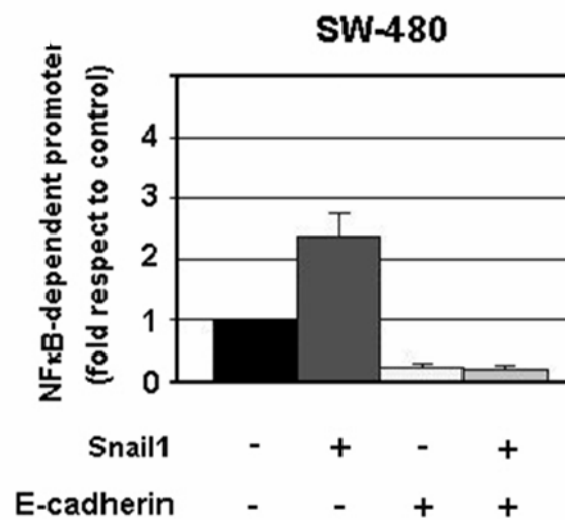


Figura R28. Snail activa i E-Cadherina reprimeix l'activitat NFκB. L'activitat NFκB es va determinar transfectant cèl·lules SW480-ADH, que expressaven establement Snail i E-Cadherina, amb 150 ng de reporter de NFκB. L'activitat luciferasa va ser mesurada 48 hores post-transfecció en tots els casos. Els nivells obtinguts eren normalitzats en tots els casos per l'activitat RLuc. L'activitat Luc era expressada com a percentatge de l'activitat trobada en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error representen la desviació estàndard.

8.2. La subunitat p65 de NFκB s'uneix al promotor de

Fibronectina

Estudis anteriors realitzats per altres grups havien descrit que NFκB s'unia al promotor de Fibronectina de rata per la seqüència TTAATTTCA (Lee et al., 2002).

Es va voler comprovar si la subunitat P65 de NFκB podia unir-se al promotor de Fibronectina humana a les cèl·lules SW480-ADH i si aquesta unió era regulada per Snail i per E-Cadherina. Amb aquest objectiu es va realitzar un assaig de CHIP (de les sigles en anglès Chromatin Immunoprecipitation) a partir d'extractes de clons de SW480-ADH que expressaven establement Snail, E-Cadherina i E-Cadherina/Snail. Es va realitzar una PCR amb els immunoprecipitats obtinguts amb l'incubació dels lisats amb anti p65 o amb IgG de ratolí com a control. Es va detectar que el fragment +39/-265 del promotor de Fibronectina, i no un fragment control de mida similar situat a -2kb de l'inici de transcripció del mateix promotor, co-precipitava específicament amb p65 (Fig. R29). Snail feia augmentar la quantitat de p65 unit al promotor de Fibronectina i l'expressió d'E-Cadherina provocava una disminució d'aquesta interacció.

Per tant, Snail induïa la formació d'un complex "in vivo", que contenia p65 i el promotor proximal de Fibronectina i que podria estar mediant-ne l'activació. L'expressió d'E-Cadherina inhibia la formació d'aquest complex, tant si s'expressava Snail com si no.

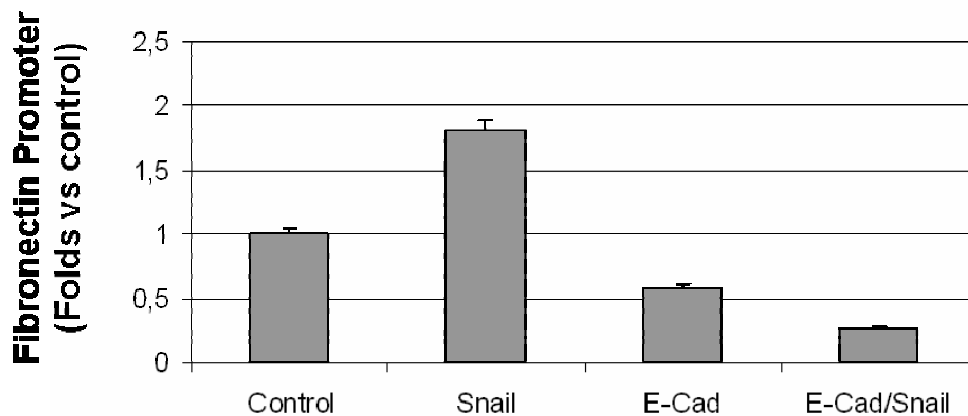


Figura R29: P65 interacciona amb el promotor de Fibronectina, Snail i E-Cadherina modulen aquesta interacció. Cèl·lules SW480-ADH que expressaven establement Snail, E-cadherina o E-Cadherina/Snail es van utilitzar per a realitzar un assaig CHIP. Es va immunoprecipitar amb un anticòs monoclonal anti P65 o amb Ig G de ratolí com a anticòs irrelevant i es va realitzar una PCR quantitativa amb primers que corresponien als fragments +105/-255 i -2kb del promotor de Fibronectina. Els nivells de RNA eren normalitzats pels nivells d'expressió d'un RNA control, HPRT, i expressats com a increment respecte als valors detectats en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a un experiment representatiu on cada valor s'ha analitzat per triplicat. Les barres d'error representen a desviació estàndard.

8.3. L'E-cadherina interacciona i reté la subunitat p65 de NFκB als contactes cèl·lula-cèl·lula.

El mecanisme molecular pel qual l'E-Cadherina modulava l'increment de p65 unit al promotor de Fibronectina era desconegut. Un estudi anterior va demostrar que la β -Catenina podia interaccionar indirectament amb les subunitats p50 i p65 del factor de transcripció NFκB (Deng et al., 2002a).

Aquesta interacció induïa una davallada de l'activitat transcripcional de NF κ B, ja que es provocava una reducció de la interacció de NF κ B amb els promotors dels seus gens diana. Segons aquests autors, doncs, la interacció β -Catenina/NF κ B estaria lligada a repressió. D'altra banda, altres estudis corroboraven que l'augment de β -Catenina citosòlica, provocat per la reducció de l'expressió d'E-Cadherina, feia augmentar l'activitat NF κ B (Kuphal et al., 2004; Kuphal and Bosserhoff, 2006). Aquest augment era causat per l'activació de la p38 MAPK per part de β -Catenina que fosforilava la subunitat p65 i, gràcies a aquesta fosforilació, podia translocar-se al nucli per actuar com a activador.

Vam voler comprovar si en les nostres línies cel·lulars NF κ B podia interaccionar amb la β -Catenina per a poder relacionar, posteriorment, els resultats obtinguts amb l'activitat transcripcional de NF κ B.

Es va estudiar la localització cel·lular de la subunitat P65 de NF κ B en SW480-ADH Snail en presència o absència de l'E-Cadherina. En clons que expressaven E-Cadherina, la distribució de la subunitat P65 de NF κ B canviava respecte als clons que no expressaven E-Cadherina. Tot i que en ambdues condicions s'observava un marcatge citoplasmàtic, en presència d'E-Cadherina, el marcatge era més localitzat resseguint els contactes. Justament en aquesta zona s'observava part del marcatge de P65 co-localitzant amb la β -Catenina (Fig. R30B) i l'E-Cadherina (Fig. R30C). A les cèl·lules que expressaven Snail es va observar que la subunitat P65 de NF κ B es localitzava per tot el citoplasma i inclús en el nucli de les cèl·lules de manera difusa (Fig.

R30A). S'observava també co-localització de la β -Catenina amb p65 però sense concentrar-se als contactes.

Aquests resultats semblaven indicar que quan les cèl·lules expressaven E-Cadherina, la subunitat p65 quedava immobilitzada a una estructura associada als contactes cèl·lula-cèl·lula i per tant, impossibilitant el seu trànsit al nucli per unir-se als promotors dels gens diana.

La retenció de p65 a una estructura associada a l'E-Cadherina l'hem demostrat també per co-immunoprecipitació en aquestes mateixes cèl·lules. Aquests resultats han estat obtinguts en el laboratori de la Dr. Mireia Duñach amb qui mantenim una estreta col·laboració (veure Discussió).

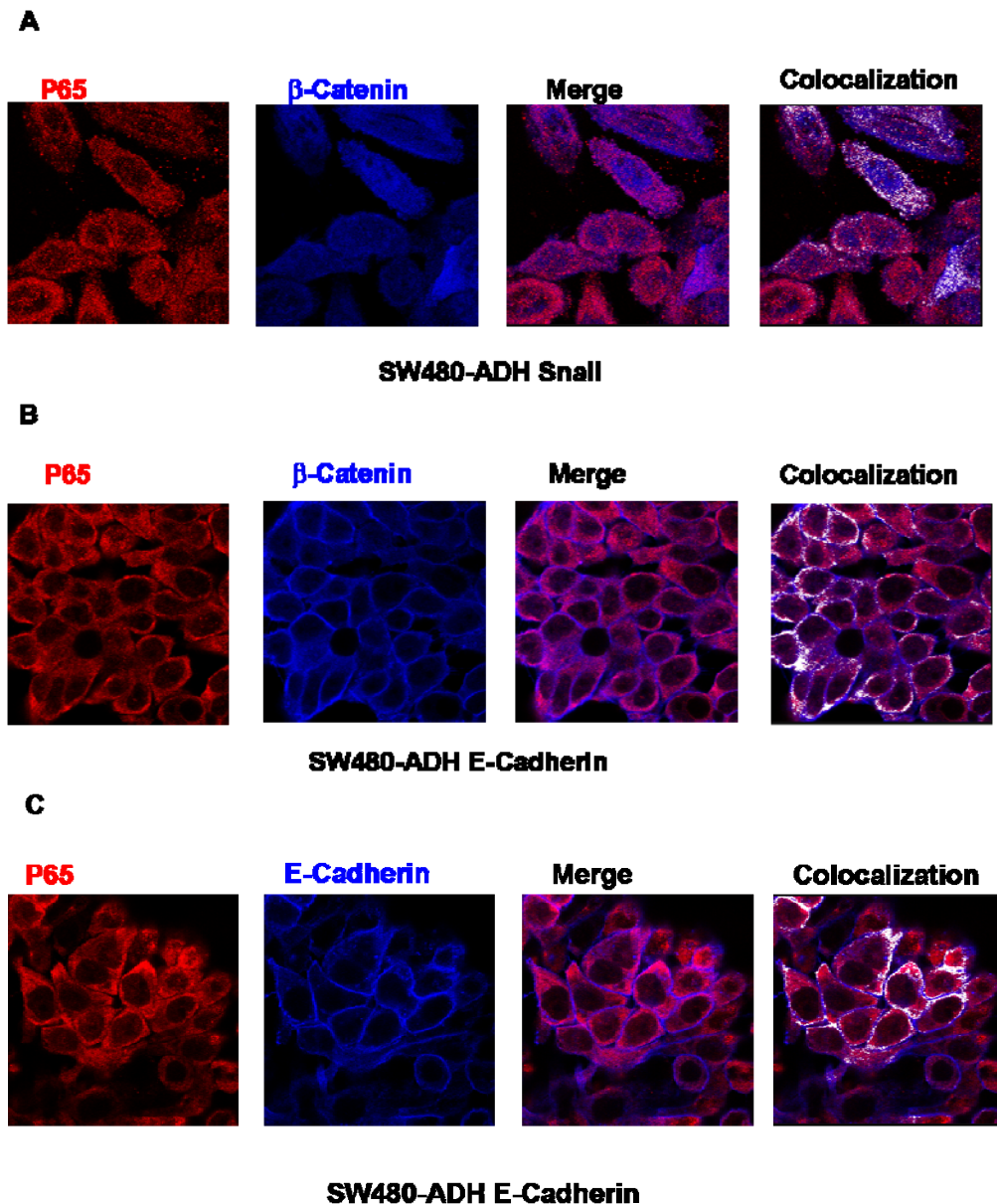


Figura R30. A: La subunitat p65 de $NF\kappa B$ es localitza al citoplasma i al nucli co-localitzant amb la β -Catenina en cèl·lules SW480-ADH que expressen Snail. Cèl·lules SW480-ADH transfectades establement amb pcDNA3 Snail-HA, es van fixar amb PFA al 4% i es va immunodetectar β -Catenina (blau) i p65 (vermell). Les imatges corresponen a una secció de 1 μm obtinguda per microscòpia confocal. **B:** La subunitat p65 de $NF\kappa B$ es localitza al citoplasma resseguint els contactes co-localitzant amb la β -Catenina en cèl·lules SW480-ADH que expressen E-Cadherina. Cèl·lules SW480-ADH transfectades establement amb pBATEM, es van fixar amb PFA al 4% i es va immunodetectar β -Catenina (blau) i p65 (vermell). Les imatges corresponen a una secció de 1 μm obtinguda per microscòpia confocal. **C:** La subunitat p65 de $NF\kappa B$ es localitza al citoplasma resseguint els contactes co-localitzant amb la E-Cadherina en cèl·lules SW480-ADH que expressen E-Cadherina. Cèl·lules SW480-ADH transfectades establement amb pBATEM, es van fixar amb PFA al 4% i es va immunodetectar E-Cadherina (blau) i p65 (vermell). Les imatges corresponen a una secció de 1 μm obtinguda per microscòpia confocal

Discussió

Funcionalment, podríem dir que la EMT és el mecanisme pel qual cèl·lules epitelials generades en una regió particular es poden dissociar de l'epiteli i migrar per dirigir-se a diferents localitzacions. Així doncs, cèl·lules immòbils, adherides entre elles i a la matriu extracel·lular, prenen la capacitat de moure's com a cèl·lules individuals (Nieto, 2002).

Els processos de transició epiteli-mesènquima (EMT) són essencials en diversos estadis del desenvolupament embrionari, des de la gastrulació a la formació de la cresta neural, òrgans i teixits (Thiery, 2002). Però la EMT també té lloc en processos patològics, com ara la fibrosi i en etapes primerenques en que els carcinomes adquireixen capacitats invasives i metastàsiques.

L'E-Cadherina és el component central de l'adhesió intercel·lular i és necessària per a la formació de l'epiteli en l'embrió i per mantenir l'homeòstasi epitelial en l'adult. S'ha descrit, tant *in vitro* com *in vivo*, que la pèrdua de l'expressió de l'E-Cadherina està fortament implicada en els processos de la EMT. El procés de repressió de l'E-Cadherina, i la consegüent inducció de la EMT, ja sigui en processos tumorals com durant el desenvolupament embrionari, és dut a terme per un mateix grup de factors de transcripció, on, entre d'altres, cal esmentar Slug (Hajra et al., 2002), E47 (Perez-Moreno et al., 2001), Zeb1 i Zeb2 (Comijn et al., 2001a), Twist (Yang et al., 2004) i Snail (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). De fet, ratolins mutants per a Snail moren durant la gastrulació, a causa d'una EMT deficient i una expressió sostinguda d'ECadherina (Carver et al., 2001).

Snail és conegut com un repressor que s'uneix a seqüències consens del DNA del tipus caixes E, presents en els promotors diana, com ara el de l'E-Cadherina i altres gens epitelials. L'expressió ectòpica de Snail en cèl·lules epitelials no solament resulta en la repressió de l'expressió de l'E-Cadherina, sinó també, en l'activació de la transcripció de gens mesenquimals (Cano et al., 2000; Guaita et al., 2002). El mecanisme pel qual Snail pot activar aquests gens encara és desconegut. No es tenen evidències de si Snail pot activar directament aquests gens, o l'activació es dona com a un mecanisme indirecte lligat a la repressió d'algun repressor.

L'objectiu del nostre treball era el de caracteritzar el mecanisme d'activació de gens mesenquimals per Snail.

1.Snail activa la transcripció de gens marcadors mesenquimals en totes les línies cel·lulars estudiades.

Durant el nostre estudi hem emprat diverses línies cel·lulars, hem utilitzat línies provinents de còlon humà com les SW480, les HT29-M6 i les LS174; també hem treballat amb cèl·lules pancreàtiques com les RWP1 i, finalment, amb cèl·lules de ronyó de gos (MDCK). Totes aquestes línies tenen origen epitelial i comparteixen la característica de que han respost a l'expressió ectòpica de Snail. Així, quan expressen Snail les cèl·lules es desenganxen les unes amb les altres i adquireixen un aspecte més estirat. En aquest treball hem

comprovat que Snail és capaç d'augmentar el mRNA de Fibronectina i LEF1 en totes les línies cel·lulars que expressen de forma estable Snail, repetint-se així, els resultats obtinguts anteriorment pel nostre grup en cèl·lules HT29-M6 (Guaita et al., 2002).

Hem escollit la línia més apropiada per a cada tipus d'experiment. Així, hem utilitzat a línia RWP1 per a molts assaigs reporter, perquè amb aquestes cèl·lules s'aconsegueix una elevada eficiència de transfecció. En canvi, les línies HT29-M6 i les LS174T es transfecten molt malament, amb la qual cosa són poc adients per aquests assajos.

La línia HT29-M6 s'ha utilitzat per a realitzar l'assaig de *time course*, perquè, gràcies al sistema *tet/off*, podíem regular l'expressió de Snail. Les SW480 van ser escollides per a sobreexpressar l'E-Cadherina, ja que al no expressar grans quantitats d'E-Cadherina, ens permetien apreciar canvis per la sobreexpressió de la forma ectòpica.

