

Nous reguladors en la via de Wnt

Meritxell Vinyoles i Vergés

ÍNDEX

| | |
|---|----|
| <i>INTRODUCCIÓ</i> | 1 |
| 1 Les unions adherents | 3 |
| 1.1 Introducció | 3 |
| 1.2 Característiques de les unions adherents | 4 |
| 1.3 Components | 4 |
| 2 Via de senyalització de Wnt | 14 |
| 2.1 El factor Wnt..... | 14 |
| 2.2 Via canònica de Wnt..... | 15 |
| 2.3 Via no canònica de Wnt | 31 |
| 2.4 Regulació funcional de la via de Wnt | 31 |
| 3 Procés d'endocitosi i trànsit de membranes | 34 |
| <i>OBJECTIUS</i> | 39 |
| <i>RESULTATS</i> | 41 |
| 1 El mutant de l'LRP constitutivament actiu (CA-LRP) permet diferenciar efectes inicials i tardans de la p120-catenina en la via de Wnt | 43 |
| 1.1 El CA-LRP imita els senyals de Wnt en l'activació de la via..... | 43 |
| 1.2 La p120-catenina no és necessària pels esdeveniments inicials quan s'activa la via amb el CA-LRP..... | 46 |
| 1.3 La p120-catenina és essencial per esdeveniments més tardans de la via de Wnt activada amb el CA-LRP..... | 48 |
| 2 La PR61ε, una subunitat reguladora de la PP2A, promou l'activació de la via de Wnt | 52 |
| 2.1 La CK1ε és necessària pel reclutament de Dvl-2 a l'LRP5/6 en Wnt..... | 52 |
| 2.2 La PP2A és necessària per l'activació de CK1ε en Wnt | 53 |
| 2.3 La subunitat reguladora PR61ε activa la via de Wnt..... | 56 |
| 2.4 La subunitat reguladora PR61ε està unida al receptor de Wnt3a | 65 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 3 | La interacció entre les unions adherents i el coreceptor LRP5/6 regula la internalització de GSK-3 dins d'endosomes en la via de Wnt | 68 |
| 3.1 | L'activació de Wnt indueix la internalització de diferents components de la via dins de cossos multivesiculars..... | 68 |
| 3.2 | La p120-catenina i l'N-cadherina són necessàries per la internalització de GSK-3 en cèl·lules activades amb el lligand Wnt | 71 |
| 3.3 | La regulació de la interacció p120-catenina/Cadherina és rellevant per a la internalització de GSK-3..... | 77 |
| 3.4 | La fosforilació de la Cadherina regula la unió amb l'LRP i la internalització de la GSK-3 | 85 |
| 3.5 | La internalització de GSK-3 dins de MVBs és dependent de caveolina | 90 |
| 3.6 | La inhibició de la internalització de GSK-3 impedeix la total activació dels efectes tardans de la via de Wnt | 93 |
| | <i>DISCUSSIÓ</i> | 103 |
| 1 | La subunitat reguladora PR61ε de la PP2A activa la CK1ε en la via canònica de Wnt..... | 105 |
| 2 | El mutant CA-LRP diferencia efectes inicials i tardans de p120-catenina en la via canònica de Wnt..... | 111 |
| 3 | El complex LRP5/6 s'internalitza dins de MVBs en Wnt | 115 |
| 4 | La dissociació de la p120-catenina i la cadherina del coreceptor LRP5/6 és necessària per la internalització de la GSK-3 via caveolina | 119 |
| 5 | La internalització de la GSK-3 dins de MVBs és essencial per l'acumulació de β-catenina en Wnt, però no és l'únic procés que regula els nivells d'aquesta proteïna..... | 122 |
| | <i>CONCLUSIONS</i> | 131 |
| | <i>MATERIALS I MÈTODES</i> | 133 |
| 1 | Cultius Cel·lulars..... | 135 |
| 1.1 | Línies cel·lulars eucariotes..... | 135 |
| 1.2 | Cultiu bacterià | 137 |
| 2 | Mètodes d'obtenció, manipulació i anàlisi del DNA | 138 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 2.1 | Transformació i extracció del DNA plasmídic..... | 138 |
| 2.2 | Modificació del DNA..... | 138 |
| 2.3 | Tècniques d'anàlisi del DNA..... | 140 |
| 2.4 | Descripció dels vectors i de les construccions de DNA utilitzades..... | 141 |
| 3 | Mètodes d'expressió i purificació de proteïnes..... | 143 |
| 3.1 | Expressió i purificació de proteïnes recombinants en procariotes..... | 143 |
| 3.2 | Expressió de proteïnes en línies cel·lulars eucariotes..... | 145 |
| 4 | Tècniques per a l'estudi de proteïnes..... | 146 |
| 4.1 | Electroforesi i Western Blot | 146 |
| 4.2 | Preparació d'extractes cel·lulars | 148 |
| 4.3 | Assaig d'interacció proteïna-proteïna..... | 149 |
| 4.4 | Assaig de localització cel·lular de proteïnes..... | 151 |
| 4.5 | Assaig de fosforilació..... | 154 |
| 4.6 | Assaigs reporters | 156 |
| 5 | Aïllament i anàlisi d'RNA per RT-PCR quantitativa..... | 156 |
| 6 | Diferenciació de mMSC a adipòcits | 157 |
| 7 | Reactius i solucions | 158 |
| | BIBLIOGRAFIA | 162 |

INTRODUCCIÓ

1 Les unions adherents

1.1 Introducció

En els organismes multicel·lulars, les unions intercel·lulars serveixen per mantenir polaritat a nivell cel·lular i tissular i per mantenir la integritat del teixit. Aquestes unions són especialment abundants als teixits epitelials, i són necessàries per mantenir l'associació entre les cèl·lules, però també per formar la barrera epitelial que separa diferents teixits (Revisat a [1]).

Les unions cel·lulars del teixit epitelial estan formades per tres estructures adhesives fonamentals: les unions estretes, les unions adherents i els desmosomes, ordenades de més apical a més basal en cèl·lules polaritzades de certs teixits, com l'intestí [2].

Les unions estretes representen la frontera entre els dominis apicals i basolaterals de la membrana i controlen el transport paracel·lular de ions i soluts (Figura 1). Aquestes unions estan formades per dos tipus de proteïnes transmembrana (occludines i claudines) que s'associen amb proteïnes citoplasmàtiques. Les unions adherents es localitzen immediatament sota les unions estretes i es caracteritzen per unir els filaments d'actina entre cèl·lules adjacents. Finalment, els desmosomes són connexions més fortes que uneixen els filaments intermedis entre cèl·lules adjacents. Tant les unions adherents com els desmosomes estan compostats per proteïnes transmembrana de la superfamília de les cadherines [3].

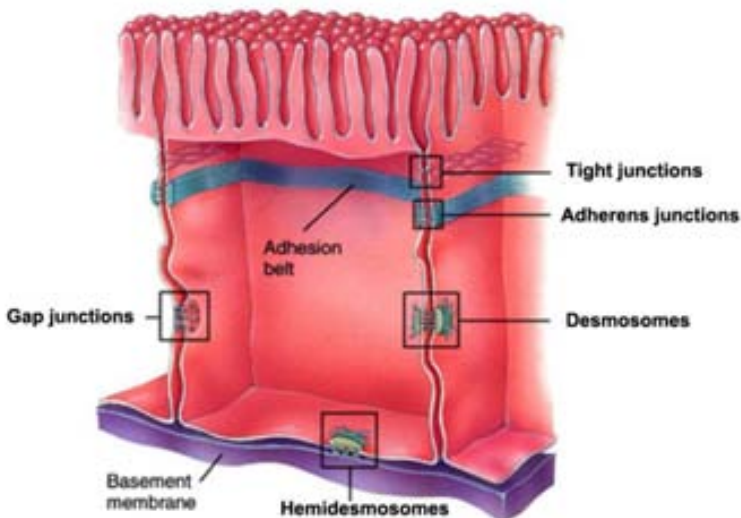


Figura 1: Diferents tipus d'unions del teixit epitelial. Unions estretes (tight junctions en anglès), unions adherents (adherens junctions) i Desmosomes. Figura adaptada de: <http://www.studyblue.com>

1.2 Característiques de les unions adherents

Les unions adherents són estructures dinàmiques importants en el manteniment de la polaritat cel·lular, en la funció de barrera epitelial, però també són rellevants en la regulació de la homeòstasi cel·lular. En l'epiteli, l'adhesió estable és necessària per mantenir una monocapa robusta i polaritzada. Al mateix temps, però, el dinamisme d'aquestes unions també es requereix per regular els canvis durant el desenvolupament embrionari, durant la regeneració tissular o per permetre la motilitat cel·lular [4].

La funcionalitat de les unions adherents depèn de la unió de les cadherines amb el citoesquelet d'actina i està controlada a nivell intracel·lular per la interacció amb les catenines.

1.3 Components

1.3.1 Cadherina

1.3.1.1 Estructura i funció

Les cadherines són l'element principal de les unions adherents, i estan àmpliament caracteritzades en vertebrats i en alguns homòlegs d'invertebrats [5]. Les cadherines són proteïnes de membrana dependents de calci i que contenen una regió extracel·lular o ectodomini format com a mínim per dues repeticions del domini cadherina extracel·lular (EC), una regió que conté 110 aminoàcids [6].

Les cadherines estan classificades en diferents famílies, i la més estudiada és la coneguda com a cadherines "clàssiques". Aquesta família es troba en les unions adherents i també en els desmosomes, i la formen diferents proteïnes, entre elles l'E-cadherina i l'N-cadherina [7].

L'estructura de les cadherines clàssiques es caracteritza per un ectodomini format per 5 EC, un domini transmembrana i una regió carboxi-terminal intracel·lular. (Figura 2).