Pel que fa a la línia LS174T, va ser utilitzada per dues raons, en primer lloc, disposàvem dels clons ens els quals podíem induir l'expressió del siRNA de β -Catenina i el mRNA de Δ TCF4 i, consegüentment, hi havia la possibilitat de silenciar l'expressió de β -Catenina i d'anul·lar la transcripció relacionada amb el complex β -Catenina/TCF. En segon lloc, aquesta línia ens va semblar molt interessant perquè expressava una forma no funcional de l'E-Cadherina, la qual cosa ens permetia estudiar els efectes d'aquesta mancança. Finalment, la línia d'origen caní MDCK, que tal com la línia HT29-M6, havia estat transfectada establement amb Snail, anteriorment al nostre laboratori i presentava una

baixada quasi tota la de l'E-Cadherina a nivell de proteïna. Extractes d'aquesta línia es van utilitzar per a fer assajos de *Pull down*.

Aquest augment de l'expressió de Fibronectina i LEF1 induïda per Snail també s'ha observat a nivell de proteïna en les tres línies cel·lular on s'ha analitzat MDCK, RWP1 i HT29-M6 (dades no mostrades). A més d'aquests dos gens, l'expressió de Snail indueix l'expressió d'altres gens mesenquimals com Zeb-1 (Guaita et al., 2002) i Vimentina (Cano et al., 2000). Altres estudis realitzats pel nostre grup han demostrat que Snail també activa l'expressió de Zeb-2 i Cox-2. L'increment de l'expressió de Fibronectina i LEF1 mitjançat per Snail podia ser causat per un augment en la transcripció d'ambdós gens, o bé, perquè Snail estabilitzés el mRNA ja sintetitzat. Tot i que per LEF1 no s'havia constatat mai l'augment de la seva expressió per estabilització dels seu mRNA, en el cas de la Fibronectina, si que s'havia descrit anteriorment que TGF- β estabilitzava el mRNA de dita proteïna en fibroblasts cardíacs (Moriguchi et al., 1999). Els experiments reporter ens demostraven que Snail induïa l'activitat de promotor de Fibronectina i LEF1. Estudis realitzats en el nostre laboratori (Porta et al., dades no publicades) van descartar la possibilitat de que Snail tingués una funció estabilitzadora del mRNA, ja que en presència de Snail no augmentava la vida mitja dels mRNA de Fibronectina i LEF1. Per tant l'activació mediada per Snail, és en part causada per un augment de la transcripció.

2.El mecanisme d'activació i de repressió de gens per Snail tenen requeriments diferents.

Tal com he comentat anteriorment, el mecanisme repressor del factor de transcripció Snail ha estat estudiat. Snail reconeix la seqüència consens, anomenada caixa E, presents al promotor dels seus gens diana, s'hi uneix i recluta un complex corepressor, format, al menys en part, pel corepressor mSin3A i les Histones de-acetilases HDAC1 i HDAC2 (Peinado et al., 2004).

En un principi, vam pensar que potser el mecanisme d'activació també es donava per una interacció directa de Snail al promotor i el reclutament de coactivadors, en comptes de repressors. De fet, estudis molt recents realitzats amb Snail2 (també conegut com a Slug), han demostrat que aquest gen pot activar el seu propi promotor mitjançant la unió a les caixes E que aquest conté (Sakai et al., 2006). La seqüència clonada del promotor de Fibronectina, però, no tenia cap caixa E, indicant que probablement el mecanisme pel qual es dona l'activació mitjançada per Snail no depèn d'aquestes caixes. El promotor de LEF1, en canvi té una caixa E. Els assaigs BOPA (Biotinilated Oligonucleotid Precipitation Assay) amb el promotor de LEF1 amb la Caixa E normal o mutada, ens indiquen que el factor Snail únicament pot unir-se al promotor de LEF1 quan la caixa E està íntegra. Tot i això, Snail era capaç d'activar el promotor de LEF1 amb la caixa E mutada i aquesta activació encara era més gran que l'exercida sobre el promotor amb la caixa E wt intacta. D'aquest resultat podem concloure que Snail pot activar la transcripció de promotors amb caixes E i sense, per un mecanisme independent d'aquestes caixes.

Basant-nos en els resultats obtinguts, distingiríem dues situacions diferents pel que fa a l'activació dels promotors de gens mesenquimals per Snail (veure més endavant). Per una banda, els promotors que no presenten cap caixa E, com per exemple el promotor de Fibronectina, en aquets promotors únicament es dóna l'activació mediada per Snail. En canvi, en els promotors que presenten una o més caixes E, com és el cas del promotor de LEF1, s'hi hauria de donar un equilibri entre la funció activadora/repressora de Snail. Aquesta diferència permet a Snail regular d'una manera molt més acurada l'expressió d'aquest gen. En el cas de LEF1, es tracta d'un gen rellevant per a la EMT, ja que a diferència de Fibronectina, no és només un efector de la EMT, sinó que pot promoure l'expressió d'altres gens implicats en la transició (Nawshad and Hay, 2003c). Per tant, donada la rellevància d'aquest gen en la EMT, s'entén que estigui sotmès a un mecanisme més complex d'activació/repressió per Snail. Aquest és el cas també, com comentaré més endavant, de la regulació del propi Snail, el qual pot activar-se i reprimir-se a ell mateix.

3. La repressió de l'E-Cadherina és necessària però no suficient per a que es produeixi l'activació gènica mediada per Snail.

L'activació de gens mesenquimals mediada per Snail, per tant, no era deguda a una interacció directa de Snail amb els promotors dels gens diana a través de

les caixes E, tal com ocorre amb la repressió. Malgrat això, l'activació podria ser conseqüència de la repressió que realitza Snail sobre l'E-Cadherina.

Utilitzant un sistema *tet/off* per Snail, hem constatat que la repressió de l'E-Cadherina i l'activació de Fibronectina i LEF1 són dos esdeveniments concomitants, per tant, repressió i activació podrien estar relacionades. A més, quan sobreexpressàvem E-Cadherina en cèl·lules SW480-ADH, l'activitat transcripcional i els nivells de mRNA de Fibronectina i LEF1, disminuïen dràsticament. Aquest resultat lliguen amb els obtinguts anteriorment pel nostre grup, per assaigs reporter. En aquests assaigs s'observava que els mutants de Snail que no podien reprimir l'expressió de l'E-Cadherina (P2A) no tenien la capacitat d'activar el promotor de Fibronectina i LEF1 (Dominguez et al., 2003). Per tant, la presència d'E-Cadherina sembla impedir l'activació dels dos gens estudiats. Només quan es redueixen els nivells d'E-Cadherina observem activació. Altres estudis han demostrat que l'expressió d'altres gens mesenquimals disminueix amb l'expressió d'E-Cadherina, és el cas, per exemple de la N-Cadherina (Kuphal and Bosserhoff, 2006), Cox-2 (Rao et al., 2006) i Vimentina (Andersen et al., 2005), entre d'altres.

Tot i aquets resultats que indiquen que la presència d'E-Cadherina anul·la l'activació de gens mesenquimals, la repressió d'E-Cadherina no és suficient per a que es doni l'activació gènica, ja que quan vam analitzar l'efecte de Snail sobre Fibronectina i LEF1 en cèl·lules LS174T que tenen mutada l'E-Cadherina i per tant, no funcional (Efstathiou et al., 1999), vam detectar un increment de l'expressió dels dos gens. Per tant, a més de reprimir E-Cadherina, Snail activa altres factors que intervenen en l'activació. En els següents apartats descriurem

i analitzarem alguns d'aquets factors. Aquests resultats són recolzats pels obtinguts per altres grups que demostraven que la repressió de l'E-Cadherina no és suficient per a que es produeixi la transició epiteli-mesènquima (Thiery, 2002).

4. La β -Catenina participa en l'activació de gens mesenquimals induïda per Snail.

Tal com he comentat en la introducció, la disminució de l'expressió d'E-Cadherina dóna lloc, a la pèrdua de la unió intercel·lular depenent de calci. Com a conseqüència, es dóna l'alliberament de la β -Catenina dels contactes de manera que pot translocar-se al nucli, unir-se a factors de transcripció i induir l'expressió d'un gran nombre de gens (revisat a (Bienz and Clevers, 2000).

S'han publicat nombrosos estudis que confirmen la rellevància que té la β -Catenina en la transició epiteli-mesènquima. S'ha demostrat que durant la transició que es produeix durant la progressió tumoral es dóna un augment de la β -Catenina nuclear (Brabletz et al., 2005a) i ratolins KO per β -Catenina no poden realitzar la EMT durant el desenvolupament embrionari i, per tant no es dóna la gastrulació (Huelsenken et al., 2000). Per tant, la rellevància de la β -Catenina en la EMT podria ser doncs, resultat de la capacitat de la β -Catenina d'activar gens mesenquimals com els que hem estudiat aquí. Entre aquests gens també s'hi podria trobar el propi Snail com discutirem més endavant. En

aquest treball presentem un seguit de proves que indiquen que la β -Catenina participa directament en la regulació de gens mesenquimals durant la transició epiteli-mesènquima induïda per Snail.

A partir d'experiments on depleccionàvem la β -Catenina endògena, o bé per l'expressió d'un siRNA específic, o per l'expressió d'APC, hem demostrat, que la β -Catenina és requerida per a l'activació de Fibronectina i LEF1 mediada per Snail, ja que s'eliminava l'activació que promovia Snail dels dos gens, tant a nivell d'activitat de promotor com a nivell de síntesi de mRNA.

En concordança, hem detectat per co-immunoprecipitació l'expressió de Snail, en cèl·lules MDCK, feia disminuir la quantitat d'E-Cadherina que s'unia a la β -Catenina, per tant, la funció repressora de Snail sobre l'expressió de l'E-Cadherina feia augmentar els nivells de β -Catenina i, probablement, que podia exercir com a coactivador transcripcional de gens.

Hem pogut constatar per assajos reporter en varis tipus cel·lulars, que Snail, de forma dosi depenent, activa el plàsmid anomenat TOP que inclou el gen de la luciferasa controlat per un promotor sintètic que conté 4 llocs d'unió a TCF. Aquests resultats suggereixen que l'expressió de Snail provoca un augment de la β -Catenina transcripcionalment activa i que l'activació que Snail exerceix sobre gens mesenquimals podria estar mitjançada pel complex β -Catenina/TCF.

D'acord amb aquests resultats, es detecta més β -Catenina nuclear en cèl·lules SW480-ADH que expressen Snail, tot i que el marcatge nuclear en tots els assajos realitzats era tènue, ja que la quantitat de β -Catenina

transcripcionalment activa és baixa i es troba al límit de detecció per immunofluorescència.

És molt més clar, però, que en aquest mateix tipus cel·lular, quan es sobreexpressa de forma ectòpica E-Cadherina, encara que també hi hagi expressió de Snail, la localització subcel·lular de β -Catenina canvia, passa del nucli al citoplasma, on forma part dels contactes cèl·lula-cèl·lula.

De fet, tan en els promotors de Fibronectina i LEF1 (Dominguez et al., 2003), com en el TOP (tal com s'ha vist en aquest treball), els mutants de Snail que no tenen la capacitat de reprimir, tampoc són capaços d'activar el reporter TOP, per tant, la repressió de l'E-Cadherina és necessària per a que Snail produeixi aquesta activació.

Recolzant la participació de la β -Catenina en l'activació de gens mesenquimals, hem constatat, per assajos de CHIP (de l'anglès Chromatin Immunoprecipitation), que la β -Catenina forma part d'un complex activador que s'uneix al promotor de Fibronectina. Aquesta interacció és regulada per l'expressió d'E-Cadherina. Per tant, tal com era d'esperar, tots els nostres resultats indiquen que la presència d'E-Cadherina impedeix l'activitat transcripcional de β -Catenina sobre els dos gens estudiats. En el mateix sentit, per exemple, estudis anteriors suggereixen que la proliferació cel·lular promoguda per la β -Catenina en fibroblasts i en cèl·lules tumorals de còlon, pot ser bloquejada per l'expressió ectòpica o bé, de la forma sencera de l'E-Cadherina o el domini citosòlic que interacciona amb la β -Catenina (Gottardi et al., 2001; Stockinger et al., 2001).

D'acord amb aquests resultats, Snail afavoreix la interacció de la β -Catenina amb els elements de la maquinària de la transcripció. S'ha descrit que la β -Catenina interacciona amb la TATA Binding Protein (TBP) (Hecht et al., 1999) i amb la CRE Binding Protein (CBP/P300) (Hecht et al., 2000) pel domini C-Terminal, al qual també se l'anomena domini transactivador. Així, assajos de *Pull down* van demostrar que en presència de Snail l'extrem C-Terminal està més ocupat que en les cèl·lules control, indicant que, probablement Snail promou la funció transcripcional de la β -Catenina. En canvi en cèl·lules sense expressió de Snail, trobem més quantitat de β -Catenina interaccionant amb l'E-Cadherina i una fracció més petita de β -Catenina unida a la maquinària de transcripció.

Un primer assaig de co-immunoprecipitació amb anti β -Catenina, recolzen aquesta hipòtesi ja que, en cèl·lules RWP1 que expressaven Snail, hi havia més CBP unida a β -Catenina que en cèl·lules que no expressaven Snail. (Fig. D1). Aquests resultats reforçarien els obtinguts anteriorment per *Pull down*. Els gens marcadors mesenquimals Fibronectina i LEF1 podrien ser activats de la mateixa manera que el grup del Dr. Hecht ha demostrat que s'activen els promotors de *siamois*, Ciclina D1 i el constructe sintètic TOP. L'activació de tots ells requereix la interacció del domini C-Terminal de la β -Catenina amb el domini CH3 de les acetil-transferases CBP o P300, aquest complex s'uneix als promotors diana i media la seva activació (Hecht et al., 2000). Snail podria estar promovent la interacció de la β -Catenina amb CBP.

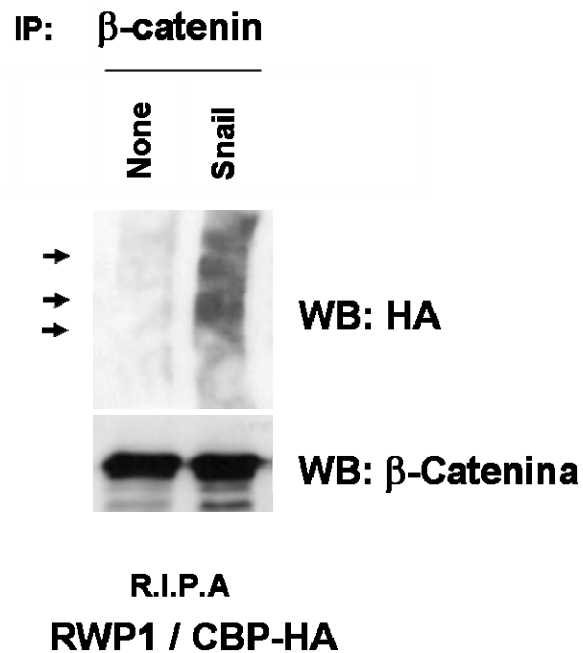


Figura D1: En presència de Snail hi ha més β -Catenina unida a CBP. Cèl·lules RWP1 van ser transfectades amb pcDNA3- Snail i pcDNA3-CBP-HA o amb els plàsmids buits com a control. Es van realitzar extractes proteics amb RIPA i es va incubar amb anti β -Catenina. Els immunoprecipitats es van analitzar per Western blot.

De la mateixa manera, Snail podria estar afavorint també la interacció de β -Catenina amb la TATA Binding Protein (TBP). Amb aquest objectiu vam realitzar assajos de *Binding in vitro* amb proteïnes recombinants de β -Catenina, Snail i TBP, l'experiment consistia en incubar GST- β -Catenina sola amb proteïna recombinant TBP a la qual, durant la purificació, se li havia tallat la GST, o bé, GST- β -Catenina amb GST-Snail i TBP. Tal com es pot veure a la figura D2, tan la β -Catenina, com Snail interaccionaven amb TBP *in vitro*. Aquest resultat suggereix que: 1) Snail interacciona directament amb TBP; i 2) Snail podria formar part del complex β -Catenina/TBP. Tot i que vam realitzar assajos de co-immunoprecipitació Snail/TBP en lisats de cèl·lules amb Snail o

sense. Aquest experiments no van donar resultats concloents per problemes tècnics.

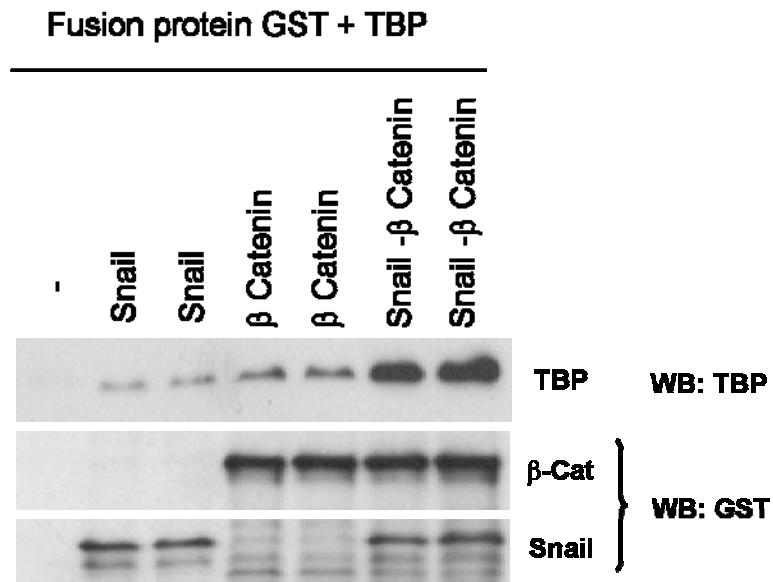


Figura D2. Snail interacciona *in vitro* amb la TATA Binding Protein (TBP). 1 pmol de proteïna de fusió GST-Snail i/o GST-β-Catenina van ser incubades amb 2 pmols de proteïna de fusió TBP a la qual, durant la purificació, se li havia tallat la GST. Els complexos es van purificar amb Glutatió-sefarosa i es van analitzar per Western blot amb anticossos anti GST i anti TBP.