La regió extracel·lular regula la unió entre cèl·lules oposades a través de la interacció entre els ectodomínis de les cadherines de cada cèl·lula (unió *trans*). En concret, les cadherines s'uneixen a través dels dominis EC1 [8]. L'estructura cristal·litzada de la cadherina mostra que la connexió entre els successius dominis EC que formen l'ectodomini requereix de Ca^{2+} , el qual confereix rigidesa a

l'estructura. Els llocs d'unió de calci són la part de la seqüència de les cadherines que està més conservada a través de les diferents espècies [9](Figura 2).

El domini extracel·lular interacciona de forma homofílica entre les cadherines de les cèl·lules adjacents, el que significa que les molècules d'un subtipus determinat interaccionen amb molècules del mateix subtipus i no amb d'altres cadherines d'un altre subtipus [10]. Tot i això, la noció de que les unions entre cadherines són exclusivament homofíliques no és correcta del tot. Experiments *in vitro* revelen unió creuada entre subtipus de cadherines, com per exemple entre E-cadherina i N-cadherina [11].

Tot i que està menys descrit, hi ha estudis que proposen que els ectodomis de les cadherines de la mateixa cèl·lula (unió lateral/*cis*) també es podrien unir, formant un agrupament de cadherines que estabilitzaria les unions adherents [12], [13].

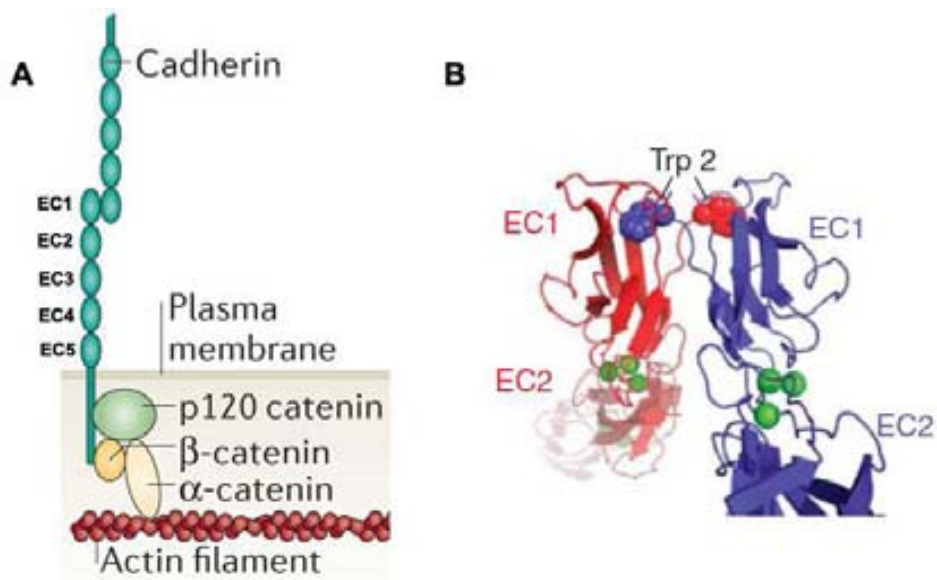


Figura 2: Estructura de la cadherina. (A) La cadherina està formada per 5 regions EC a la part extracel·lular, i a la part intracel·lular s'uneix amb p120-catenina i amb β -catenina que la connecta amb el citoesquelet d'actina. (B) Estructura cristal·logràfica de la unió entre els ectodomis de dues cadherines. Els ions de Ca^{2+} estan indicats amb el color verd. Figura adaptada de [14], [15].

La regió intracel·lular està formada per 150 aminoàcids, i està molt conservada entre les cadherines clàssiques. Aquesta regió regula la reorganització del

citoesquelet d'actina i promou la senyalització intracel·lular a través de la unió amb les catenines. La β -catenina s'uneix a la regió carboxi-terminal de la cadherina [16], mentre que la p120-catenina s'uneix a la juxtamembrana [17]. Finalment, la β -catenina també interacciona amb l' α -catenina que està unida al citoesquelet d'actina.

1.3.1.2 Regulació

Les cadherines presents a la superfície cel·lular són controlades a nivell transcripcional i post-transcripcional. S'ha vist que diferents factors de transcripció de la família *zinc finger* controlen l'expressió de les cadherines. Per exemple, el factor de transcripció Snail és un repressor de l'E-cadherina, i afavoreix la transició epiteli-mesènquima (EMT), procés pel qual les cèl·lules epitelials perden la polaritat i les unions intercel·lulars, i esdevenen cèl·lules mesenquimals [18].

A nivell post-transcripcional, el fet que l'E-cadherina necessiti la unió d'altres proteïnes per la seva funcionalitat, és important en la aquesta regulació. L'E-cadherina acabada de sintetitzar s'associa amb la β -catenina ja en el reticle endoplasmàtic, i les dues proteïnes van cap a la superfície cel·lular [19]–[21]. Un cop a la membrana, l'E-cadherina s'estabilitza mitjançant les interaccions homofíliques i es regula a nivell intracel·lular per la p120-catenina, que promou la seva estabilitat (Veure més endavant).

L'E-cadherina també es regula per fosforilació. S'ha descrit que la fosforilació del domini citoplasmàtic de l'E-cadherina per CK2 augmenta la seva afinitat per la β -catenina promovent una major unió i estabilitat de les unions adherents [22], mentre que la fosforilació per CK1 disminueix l'afinitat entre aquestes dues proteïnes [23].

1.3.1.3 E-cadherina i N-cadherina

Dues de les proteïnes més caracteritzades que trobem dins de la família de les cadherines clàssiques, són la E- (epitelial) i N- (Neural) cadherines. L'E-cadherina s'expressa bàsicament en teixits epitelials, on manté l'adhesió cel·lular i l'arquitectura tissular. A més, s'ha descrit àmpliament el paper d'aquesta proteïna com a supressora de tumors, ja que promou la disminució de la motilitat i la invasivitat cel·lular [24]. Els nivells de l'E-cadherina disminueixen durant l'EMT, mentre que els nivells d'altres cadherines, com els de l'N-cadherina, augmenten. L'N-cadherina es troba en una gran varietat de cèl·lules, com en les neurals, les

musculars o les cèl·lules mesenquimals. A més, la funció de l’N-cadherina és dependent de context, ja que per una banda controla l’adhesió entre cèl·lules del cor a partir de la formació d’unions adherents, però també indueix canvis cel·lulars per promoure un fenotip més migratori i invasiu durant l’EMT, característic de la transformació tumoral (Revisat a [25]).

La E- i l’N-cadherina comparteixen característiques funcionals i estructurals relacionades amb la seva activitat adhesiva. Els dominis extracel·lulars d’ambdues proteïnes contenen 5 dominis EC, però estan menys conservats que els respectius dominis citoplasmàtics, que presenten un alt índex de conservació i són els que interaccionen amb les catenines [26](Figura 3).

```

Ecad_hs.protein   EAGLQIPAILGILGGILALLLILLLLLLFLRRR--AVVKEPLLPPEDDTRDNVYYVDEE 758
Ncad_hs.protein  GAGLGTGAIIAAILLCIIILLLILVLMFVWWMKRDRKERQAKQLLIDPEDDVRDNIILKYDEE 776
                ***  **:.** *: ****:***:::*** ** .*: *: ****.***: ***

Ecad_hs.protein   GGGEEQDQDFDLSQLHRGLDARPEVTR----NDVAPTLMSVPRYLPRPANPD--EIGNFI 811
Ncad_hs.protein  GGGEEQDQDYDLSQLQQPDTVEPDAIKPVGIRRMDERPIHAEQYPVRSAAAPHGDIQDFI 836
                *****:*****: ..*:. : . : : :*: *.* *.:**:*

Ecad_hs.protein   DENLKAADTDPTAPPYDSLIVFDYEGSGSEAAASLSLNSSESDKDQDYDYLNEWGNRFKK 871
Ncad_hs.protein  NEGLKAADNDPTAPPYDSLIVFDYEGSGSTAGSLSLNSSSGGEQDYDYLNDWGPRFKK 896
                :*.*****.*****.*****.*****.*****.*.*****.*. :*****:*

Ecad_hs.protein   LADMYGGGEDD 882
Ncad_hs.protein  LADMYGGGDD- 906
                *****:*

```

Figura 3: Alineament de la seqüència d’aminoàcids de la regió citoplasmàtica de l’E-cadherina i de l’N-cadherina. La regió citoplasmàtica s’inicia amb la regió marcada de color groc, que és la regió jxtamembrana on s’uneix la p120-catenina. La regió marcada en gris és la regió per on s’uneix la β -catenina.

Tenint en compte la semblança entre aquestes dues proteïnes, s’han realitzat estudis per comprovar si una de les cadherines podria reemplaçar l’altra en les seves funcions dins de cada teixit. Un d’aquests estudis mostra que l’E-cadherina pot reemplaçar la morfogènesi cardíaca en embrions que no expressen N-cadherina [27], tot i que un altre estudi similar mostra que aquests ratolins no tenen una funció cardíaca normal i desenvolupen cardiomiopaties [28]. Experiments contraris, en els quals s’expressa N-cadherina en el teixit epitelial de l’intestí en ratolins que no expressen E-cadherina, mostren que l’N-cadherina substitueix l’E-cadherina a nivell estructural, però en aquests casos s’indueix la

hiperplàsia del teixit epitelial i la formació de pòlips [29]. Aquests experiments demostren que tot i que aquestes proteïnes actuen de forma similar a nivell estructural, hi ha funcions que exerceix cada una d'elles en cada teixit que no poden ser reemplaçades.

Finalment, estudis del nostre grup i d'altres a nivell cel·lular, indiquen que tant l'N-com l'E-cadherina s'uneixen directament al correceptor LRP5/6 de la via de Wnt pel domini citoplasmàtic [30], [31]. En presència del lligand Wnt, ambdues proteïnes es fosforilen a la regió citoplasmàtica per CK1, promovent la separació del complex cadherina-LRP5/6 [31], [32]. Tenint en compte el paper similar que tenen les dues cadherines en l'activació de la via de Wnt, s'han utilitzat ambdues proteïnes indistintament per realitzar els experiments presentats en aquest treball.

1.3.2 β -catenina

1.3.2.1 Estructura

La β -catenina és una proteïna molt conservada evolutivament, de 781 aminoàcids. La seva estructura està formada per un domini central armadillo que conté 12 repeticions de 33 aminoàcids que formen una superhèlix molt rígida i dos extrems N- i C-terminal [20]. El domini armadillo interacciona amb la regió C-terminal de la cadherina mentre que l'extrem N-terminal s'uneix a l' α -catenina. D'aquesta manera la β -catenina connecta la cadherina amb el citoesquelet d'actina (a través de l' α -catenina) per tal de regular les unions adherents [16] (Figura 4). Per altra banda, proteïnes involucrades amb la senyalització de la via de Wnt com APC, TCF i Kaiso s'uneixen a la β -catenina a través del domini armadillo, i competeixen amb la cadherina [33]–[35].

1.3.2.2 Regulació

La fosforilació de la β -catenina en tirosines és important en la regulació de les unions adherents. Tal i com s'ha descrit al nostre laboratori, la fosforilació del residu Tyr654 pel receptor d'EGF (*Epithelial Growth Factor*) fa disminuir la seva interacció amb l'E-cadherina [36], [37], mentre que la fosforilació en la Tyr142 per Fyn o Fer inhibeix la unió amb l' α -catenina [38].

Tal i com s'explica al capítol següent, a més de formar part de les unions adherents, la β -catenina té una altra funció rellevant al nucli com a coactivadora transcripcional de la via de Wnt.

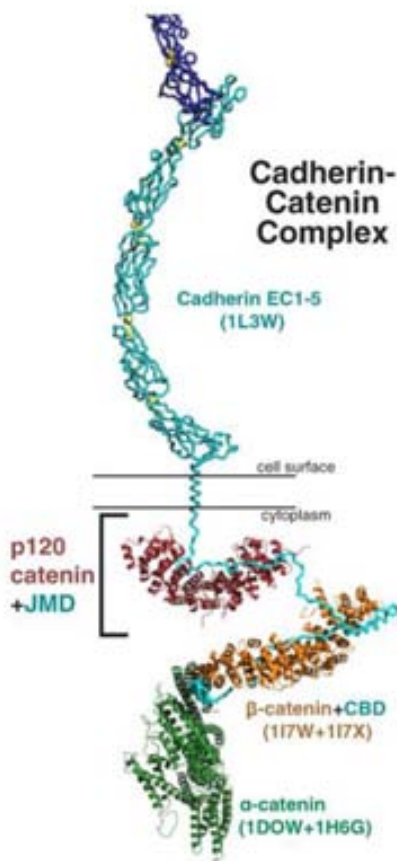


Figura 4: Model del complex cadherina/catenina. Superposició de les estructures cristal·logràfiques obtingudes de l'ectodomini de la C-cadherina [9], del complex p120-catenina/ l'E-cadherina [13], del complex β -catenina/E-cadherina [20] i dels fragments d' α -catenina [39]. Figura adaptada de [13].

1.3.3 α -catenina

L' α -catenina és una proteïna d'unió a l'actina que presenta tres dominis homòlegs a una altra proteïna que també s'uneix a l'actina, la vinculina [40]. La regió N-terminal conté un domini d'unió a la β -catenina mentre que el domini C-terminal s'uneix a l'actina [16], [41].

El model clàssic que proposa que l' α -catenina connecta el complex format per cadherina, p120-catenina i β -catenina amb l'actina, ha estat qüestionat [42]. Recentment s'ha descrit que l' α -catenina no s'uneix amb l'actina i amb el complex de la cadherina de forma simultània, sinó que hi hauria dues poblacions diferents d' α -catenina a la cèl·lula. Una de les poblacions s'associaria a la β -catenina de forma directa o indirectament (a través de la unió de proteïnes com Formina-1 o Eplina [43], [44]); mentre que l'altra població d' α -catenina es trobaria al citosol formant homodímers. Aquests homodímers són els que regularien l'organització de l'actina per controlar la migració cel·lular [42], [45].

1.3.4 p120-catenina

1.3.4.1 Estructura

La p120-catenina es va identificar per primera vegada en un cribatge de substrats de la tirosina quinasa Src [46], i es va observar que interacciona amb la família de cadherines clàssiques formant part de les unions adherents, però també està implicada en molts fenòmens de transducció de senyals (adhesió, mobilitat i creixement cel·lular). A més, tal i com s'explica més endavant, el nostre grup ha descrit que la p120-catenina també té un paper essencial en l'activació de la via de Wnt (Veure apartat 2.2.2).

Aquesta proteïna p120-catenina dona nom a una subfamília dins del grup de catenines que contenen repeticions armadillo (ARM). Dins de la subfamília s'hi troben altres proteïnes que també estan presents en les unions entre cèl·lules: ARVCF, δ -catenina i p0071.

Estructuralment la p120-catenina, igual que la β -catenina, està formada per un domini central armadillo flanquejat per una regió N-terminal i C-terminal (Figura 5). El domini armadillo és la regió per on la p120-catenina interacciona amb el domini juxtamembrana de la cadherina i amb la proteïna Kaiso, mentre que el domini N-terminal és important per la regulació de la p120-catenina. Aquest conté la majoria de residus tirosina, serines i treonina de la proteïna fosforilables per diferents quinases (Revisat a [47]). Aquesta proteïna presenta múltiples isoformes que vénen determinades per l'*splicing* alternatiu dels exons (A-C) i perquè té quatre orígens diferents de la transcripció, que determina el nom de les 4 isoformes: isoforma I (s'inicia en l'aminoàcid 1), isoforma II (aminoàcid 55), isoforma III (aminoàcid 102) i isoforma IV (aminoàcid 324) (Figura 4) [48].



Figura 5: Esquema de la proteïna p120-catenina. La p120-catenina conté el domini N-terminal (NTR), el domini armadillo central (ARM) format per 9 repeticions armadillo i el domini C-terminal. En la figura també hi ha representats els 4 inicis diferents de la transcripció de la proteïna, i els 3 exons (A-C) que determinen l'*splicing* alternatiu. Figura adaptada de [13].

Les isoformes s'expressen de diferent manera segons el tipus cel·lular, indicant que hi ha diferències funcionals entre elles. Per exemple, els fibroblasts expressen més quantitat de la isoforma I, mentre que les cèl·lules epitelials tenen preferència per la isoforma III [49].

1.3.4.2 Funció

1.3.4.2.1 Estabilització de l'E-cadherina a la membrana

Una de les funcions importants de la p120-catenina és la d'estabilitzar la cadherina a la membrana plasmàtica i induir l'agrupament lateral (o unió *cis*) d'aquestes cadherines. Tal i com ha estat descrit, la dissociació de la p120-catenina del complex promou la internalització endocítica de les cadherines [50], [51]. El model acceptat actualment per explicar el paper de la p120-catenina en aquesta endocitosis es basa en la publicació recent de l'estructura cristal·litzada de la p120-catenina unida a l'E-cadherina [13]. En aquest article es descriu que la regió juxtamembrana de l'E-cadherina on s'uneix la p120-catenina conté residus implicats en l'endocitosis via clatrina i en la ubiquitinització depenent de Hakai. D'aquesta manera, la separació de la p120-catenina de la cadherina mostra els llocs d'unió de la proteïna adaptadora 2 (AP-2) i de la lligasa E3 Hakai. L'AP2 promourà l'endocitosis de la cadherina que podrà reciclar-se de nou a la membrana. Per altra banda, la proteïna Hakai indueix la ubiquitinació de la cadherina i la degradació via proteosoma (Figura 5).

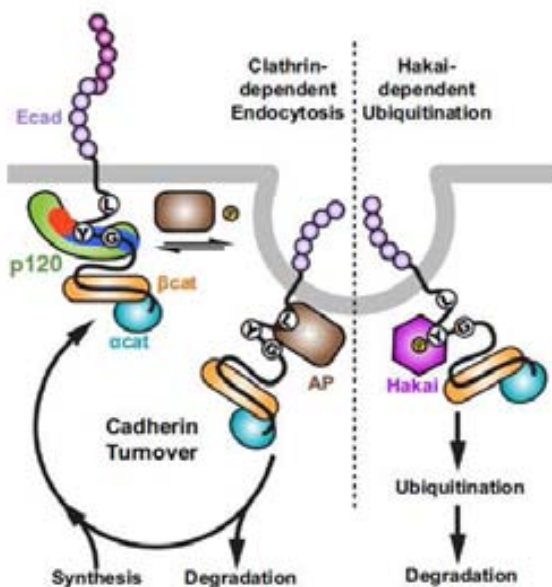


Figura 6: Esquema de la regulació de l'E-cadherina dependent de p120-catenin. Els detalls de l'activació es troben al text. Figura adaptada de [13].

Paral·lelament, s'ha descrit el paper d'una altre proteïna, la Numb, en aquest procés. Aquesta proteïna controla la polarització de les cèl·lules epitelials, promovent l'endocitosi de l'E-cadherina excepte en les zones on es formen les unions adherents [52].