5. La β-Catenina forma part d'un complex activador *in vivo*, amb el promotor de Fibronectina, diferent a la via canònica.

La β-Catenina no té la capacitat d'interaccionar directament amb el DNA, necessita d'una proteïna pont per a la unió. Els *partners* d'unió al DNA clàssics

de la β -Catenina són els membres de la família TCF, però també se'n coneixen altres com els factors de transcripció SOX.

Pel que fa als factors TCF, el promotor de Fibronectina té un lloc semblant a la seqüència consens que un treball realitzat per Gradl i els seus col·laboradors en *Xenopus*, indica que podria ser funcional (Gradl et al., 1999). Experiments reporter amb el promotor humà mutat realitzats al nostre laboratori, però, van determinar que no ho era (Porta-de-la-Riva et al., dades no publicades). En el cas del promotor de LEF1 (Hovanes et al., 2000), trobem 3 llocs d'unió a TCF4 (factor de la família TCF present a l'epiteli intestinal), també però, s'han descrit elements de resposta a factors WNT (WRE) independents de TCF (Filali et al., 2002).

Els assajos reporter on estudiàvem l'efecte d'un dominant positiu i un dominant negatiu de TCF sobre l'activitat del promotor de Fibronectina i del promotor de LEF1 indiquen que el promotor de LEF1 clonat és sensible a l'activitat β -Catenina /TCF, mentre que confirmem que el promotor de Fibronectina no ho és. Tot i això, els experiments de reporter en RWP1 i els d'expressió de Δ TCF4 *tet/on* en cèl·lules L174T, suggereixen que tant Fibronectina com LEF1 responen a Snail en presència del dominant negatiu Δ TCF4. Per tant, podem concloure que l'activació gènica mediada per Snail necessita β -Catenina, i els factors TCF són prescindibles.

Els nostres resultats suggereixen doncs, que la intervenció de la β -Catenina en l'activació de gens mesenquimals promoguda per Snail es donava per una via diferent a la canònica. Alguns autors havien demostrat que la β -Catenina podia unir-se a SOX17 i activar l'expressió de gens de l'endoderma independentment

de TCF4 (Sinner et al., 2004). També podia interaccionar amb SOX7 (Takash et al., 2001) o SOX9 (Akiyama et al., 2004) i interferir en l'activitat β -Catenina/TCF4. A més, un estudi realitzat per Sakai et al. (Sakai et al., 2006), havia constatat que el gen Slug (també anomenat Snail2) que presenta moltes similituds en estructura i funció amb Snail, era capaç d'activar-se ell mateix mitjançant la interacció directa amb SOX9, el qual, s'unia a una seqüència flanquejant a la caixa E del promotor de Slug. Hem constatat que l'expressió ectòpica de SOX7 i SOX9 potencia l'efecte activador de Snail sobre l'expressió de Fibronectina i LEF1 a nivell de mRNA i de transcripció. Aquestes dades, a més, anaven acompanyades d'un lleuger canvi en el fenotip de les cèl·lules en cultiu a causa de la transfecció amb els cDNA de SOX7 o SOX9.

Tot i que els resultats obtinguts apuntaven cap a una possible implicació de SOX7 i SOX9 en l'activació gènica mitjançada per Snail, caldrien altres experiments per confirmar-ho com assajos ChIP, que constatessin la interacció de SOX7 i SOX9 amb el promotors dels gens diana, assajos de co-immunoprecipitació de la β -Catenina amb ambdues proteïnes i, sobretot experiments de silenciament, mitjançant RNA interferents, d'ambdós gens. Aquest darrer tipus d'assaig seria clau per demostrar la rellevància de SOX7 i/o SOX9 en l'activació induïda per Snail. Així, expressant ectòpicament un siRNA específic per cada un dels dos gens comprovaríem si realment s'anul·laria l'activació de Fibronectina i LEF1 causada per Snail. De fet, aquest experiments ja s'han intentat durant el desenvolupament d'aquest treball, i, tot i que vam utilitzar diferents estratègies per a l'expressió d'un siRNA específic per

SOX7 i SOX9), no vam aconseguir demostrar una davallada en els nivells d'aquestes proteïnes.

D'altra banda, SOX7 podria intervenir en un *feed-back* regulador, ja que Snail i E-Cadherina en regulen la seva expressió. Es van analitzar els nivells de RNA de SOX7 i SOX9 en clons estables de SW480-ADH que expressaven Snail i E-Cadherina. Mentre que l'expressió de SOX9 no es veia afectada per l'expressió de Snail i E-Cadherina (Fig. D3), els nivells de RNA de SOX7 augmentaven amb l'expressió de Snail i disminuïen amb la sobreexpressió d'E-Cadherina.

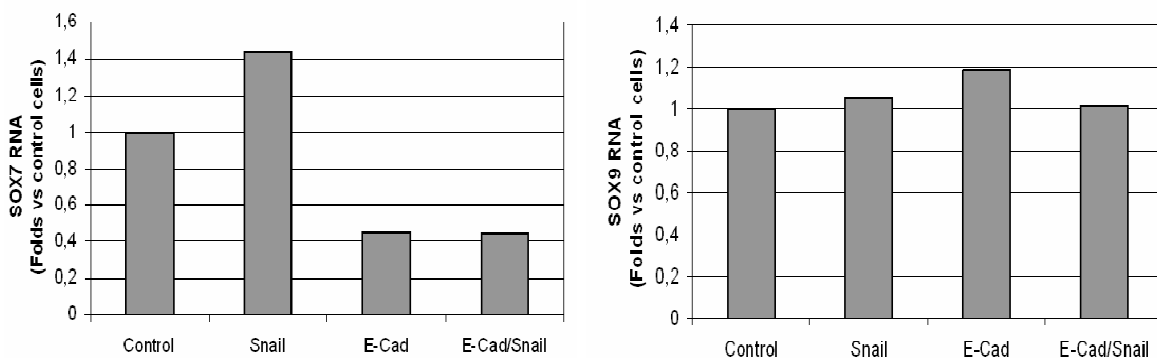


Figura D4. L'expressió de SOX7 està regulada per Snail i E-Cadherina. Es va extreure RNA de cèl·lules SW480-ADH que expressaven establement Snail i E-Cadherina. Es van analitzar els nivells RNA per RT-PCR amb primers específics.

Per tant, concloem que aquests factors són uns bons candidats per a mediar l'acció de la β -Catenina . Els factors SOX podrien ser els encarregats d'aportar especificitat a la β -Catenina per a que activi gens implicats en la EMT en contra dels gens relacionats amb la proliferació cel·lular. Aquesta especificitat pot venir donada també per la unió simultània del factor NF κ B, com comentaré més endavant.

La β -Catenina pot interaccionar amb altres factors de transcripció i activar la transcripció gènica de manera independent dels factors TCF. Entre d'altres, trobem els factors FOXO (Essers et al., 2005), el SF-1 (Steroidogenic factor-1) (Parakh et al., 2006) i el receptor d'andrògens (Yang et al., 2002). Recentment, també s'ha descrit que HIF-1 (de l'anglès Hypoxia Inducible Factor) competeix amb TCF4 per a unir-se a β -Catenina. Aquest complex β -Catenina/HIF-1 interacciona amb el DNA dels promotors dels gens diana de HIF i media la seva activació (Kaidi et al., 2007). Durant la progressió tumoral, l'expansió del tumor ve condicionada per les alteracions que es produeixen a l'ambient que l'envolta. Un dels factors determinants és la hipòxia causada pels baixos nivells d'oxigen que arriben al tumor per la inadequada vascularització local. La hipòxia desencadena una resposta transcripcional coordinada mediada, principalment, per l'activació de HIF-1. L'activitat transcripcional relacionada amb HIF-1 facilita adaptacions a la hipòxia com ara activació de gens de la glicòlisi, angiogènesi, regulació del pH i aturada del cycle cel·lular. La β -Catenina juntament amb HIF-1 podria promoure doncs, la supervivència de les cèl·lules que conformen el tumor i permetre l'avançament de la progressió tumoral. Altres estudis han constatat que HIF-1 també activa l'expressió de Snail i en conseqüència es produeix una davallada dels nivells d'E-Cadherina i un augment de la capacitat d'invasió de les cèl·lules tumorals (Evans et al., 2007; Imai et al., 2003b). Per tant, no és descartable que a β -Catenina podria estar participant en l'activació del propi Snail o bé, de l'activació de gens mesenquimals en combinació amb HIF-1 i Snail.

6. Snail i la β -Catenina interaccionen, pot aquesta interacció ser rellevant per a l'activació de gens mesenquimals?

Resultats que han aparegut durant la realització d'aquest treball indiquen que tan Snail com la β -Catenina poden estar regulats per un mecanisme comú dependent de WNT i GSK3 β (Zhou et al., 2004b). Per tant, la interacció entre la β -Catenina i Snail que hem descrit en aquest treball, podria doncs ser rellevant pel *cross-talk* entre les dues vies. Tot i això, aquesta interacció podria tenir un paper en el mecanisme d'activació gènica, com també en altres funcions de les dues proteïnes com ara la regulació de la xarxa de microtúbuls.

Tot i que els experiments de co-immunoprecipitació entre β -Catenina i Snail ens van donar molts problemes d'inespecificitat, amb la qual cosa, no vam poder extreure cap resultat conclouent, la caracterització de la interacció directa entre la β -Catenina i Snail, ens permet crear un model de com aquestes dues proteïnes interaccionen. Per assajos de *Pull Down*, de *Binding in vitro*, d'Overlay i de Dot Blot, vam poder concloure que Snail pot interaccionar directament amb la β -Catenina tant per l'extrem N-Terminal, com amb el C-Terminal. La fosforilació que afecta a l'export de Snail (Dominguez et al., 2003) no condiciona aquesta interacció, ja que tant la forma fosforilada de Snail com la no fosforilada poden interaccionar amb la β -Catenina. En col·laboració amb el grup de la Dra. Duñach de la Universitat Autònoma de Barcelona van determinar que la β -Catenina s'uneix a Snail pel domini armadillo, i que els

extrems N i C-Terminal de la mateixa β -Catenina podrien estar regulant aquesta interacció, ja que ambdós extrems poden interaccionar el domini Armadillo i aquesta interacció, no permet que aquest s'uneixi a Snail (Castaño J. and Vilagrasa P et al., dades no publicades). La figura D4 mostra un esquema de com podria donar-se la interacció entre les dues proteïnes.

El model que es planteja s'inspira amb el tipus de regulació que s'ha descrit per altres proteïnes que interaccionen amb la β -Catenina, com ara l'E-Cadherina (Piedra et al., 2001), la TATA Binding Protein (Piedra et al., 2001) i l' α -Catenina (Piedra et al., 2003). El pas d'una forma de β -Catenina a l'altra vindria regulada per la interacció amb dits partners (Castano et al., 2002; Piedra et al., 2001) i/o per fosforilacions (Piedra et al., 2001; Piedra et al., 2003; Castano et al., 2002; Roura et al., 1999).

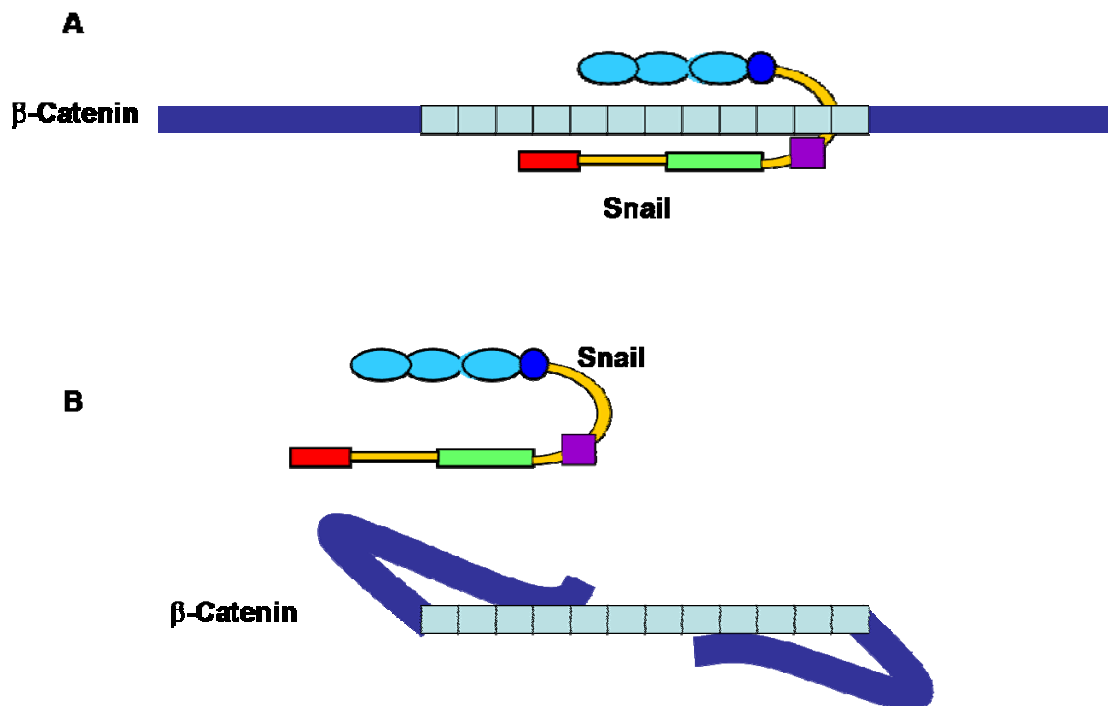


Figura D4: Esquema de la interacció entre la β -Catenina i Snail. A: El domini N i C-Terminal de Snail interaccionen amb el domini central Armadillo de la β -Catenina. **B:** Els extrems N i C-Terminal de la β -Catenina competeixen amb Snail per la interacció amb el domini Armadillo i impossibiliten la interacció amb Snail.

No sabem quina funció pot tenir la interacció β -Catenina/Snail, de fet no podem assegurar que tingui alguna rellevància *in vivo*. Ja que en les nostres cèl·lules amb Snail observem més β -Catenina transcripcionalment activa, ens vam plantejar si Snail podria estabilitzar la β -Catenina. Primerament vam analitzar els nivells de β -Catenina en clons estables per Snail i no vam detectar nivells de proteïna de β -Catenina superiors respecte a les cèl·lules control. A més, vam estudiar la vida mitja de la β -Catenina en cèl·lules que expressaven Snail de forma estable i no vam trobar diferències en la vida mitja de la β -Catenina respecte a les cèl·lules control (dades no mostrades). També vam comprovar que no hi havia diferències entre cèl·lules que expressaven Snail i cèl·lules

control en els nivells de β -Catenina fosforilada en Serines (aquesta fosforilació promou la degradació via proteasoma de la β -Catenina) (dades no mostrades). Per tant, podem descartar que Snail estabilitzi a la β -Catenina, és a dir, Snail no juga un paper com a protector de la β -Catenina. En canvi, aquest efecte si que és detectable a la inversa. Segons un estudi recent, la β -Catenina protegeix a Snail de la seva degradació, ja que, el complex β -Catenina/TCF activa l'expressió d'Axina2, aquesta exerceix de Chaperona a de la GSK3 β i impedeix que fosforili Snail, evitant així, que es desagradi via proteasoma (Yook et al., 2006). Encara que els autors no ho han provat directament, aquesta estabilització es pot explicar sense que les proteïnes Snail i β -Catenina interaccionin.

Una altra possibilitat, seria que la funció de la interacció β -Catenina/Snail fos necessària per a l'activació dels gens mesenquimals promoguda per Snail. Potser un requeriment més per a que Snail activi la transcripció dels seus gens diana seria que estigués unit a la β -Catenina i el complex β -Catenina/Snail es trobés unit al promotor dels gens que activa. Aquesta interacció podria afavorir que la β -Catenina incrementés la unió als coactivadors o als factors de transcripció adequats per a unir-se específicament amb el DNA dels promotors des gens mesenquimals. A favor d'aquesta possibilitat, encara que no de maner conclusiva, experiments de ChIP realitzats en el nostre laboratori per la Dra. Peiró i la Montse Porta, van demostrar que Snail era capaç d'interaccionar amb el promotor proximal de Fibronectina (veure Model en l'apartat 9).

Altres aproximacions que ens informarien si la interacció β -Catenina/Snail és necessària per a l'activació gènica mediada per Snail, seria comprovar si

l'expressió exògena de les dues proteïnes assemblades tingués un efecte positiu en l'activació dels gens diana. Per confirmar-ho vam construir un cDNA quimera que contenia el cDNA de Snail seguit del de β -Catenina. Esperaríem que si la interacció Snail/ β -Catenina fos necessària per a l'activació, l'expressió d'aquest cDNA promouria una activació més acusada que la promoguda per l'expressió de Snail sol. Vam transfectar cèl·lules RWP1 sensibles a Snail amb aquest cDNA clonat en el vector d'expressió pcDNA3 i els promotors de Fibronectina i LEF1. En els assajos reporter realitzats amb tots dos promotors vam poder observar que la proteïna de fusió no activava més, sinó que fins i tot interferia, la transcripció dels dos gens respecte quan transfectàvem amb Snail sense β -Catenina (dades no mostrades). Entenem però, que aquest resultat negatiu no indica que el complex β -Catenina-Snail no tingui una funció activadora, ja que la quimera podria adaptar una estructura diferent a la del complex nadiu β -Catenina-Snail.