La presència de la cadherina a les unions adherents depèn de l'equilibri entre la cadherina estabilitzada a la membrana per la p120-catenina i l'endocitada. La regulació d'aquest procés també es controla per fosforilació. La p120-catenina és una proteïna acobladora que uneix diferents tirosina quinases com Fer i Fyn, tirosina fosfatases i també interacciona amb la serina/treonina quinasa CK1ε [31], [38], [53], [54]. S'ha descrit que la fosforilació de determinats residus tirosines de la p120-catenina tant pot incrementar la unió amb les cadherines [37], [38], [55], com promoure la separació de les unions adherents en segons quines situacions, com en l'activació de cascades que activen la migració cel·lular (Revisat a [53]). Per altra banda, la fosforilació en tirosines de l'E-cadherina en els residus Y755/756 [13] o la fosforilació de les serines 268,269 de la p120-catenina per la CK1 promou la disrupció del complex p120-catenina/cadherina [31].

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

Les RhoGTPases RhoA, Rac1 i Cdc42 són interruptors moleculars que controlen la migració cel·lular així com l'adhesió entre cèl·lules depenent de cadherina, a través de la regulació del citoesquelet d'actina [56]–[58]. Aquesta regulació requereix de la p120-catenina. S'ha descrit que la localització d'aquesta proteïna al citosol augmenta l'activitat de Rac1 i de Cdc42, mentre que suprimeix l'activitat de RhoA [56], [59]. L'activació de Rac1 i Cdc42 es produeix a través de l'associació de Vav2, un factor d'intercanvi de la família Rho [60].

Les RhoGTPases tenen efectes variats en la motilitat cel·lular. Són essencials en la reorganització del citoesquelet d'actina durant el moviment cel·lular, però l'activació de Rac1 i de Cdc42 també promou la disminució de la motilitat en les cèl·lules epitelials, incrementant l'adhesió cel·lular [53]. La diferent localització de p120-catenina entre el citosol i la membrana controla aquesta activitat. Quan la p120-catenina està a la membrana promou un fenotip menys mòbil, a diferència del que succeeix quan aquesta està localitzada al citosol.

A part d'estar involucrades en la motilitat cel·lular, les RhoGTPases també tenen un paper important en el trànsit vesicular, regulant l'estabilitat de l'E-cadherina.

1.3.4.2.3 Senyalització a nivell nuclear

Una altra de les funcions de la p120-catenina és la regulació de la transcripció gènica, en particular la regulació de gens diana de la via de Wnt. La p120-catenina citosòlica afavoreix l'entrada de la β -catenina (l'element central de la via de Wnt) dins del nucli a través de l'activació de la Rac1 [61], i promou que aquesta proteïna pugui activar gens diana de la via de Wnt com els relacionats amb la proliferació. Per altra banda, la p120-catenina també pot entrar al nucli i unir-se al repressor Kaiso alliberant la seva inhibició sobre el complex transcripcional β -catenina/TCF-4 i afavorint l'activació de la transcripció gènica [35], [62]. (Veure apartat Senyalització de Wnt).

1.3.4.2.4 La p120-catenina en càncer

En la tumorigènesi epitelial, la p120-catenina pot actuar com a proteïna pro-tumoral o tenir funcions antitumorals.

Per una banda, estabilitza l'E-cadherina a la membrana, afavorint el paper de proteïna supressora de tumors que té aquesta cadherina epitelial. Diferents estudis mostren que la depleció de la p120-catenina dóna lloc a l'aparició de diferents càncers [63].

Per altra banda, el procés d'EMT que es produeix durant la progressió tumoral promou la depleció dels nivells d'E-cadherina i l'expressió de la proteïna mesenquimal N-cadherina. La falta d'E-cadherina promou la localització de la p120-catenina al citosol, i aquest fet és un marcador de prognosi tumoral dolent [64]. També s'ha observat que la p120-catenina indueix la motilitat i invasió cel·lular a través de l'activació de la senyalització de Rac1 depenent de les cadherines mesenquimals [65], [66].

Així doncs, sembla que la p120-catenina exerceix el paper de proteïna pro-tumoral o anti-tumoral depenent del tipus de cadherina present [47].

2 Via de senyalització de Wnt

La via de senyalització de Wnt regula diferents funcions cel·lulars com la proliferació, la polaritat i la determinació del destí cel·lular durant el desenvolupament i durant la homeòstasi tissular (Revisat a [67]). Com a resultat, mutacions en aquesta via estan implicades en el càncer i en altres malalties (Revisat a [68]).

Hi ha diferents vies de senyalització de Wnt, que es classifiquen segons si depenen de la β -catenina o no: la via canònica de Wnt (o via de Wnt/ β -catenina) i les vies no canòniques de Wnt (o vies independents de β -catenina). En tots els casos, els diferents factors Wnt són els que activen i regulen aquestes vies.

2.1 El factor Wnt

Els factors Wnt es troben conservats en tots els animals metazous, i es sintetitzen per 19 gens independents en humà i ratolí. Aquests factors són glicoproteïnes de 350-400 aminoàcids riques en cisteïnes i que contenen un pèptid senyal en N-terminal que les marca per la secreció [69]. Tot i que hi ha lligands que es considera que activen la via no-canònica (com el Wnt4, Wnt5a i el Wnt11) i d'altres que activen la canònica (com el Wnt3a i el Wnt1), no hi ha diferència entre la seqüència o l'estructura bàsica entre cada grup de lligands. Sembla que el que promou que s'activi la via canònica o la no canònica és el patró d'expressió dels correceptors de Wnt [70].

Les proteïnes Wnt es modifiquen al llarg del reticle endoplasmàtic mitjançant l'addició de glicosilacions i acilacions necessàries per la secreció de la proteïna [71]. Recentment s'ha descrit a partir de la publicació de l'estructura del lligand Wnt, que únicament la serina conservada i corresponent a la 209 en Wnt3a, conté una modificació lipídica, que és la que confereix la poca solubilitat al lligand [72]. Aquesta modificació és promoguda per la proteïna *Porcupine* al reticle endoplasmàtic [73], i és necessària perquè la proteïna Wntless (Wls) s'uneixi al factor Wnt a l'aparell de Golgi i l'acompanyi fins a la superfície cel·lular per promoure la secreció del lligand [74].

En aquest treball s'ha utilitzat el lligand Wnt3a per activar la via canònica de Wnt, ja que és un factor més soluble que la majoria de lligands.

2.2 Via canònica de Wnt

La via canònica de Wnt o també anomenada via de senyalització Wnt/ β -catenina, és una via molt conservada en els vertebrats i en *Drosophila*, i té com a element central la regulació del coactivador transcripcional β -catenina.

En absència del lligand Wnt, el complex de degradació format per Axina, APC i les quinases GSK-3 i CK1 α fosforila la β -catenina citoplasmàtica no unida a les unions adherents, promovent la degradació d'aquesta via proteosoma. D'aquesta manera es mantenen nivells baixos de β -catenina en el citoplasma i al nucli. En canvi, en presència de Wnt, el lligand s'uneix al receptor Fz i al coreceptor LRP5/6, afavorint el reclutament de Dvl i d'Axina a la membrana. Aquest reclutament provocarà la inhibició de la degradació de β -catenina i l'estabilització d'aquesta proteïna. L'augment dels nivells citosòlics i nuclears de β -catenina afavorirà l'expressió de gens relacionats amb la via de Wnt, induint processos com la proliferació o diferenciació (Figura 7)(Revisat a [75]).

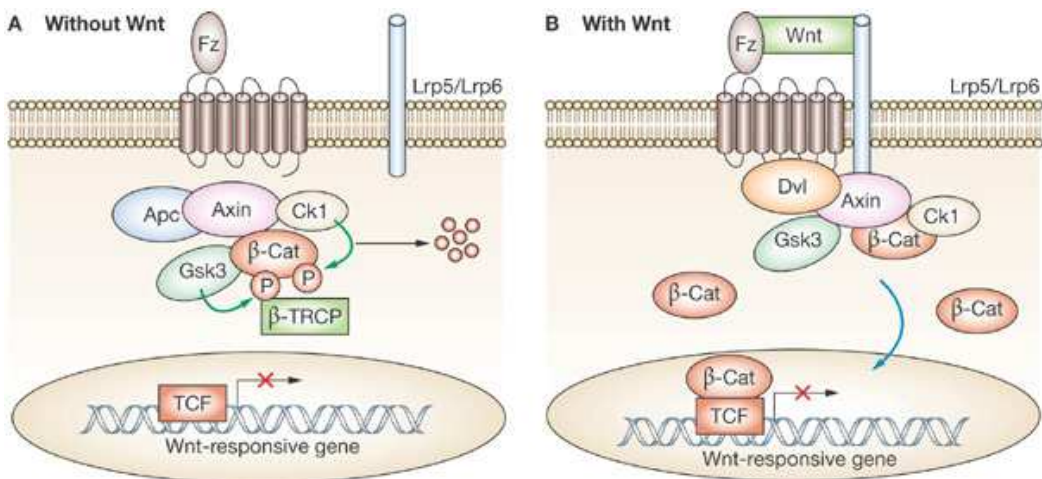


Figura 7. Esquema de la senyalització de la via canònica de Wnt. (A) Sense Wnt, el complex de degradació està actiu i la β -catenina és fosforilada, ubiquitinada i degradada via proteosoma. (B) En presència del lligand Wnt, la unió de Fz i LRP5/6 promou el reclutament de Dvl-2 i del complex de degradació a la membrana. En conseqüència la β -catenina no es fosforila i es transloca al nucli on activarà gens de la via de Wnt. Figura adaptada de [76].

2.2.1 Components de la via

2.2.1.1 Complex de degradació. Axina, GSK-3 i APC

Tal i com s'ha comentat anteriorment, en absència d'estimulació del lligand Wnt, els nivells de la β -catenina es controlen pel complex de degradació de la β -catenina, format per la proteïna acobladora Axina que s'uneix directament als altres membres del complex: la β -catenina, les quinases *glycogen synthase kinase 3* (GSK-3) i *casein kinase α* (CK1 α), la proteïna *adenomatous polyposis coli* (APC), la fosfatasa *protein phosphatase 1* (PP1) i la subunitat catalítica i subunitat reguladora PR61 de la *protein phosphatase 2A* (PP2A) [77]–[82].

L'Axina exerceix el paper d'acobladora del complex, i és essencial per permetre la fosforilació de la β -catenina en la regió N-terminal per les quinases GSK-3 i CK1 α . La CK1 α fosforila inicialment la Ser45 de la β -catenina, que primarà la fosforilació del residu Thr41 per la GSK-3, i les posteriors fosforilacions seqüencials a les Ser 37 i 33 també per GSK-3 [81]. Les serines fosforilades 33 i 37 són reconegudes per la proteïna β -TRCP que forma part del complex ubiquitina lligasa SCF (*Skp1-Cul1-F-box-protein*). D'aquesta manera la β -catenina és ubiquitinada i marcada per posterior degradació via proteosoma [83], [84].

La GSK-3 és una serina/treonina quinasa que és multifuncional i que es troba a tots els organismes eucariotes. A més de regular la via de Wnt, aquesta quinasa està involucrada en molts altres processos com en la biosíntesi de glicogen, l'estabilitat de microtúbuls o en el control del cicle cel·lular [85]. La GSK-3 presenta dues isoformes (α i β) que funcionen de forma redundant en la via canònica de Wnt [86].

La GSK-3 s'activa després de la fosforilació del seu *loop* activador [87], i a diferència del que passa en altres vies on aquesta quinasa està implicada, la GSK-3 no s'inhibeix a través de la fosforilació de la ser21 (isoforma α)/ ser 9 (isoforma β) quan s'activa la via canònica de Wnt [88]. En el complex de degradació, la GSK-3 no només fosforila la β -catenina marcant-la per a la degradació, sinó que també fosforila l'Axina, augmentant l'afinitat entre aquests dos factors [89], [90]. La fosfatasa PP1, en canvi, actua defosforilant l'Axina tot separant-la de la β -catenina i regulant de forma negativa la formació del complex de degradació [79], [91].

L'APC és una proteïna de més de 300 aminoàcids que es troba alterada en el 90% de càncers de colon [68]. Aquesta proteïna conté tres repeticions amb la seqüència SAMP (Ser-Ala-Met-Pro) que faciliten la interacció entre APC i Axina [92] i tres repeticions de 15 aminoàcids i set de 20 aminoàcids per on interacciona directament amb la β -catenina [93], [94]. A més, la fosforilació de les repeticions de 20 aminoàcids per GSK-3 i per CK1 augmenten l'afinitat amb la β -catenina fins a 500 vegades [93]. L'APC també s'uneix a la família de subunitats reguladores PR61 de la fosfatasa PP2A per la regió amino-terminal [95].

Tot i que s'ha descrit àmpliament que l'APC és necessari per la regulació de la via canònica de Wnt afavorint la degradació de la β -catenina [92] i que les mutacions d'APC són oncogèniques [96]; encara no està clar el paper a nivell molecular d'APC en la destrucció de β -catenina. Un dels models proposats suggereix que l'APC promouria l'estabilització del complex de degradació i la fosforilació de la β -catenina a través de les quinases unides a l'Axina [97]. Un altre model es basa en el fet de que l'APC es fosforila per GSK-3 i CK1 després de que la β -catenina hagi estat fosforilada a la regió amino-terminal [93]. La fosforilació d'APC faria augmentar l'afinitat d'aquesta proteïna per β -catenina que se separaria de l'Axina, deixant aquesta proteïna lliure per unir-se amb més β -catenina [98], [99]. Aquest model també suggereix que la família PR61 de les subunitats reguladores de la PP2A defosforilaria l'APC, permetent la separació d'aquest amb la β -catenina i alliberant-lo per una nova ronda de fosforilació i degradació de β -catenina [78]. Finalment, un altre mecanisme plantejat és el que descriu que el paper de l'APC es basaria en promoure la ubiquitinació de la β -catenina, regulant la unió de la β -TRCP amb la β -catenina [94], [100].

2.2.1.2 Receptors de la senyal de Wnt. Fz, LRP5/6 i Dvl

2.2.1.2.1 Components

L'inici de la senyalització requereix de la unió del lligand Wnt al complex receptor. Aquest complex està format per dues proteïnes transmembrana diferents: Frizzled (Fz) i LDL-receptor related protein 5/6 (LRP5/6). La proteïna Fz s'uneix al lligand Wnt amb alta afinitat, i és un receptor necessari tant per la via canònica com per la via no canònica de Wnt, a diferència de l'LRP5/6 que només actua en la via canònica. La unió de les dues proteïnes al lligand Wnt permet la transmissió de la senyal (Revisat a [101]).

El receptor Fz presenta un domini extracel·lular ric en cisteïnes (CRD) en la regió amino-terminal de la proteïna, necessari per la unió del lligand Wnt, i set segments transmembrana similars als que tenen els receptors acoblats a proteïnes G (GPCR). A més, conté un motiu KTxxxW juxtamembrana a la regió de la cua carboxil, necessari per a la senyalització [72] (Figura 8A). En humans hi ha deu proteïnes Fz diferents, numerades de l'1 al 10, de les quals Fz 3 i Fz 6 estan implicades en la transmissió de la senyal en la via no canònica.

Les proteïnes LRP5 i LRP5/6 són receptors amb un únic segment transmembrana i representen l'únic grup de la família LDLR. Aquestes dues proteïnes presenten un 70% de similaritat entre elles, i un 45% de similaritat amb Arrow, la proteïna homòloga d'aquest receptor en mosca [102], [103]. Entre els dos receptors LRP, LRP5/6 té un paper més dominant i és essencial per l'embriogènesi. L'LRP5, en canvi, no és necessari per l'embriogènesi però és determinant per l'homeòstasi òssia. Tot i això, l'LRP5, i l'LRP5/6 són redundants parcialment [102].

La proteïna LRP5/6 presenta un domini extracel·lular (ECD) de més de 1600 aminoàcids que conté quatre tàndems de β -*propeller* i *epidermal growth factor* (EGF), seguits de tres repeticions d'LDLR tipus A [104]. L'ECD media la interacció entre l'LRP5/6 i lligands extracel·lulars com Wnt, o l'inhibidor Dickkopf1 (Dkk1) a través dels quatre tàndems diferents que conté [105]. La regió citoplasmàtica (ICD) està formada per 200 aminoàcids i conté 5 motius PPSPxS (P=Prolina, S=Serina i X=qualsevol aminoàcid) que estan altament conservats des dels invertebrats fins als humans (Figura 8B). Les dues serines del motiu (que també poden ser treonines) es fosforilen després de l'activació de Wnt i són necessàries per a l'estabilització de la β -catenina. Anterior a aquests motius, a més, hi ha el clúster S/T que també es fosforila en Wnt [106]–[108].

Els mutants de l'LRP5/6 que no contenen la regió citoplasmàtica (LRP5/6 Δ C) o tenen totes les serines dels 5 motius mutades a alanines actuen com a dominants negatius de la via de Wnt [103]. En canvi, els mutants de l'LRP5/6 que no contenen la regió extracel·lular però que mantenen la part transmembrana que els localitza a la membrana (LRP5/6 Δ N o CA-LRP) actuen com a receptors constitutivament actius i tenen els motius PPSPxS fosforilats també de forma constitutiva [106], [109]. Aquests resultats suggereixen que la regió extracel·lular de l'LRP5/6 actuaria com a auto-inhibitòria en la senyalització de Wnt.

A més de les proteïnes transmembranes que s'uneixen directament al lligand Wnt, la proteïna citoplasmàtica Dishevelled també és necessària per permetre la transducció de la senyal.

La proteïna Dishevelled (Dvl 1-3 en humà, Dsh en *Drosophila*) és multifuncional i té un paper rellevant tant en la via canònica de Wnt com en la via no canònica. Les proteïnes Dvl tenen uns 700 aminoàcids i contenen tres dominis principals: DIX (*Dishevelled, Axin*), PDZ (*Postsynaptic density 95, discs large, zona occludens-1*) i DEP (*Dishevelled, Eg1-10*) (Figura 8C).