Una altra possibilitat, a més de que el complex β -Catenina-Snail actuï com a activador al nucli, és que tingui una altra funció al citoplasma associada als microtúbuls. Aquest complex podria regular la seva polimerització i afavorir la capacitat de migració de la cèl·lula intervenint en la formació de lamel·lipodis i altres estructures que participen en el moviment cel·lular. Assajos realitzats anteriorment al nostre laboratori pel Dr. Domínguez, van demostrar que Snail co-localitza i co-sedimenta, específicament en varies línies cel·lulars, amb la xarxa de microtúbuls. Com a resultat de la unió a als microtúbuls, en resulta l'estabilització d'aquests (Domínguez et al., dades no publicades). La β -Catenina també s'ha relacionat amb la xarxa microtubular, un estudi molt recent

ha demostrat que la β -Catenina s'acumula al centrosoma i organitza els microtúbuls (Huang et al., 2007), anteriorment s'havia descrit que la β -Catenina recluta i estabilitza als microtúbuls a les unions adherents, mitjançant la interacció directa amb la Dineïna (Allan and Nathke, 2001; Ligon et al., 2001). En aquest cas, la funció del complex β -Catenina/Snail seria independent de la funció de β -Catenina com a activador transcripcional.

7. E-Cadherina controla també l'activitat del factor de transcripció NF κ B.

Tal com s'ha descrit a la introducció, una altra molècula de senyalització que s'ha relacionat amb el fenotip mesenquimal i que està regulada d'alguna manera per l'E-Cadherina és NF κ B. Tal com passa amb la β -Catenina, NF κ B s'ha relacionat amb la EMT, tant en la inducció com en el manteniment (Huber et al., 2004a; Huber et al., 2004c).

Així com la regulació de l'activitat transcripcional de la β -Catenina per l'E-Cadherina és coneguda, no es té quasi informació sobre com l'activitat NF κ B és reprimida per l'E-Cadherina.

De fet, vam confirmar que els gens emprats en el nostre estudi eren sensibles a NF κ B, i que en el nostre model cel·lular, Snail i E-Cadherina podien modificar l'activitat transcripcional mediada per NF κ B.

Estudis realitzats en rates havien constatat que NF κ B activa el promotor de Fibronectina unint-se a una caixa TTAATTTCA (Lee et al., 2002). En assaigs de CHIP en cèl·lules SW48-ADH que expressaven establement Snail i E-Cadherina, vam demostrar que NF κ B podia formar un complex amb el promotor proximal de Fibronectina *in vivo*, aquesta interacció era major en les cèl·lules que expressaven Snail, mentre que la unió de la subunitat p65 amb el promotor es perdia quan les cèl·lules expressaven E-Cadherina. Per tant, aquests resultats recolzaven l'evidència de que l'E-Cadherina inhibia l'activació transcripcional vinculada a NF κ B.

Tal com he dit abans, no es tenen molts coneixements sobre com l'E-Cadherina pot realitzar aquesta inhibició de l'activitat NF κ B. Hi ha alguns estudis que suggereixen que en la regulació a la baixa provocada per l'E-Cadherina hi juga una paper important la β -Catenina. Com a conseqüència de la disminució de l'expressió de l'E-Cadherina, augmenten els nivells de β -Catenina lliure al citoplasma, aquesta activaria la p38 MAPK que, a la seva vegada, fosforilaria l'inhibidor I κ B, una vegada fosforilat, aquest es degradaria via proteasoma alliberant NF κ B que translocaria al nucli i induiria l'activació dels seus gens diana (Kuphal et al., 2004). Altres treballs, però, també relacionen a la β -Catenina amb la via NF κ B però contràriament a l'estudi de Kuphal et al., Deng et al. proposen que l'expressió de la β -Catenina provoca la inhibició de l'activitat NF κ B en cèl·lules tumorals de càncer de còlon i de mama. Aquesta correlació inversa s'explicaria per una interacció indirecta de la β -Catenina interaccionaria amb les subunitats p65 i p50 i, com a resultat

d'aquesta interacció, es detecta una disminució de la capacitat de NF κ B d'unir-se al DNA dels gens diana (Deng et al., 2004)

En aquest treball hem observat que en els clons que expressaven E-Cadherina, la distribució de la subunitat P65 de NF κ B canviava respecte als clons que no expressaven E-Cadherina. Tot i que en ambdues condicions s'observava un marcatge citoplasmàtic, en presència d'E-Cadherina, el marcatge era més localitzat resseguint els contactes. Justament en aquesta zona s'observava part del marcatge de P65 co-localitzant amb la β -Catenina i l'E-Cadherina. Els resultats suggerien que quan les cèl·lules expressaven E-Cadherina, la subunitat p65 quedava immobilitzada a una estructura associada als contactes cèl·lula-cèl·lula i per tant, impossibilitant el seu trànsit al nucli per unir-se als promotors dels gens diana. Aquesta retenció de p65 a una estructura associada relacionada amb l'E-Cadherina l'hem demostrat també per co-immunoprecipitació en aquestes mateixes cèl·lules (Fig. D5). Aquests resultats han estat obtinguts per la Guiomar Solanas del laboratori de la Dr. Mireia Duñach amb qui mantenim col·laboració. A la figura es pot observar que p65 co-immunoprecipita amb la β -Catenina i altres molècules dels contactes com p120 només en presència d'E-Cadherina. L'I κ B α competeix amb l'E-Cadherina per a unió a p65.

Si bé la interacció de β -Catenina i E-Cadherina s'ha demostrat directa (Kemler, 1993), no està clar com interacciona NF κ B. Els resultats de la figura D4 que mostren que la β -Catenina i p120 no co-precipiten amb p65 sinó hi ha E-Cadherina poden suggerir que NF κ B interacciona amb una molècula del contacte madur que no és β -Catenina, p120 i potser tampoc E-Cadherina.

D'altra banda, els resultats de Deng et al. Indiquen que la β -Catenina pot interaccionar, de manera indirecta, amb $\text{NF}\kappa\text{B}$. En aquest estudi, com nosaltres, relacionaven aquesta interacció amb un davallada de l'activitat $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Deng et al., 2002b), tot i que en el nostre cas, la interacció es produeix al citoplasma.

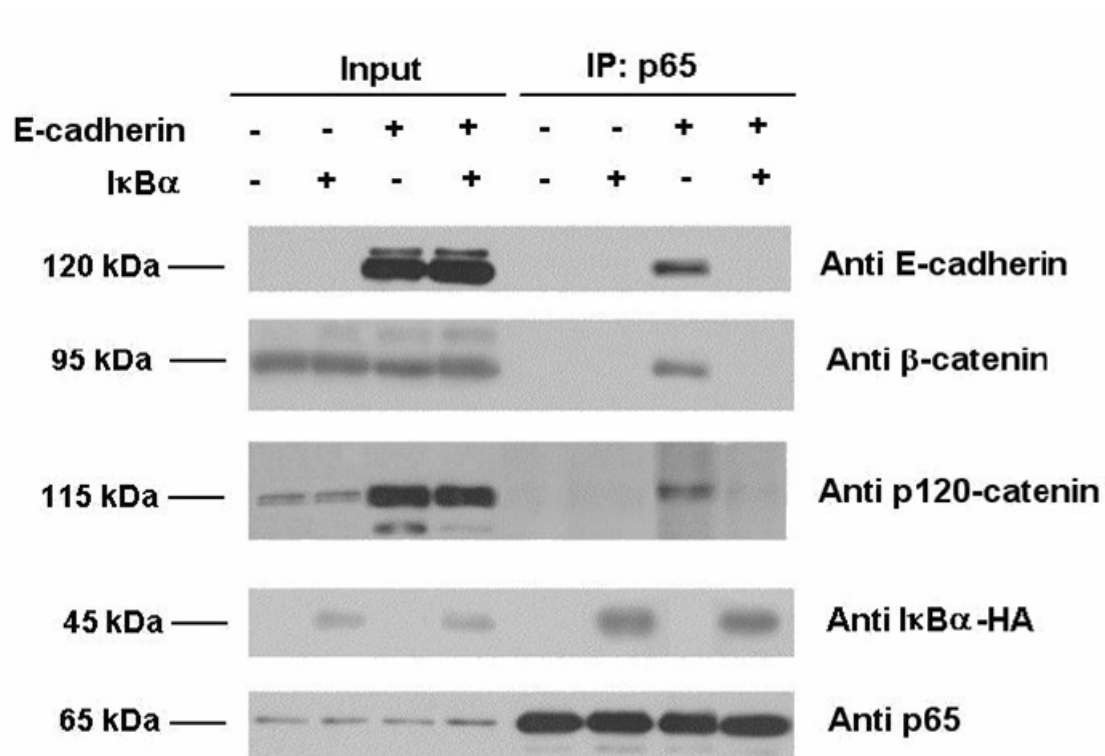


Figura D5: La subunitat p65 de $\text{NF}\kappa\text{B}$ co-precipita amb E-Cadherina, β -Catenina i p120-Catenina. Es van obtenir extractes proteics amb RIPA de cèl·lules SW480-ADH control i E-Cadherina, transfectades transitòriament amb el pcDNA3- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -HA o el vector buit; i es van incubar amb anti p65. Els immunoprecipitats es van resoldre per SDS-PAGE i es van analitzar els nivells d'E-Cadherina, β -Catenina, α -Catenina i $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (HA) per Western blot.

Aquests resultats apunten, de manera inequívoca i per primera vegada, cap a un mecanisme de regulació de l'activitat transcripcional lligada a $\text{NF}\kappa\text{B}$, anàleg

al de la β -Catenina. L'E-Cadherina, segresta i inactiva als contactes els factors de transcripció.

9. Model de l'activació de gens marcadors mesenquimals per Snail.

Proposem, a partir dels resultats obtinguts durant el desenvolupament d'aquesta tesi, amb els gens Fibronectina i LEF1 en varies línies cel·lulars, un model per a l'activació de gens mesenquimals mediada per Snail.

En el model que proposem hauríem de distingir dues situacions diferents a la cèl·lula: en primer lloc, quan la cèl·lula presenta expressió d'E-Cadherina, que com hem vist, és un factor clau en la regulació de l'activació gènica induïda per Snail; i en segon lloc, quan les cèl·lules no n'expressen.

Els nostres resultats indiquen que quan les cèl·lules presenten les unions adherents madures (Fig. D5A), l'activitat transcripcional de la β -Catenina i $\text{NF}\kappa\text{B}$ queden inhibides. Hem vist que l'E-Cadherina té la capacitat de retenir tant a la β -Catenina, com a la subunitat p65 de $\text{NF}\kappa\text{B}$ en una estructura associada als contactes, impossibilitant que es transloquin al nucli i activin els seus gens diana, per tant, l'E-Cadherina actua com un inhibidor d'aquests gens.

Quan les cèl·lules han patit una EMT com les que expressen Snail de manera ectòpica (Fig. D5B), l'expressió d'E-Cadherina, per tant, està reprimida i la proporció d'unions adherents és insignificant. En aquestes condicions, la β -

Catenina i el NF κ B participen, dins del nucli, en l'activació de gens marcadors mesenquimals com Fibronectina i LEF1. En aquest procés d'activació la β -Catenina i NF κ B formen un complex *in vivo* amb el promotor proximal de Fibronectina. La β -Catenina s'uneix als promotors per un mecanisme diferent al clàssic, és a dir, independentment dels factors TCF. El NF κ B segurament actua unint-se directament als promotors tal com suggereixen estudis realitzats amb el promotor de Fibronectina de rata (Lee et al., 2002).

La participació simultània de β -Catenina i NF κ B podria ser un dels requeriments necessaris per a l'activació de gens mesenquimals dins la bateria diversa de gens activats per les dues molècules independentment. La localització nuclear d'ambdues proteïnes, queda confirmada pels assajos de ChIP i els nostres resultats, confirmen que la subunitat p65 i β -Catenina estan units al promotor de Fibronectina durant l'activació. Aquesta observació apunta en el mateix sentit que la activació simultània d'un conjunt de gens específics, tan β -Catenina com NF κ B són activats per IKK β (I κ B quinasa β) (Lamberti et al., 2001) i la inhibició de GSK3 β fa augmentar els nivells d'ambdues proteïnes (Deng et al., 2004; Steinbrecher et al., 2005), indicant que les dues vies podrien estar regulades per efectors comuns.

En concordança, els gens activats per β -Catenina i NF κ B, d'aquest estudi, estan implicats en la transició epiteli-mesènquima, pròpiament dita. La Fibronectina s'ha relacionat amb capacitat de migració i invasió de la cèl·lula, i el factors de transcripció LEF1 en l'activació transcripcional de gens que intervenen en la EMT.

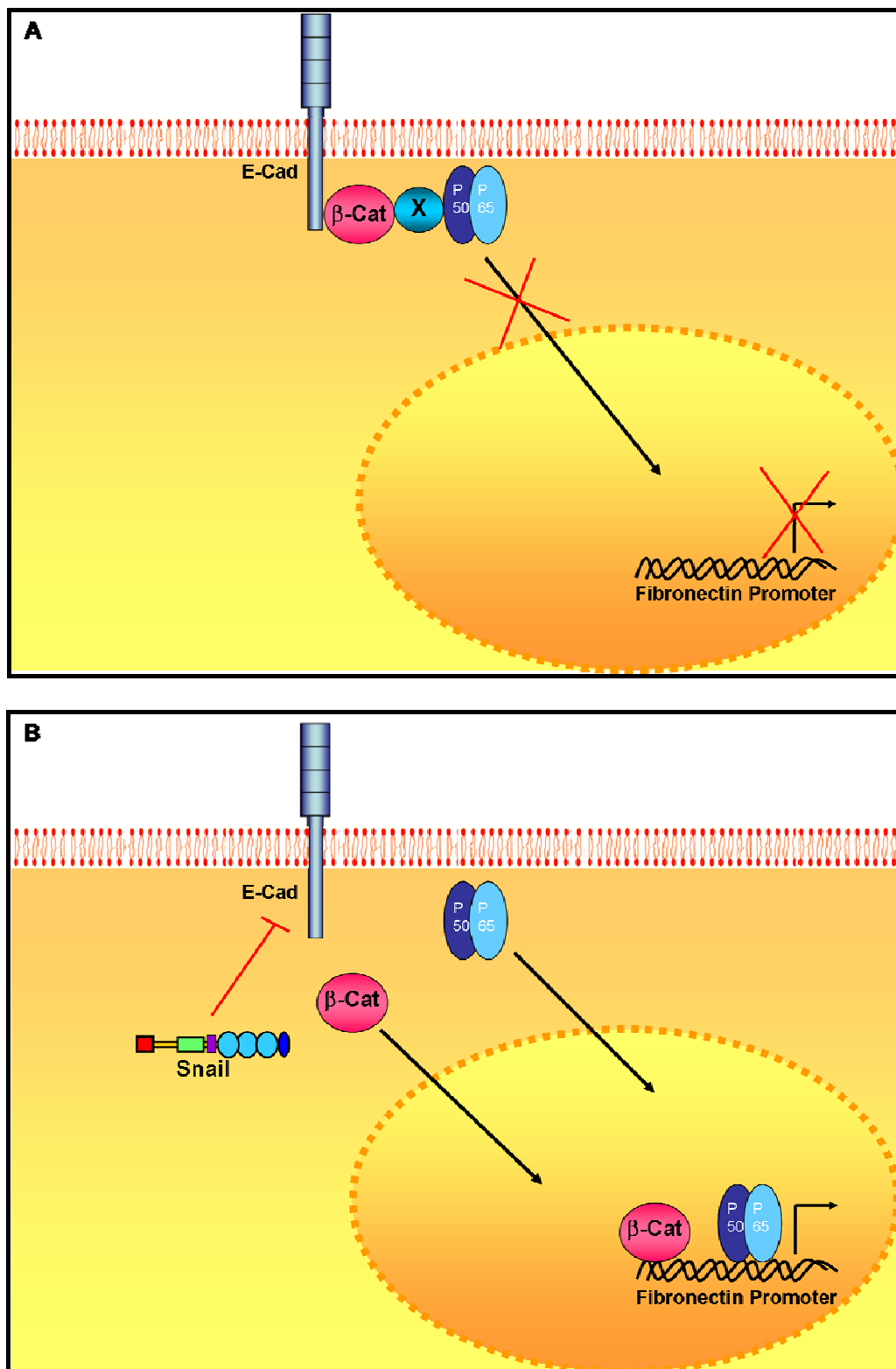


Figura D5: Esquema del model proposat per a explicar l'activació de gens mesenquimals mediada per Snail. **A:** Cèl·lules que expressen E-Cadherina i presenten contactes madurs. **B:** Cèl·lules que expressen Snail i en conseqüència tenen reprimida l'expressió de l'E-Cadherina.

L'activació de marcadors mesenquimals per Snail es dona per un mecanisme diferent que la repressió, tal com hem vist, Snail no interacciona directament amb el promotor dels gens diana per les caixes E.; per tant, per a que Snail l'activi, necessita altres factors que intervinguin en el mecanisme activador.

Basant-nos en els resultats obtinguts, proposaríem el següent mecanisme general per a tots els promotors, tan si presenten caixa E, com si no (Fig. D6).

La β -Catenina interaccionaria amb el promotor mitjançant una proteïna pont (proteïna X en l'esquema), que podria ser un factor de transcripció de la família SOX, com ara SOX7 o SOX9. En aquest complex s'hi unirien coactivadors, probablement per unió directa a β -Catenina, com la TATA Binding Protein (TBP) i la CRE Binding Protein (CBP/P300). A més de β -Catenina, també s'uniria al promotor de Fibronectina la subunitat p65 de NF κ B i probablement, aquesta simultaneïtat provoca l'especificitat necessària per a que s'activi l'expressió de gens que intervenen en la EMT, com ara gens implicats en l'adhesió, la migració, etc.

Fins aquí, Snail doncs, activaria els seus gen diana d'una manera indirecta, com a conseqüència de la repressió de l'E-Cadherina i l'alliberament de la β -Catenina i el NF κ B dels contactes. Però, en experiments realitzats amb la línia cel·lular LS174T que tenien l'E-Cadherina no funcional, vam constatar que aquestes cèl·lules encara eren activades per Snail, per tant, sembla ser que Snail està induint dos esdeveniments per a que es produeixi l'activació dels seus gens diana: 1) la repressió de l'E-Cadherina i el conseqüent alliberament de factors de transcripció com β -Catenina i NF κ B; i 2) altres canvis addicionals.

Aquest segon esdeveniment podria ser la interacció directa del propi Snail amb els promotors dels gens mesenquimals. En concordança, experiments de ChIP i d'EMSA realitzats al nostre laboratori per la Dra. Peiró i per la Montse Porta, han demostrat que també Snail pot formar un complex *in vivo* amb el promotor de Fibronectina, aquesta interacció pot estar relacionada amb l'activació. Snail interaccionaria amb el promotor de manera independent a les caixes E, que tal com hem demostrat en el nostre estudi no estan relacionades amb activació, per tant, de la mateixa manera que la β -Catenina, necessitaria d'una proteïna que mediés aquesta unió. Un possible candidat seria la TBP, ja que havíem vist que Snail hi interaccionava directament *in vitro*. No podem descartar que la interacció β -Catenina/Snail, que hem descrit en aquest treball, sigui rellevant per a la formació del complex activador, i tampoc que TBP i el complex β -Catenina/Proteïna X mediïn la interacció de Snail amb els promotors. En cas de que Snail no utilitzés TBP o β -Catenina/proteïna per unir-se al DNA, aleshores, caldria una proteïna (Proteïna Y a l'esquema) que mediés la interacció. Si existís aquesta proteïna i s'unís a una seqüència específica (XXX), seria, probablement, un altre element que marcaria l'especificitat del complex.

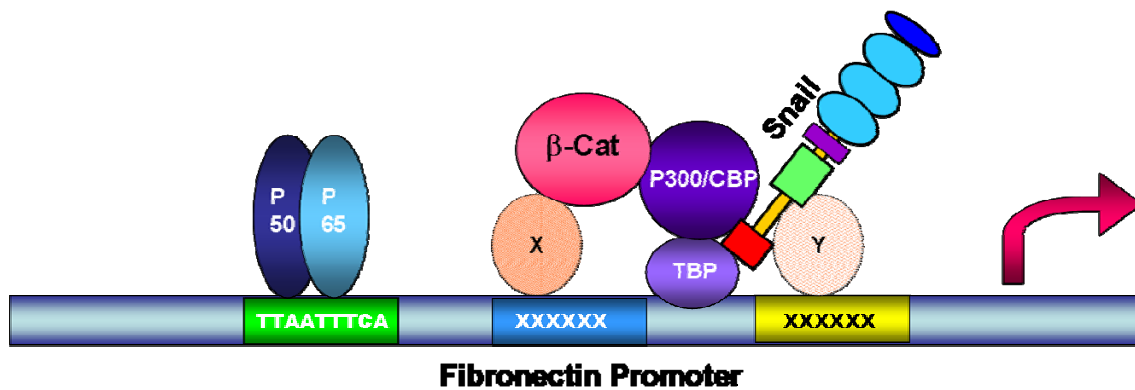


Figura D6. Model esquemàtic per explicar les molècules que intervien en l'activació dels gens mesenquimals que no presenten caixes E als seus promotors.

Pel que fa als promotors que presenten una o més caixes E al seu promotor, com és el cas del promotor de LEF1 (Fig. D7), s'hauria de donar un equilibri entre aquest mecanisme activador i el mecanisme repressor. Això vol dir que la disponibilitat de β -Catenina i $\text{NF}\kappa\text{B}$ determinaria si Snail s'uneix a les caixes E, o bé, si participa en el complex activador. En absència de β -Catenina i $\text{NF}\kappa\text{B}$, quan la cèl·lula presenta contactes cèl·lula-cèl·lula madurs, Snail s'uniria a les caixes E dels promotors i reprimiria la seva expressió. Nosaltres hem pogut demostrar que Snail pot activar i reprimir a l'hora el promotor de LEF1, ja que quan mutàvem la caixa E present en aquest promotor, Snail activava molt més el promotor de LEF1 que no pas quan aquest tenia la caixa E intacta. Hem trobat resultats similars quan analitzàvem l'activació que exerceix Snail sobre el seu propi promotor. El promotor de Snail, tal com el promotor de LEF1 té caixes E, en un estudi realitzat al nostre laboratori per la Dr. Peiró i la Maria Escrivà, Snail pot unir-se a la caixa E situada a -146 de l'inici de transcripció, i reprimir la seva pròpia activitat (Peiro et al., 2006). A més, en absència d'E-Cadherina, Snail també media la seva pròpia activació, en cèl·lules SW480-ADH, Snail fa

augmentar l'activitat del seu promotor unes dues vegades (dades no mostrades). Existeix, per tant, un mecanisme de *feed-back* que regula l'expressió de Snail. Així doncs, com hem comentat anteriorment, sembla que gens implicats en la regulació de la EMT, com Snail i LEF1, són finament regulats per Snail i E-Cadherina. Aquesta regulació pot ser rellevant, especialment, pel control de l'inici dels processos d'EMT o MET.

Durant la progressió tumoral, les cèl·lules que presenten contactes madurs, com les de l'interior del tumor, tot i que puguin rebre senyals externes favorables a l'expressió de gens mesenquimals com Snail i LEF1, serien molt reticents a patir un augment de l'expressió de Snail. Això és degut, probablement, a que la β -Catenina i el NF κ B estarien retinguts a les unions adherents i el mecanisme activador de gens mesenquimals es trobaria bloquejat. Així, si es donessin augments transitoris de Snail, aquest s'uniria a les caixes E i reprimiria l'expressió tan de Snail com de LEF1.

En canvi, en un context on les cèl·lules que formen menys contactes, com en les cèl·lules externes de la massa tumoral que formen els fronts d'invasió del tumor, o les cèl·lules adjacents a una ferida, ja sigui per l'acumulació de canvis epigenètics i alteracions genètiques (en el cas del tumor) o en resposta a citoquines (en el cas de la ferida) (De Craene et al., 2005b), pot donar-se un increment transitori de l'expressió de Snail, aquest pot activar la transcripció de Snail i LEF1 i induir una EMT. Així, a nivells baixos d'E-Cadherina i disponibilitat de β -Catenina i el NF κ B, l'equilibri repressió/activació es declinaria cap a l'activació.

Una altra situació a tenir en compte és a les etapes finals de la progressió tumoral, una cèl·lula del carcinoma pot extravasar-se i instal·lar-se a un entorn nou, pot romandre solitària i formar el que es coneix amb el nom de micrometàstasi, o bé, pot formar un nou carcinoma, que seria la metàstasi pròpiament dita, patint una MET (revisat a (Thiery, 2002)). Si una vegada al nou entorn, la cèl·lula pot recuperar l'expressió i la localització normal de l'E-Cadherina, el mecanisme pel qual Snail activa gens mesenquimals queda bloquejat i l'equilibri activació/repressió de Snail es declina cap a la repressió. Per tant, l'expressió tan de Snail com de LEF1 es reprimeix permetent, que es produeixi la transició mesènquima-epiteli.

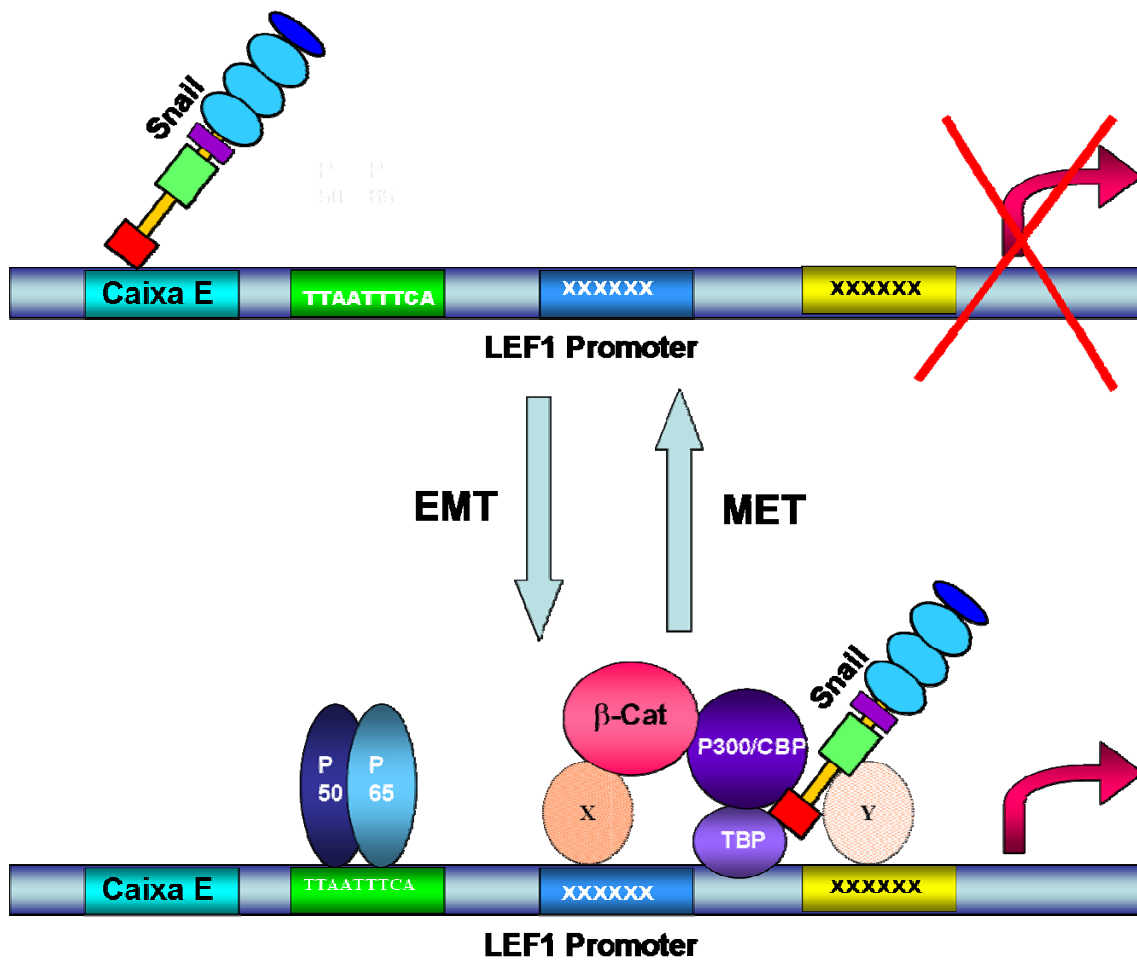


Figura D7: Model esquemàtic per explicar l'alternança de repressió/activació promogudes per Snail en els gens mesenquimals que presenten caixes E als seus promotors.

Conclusions

- 1. El factor transcripcional Snail activa l'expressió dels gens marcadors mesenquimals com Fibronectina i LEF1. Aquesta inducció és deguda, almenys en part, per un augment de la transcripció.
- 2. La repressió de l'E-Cadherina és necessària però no suficient per a que es produeixi l'activació gènica mediada per Snail.
- 3. La β -Catenina és necessària per a l'activació de gens mesenquimals induïda per Snail.
- 4. En presència de Snail, la β -Catenina forma part d'un complex activador *in vivo* amb el promotor de Fibronectina. Els factors de transcripció SOX7 i SOX9 són uns bons candidats per a mediar la interacció de la β -Catenina amb els promotors del gens mesenquimals que activa.
- 5. L'E-Cadherina reté a la β -Catenina a les unions adherents i impedeix la seva funció activadora.
- 6. Snail i la β -Catenina interaccionen directament. Snail s'uneix al domini Armadillo de la β -Catenina tan pel domini N- com pel C-Terminal. La fosforilació que regula l'export de Snail no interfereix en aquesta interacció.

- 7. Snail induïx l'activitat transcripcional associada a NF κ B. La subunitat p65 de NF κ B s'uneix *in vivo* al promotor de Fibronectina. Aquesta interacció és promoguda per Snail i reprimida per E-Cadherina.
- 8. L'E-cadherina interacciona i reté la subunitat p65 de NF κ B als contactes impedit que vagi al nucli i participi en l'activació gènica mediada per Snail.

Bibliografia

Bibliografia

References

- Aberle, H., S.Butz, J.Stappert, H.Weissig, R.Kemler, and H.Hoschuetzky. 1994. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 12):3655-3663.
- Aberle, H., H.Schwartz, and R.Kemler. 1996. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J. Cell Biochem.* 61:514-523.
- Aggarwal, B.B. 2004. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 6:203-208.
- Akiyama, H., M.C.Chaboissier, J.F.Martin, A.Schedl, and B.de Crombrughe. 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 16:2813-2828.
- Akiyama, H., J.P.Lyons, Y.Mori-Akiyama, X.Yang, R.Zhang, Z.Zhang, J.M.Deng, M.M.Taketo, T.Nakamura, R.R.Behringer, P.D.McCrea, and B.de Crombrughe. 2004. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* 18:1072-1087.
- Allan, V. and I.S.Nathke. 2001. Catch and pull a microtubule: getting a grasp on the cortex. *Nat. Cell Biol.* 3:E226-E228.

Andersen, H., J.Mejlvang, S.Mahmood, I.Gromova, P.Gromov, E.Lukanidin, M.Kriajevska, J.K.Mellon, and E.Tulchinsky. 2005. Immediate and delayed effects of E-cadherin inhibition on gene regulation and cell motility in human epidermoid carcinoma cells. *Mol. Cell Biol.* 25:9138-9150.

Ara, T., Y.Deyama, Y.Yoshimura, F.Higashino, M.Shindoh, A.Matsumoto, and H.Fukuda. 2000. Membrane type 1-matrix metalloproteinase expression is regulated by E-cadherin through the suppression of mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Lett.* 157:115-121.

Ashraf, S.I. and Y.T.Ip. 2001. The Snail protein family regulates neuroblast expression of inscuteable and string, genes involved in asymmetry and cell division in Drosophila. *Development* 128:4757-4767.

Avilion, A.A., S.K.Nicolis, L.H.Pevny, L.Perez, N.Vivian, and R.Lovell-Badge. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17:126-140.

Bachelder, R.E., S.O.Yoon, C.Franci, A.G.De Herreros, and A.M.Mercurio. 2005. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* 168:29-33.

Barbera, M.J., I.Puig, D.Dominguez, S.Julien-Grille, S.Guaita-Esteruelas, S.Peiro, J.Baulida, C.Franci, S.Dedhar, L.Larue, and d.H.Garcia. 2004. Regulation of Snail

transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene* 23:7345-7354.

Barker, N. and H.Clevers. 2006. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5:997-1014.

Barrallo-Gimeno, A. and M.A.Nieto. 2005a. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132:3151-3161.

Basseres, D.S. and A.S.Baldwin. 2006. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25:6817-6830.

Battle, E., J.T.Henderson, H.Beghtel, M.M.van den Born, E.Sancho, G.Huls, J.Meeldijk, J.Robertson, W.M.van de, T.Pawson, and H.Clevers. 2002. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111:251-263.

Battle, E., E.Sancho, C.Franci, D.Dominguez, M.Monfar, J.Baulida, and d.H.Garcia. 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2:84-89.

Bauer, A., O.Huber, and R.Kemler. 1998. Pontin52, an interaction partner of beta-catenin, binds to the TATA box binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:14787-14792.

Baulida, J., E.Batlle, and D.H.Garcia. 1999. Adenomatous polyposis coli protein (APC)-independent regulation of beta-catenin/Tcf-4 mediated transcription in intestinal cells. *Biochem. J.* 344 Pt 2:565-570.

Behrens, J., B.A.Jerchow, M.Wurtele, J.Grimm, C.Asbrand, R.Wirtz, M.Kuhl, D.Wedlich, and W.Birchmeier. 1998. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 280:596-599.

Behrens, J., J.P.von Kries, M.Kuhl, L.Bruhn, D.Wedlich, R.Grosschedl, and W.Birchmeier. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382:638-642.

Bienz, M. 2005. beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr. Biol.* 15:R64-R67.

Bienz, M. and H.Clevers. 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103:311-320.

Biswas, D.K., A.P.Cruz, E.Gansberger, and A.B.Pardee. 2000. Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:8542-8547.