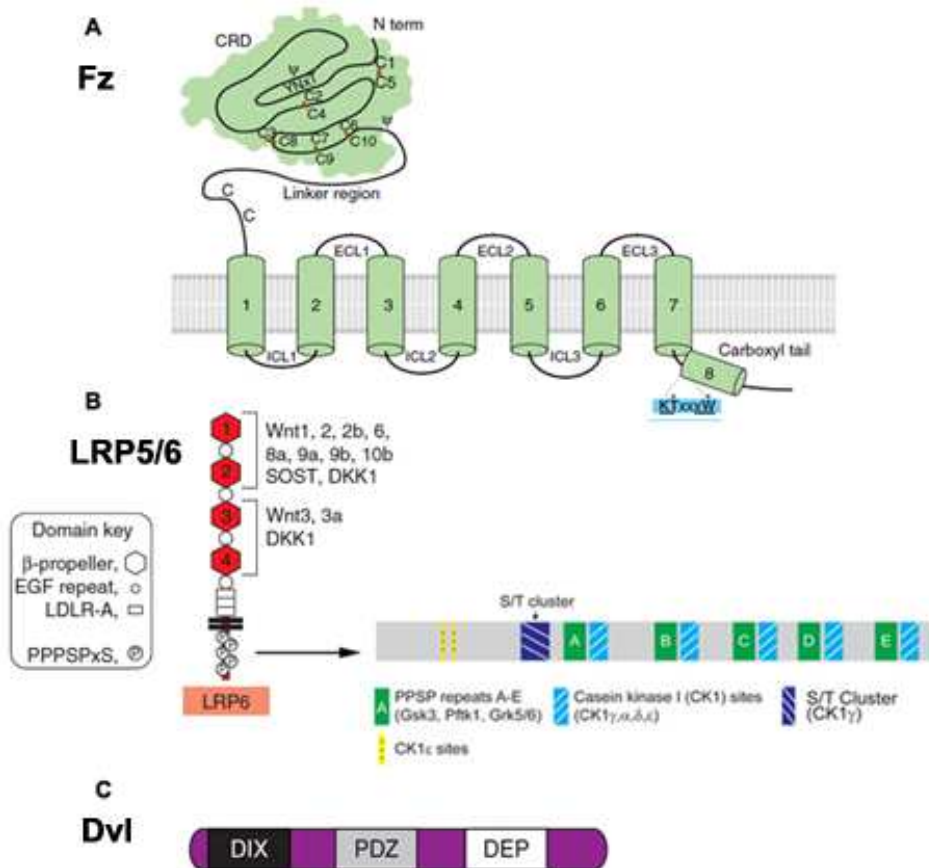


Figura 8. Diagrama dels diferents dominis del receptor Fz, del correceptor LRP5/6 i de Dvl. (A) Representació del receptor Fz amb la regió extracel·lular rica en cisteïnes (CRD), els set fragments transmembrana i la regió juxtamembrana de la cua carboxil. (B) Representació dels dominis del receptor LRP5/6, a nivell extracel·lular i intracel·lular, i esquema de la regió intracel·lular que conté els 5 motius PPSPxS. (C). Esquema de la proteïna Dvl amb els seus tres dominis. Figura adaptada de [101], [105]

El domini més N-terminal és el DIX, que també es troba en l'Axina. Aquest domini permet tant l'homo- com l'heteropolimerització i la formació d'una plataforma de proteïnes Dvl que permet la unió entre diferents factors, com Dvl-Axina [110]. El domini PDZ és essencial per unir la proteïna Dvl amb Fz a través del motiu jxtamembrana KTxxxW del receptor [111]. Finalment, el domini DEP també participaria en la unió de Dvl amb Fz, tot i que diferents estudis suggereixen que aquest domini no seria necessari per la senyalització canònica de Wnt (Revisat a [101]) (Figura 8C).

Dvl s'associa amb quinases com la CK1 ϵ , i s'hiperfosforila després de l'activació canònica de la via de Wnt [112]. Tot i que està documentat que aquestes quinases activen la via canònica de Wnt, el paper que desenvolupa la fosforilació de Dvl encara no està clar [101], [113].

2.2.1.2.2 Activació del complex receptor de Wnt

La unió del lligand Wnt al complex receptor format per Fz i LRP5/6, indueix l'activació de la senyalització de la via a través de la fosforilació de l'LRP5/6.

La fosforilació de l'LRP5/6 es produeix als motius PPSPxS de la regió citoplasmàtica de l'LRP5/6, i promou el reclutament d'Axina al correceptor. Els dominis PPSPxS es fosforilen per GSK-3 en la primera serina del motiu, que primarà la posterior fosforilació de l'altra serina per CK1. Una de les serines que està àmpliament descrit que es fosforila per GSK-3 és la 1490 que es troba al primer domini PPSPxS [114]. Les quinases de la família de la CK1 que sembla que fosforilen els diferents motius són la CK1 α , i la CK1 ϵ/δ que estan associades a Axina i a Dvl-2, respectivament. A part de la GSK-3 i la CK1, s'han descrit altres quinases que estan implicades en la fosforilació dels motius PPSPxS com la Grk5/6, la PKA i la Pftk1/Ccny (Revisat a [105]).

Prèviament a les fosforilacions dels motius PPSPxS, s'indueix la fosforilació del clúster S/T que es localitza més N-terminal respecte tots aquests dominis (Figura 8B). En aquest cas la CK1 γ , una quinasa unida a la membrana a través d'isoprenilació, fosforila el residu 1479 [75], [108]. L'explicació funcional d'aquesta fosforilació encara no està clara, tot i que un estudi suggereix que podria promoure un lloc d'unió per la GSK-3 que d'aquesta manera podria iniciar la fosforilació dels motius PPSPxS [115].

El receptor Fz és necessari per la fosforilació de GSK-3 als motius PPSPxS de l'LRP5/6, i necessita també la unió directe de Dvl-2 per regular aquesta fosforilació [116]. A més, també s'ha descrit que l'Axina és requerida per promoure aquesta fosforilació del correceptor, però només quan està unida a GSK-3 [106].

Aquests resultats porten a descriure diferents models de fosforilació de l'LRP5/6 i d'activació del complex receptor de Wnt. El model d'iniciació i amplificació s'origina amb la formació del complex Wnt/Fz/LRP5/6 que provoca la localització de Dvl-2 a la membrana i el reclutament d'Axina unida a GSK-3 i a CK1 α al complex. La GSK-3 iniciarà la fosforilació del primer motiu PPSPxS que reforçarà la interacció de l'Axina al complex, promourà un *feed-back* positiu que fosforilarà els altres motius PPSPxS i provocarà un major reclutament d'Axina al complex (Figura 9A) [116]. Aquest model és complementari i similar al conegut com a model del signalosoma i es basa en l'homopolimerització de Dvl-2 al citosol a través del domini DIX. La polimerització de Dvl-2 permet la formació de plataformes dinàmiques d'aquesta proteïna a la membrana plasmàtica que estableixen el complex Fz-LRP5/6 i promouen la fosforilació del correceptor LRP5/6 per GSK-3 i CK1, i el reclutament d'Axina (Figura 9B) [110], [117].

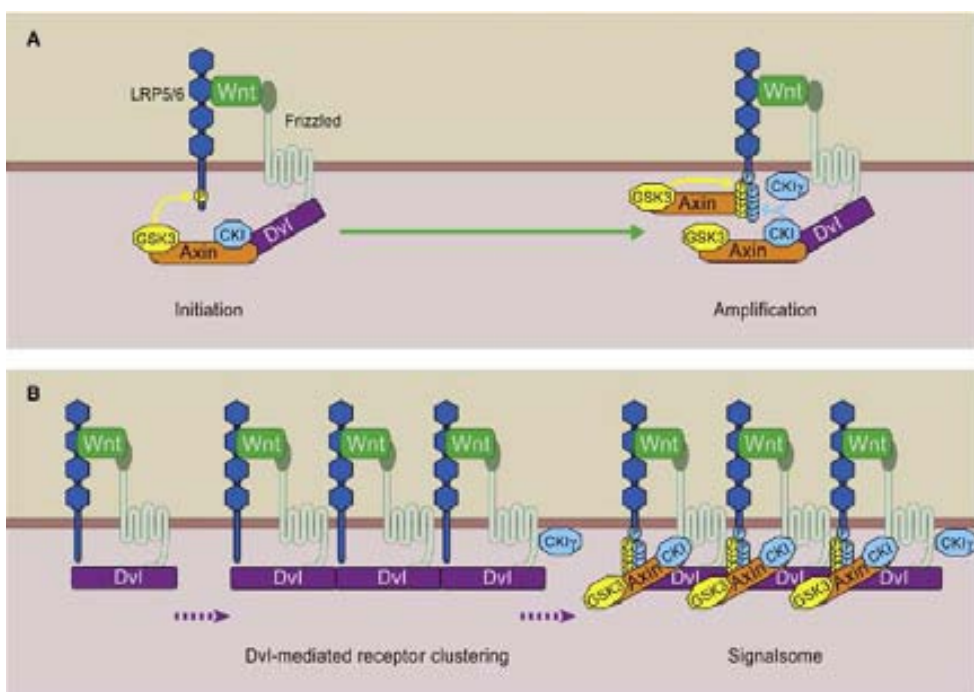


Figura 9: Models d'activació del complex receptor de Wnt. (A) Model d'iniciació i amplificació (B) Model del signalosoma. Figura adaptada de [75].

2.2.1.2.3 Estabilització de la β -catenina

L'activació de la via canònica de Wnt promou l'estabilització de la β -catenina, però encara és matèria de debat com l'activació del complex receptor estabilitza aquesta proteïna. Han sorgit diferents models que postulen que l'estabilització de la β -catenina es produeix com a conseqüència de la dissociació del complex de degradació, de manera que l'Axina [67], [118], l'APC [97] o la GSK-3 [119] se separarien del complex i s'impediria la fosforilació de la β -catenina.

També s'han publicat altres models proposant que l'activació de la via de Wnt provoca la degradació de la proteïna Axina, inhibint d'aquesta manera el complex de degradació [120], [121]. Aquest model, però, quedaria descartat després de resultats que descriuen que l'estabilització de la β -catenina i l'aparició de gens diana de la via de Wnt es produeixen prèviament a la degradació de l'Axina [100].

Recentment, un dels models més acceptats és el que proposa que la fosforilació dels motius PPSPxS de l'LRP5/6 crea un lloc d'inhibició directe de la quinasa GSK-3, de manera que aquesta no pot fosforilar la β -catenina [115], [122], [123]. Aquest model es basa en resultats que indiquen que la fosforilació *in vitro* de l'LRP5/6 recombinant uneix la GSK-3 i inhibeix la fosforilació *in vitro* de la β -catenina per aquesta quinasa (Figura 10A). Aquest mecanisme explicaria la inhibició de forma selectiva de la fracció de la quinasa que forma part del complex Axina-GSK-3 responsable de la fosforilació de la β -catenina. El model es pot complementar amb els resultats publicats que afegixen que la inhibició de la GSK-3 per la unió directa de l'LRP5/6, provoca una defosforilació de l'Axina a través de la fosfatasa PP1 que la separa de la β -catenina [79], [91].