Bittner, M., P.Meltzer, Y.Chen, Y.Jiang, E.Seftor, M.Hendrix, M.Radmacher, R.Simon, Z.Yakhini, A.Ben Dor, N.Sampas, E.Dougherty, E.Wang, F.Marincola, C.Gooden,

- J.Lueders, A.Glatfelter, P.Pollock, J.Carpten, E.Gillanders, D.Leja, K.Dietrich, C.Beaudry, M.Berens, D.Alberts, and V.Sondak. 2000. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406:536-540.
- Blache, P., W.M.van de, I.Duluc, C.Domon, P.Berta, J.N.Freund, H.Clevers, and P.Jay. 2004a. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J. Cell Biol.* 166:37-47.
- Blanco, M.J., G.Moreno-Bueno, D.Sarrío, A.Locascio, A.Cano, J.Palacios, and M.A.Nieto. 2002. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 21:3241-3246.
- Bond, M., R.P.Fabunmi, A.H.Baker, and A.C.Newby. 1998. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett.* 435:29-34.
- Bowles, J., G.Schepers, and P.Koopman. 2000. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* 227:239-255.
- Brabletz, T., F.Hlubek, S.Spaderna, O.Schmalhofer, E.Hiendlmeyer, A.Jung, and T.Kirchner. 2005a. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues. Organs* 179:56-65.

Brabletz, T., A.Jung, S.Dag, F.Hlubek, and T.Kirchner. 1999. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am. J. Pathol.* 155:1033-1038.

Brabletz, T., A.Jung, S.Spaderna, F.Hlubek, and T.Kirchner. 2005b. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 5:744-749.

Cano, A., M.A.Perez-Moreno, I.Rodrigo, A.Locascio, M.J.Blanco, M.G.del Barrio, F.Portillo, and M.A.Nieto. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2:76-83.

Capaldo, C.T. and I.G.Macara. 2007. Depletion of E-cadherin disrupts establishment but not maintenance of cell junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 18:189-200.

Carr, K.M., M.Bittner, and J.M.Trent. 2003. Gene-expression profiling in human cutaneous melanoma. *Oncogene* 22:3076-3080.

Carver, E.A., R.Jiang, Y.Lan, K.F.Oram, and T.Gridley. 2001. The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol. Cell Biol.* 21:8184-8188.

Castano, J., I.Raurell, J.A.Piedra, S.Miravet, M.Dunach, and d.H.Garcia. 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.

Castanon, I. and M.K.Baylies. 2002. A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene* 287:11-22.

Cavallo, R.A., R.T.Cox, M.M.Moline, J.Roose, G.A.Polevoy, H.Clevers, M.Peifer, and A.Bejsovec. 1998. Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395:604-608.

Chen, S., S.Mukherjee, C.Chakraborty, and S.Chakrabarti. 2003. High glucose-induced, endothelin-dependent fibronectin synthesis is mediated via NF-kappa B and AP-1. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 284:C263-C272.

Chesire, D.R., C.M.Ewing, W.R.Gage, and W.B.Isaacs. 2002. In vitro evidence for complex modes of nuclear beta-catenin signaling during prostate growth and tumorigenesis. *Oncogene* 21:2679-2694.

Cheung, M., M.C.Chaboissier, A.Mynett, E.Hirst, A.Schedl, and J.Briscoe. 2005. The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Dev. Cell* 8:179-192.

Chua, H.L., P.Bhat-Nakshatri, S.E.Clare, A.Morimiya, S.Badve, and H.Nakshatri. 2007. NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal

transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2.

Oncogene 26:711-724.

Ciruna, B. and J.Rossant. 2001. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev. Cell* 1:37-49.

Clevers, H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469-480.

Comijn, J., G.Berx, P.Vermassen, K.Verschueren, L.van Grunsven, E.Bruyneel, M.Mareel, D.Huylebroeck, and F.van Roy. 2001a. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell* 7:1267-1278.

Conacci-Sorrell, M., I.Simcha, T.Ben Yedidia, J.Blechman, P.Savagner, and A.Ben Ze'ev. 2003. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J. Cell Biol.* 163:847-857.

Crawford, H.C., B.M.Fingleton, L.A.Rudolph-Owen, K.J.Goss, B.Rubinfeld, P.Polakakis, and L.M.Matrisian. 1999a. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 18:2883-2891.

Cruet-Hennequart, S., S.Maubant, J.Luis, P.Gauduchon, C.Staedel, and S.Dedhar. 2003. alpha(v) integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells. *Oncogene* 22:1688-1702.

De Craene, B., B.Gilbert, C.Stove, E.Bruyneel, F.van Roy, and G.Berx. 2005a. The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res.* 65:6237-6244.

De Craene, B., F.van Roy, and G.Berx. 2005b. Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal.* 17:535-547.

del Barrio, M.G. and M.A.Nieto. 2002. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development* 129:1583-1593.

Deng, J., S.A.Miller, H.Y.Wang, W.Xia, Y.Wen, B.P.Zhou, Y.Li, S.Y.Lin, and M.C.Hung. 2002a. beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell* 2:323-334.

Deng, J., W.Xia, S.A.Miller, Y.Wen, H.Y.Wang, and M.C.Hung. 2004. Crossregulation of NF-kappaB by the APC/GSK-3beta/beta-catenin pathway. *Mol. Carcinog.* 39:139-146.

Dominguez, D., B.Montserrat-Sentis, A.Virgos-Soler, S.Guaita, J.Grueso, M.Porta, I.Puig, J.Baulida, C.Franci, and d.H.Garcia. 2003. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol. Cell Biol.* 23:5078-5089.

Efstathiou, J.A., D.Liu, J.M.Wheeler, H.C.Kim, N.E.Beck, M.Ilyas, A.J.Karayiannakis, N.J.Mortensen, W.Kmiot, R.J.Playford, M.Pignatelli, and W.F.Bodmer. 1999. Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:2316-2321.

Eisaki, A., H.Kuroda, A.Fukui, and M.Asashima. 2000. XSIP1, a member of two-handed zinc finger proteins, induced anterior neural markers in *Xenopus laevis* animal cap. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271:151-157.

Elloul, S., M.B.Elstrand, J.M.Nesland, C.G.Trope, G.Kvalheim, I.Goldberg, R.Reich, and B.Davidson. 2005. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 103:1631-1643.

Espineda, C.E., J.H.Chang, J.Twiss, S.A.Rajasekaran, and A.K.Rajasekaran. 2004. Repression of Na,K-ATPase beta1-subunit by the transcription factor snail in carcinoma. *Mol. Biol. Cell* 15:1364-1373.

Essers, M.A., L.M.Vries-Smits, N.Barker, P.E.Polderman, B.M.Burgering, and H.C.Korswagen. 2005. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* 308:1181-1184.

Evans, A.J., R.C.Russell, O.Roche, T.N.Burry, J.E.Fish, V.W.Chow, W.Y.Kim, A.Saravanan, M.A.Maynard, M.L.Gervais, R.I.Sufan, A.M.Roberts, L.A.Wilson,

M.Betten, C.Vandewalle, G.Berx, P.A.Marsden, M.S.Irwin, B.T.Teh, M.A.Jewett, and M.Ohh. 2007. VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and snail. *Mol. Cell Biol.* 27:157-169.

Fagotto, F., U.Gluck, and B.M.Gumbiner. 1998. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr. Biol.* 8:181-190.

Farina, A.R., A.Tacconelli, A.Vacca, M.Maroder, A.Gulino, and A.R.Mackay. 1999. Transcriptional up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression during spontaneous epithelial to neuroblast phenotype conversion by SK-N-SH neuroblastoma cells, involved in enhanced invasivity, depends upon GT-box and nuclear factor kappaB elements. *Cell Growth Differ.* 10:353-367.

Filali, M., N.Cheng, D.Abbott, V.Leontiev, and J.F.Engelhardt. 2002. Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *J. Biol. Chem.* 277:33398-33410.

Franci, C., M.Takkunen, N.Dave, F.Alameda, S.Gomez, R.Rodriguez, M.Escriva, B.Montserrat-Sentis, T.Baró, M.Garrido, F.Bonilla, I.Virtanen, and d.H.Garcia. 2006. Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene* 25:5134-5144.

Fujita, N., D.L.Jaye, M.Kajita, C.Geigerman, C.S.Moreno, and P.A.Wade. 2003a. MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell* 113:207-219.

Fukuchi, T., M.Sakamoto, H.Tsuda, K.Maruyama, S.Nozawa, and S.Hirohashi. 1998. Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res.* 58:3526-3528.

Fuse, N., S.Hirose, and S.Hayashi. 1994. Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by *escargot*. *Genes Dev.* 8:2270-2281.

Gallet, A., C.Angelats, A.Erkner, B.Charroux, L.Fasano, and S.Kerridge. 1999. The C-terminal domain of armadillo binds to hypophosphorylated teashirt to modulate wingless signalling in *Drosophila*. *EMBO J.* 18:2208-2217.

Gary, D.S., O.Milhavet, S.Camandola, and M.P.Mattson. 2003. Essential role for integrin linked kinase in Akt-mediated integrin survival signaling in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 84:878-890.

Genetta, T., D.Ruezinsky, and T.Kadesch. 1994. Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-loop-helix proteins: implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol. Cell Biol.* 14:6153-6163.

Ghosh, S., M.J.May, and E.B.Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:225-260.

Gilmore, T.D. 2006a. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25:6680-6684.

Gordon, M.D. and R.Nusse. 2006. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol. Chem.* 281:22429-22433.

Gottardi, C.J., E.Wong, and B.M.Gumbiner. 2001. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J. Cell Biol.* 153:1049-1060.

Grabl, D., M.Kuhl, and D.Wedlich. 1999. The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Mol. Cell Biol.* 19:5576-5587.

Grande, M., A.Franzen, J.O.Karlsson, L.E.Ericson, N.E.Heldin, and M.Nilsson. 2002. Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. *J. Cell Sci.* 115:4227-4236.

Greenberg, H., X.Ye, D.Wilson, A.K.Htoo, T.Hendersen, and S.F.Liu. 2006. Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:591-596.

Grego-Bessa, J., J.Diez, L.Timmerman, and J.L.de la Pompa. 2004. Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw. *Cell Cycle* 3:718-721.

Grimes, H.L., T.O.Chan, P.A.Zweidler-McKay, B.Tong, and P.N.Tsichlis. 1996. The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol. Cell Biol.* 16:6263-6272.

Grooteclaes, M.L. and S.M.Frisch. 2000. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene* 19:3823-3828.

Grunert, S., M.Jechlinger, and H.Beug. 2003. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:657-665.

Guaita, S., I.Puig, C.Franci, M.Garrido, D.Dominguez, E.Batlle, E.Sancho, S.Dedhar, A.G.De Herreros, and J.Baulida. 2002. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J. Biol. Chem.* 277:39209-39216.

Haas, A.F., J.W.Wong, C.K.Iwahashi, B.Halliwell, C.E.Cross, and P.A.Davis. 1998. Redox regulation of wound healing? NF-kappaB activation in cultured human keratinocytes upon wounding and the effect of low energy HeNe irradiation. *Free Radic. Biol. Med.* 25:998-1005.

Hajra, K.M., D.Y.Chen, and E.R.Fearon. 2002. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res.* 62:1613-1618.

Hart, M.J., S.R.de los, I.N.Albert, B.Rubinfeld, and P.Polak. 1998. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr. Biol.* 8:573-581.

Hay, E.D. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)* 154:8-20.

Hay, E.D. 2005. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev. Dyn.* 233:706-720.

He, T.C., T.A.Chan, B.Vogelstein, and K.W.Kinzler. 1999. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 99:335-345.

He, T.C., A.B.Sparks, C.Rago, H.Hermeking, L.Zawel, L.T.da Costa, P.J.Morin, B.Vogelstein, and K.W.Kinzler. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281:1509-1512.

Hecht, A., C.M.Litterst, O.Huber, and R.Kemler. 1999. Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. *J. Biol. Chem.* 274:18017-18025.

Hecht, A., K.Vleminckx, M.P.Stemmler, F.van Roy, and R.Kemler. 2000. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J.* 19:1839-1850.

Hemavathy, K., S.I.Ashraf, and Y.T.Ip. 2000. Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* 257:1-12.

Honore, S.M., M.J.Aybar, and R.Mayor. 2003. Sox10 is required for the early development of the prospective neural crest in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* 260:79-96.

Hovanes, K., T.W.Li, and M.L.Waterman. 2000. The human LEF-1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 28:1994-2003.

Hsu, S.C., J.Galceran, and R.Grosschedl. 1998. Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol. Cell Biol.* 18:4807-4818.

Huang, P., T.Senga, and M.Hamaguchi. 2007. A novel role of phospho-beta-catenin in microtubule regrowth at centrosome. *Oncogene*.

Huber, A.H., W.J.Nelson, and W.I.Weis. 1997. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90:871-882.

Huber, M.A., N.Azoitei, B.Baumann, S.Grunert, A.Sommer, H.Pehamberger, N.Kraut, H.Beug, and T.Wirth. 2004a. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J. Clin. Invest* 114:569-581.

Huber, M.A., H.Beug, and T.Wirth. 2004c. Epithelial-mesenchymal transition: NF-kappaB takes center stage. *Cell Cycle* 3:1477-1480.

Huber, M.A., N.Kraut, and H.Beug. 2005. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:548-558.

Huelsken, J., R.Vogel, V.Brinkmann, B.Erdmann, C.Birchmeier, and W.Birchmeier. 2000. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J. Cell Biol.* 148:567-578.

Ikenouchi, J., M.Matsuda, M.Furuse, and S.Tsukita. 2003. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J. Cell Sci.* 116:1959-1967.

Imai, T., A.Horiuchi, C.Wang, K.Oka, S.Ohira, T.Nikaido, and I.Konishi. 2003a. Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am. J. Pathol.* 163:1437-1447.

Israel, A., O.Le Bail, D.Hatat, J.Piette, M.Kieran, F.Logeat, D.Wallach, M.Fellous, and P.Kourilsky. 1989. TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF kappa B-like enhancer binding activity which displaces constitutive factors. *EMBO J.* 8:3793-3800.

Jamora, C., P.Lee, P.Kocieniewski, M.Azhar, R.Hosokawa, Y.Chai, and E.Fuchs. 2005. A signaling pathway involving TGF-beta2 and snail in hair follicle morphogenesis.

PLoS. Biol. 3:e11.

Janda, E., K.Lehmann, I.Killisch, M.Jechlinger, M.Herzig, J.Downward, H.Beug, and S.Grunert. 2002. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J. Cell Biol.* 156:299-313.

Jho, E.H., T.Zhang, C.Domon, C.K.Joo, J.N.Freund, and F.Costantini. 2002. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 22:1172-1183.

Jiao, W., K.Miyazaki, and Y.Kitajima. 2002a. Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer* 86:98-101.

Kaibori, M., H.Yanagida, H.Nakanishi, N.Yokoigawa, A.H.Kwon, T.Okumura, and Y.Kamiyama. 2004. Effect of hepatocyte growth factor on induction of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat hepatocytes. *Transplant. Proc.* 36:1977-1979.

Kaidi, A., A.C.Williams, and C.Paraskeva. 2007. Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat. Cell Biol.* 9:210-217.

Kajita, M., K.N.McClinic, and P.A.Wade. 2004. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol. Cell Biol.* 24:7559-7566.

Kang, Y. and J.Massague. 2004. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118:277-279.

Kataoka, H., T.Murayama, M.Yokode, S.Mori, H.Sano, H.Ozaki, Y.Yokota, S.Nishikawa, and T.Kita. 2000. A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Res.* 28:626-633.

Kemler, R. 1993. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 9:317-321.

Kida, Y., M.Kobayashi, T.Suzuki, A.Takeshita, Y.Okamatsu, S.Hanazawa, T.Yasui, and K.Hasegawa. 2005. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine* 29:159-168.

Kim, J., L.Lo, E.Dormand, and D.J.Anderson. 2003. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* 38:17-31.

Kim, J.S., H.Crooks, T.Dracheva, T.G.Nishanian, B.Singh, J.Jen, and T.Waldman. 2002a. Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res.* 62:2744-2748.

Kim, J.S., H.Crooks, A.Foxworth, and T.Waldman. 2002b. Proof-of-principle: oncogenic beta-catenin is a valid molecular target for the development of pharmacological inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 1:1355-1359.

Kinzler, K.W., M.C.Nilbert, L.K.Su, B.Vogelstein, T.M.Bryan, D.B.Levy, K.J.Smith, A.C.Preisinger, P.Hedge, D.McKechnie, and . 1991. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253:661-665.

Koh, T.J. 2002. Extragastric effects of gastrin gene knock-out mice. *Pharmacol. Toxicol.* 91:368-374.

Kolligs, F.T., M.T.Nieman, I.Winer, G.Hu, D.Van Mater, Y.Feng, I.M.Smith, R.Wu, Y.Zhai, K.R.Cho, and E.R.Fearon. 2002. ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer Cell* 1:145-155.

Kramps, T., O.Peter, E.Brunner, D.Nellen, B.Froesch, S.Chatterjee, M.Murone, S.Zullig, and K.Basler. 2002. Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 109:47-60.

- Kuphal, S. and A.K.Bosserhoff. 2006. Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma. *Oncogene* 25:248-259.
- Kuphal, S., I.Poser, C.Jobin, C.Hellerbrand, and A.K.Bosserhoff. 2004. Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma. *Oncogene* 23:8509-8519.
- Lamberti, C., K.M.Lin, Y.Yamamoto, U.Verma, I.M.Verma, S.Byers, and R.B.Gaynor. 2001. Regulation of beta-catenin function by the IkappaB kinases. *J. Biol. Chem.* 276:42276-42286.
- Lamprecht, S.A. and M.Lipkin. 2002. Migrating colonic crypt epithelial cells: primary targets for transformation. *Carcinogenesis* 23:1777-1780.
- Lee, B.H., S.Y.Park, K.B.Kang, R.W.Park, and I.S.Kim. 2002. NF-kappaB activates fibronectin gene expression in rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297:1218-1224.
- Lee, J.M., S.Dedhar, R.Kalluri, and E.W.Thompson. 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* 172:973-981.

Lee, K.S., M.Buck, K.Houglum, and M.Chojkier. 1995. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J. Clin. Invest* 96:2461-2468.

Lefebvre, V., W.Huang, V.R.Harley, P.N.Goodfellow, and B.de Crombrughe. 1997. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol. Cell Biol.* 17:2336-2346.

Lepourcelet, M., Y.N.Chen, D.S.France, H.Wang, P.Crews, F.Petersen, C.Bruseo, A.W.Wood, and R.A.Shivdasani. 2004. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell* 5:91-102.

Li, X., W.Deng, C.D.Nail, S.K.Bailey, M.H.Kraus, J.M.Ruppert, and S.M.Lobo-Ruppert. 2006. Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene* 25:609-621.

Ligon, L.A., S.Karki, M.Tokito, and E.L.Holzbaur. 2001. Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. *Nat. Cell Biol.* 3:913-917.

Liu, C., Y.Li, M.Semenov, C.Han, G.H.Baeg, Y.Tan, Z.Zhang, X.Lin, and X.He. 2002. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108:837-847.

Liu, W., Y.Liu, and J.W.Lowe, Jr. 2001. The role of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinases in insulin-like growth factor-I-mediated effects in vascular endothelial cells. *Endocrinology* 142:1710-1719.

Locascio, A., S.Vega, C.A.de Frutos, M.Manzanares, and M.A.Nieto. 2002. Biological potential of a functional human SNAIL retrogene. *J. Biol. Chem.* 277:38803-38809.

Loch, T., B.Michalski, U.Mazurek, and M.Graniczka. 2001. [Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in neoplastic processes]. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 55:257-274.

Lu, L., S.S.Chen, J.Q.Zhang, F.J.Ramires, and Y.Sun. 2004. Activation of nuclear factor-kappaB and its proinflammatory mediator cascade in the infarcted rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321:879-885.

Lu, Z., S.Ghosh, Z.Wang, and T.Hunter. 2003. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 4:499-515.

Mann, B., M.Gelos, A.Siedow, M.L.Hanski, A.Gratchev, M.Ilyas, W.F.Bodmer, M.P.Moyer, E.O.Riecken, H.J.Buhr, and C.Hanski. 1999a. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:1603-1608.

Mann, B., M.Gelos, A.Siedow, M.L.Hanski, A.Gratchev, M.Ilyas, W.F.Bodmer, M.P.Moyer, E.O.Riecken, H.J.Buhr, and C.Hanski. 1999c. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:1603-1608.

Manzanares, M., A.Locascio, and M.A.Nieto. 2001. The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends Genet.* 17:178-181.

Margetts, P.J., P.Bonnaud, L.Liu, C.M.Hoff, C.J.Holmes, J.A.West-Mays, and M.M.Kelly. 2005. Transient overexpression of TGF- β 1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:425-436.

Martinez-Alvarez, C., M.J.Blanco, R.Perez, M.A.Rabadan, M.Aparicio, E.Resel, T.Martinez, and M.A.Nieto. 2004. Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates. *Dev. Biol.* 265:207-218.

Massague, J. and D.Wotton. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 19:1745-1754.

Mauhin, V., Y.Lutz, C.Dennefeld, and A.Alberga. 1993. Definition of the DNA-binding site repertoire for the Drosophila transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res.* 21:3951-3957.

Messer, G., E.H.Weiss, and P.A.Baeuerle. 1990. Tumor necrosis factor beta (TNF-beta) induces binding of the NF-kappa B transcription factor to a high-affinity kappa B element in the TNF-beta promoter. *Cytokine* 2:389-397.

Michaelson, J.S. and P.Leder. 2001. beta-catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland. *Oncogene* 20:5093-5099.

Miller, J.R., A.M.Hocking, J.D.Brown, and R.T.Moon. 1999. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* 18:7860-7872.

Miravet, S., J.Piedra, J.Castano, I.Raurell, C.Franci, M.Dunach, and d.H.Garcia. 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.* 23:7391-7402.

Miwa, N., M.Furuse, S.Tsukita, N.Niikawa, Y.Nakamura, and Y.Furukawa. 2001. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol. Res.* 12:469-476.

Miyagishi, M., R.Fujii, M.Hatta, E.Yoshida, N.Araya, A.Nagafuchi, S.Ishihara, T.Nakajima, and A.Fukamizu. 2000. Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating beta-catenin with CBP/p300. *J. Biol. Chem.* 275:35170-35175.

Moreno-Bueno, G., E.Cubillo, D.Sarrio, H.Peinado, S.M.Rodriguez-Pinilla, S.Villa, V.Bolos, M.Jorda, A.Fabra, F.Portillo, J.Palacios, and A.Cano. 2006. Genetic profiling of epithelial cells expressing e-cadherin repressors reveals a distinct role for snail, slug, and e47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 66:9543-9556.

Moriguchi, Y., H.Matsubara, Y.Mori, S.Murasawa, H.Masaki, K.Maruyama, Y.Tsutsumi, Y.Shibasaki, Y.Tanaka, T.Nakajima, K.Oda, and T.Iwasaka. 1999. Angiotensin II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates fibronectin and transforming growth factor-beta synthesis via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Circ. Res.* 84:1073-1084.

Morin, P.J., A.B.Sparks, V.Korinek, N.Barker, H.Clevers, B.Vogelstein, and K.W.Kinzler. 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275:1787-1790.

Murray, S.A. and T.Gridley. 2006. Snail family genes are required for left-right asymmetry determination, but not neural crest formation, in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:10300-10304.

Nakamura, T., T.Nishizawa, M.Hagiya, T.Seki, M.Shimonishi, A.Sugimura, K.Tashiro, and S.Shimizu. 1989. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342:440-443.

Nakayama, H., I.C.Scott, and J.C.Cross. 1998. The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev. Biol.* 199:150-163.

Navarro, P., M.Gomez, A.Pizarro, C.Gamallo, M.Quintanilla, and A.Cano. 1991. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell Biol.* 115:517-533.

Nawshad, A. and E.D.Hay. 2003a. TGFbeta3 signaling activates transcription of the LEF1 gene to induce epithelial mesenchymal transformation during mouse palate development. *J. Cell Biol.* 163:1291-1301.

Nibu, Y., H.Zhang, E.Bajor, S.Barolo, S.Small, and M.Levine. 1998. dCtBP mediates transcriptional repression by Knirps, Kruppel and Snail in the Drosophila embryo. *EMBO J.* 17:7009-7020.

Nieto, M.A. 2002. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:155-166.

Nishita, M., M.K.Hashimoto, S.Ogata, M.N.Laurent, N.Ueno, H.Shibuya, and K.W.Cho. 2000. Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* 403:781-785.

Noren, N.K., W.T.Arthur, and K.Burridge. 2003. Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP. *J. Biol. Chem.* 278:13615-13618.

- Nose, A., A.Nagafuchi, and M.Takeichi. 1988. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* 54:993-1001.
- Novak, U., B.G.Cocks, and J.A.Hamilton. 1991. A labile repressor acts through the NFkB-like binding sites of the human urokinase gene. *Nucleic Acids Res.* 19:3389-3393.
- Nusse, R. and H.E.Varmus. 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.
- Ohkubo, T. and M.Ozawa. 2004. The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J. Cell Sci.* 117:1675-1685.
- Okada, H., T.M.Danoff, R.Kalluri, and E.G.Neilson. 1997. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am. J. Physiol* 273:F563-F574.
- Oosterwegel, M.A., M.L.van de Wetering, F.C.Holstege, H.M.Prosser, M.J.Owen, and H.C.Clevers. 1991. TCF-1, a T cell-specific transcription factor of the HMG box family, interacts with sequence motifs in the TCR beta and TCR delta enhancers. *Int. Immunol.* 3:1189-1192.

Osborn, L., C.Hession, R.Tizard, C.Vassallo, S.Luhowskyj, G.Chi-Rosso, and R.Lobb.

1989. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59:1203-1211.

Ozes, O.N., L.D.Mayo, J.A.Gustin, S.R.Pfeffer, L.M.Pfeffer, and D.B.Donner. 1999.

NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401:82-85.

Palmer, H.G., M.J.Larriba, J.M.Garcia, P.Ordonez-Moran, C.Pena, S.Peiro, I.Puig,

R.Rodriguez, F.R.de la, A.Bernad, M.Pollan, F.Bonilla, C.Gamallo, A.G.De Herreros, and A.Munoz. 2004. The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nat. Med.* 10:917-919.

Parakh, T.N., J.A.Hernandez, J.C.Grammer, J.Weck, M.Hunzicker-Dunn, A.J.Zeleznik,

and J.H.Nilson. 2006. Follicle-stimulating hormone/cAMP regulation of aromatase gene expression requires beta-catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:12435-12440.

Paznekas, W.A., K.Okajima, M.Schertzer, S.Wood, and E.W.Jabs. 1999. Genomic

organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAI1) and a related processed pseudogene (SNAI1P). *Genomics* 62:42-49.

Peinado, H., E.Ballestar, M.Esteller, and A.Cano. 2004. Snail mediates E-cadherin

repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol. Cell Biol.* 24:306-319.

Peinado, H., M.Quintanilla, and A.Cano. 2003a. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* 278:21113-21123.

Peirano, R.I., D.E.Goerich, D.Riethmacher, and M.Wegner. 2000. Protein zero gene expression is regulated by the glial transcription factor Sox10. *Mol. Cell Biol.* 20:3198-3209.

Peiro, S., M.Escriva, I.Puig, M.J.Barbera, N.Dave, N.Herranz, M.J.Larriba, M.Takkunen, C.Franci, A.Munoz, I.Virtanen, J.Baulida, and d.H.Garcia. 2006. Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression. *Nucleic Acids Res.* 34:2077-2084.

Pena, C., J.M.Garcia, V.Garcia, J.Silva, G.Dominguez, R.Rodriguez, C.Maximiano, d.H.Garcia, A.Munoz, and F.Bonilla. 2006. The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas. *Int. J. Cancer* 119:2098-2104.

Pena, C., J.M.Garcia, J.Silva, V.Garcia, R.Rodriguez, I.Alonso, I.Millan, C.Salas, A.G.De Herreros, A.Munoz, and F.Bonilla. 2005. E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations. *Hum. Mol. Genet.* 14:3361-3370.

Perez-Moreno, M.A., A.Locascio, I.Rodrigo, G.Dhondt, F.Portillo, M.A.Nieto, and A.Cano. 2001. A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* 276:27424-27431.

Piedra, J., D.Martinez, J.Castano, S.Miravet, M.Dunach, and A.G.De Herreros. 2001. Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276:20436-20443.

Piedra, J., S.Miravet, J.Castano, H.G.Palmer, N.Heisterkamp, d.H.Garcia, and M.Dunach. 2003. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol. Cell Biol.* 23:2287-2297.

Pokutta, S., F.Drees, Y.Takai, W.J.Nelson, and W.I.Weis. 2002. Biochemical and structural definition of the 1-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin. *J. Biol. Chem.* 277:18868-18874.

Poser, I., D.Dominguez, A.G.de Herreros, A.Varnai, R.Buettner, and A.K.Bosserhoff. 2001. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J. Biol. Chem.* 276:24661-24666.

Postigo, A.A. and D.C.Dean. 2000. Differential expression and function of members of the zfh-1 family of zinc finger/homeodomain repressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:6391-6396.

Radisky, D.C., D.D.Levy, L.E.Littlepage, H.Liu, C.M.Nelson, J.E.Fata, D.Leake, E.L.Godden, D.G.Albertson, M.A.Nieto, Z.Werb, and M.J.Bissell. 2005. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436:123-127.

Rao, D.S., D.Gui, M.E.Koski, L.M.Popoviciu, H.Wang, R.E.Reiter, and J.W.Said. 2006. An inverse relation between COX-2 and E-cadherin expression correlates with aggressive histologic features in prostate cancer. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 14:375-383.

Riggelman, B., E.Wieschaus, and P.Schedl. 1989. Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes Dev.* 3:96-113.

Rommel, C. and E.Hafen. 1998. Ras--a versatile cellular switch. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:412-418.

Roose, J., G.Huls, M.van Beest, P.Moerer, H.K.van der, R.Goldschmeding, T.Logtenberg, and H.Clevers. 1999. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* 285:1923-1926.

Rosivatz, E., I.Becker, K.Specht, E.Fricke, B.Luber, R.Busch, H.Hofler, and K.F.Becker. 2002. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am. J. Pathol.* 161:1881-1891.

Roura, S., S.Miravet, J.Piedra, d.H.Garcia, and M.Dunach. 1999. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274:36734-36740.

Rubinfeld, B., P.Robbins, M.El Gamil, I.Albert, E.Porfiri, and P.Polakis. 1997. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275:1790-1792.

Rubinfeld, B., B.Souza, I.Albert, S.Munemitsu, and P.Polakis. 1995. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J. Biol. Chem.* 270:5549-5555.

Sakai, D., T.Suzuki, N.Osumi, and Y.Wakamatsu. 2006. Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development. *Development* 133:1323-1333.

Savagner, P. 2001. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 23:912-923.

Schepers, G.E., R.D.Teasdale, and P.Koopman. 2002. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev. Cell* 3:167-170.

- Schreck, R., P.Rieber, and P.A.Baeuerle. 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10:2247-2258.
- Seki, K., T.Fujimori, P.Savagner, A.Hata, T.Aikawa, N.Ogata, Y.Nabeshima, and L.Kaechoong. 2003. Mouse Snail family transcription repressors regulate chondrocyte, extracellular matrix, type II collagen, and aggrecan. *J. Biol. Chem.* 278:41862-41870.
- Shen, B.J., C.J.Chang, H.S.Lee, W.H.Tsai, L.H.Miau, and S.C.Lee. 1997. Transcriptional induction of the agp/ebp (c/ebp beta) gene by hepatocyte growth factor. *DNA Cell Biol.* 16:703-711.
- Silletti, S., S.Paku, and A.Raz. 1998. Autocrine motility factor and the extracellular matrix. I. Coordinate regulation of melanoma cell adhesion, spreading and migration involves focal contact reorganization. *Int. J. Cancer* 76:120-128.
- Sinner, D., S.Rankin, M.Lee, and A.M.Zorn. 2004. Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes. *Development* 131:3069-3080.
- Spagnoli, F.M., C.Cicchini, M.Tripodi, and M.C.Weiss. 2000. Inhibition of MMH (Met murine hepatocyte) cell differentiation by TGF(beta) is abrogated by pre-treatment with the heritable differentiation effector FGF1. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 20):3639-3647.

Stein, B., H.J.Rahmsdorf, A.Steffen, M.Litfin, and P.Herrlich. 1989. UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein. *Mol. Cell Biol.* 9:5169-5181.

Steinbrecher, K.A., W.Wilson, III, P.C.Cogswell, and A.S.Baldwin. 2005. Glycogen synthase kinase 3beta functions to specify gene-specific, NF-kappaB-dependent transcription. *Mol. Cell Biol.* 25:8444-8455.

Stockinger, A., A.Eger, J.Wolf, H.Beug, and R.Foisner. 2001. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J. Cell Biol.* 154:1185-1196.

Stoker, M. and M.Perryman. 1985. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J. Cell Sci.* 77:209-223.

Stolt, C.C., P.Lommes, E.Sock, M.C.Chaboissier, A.Schedl, and M.Wegner. 2003. The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev.* 17:1677-1689.

Stolt, C.C., S.Rehberg, M.Ader, P.Lommes, D.Riethmacher, M.Schachner, U.Bartsch, and M.Wegner. 2002. Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev.* 16:165-170.

Strizzi, L., C.Bianco, N.Normanno, M.Seno, C.Wechselberger, B.Wallace-Jones, N.I.Khan, M.Hirota, Y.Sun, M.Sanicola, and D.S.Salomon. 2004. Epithelial

mesenchymal transition is a characteristic of hyperplasias and tumors in mammary gland from MMTV-Cripto-1 transgenic mice. *J. Cell Physiol* 201:266-276.

Sugimachi, K., S.Tanaka, T.Kameyama, K.Taguchi, S.Aishima, M.Shimada, K.Sugimachi, and M.Tsuneyoshi. 2003. Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 9:2657-2664.

Takash, W., J.Canizares, N.Bonneaud, F.Poulat, M.G.Mattei, P.Jay, and P.Berta. 2001. SOX7 transcription factor: sequence, chromosomal localisation, expression, transactivation and interference with Wnt signalling. *Nucleic Acids Res.* 29:4274-4283.

Takemaru, K.I. and R.T.Moon. 2000. The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J. Cell Biol.* 149:249-254.

Tan, C., P.Costello, J.Sanghera, D.Dominguez, J.Baulida, A.G.De Herreros, and S.Dedhar. 2001. Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC^{-/-} human colon carcinoma cells. *Oncogene* 20:133-140.

Tarin, D., E.W.Thompson, and D.F.Newgreen. 2005. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res.* 65:5996-6000.

Tetsu, O. and F.McCormick. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398:422-426.

Thiery, J.P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2:442-454.

Thiery, J.P. 2003. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:740-746.