Paralelament a aquest mecanisme, s'ha descrit un altre model que es basa en el fet de que el complex de degradació no es dissocia després de l'estimulació per Wnt sinó que les quinases romanen actives i segueixen fosforilant la β -catenina, tot i que aquesta no es degrada degut a que la β -TRCP no la ubiquitina [100].

Finalment, s'ha publicat un altre article que proposa que després del reclutament de tot el complex al correceptor LRP5/6, aquest s'internalitza dins de cossos multivesiculars (MVB), de manera que s'impedeix la fosforilació de la β -catenina per part de la GSK-3, que es trobaria en un altre compartiment. En aquest model l'activitat quinasa de la GSK-3 no s'inhibeix, però en internalitzar-se a través d'endosomes, no pot fosforilar la β -catenina del citoplasma (Figura 10B)[124].

Aquest model és compatible amb articles publicats prèviament on es descriu que la fosforilació de l'LRP5/6 en els *lipids rafts* (un microdomini de la membrana plasmàtica ric en colesterol), i la posterior endocitosi a través de caveolina és necessària per la senyalització de Wnt. Aquest mecanisme descriu que els processos de fosforilació i d'internalització del correceptor via caveolina són independents i necessaris per permetre l'acumulació de β -catenina [109], [125]–[127].

Tenint en compte que encara no es coneix quin dels anteriors models presentats és el que promou l'estabilització de la β -catenina, s'espera que aquest treball ajudi a elucidar aquesta qüestió, una de les claus per entendre l'activació de la via de Wnt.

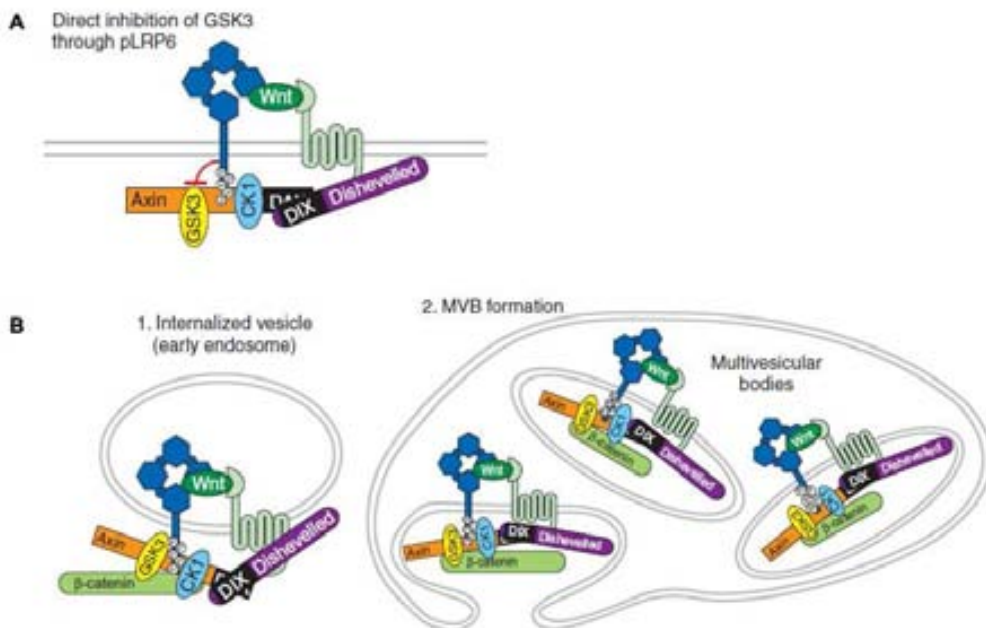


Figura 10: Models per promoure l'estabilització de la β -catenina. (A) Model d'inhibició de la GSK-3 per interacció directa amb l'LRP5/6. (B) Model d'internalització del complex de Wnt dins de MVBs. Figura adaptada de [101].

2.2.1.3 Activadors de la transcripció

2.2.1.3.1 Translocació de β -catenina al nucli

L'estabilització de la β -catenina correlaciona amb l'entrada d'aquesta proteïna dins del nucli i l'activació de gens diana de la via de Wnt.

Tot i que la localització nuclear de la β -catenina en resposta a Wnt és essencial per a la senyalització, els mecanismes que controlen aquest procés encara no estan clars. Estudis inicials suggerien que un coactivador de la β -catenina, BCL9, podria promoure l'entrada de β -catenina al nucli [128], mentre que l'APC exportaria la proteïna al citosol [129], [130]. Tot i això, un estudi posterior conclou que aquestes molècules funcionen bàsicament retenint la β -catenina al nucli o al citoplasma i no afavorint l'import o l'export nuclear de la proteïna [131]. Altres resultats publicats suggereixen que l'activació de Rac1 és necessària per la translocació de la β -catenina i actua promovent la fosforilació de β -catenina per *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) [132]. Experiments realitzats al nostre laboratori, afegeixen, a més, que la p120-catenina seria necessària per aquesta activació de la GTPasa Rac1 [61].

2.2.1.3.2 Formació del complex transcripcional

Dins del nucli, la β -catenina s'uneix a la família de factors transcripcionals TCF/LEF. La família de proteïnes TCF és expressada per 4 gens diferents en mamífers, però l'*splicing* alternatiu produeix un gran nombre de variants proteiques (Revisat a [133]). Quan la via de Wnt no està activada, TCF-4 impedeix l'expressió gènica mitjançant la unió amb el repressor Groucho (TLE1 en humans) [134]. En canvi, quan la β -catenina s'acumula al nucli com a resposta de l'activació de Wnt, aquesta desplaça a la proteïna TLE1, s'uneix amb TCF-4 [135] i es recluten altres coactivadors com BCL9/Pygo o p300/CBP, entre d'altres, per activar l'expressió gènica. Hi ha diferents repressors i inhibidors que impedeixen la formació del complex β -catenina/TCF-4 (Revisat a [75], [136]). Un exemple és el repressor Kaiso que s'uneix directament a TCF-4 i que és regulat per la proteïna p120-catenina durant l'activació de la via de Wnt [137]–[139].

2.2.1.3.3 Gens diana de la via canònica de Wnt

Degut a que la via de Wnt/ β -catenina regula diferents processos com la proliferació, la diferenciació i l'homeòstasi de teixits en adults, els gens diana de la via de Wnt són diversos i dependents de la cèl·lula i del context específic. En aquest treball s'ha analitzat l'expressió dels següents gens, com a exemple de gens diana de Wnt: *AXIN2* [140] i *TCF7* [141] que promouen un efecte de *feedback* negatiu en la via; *CCND1*, que expressa una ciclina involucrada directament en l'augment de proliferació [142] i l'*EPHB3*, que expressa un receptor implicat en el correcte posicionament de les cèl·lules epitelials al llarg de la cripta de l'intestí i del

colon [143]. Per una descripció completa dels gens activats pel complex β -catenina/TCF-4, anar a <http://web.stanford.edu/group/nusselab>.

2.2.1.4 Família proteïna quinasa CK1

La *Casein Kinase I* (CK1) és una família de proteïnes serina/treonina quinasa i monomèriques que regula diferents processos cel·lulars com els ritmes circadians, la senyalització de la via de Wnt i la replicació de DNA (Revisat a [144]).

2.2.1.4.1 Estructura

La família CK1 s'expressa per sis gens diferents en humans (α , δ , ϵ , γ_1 , γ_2 i γ_3) que juntament amb les modificacions transcripcionals que es produeixen, dóna lloc a 11 variants diferents de la família. Els diferents membres comparteixen una gran homologia en el domini quinasa, però difereixen en la llargada i la seqüència d'aminoàcids de les extensions en N-terminal i en C-terminal (Revisat a [145]). En general, les quinases d'aquesta família són actives de forma constitutiva, però les quinases CK1 δ i CK1 ϵ presenten una regió autoinhibitòria en C-terminal. Aquesta regió s'autofosforila inhibint l'activitat del domini quinasa, i s'activa per la defosforilació realitzada per fosfatases [146], [147].

Un dels llocs conservats de fosforilació de la família CK1 és el S/Tp-X-X-S/T, on S/Tp significa una serina o una treonina fosforilada, indicant que aquesta família requereix de fosforilació encebadora prèvia [148]. Tot i així la CK1 també pot fosforilar sense necessitat d'encebament, com en la fosforilació de l'extrem N-terminal de la β -catenina. En aquest cas, però, és necessària que la serina que s'ha de fosforilar vagi seguida d'un clúster de residus àcids [149].

2.2.1.4.2 La CK1 a la via canònica de Wnt

S'ha descrit que les diferents isoformes de la CK1 estan implicades en la regulació de la via de Wnt, tant de forma positiva com de forma negativa.

La CK1 a través de les isoformes α , ϵ i γ fosforila diferents dominis de l'LRP5/6 promovent l'activació del receptor i de la via (veure apartat 2.2.1.2.2). També fosforila components del complex de degradació, provocant la seva desestabilització i per tant facilitant l'estabilització de la β -catenina [150]. A més, la CK1 ϵ s'uneix a Dvl-2 i fosforila aquesta proteïna, activant la via canònica de Wnt [32], [119], [151]–[153]. Finalment, el nostre grup ha descrit que la CK1 α també actua de forma positiva en la via, fosforilant proteïnes que formen part de les

unions adherents i que són essencials per l'activació de la ruta [31], [32], [35], [61] (veure apartat 2.2.2).