Thiery, J.P. and J.P.Sleeman. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:131-142.

Timmerman, L.A., J.Grego-Bessa, A.Raya, E.Bertran, J.M.Perez-Pomares, J.Diez, S.Aranda, S.Palomo, F.McCormick, J.C.Izpisua-Belmonte, and J.L.de la Pompa. 2004. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* 18:99-115.

Tsutsumi, S., T.Yanagawa, T.Shimura, H.Kuwano, and A.Raz. 2004. Autocrine motility factor signaling enhances pancreatic cancer metastasis. *Clin. Cancer Res.* 10:7775-7784.

Valcourt, U., M.Kowanetz, H.Niimi, C.H.Heldin, and A.Moustakas. 2005. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol. Biol. Cell* 16:1987-2002.

Valdes, F., A.M.Alvarez, A.Locascio, S.Vega, B.Herrera, M.Fernandez, M.Benito, M.A.Nieto, and I.Fabregat. 2002. The epithelial mesenchymal transition confers

resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes. *Mol. Cancer Res.* 1:68-78.

Van de, S.A., E.Caldenhoven, B.G.Stade, L.Koenderman, J.A.Raaijmakers, J.P.Johnson, and P.T.Van der Saag. 1994. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J. Biol. Chem.* 269:6185-6192.

van de, W.M., R.Cavallo, D.Dooijes, M.van Beest, J.van Es, J.Loureiro, A.Ypma, D.Hursh, T.Jones, A.Bejsovec, M.Peifer, M.Mortin, and H.Clevers. 1997a. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 88:789-799.

van de, W.M., I.Oving, V.Muncan, M.T.Pon Fong, H.Brantjes, D.van Leenen, F.C.Holstege, T.R.Brummelkamp, R.Agami, and H.Clevers. 2003a. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep.* 4:609-615.

van de, W.M., E.Sancho, C.Verweij, W.de Lau, I.Oving, A.Hurlstone, H.K.van der, E.Battle, D.Coudreuse, A.P.Haramis, M.Tjon-Pon-Fong, P.Moerer, B.M.van den, G.Soete, S.Pals, M.Eilers, R.Medema, and H.Clevers. 2002a. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111:241-250.

Vega, S., A.V.Morales, O.H.Ocana, F.Valdes, I.Fabregat, and M.A.Nieto. 2004. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 18:1131-1143.

Veltmaat, J.M., C.C.Orelia, D.Ward-Van Oostwaard, M.A.Van Rooijen, C.L.Mummery, and L.H.Defize. 2000. Snail is an immediate early target gene of parathyroid hormone related peptide signaling in parietal endoderm formation. *Int. J. Dev. Biol.* 44:297-307.

Venkov, C.D., A.J.Link, J.L.Jennings, D.Plieth, T.Inoue, K.Nagai, C.Xu, Y.N.Dimitrova, F.J.Rauscher, and E.G.Neilson. 2007. A proximal activator of transcription in epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest* 117:482-491.

Vleminckx, K., L.Vakaet, Jr., M.Mareel, W.Fiers, and F.van Roy. 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66:107-119.

Wegner, M. 1999. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.* 27:1409-1420.

Weis, W.I. and W.J.Nelson. 2006. Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J. Biol. Chem.* 281:35593-35597.

Wielenga, V.J., R.Smits, V.Korinek, L.Smit, M.Kielman, R.Fodde, H.Clevers, and S.T.Pals. 1999. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am. J. Pathol.* 154:515-523.

-
- Wilson, M. and P.Koopman. 2002. Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:441-446.
- Wolpert, L. 1998. Pattern formation in epithelial development: the vertebrate limb and feather bud spacing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 353:871-875.
- Wu, H., Y.L.Liang, Z.Li, J.Jin, W.Zhang, L.Duan, and X.Zha. 2006. Positive expression of E-cadherin suppresses cell adhesion to fibronectin via reduction of alpha5beta1 integrin in human breast carcinoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 132:795-803.
- Yamada, S., S.Pokutta, F.Drees, W.I.Weis, and W.J.Nelson. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 123:889-901.
- Yang, A.D., E.R.Camp, F.Fan, L.Shen, M.J.Gray, W.Liu, R.Somcio, T.W.Bauer, Y.Wu, D.J.Hicklin, and L.M.Ellis. 2006. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 66:46-51.
- Yang, F., X.Li, M.Sharma, C.Y.Sasaki, D.L.Longo, B.Lim, and Z.Sun. 2002. Linking beta-catenin to androgen-signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 277:11336-11344.
- Yang, J., S.A.Mani, J.L.Donaher, S.Ramaswamy, R.A.Itzykson, C.Come, P.Savagner, I.Gitelman, A.Richardson, and R.A.Weinberg. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117:927-939.

-
- Yao, P., Y.Zhan, W.Xu, C.Li, P.Yue, C.Xu, D.Hu, C.K.Qu, and X.Yang. 2004. Hepatocyte growth factor-induced proliferation of hepatic stem-like cells depends on activation of NF-kappaB. *J. Hepatol.* 40:391-398.
- Yokoyama, K., N.Kamata, E.Hayashi, T.Hoteiya, N.Ueda, R.Fujimoto, and M.Nagayama. 2001. Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol.* 37:65-71.
- Yook, J.I., X.Y.Li, I.Ota, E.R.Fearon, and S.J.Weiss. 2005. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J. Biol. Chem.* 280:11740-11748.
- Yook, J.I., X.Y.Li, I.Ota, C.Hu, H.S.Kim, N.H.Kim, S.Y.Cha, J.K.Ryu, Y.J.Choi, J.Kim, E.R.Fearon, and S.J.Weiss. 2006. A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat. Cell Biol.* 8:1398-1406.
- Yost, C., M.Torres, J.R.Miller, E.Huang, D.Kimelman, and R.T.Moon. 1996. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* 10:1443-1454.
- Yu, H.G., X.Zhong, Y.N.Yang, H.S.Luo, J.P.Yu, J.J.Meier, H.Schrader, A.Bastian, W.E.Schmidt, and F.Schmitz. 2004. Increased expression of nuclear factor-kappaB/RelA is correlated with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Int. J. Colorectal Dis.* 19:18-22.

Zavadil, J. and E.P.Bottinger. 2005. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24:5764-5774.

Zhang, X., J.P.Gaspard, and D.C.Chung. 2001. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res.* 61:6050-6054.

Zhou, B.P., J.Deng, W.Xia, J.Xu, Y.M.Li, M.Gunduz, and M.C.Hung. 2004a. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* 6:931-940.

Zhou, B.P. and M.C.Hung. 2005a. Wnt, hedgehog and snail: sister pathways that control by GSK-3beta and beta-Trcp in the regulation of metastasis. *Cell Cycle* 4:772-776.

Zoltan-Jones, A., L.Huang, S.Ghatak, and B.P.Toole. 2003. Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278:45801-45810.

Zorn, A.M., G.D.Barish, B.O.Williams, P.Lavender, M.W.Klymkowsky, and H.E.Varmus. 1999. Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin. *Mol. Cell* 4:487-498.

Abreviatures

APC: Adenomatous polyposis Coli Protein.

C-Terminal: Extrem carboxi-terminal.

CBP: CRE Binding Protein.

ChIP: Chromatin Immunoprecipitation.

cDNA: DNA codificant.

DNA: Àcid Desoxirribonucleic.

EMT: Transició Epiteli-Mesènquima

GFP: Proteïna verda fluorescent

GST: Glutathione S-Transferase

IP: Immunoprecipitació.

IRES: Internal Ribosome Entry Site.

LEF-1: Lymphoid Enhancer binding Factor 1.

MET: Transició Mesènquima-Epiteli.

mRNA: RNA missatger.

NFκB: Nuclear Factor Kappa B.

N-Terminal: Extrem amino-terminal.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

RNA: Àcid Ribonucleic.

RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

siRNA: RNA interferent.

TBP: TATA Binding Protein.

TCF: Transcription Factor.

WB: Western-blot

WNT: wingless.

Agraïments

Primer de tot he de donar les gràcies a en Josep Baulida, el meu director de tesi. Gràcies Jepi per confiar en aquella noia que volia canviar de la fotosíntesi a la biologia molecular i donar-me la oportunitat de treballar amb vosaltres. Gràcies per animar-me quan els resultats no sortien, gràcies per passar-te fins a 45 minuts davant d'un film amb la confiança de que la banda apareixeria, gràcies per l'empatia i sobretot per la paciència. Sé que durant aquests 5 anys hem passat moments dolents i que de vegades t'he llançat tota la cavalleria per sobre, gràcies per no tenir-m'ho en compte. Me'n vaig amb molt bon record, i crec que si tornés a començar, repetiria amb tu, el Snail i la β -Catenina.

També vull agrair a l'Antonio García de Herreros, gracias Antonio por apoyarnos a Jepi y a mí en nuestro proyecto, gracias por tus consejos y por todos los reactivos. Gracias también por ayudarme a defender mis derechos cuando fue necesario, tú podrías haberte lavado las manos y sin embargo, permaneciste a mi lado, sinceramente, muchas gracias.

Gràcies a tota la gent del Snail team, els presents i els que ja han marxat. Primer de tot a en Fran Sánchez, el nostre tècnic. Muchas gracias por todo Fran, sin tí esta tesis no sería lo que es, ¡no veas lo que te he echado de menos desde que te fuiste! Espero que te vaya todo genial, te lo mereces. Moltíssimes gràcies també a en Ferran Pons (Ferrinho!!!) per aquells clons que crec que van ser, almenys en part, la raó per la qual decidíssis deixar la ciència i dedicar-te a voltar pel món. Gràcies també, per compartir amb mi la passió pel Brasil, per tots els concerts, els CDs, etc. Ara és el torn de les nenes: Gràcies a la Bàrbara Montserrat, per tots els moments compartits, per totes les converses a l'altra banda de la

“poiata”, per excursions, sopars, cines i tot el que ens queda per fer. En definitiva gràcies per ser la meva amiga. Gràcies a la Sandra Guaita, a vegades m’he arribat a espantar de com ens assemblem! de veritat, et recordo i sovint em veig a mi (tindran part de raó els astròlegs?). Moltíssimes gràcies pel recolzament i per ser la meva gurú de les transfeccions. Gràcies a la Isa Puig, per la teva admirable força, per l’alegria i per l’empenta, ets un exemple a seguir en tots els aspectes. A la Montse Porta per tota l’ajuda que m’has ofert durant tot aquest temps, per salvar-me més d’una transfecció a última hora quan s’acabava la miniprep i allí eres tu per deixar-me’n, gràcies per totes les construccions i per sempre estar disposada a donar un cop de mà. Gràcies a la Sandra Peiró (super P!), per fer-me costat als moments difícils de la tesi, quan ja quasi estava a punt d’engegar-ho tot, gràcies també per tota l’ajuda amb les ChIPS i els EMSA, sense tu no ens hauríem sortit. Gràcies a en Manolo Beltrán i al friqui de l’Àlvaro Jansà, per les hores que hem passat els tres comprimits esquena contra esquena a l’antic laboratori de l’IMIM, per tot el que hem rigut (Manolo, no et tinc en compte tots els acudits de rubias que m’has fet) i a tú friqui, moltes gràcies per tots els ànims que m’has donat i totes les animalades que m’has arribat a dir. Gràcies a la Natàlia Dave, per unes pràctiques que gràcies a tu m’han passat volant, gràcies també per uns quants divendres a la tarda al Bitàcora i pel teu bon humor. A la Maria Escrivà, per una excursió fallida a la neu, una peli en Japonès i moltes converses. Gràcies a l’Ariadna Virgós per demostrar-nos a tots que és possible viure en coherència amb el que un creu i que es pot anar a contracorrent. Moltes gràcies a en David Domínguez, per un llibre difícil d’oblidar i tants protocols des de l’altra punta del món. Gràcies a la Judit Grueso, per la feina ben feta, per totes les teves anècdotes i fins i tot per fer de “segurata” del laboratori!. Moltíssimes gràcies a la Clara Francí, per la teva inestimable ajuda amb les immunos i els teus consells sobre una prova gàstrica. A en Niko Herranz (ja quasi m’he oblidat d’aquell partit de tennis amb la Wii),

gràcies per tota l'ajuda amb les ChIPs i per ser, en part, responsable en que ara estigui enganxada a Lost i Heroes. També vull agrair a en Víctor Díaz i a la Belén Álvarez el seu suport durant aquests darrers dos mesos en que hem compartit despatx.

No em puc oblidar de la gent de la UAB, gràcies a la Mireia Duñach, per totes les construccions, els anticossos i les idees aportades. A en Julio Castaño per ajudar-me amb els *bindings* i animar-me a no perdre l'esperança quan hi havia tant d'inespecífic i sobretot, per donar-me la idea dels Overlays tot fent una cervesa en un bar. Gràcies a en Jose Piedra, la Susana Miravet i la Imma Raurell per acollir-me una setmaneta al vostre laboratori i fer-me sentir com a casa. Gràcies a la Patricia Vilagrasa i la Guiomar Solanas, per la feina compartida i tots els consells.

També he d'agrair a la resta de la gent del laboratori. Primer de tot a en Xavi Viscarri, per la infinita paciència que has tingut i tens amb mi i per deixar-me ocupar el teu lloc per a poder escriure la tesi, què faràs amb tant d'espai quan marxi? Gràcies per ser-hi i per ser un bon amic. Gràcies a l'Oriol Roda, per la capoeira a la platja, les excursions, els cines i per no matar a la meva gata la nit que de què acaba amb tu d'un ensurt. A l'Elena Ortiz, per tota la música genial que me has pasado y per ser una buena amiga. A la Susana Aguilar per tot el temps compartit al laboratori i per fer-nos d'amfitriona tant a Madrid com a Londres (gràcies també a l'Héctor per suportar la invasió). A en Maurici, la Raquel, la Laura, en Ramon, la Laia, en David, l'Andrea, l'Elena, la Mercè, la Mireia, en Carles, la Jessi, la Neus, etc., pels dinars al Xiringuito, a la platja o al final del passadís; i per totes les festes. Gràcies a en Dani Moya per ser l'alegria del laboratori, el IMIM ya no es lo mismo sin tí... Gràcies també, a l'Anna Merlos per ajudar-nos amb les immunohistoquímiques i els RNAs. A l'Òscar Fornàs per la seva ajuda amb el sortir i

totes les converses sobre gossos. A l'Arrate Mallabariena i després en Xavi Sanjuan, pels seus consells amb les immunofluorescències i les imatges de confocal. A en Gabriel, per un piló de construccions i per ajudar-nos a clonar el que semblava inclonable. A en Roque i la Vane per les construccions de SOX.

Moltíssimes gràcies a l'Eva, per la portada de disseny tan xula que m'ha fet.

També vull donar les gràcies als membres de la meva família urbana, a en Pau, el meu gran amic, gràcies per poder comptar sempre amb tu, per escoltar-me, per obrir-me les portes de casa teva quan ho he necessitat, per tot Pau, saps que ho faria i a més, a saco. A la Mian, per ser la meva amiga des de la nostra arribada a Barcelona, per tot el temps compartit i moltíssimes "autofotos". A la Esther y su manera de ver el mundo, a la Tesi, que aunque no te escriba, sabes que te echo un montón de menos... desde que te has ido, a nuestra familia le falta glamour. A l'Albert i la Marta, que tot i que han marxat cap a Brooklin seguim en contacte. Gràcies a la Clara o Sue, com prefereixis, per totes les bones estones que hem passat tan al Delta (no "lo delta") i a Barcelona, i per últim, i no per això menys important, a en Roger, que ara que això de la tesi està acabant espero tornar pujar muntanyes amb tu (les pròximes vegades amb ulleres de sol, ho prometo).

Gràcies a les meves nenes de Lloret: la Wen, la Mar, la Prima, la Silvia, la Patri, la Sandra Pujol... no puc recordar cap etapa de la meva vida sense alguna vosaltres. També la Marissa, la Ruth i l'Esther. Gràcies a totes per ser-hi i fer-me sentir que el temps no ha passat cada vegada que torno a casa.

Gràcies al meus companys de capoeira: l'Òscar, la Flamingo, en Carangeijo, en Javi, la Mar, l'Alba, etc. Per un viatge inolvidable a Brasil. A en Chispa i en Lord, pels entrenaments dels diumenges a la Barceloneta. També a en Teco, en Mosquetero, la Meri, en Benji, la Navi... i la resta de gent d'Abada Barcelona.

I ja acabant, a la meva família gràcies al meu avi Paco, un home a qui admiro moltíssim, gràcies per la il·lusió i per fer-me sentir que el que faig és important.

Mil gràcies als meus pares, per recolzar-me sempre, per creure en mi i ajudar-me a assolir els meus objectius. Tot el que sóc us ho dec a vosaltres. Gràcies a en Josep el meu germà i el meu heroi, gràcies per ser com ets. Gràcies perquè amb vosaltres tres és impossible avorrir-se, gràcies per fer-me riure tant i sentir-me tan estimada.

I per últim, un milió de gràcies a en Sergi, per aguantar-me cada dia, per estar al meu costat i donar-me suport en tot moment, no sé si hagués acabat aquesta tesi sense els teus ànims. Gràcies per suportar el meu mal humor, les comèdies armènies i la música de capoeira, per convertir casa nostra en la casa de Los Otros, per amagar una dutxa, per matar totes les paneroles, per fer-me riure quan estic trista... no acabaria d'enumerar totes les coses bones que fas per mi, en fi, gràcies per ser com ets!