No obstant, les diferents isoformes de la CK1 també regulen la via canònica de Wnt de forma negativa. Bàsicament fosforilen la β -catenina i l'APC promovent la degradació de la β -catenina i impedit l'activació de la senyal de Wnt [81], [93].

2.2.1.4.3 Regulació i activació de la CK1 ϵ en la via de Wnt

La CK1 ϵ necessita activar-se per tal de poder fosforilar Dvl-2 com a resposta a la unió del lligand Wnt als receptors [119]. Està descrit que l'activitat de CK1 ϵ augmenta quan s'activa la via, i que un mutant d'aquesta quinasa que li falten els llocs d'autofosforilació és més actiu que la quinasa *wild type*, i no respon a l'activació de Wnt. A més, en el mateix treball és descriu que inhibidors de les fosfatases PP1, PP2A i PP2B bloquegen l'activació de la quinasa CK1 ϵ *wild type* en Wnt, però no la de la mutant [154]. Aquests resultats suggereixen que Wnt activa una fosfatasa que defosforila la cua inhibidora C-terminal de CK1 ϵ , activant d'aquesta manera la quinasa [154](Figura 11). Aquesta és una de les etapes inicials de la via de Wnt.

Un dels objectius plantejats en aquest treball és identificar quin és la fosfatasa que defosforila i activa la CK1 ϵ en la via de Wnt. Resoldre aquesta qüestió permetrà tenir noves dades de la regulació d'aquesta via.

S'ha descrit que la CK1 ϵ també es pot activar de forma complementària mitjançant activadors al·lostèrics. S'ha identificat que després de l'activació de Wnt, l'helicasa d'RNA DDX3 s'uneix directament a la CK1 ϵ i l'activa, promovent la fosforilació de la proteïna Dvl-2 [155](Figura 11).

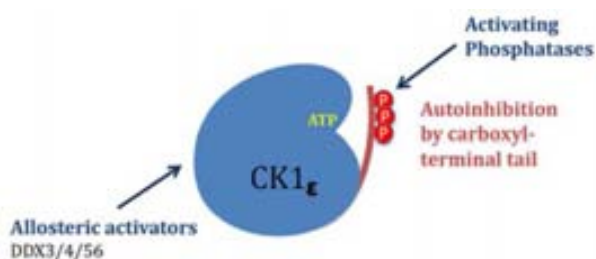


Figura 11: Esquema de la regulació de la quinasa CK1 ϵ en Wnt. La quinasa CK1 ϵ s'activa a través de les fosfatases que defosforilen els llocs autoinhibitoris de la regió C-terminal, i a partir d'activadors al·lostèrics com la proteïna DDX3. Figura adaptada de [156].

2.2.1.5 Proteïna fosfatasa PP2A

La PP2A pertany a la família de les serina/treonina fosfatases i té com a funció revertir l'acció de diferents quinases que actuen en la majoria de cascades de senyalització, com en la via canònica de Wnt. Juntament amb la fosfatasa PP1, representen el 90% de les fosfatases serines/treonines que actuen dins la cèl·lula [157].

2.2.1.5.1 Estructura

La PP2A és un holoenzim format per tres components diferents: la subunitat catalítica (PP2Ac), la subunitat estructural (PR65) i la subunitat reguladora (B). La PP2Ac i la PR65 s'uneixen directament creant el nucli de l'enzim, i la subunitat reguladora B és la que aporta l'especificitat de substrat a la fosfatasa (Revisat a [157]) (Figura 12).

La subunitat catalítica (PP2Ac) s'expressa per dos gens diferents (PP2Ac α i β) que es troben a gairebé a tots els teixits. Aquesta subunitat conté un domini conservat que forma un lloc actiu per a la hidròlisi dels grups fosfat presents en serines, treonines, i en segons quines condicions també en tirosines [158]. L'estructura cristal·litzada dels tres dominis de la PP2A indica que tant la subunitat estructural com la subunitat reguladora s'uneixen per la regió conservada C-terminal de la subunitat catalítica [159]. A més, el reclutament de la subunitat reguladora al nucli de l'enzim està regulat per la fosforilació i metilació d'aquesta regió C-terminal [160].

La subunitat estructural (PR65) s'expressa per dos gens diferents, de manera similar a la subunitat catalítica, la PR65 α i la PR65 β . Tal i com indica el seu nom, aquesta subunitat actua de forma estructural facilitant la interacció de la subunitat catalítica amb la subunitat reguladora. La unió de la PP2Ac amb la PR65 forma una estructura en forma de ferradura que afavorirà el reclutament de la proteïna substrat a través de la subunitat reguladora [159].

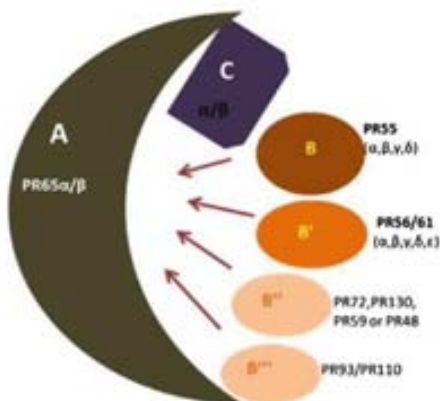


Figura 12: Representació esquemàtica de la PP2A. La subunitat estructural (A), la subunitat catalítica (C), i les diferents famílies de la subunitat reguladora (B, B', B'' i B''') estan representades. Figura modificada de [161].

La subunitat reguladora (B) s'expressa per 15 gens diferents en humans, que codifiquen per unes 26 variants transcripcionals diferents. Aquestes diferents subunitats són les que doten a la fosfatasa PP2A d'especificitat de substrat. Les diferents subunitats es classifiquen en quatre famílies diferents: La B/PR55, la B'/PR61, la B''/PR72 i la PTP/PR53; que no comparteixen similitud de seqüència excepte en la regió que les uneix amb la subunitat estructural [161].

2.2.1.5.2 La PP2A a la via canònica de Wnt

La PP2A té un paper important a la via de Wnt i està implicada en la regulació d'aquesta a diferents nivells. Tot i que hi ha subunitats reguladores que exerceixen papers positius i d'altres que exerceixen papers negatius en l'activació de la via, el rol que domina és el d'inhibidor. Aquest fet s'ha demostrat mitjançant l'ús de l'àcid okadaic, un inhibidor que a determinades concentracions és específic de la PP2A. L'ús de l'inhibidor promou l'estabilització de β -catenina [95].

Les famílies PR55 i PR61 estan implicades en la regulació d'aquesta via. Es va descriure mitjançant un assaig de doble híbrid que la PR61 α i la PR61 δ s'uneixen a APC, i que la sobreexpressió d'aquestes subunitats fa disminuir els nivells de β -catenina [95]. Posteriorment es va publicar que aquestes subunitats també s'uneixen a Axina i que inhibeixen la senyalització de Wnt durant el desenvolupament dels vertebrats [82], [162]. Aquests resultats mostren el paper negatiu d'aquestes subunitats reguladores en la via de Wnt, i són concordants amb el model de que l'APC al complex de degradació necessita ser defosforilat per separar-se de la β -catenina ja fosforilada i poder seguir promovent la degradació de més β -catenina (veure *apartat 2.2.1.1 complex de degradació*).

Experiments inicials també van descriure la PR61 ϵ com un regulador negatiu de la via de Wnt que s'unia a Dvl-2 i a APC [95]. Tot i això, experiments de *knockdown* realitzats posteriorment indiquen que aquesta subunitat és activadora de la via i actuaria per sobre de Dvl-2 [163]. La subunitat PR55 α també té un paper positiu en Wnt, però en aquest cas promovent la defosforilació de la β -catenina i impeding la seva degradació [164]. Finalment, també s'ha publicat que la PP2A α es localitza a la membrana plasmàtica formant un complex amb la β -catenina i l'E-cadherina que estabilitza aquestes dues proteïnes. En aquest cas, però, encara no s'ha descrit la subunitat reguladora específica que realitzaria aquesta funció [165].

2.2.2 Implicació de les unions adherents en l'activació de la via

El nostre grup ha descrit una connexió entre el correceptor de la via canònica de Wnt i els components de les unions adherents. Aquests resultats mostren el paper crucial de la p120-catenina en la regulació de l'estabilitat i l'activitat transcripcional de l'element central de la via, la β -catenina [31], [32], [35], [61]. Amb els resultats obtinguts al laboratori, juntament amb el que s'ha descrit prèviament de la via canònica de Wnt, s'ha proposat el següent model d'activació de la via:

En cèl·lules no estimulades, la cadherina s'uneix directament a l'LRP5/6 per la regió citoplasmàtica, i connecta la p120-catenina amb el correceptor de la via de Wnt. La regió N-terminal de la p120-catenina es troba unida directament a la quinasa CK1 ϵ que està inactiva (Figura 13A). L'estimulació de Wnt3a promou l'associació de tot aquest complex amb el receptor Fz, i activa la CK1 ϵ mitjançant la defosforilació dels residus autoinhibitoris per una fosfatasa no identificada. La CK1 ϵ activada fosforila diferents substrats com Dvl-2, que polimeritzarà i s'unirà al complex de Fz-LRP5/6. Tant la p120-catenina com la CK1 ϵ , són necessàries per aquesta fosforilació de Dvl-2 i per la posterior activació de la via, i la seva depleció resulta en el bloqueig de la via. A continuació CK1 γ fosforila el residu 1479 de l'LRP5/6, provocant el reclutament d'Axina unida a GSK-3 i a CK1 α , que fosforilaran més motius de l'LRP5/6 afavorint el reclutament de més Axina (Figura 13B). La CK1 α reclutada al complex també fosforila la p120-catenina, a les serines 268, 269, i la cadherina. Aquestes modificacions fan que la p120-catenina se separi de la cadherina, i també que la cadherina se separi del correceptor LRP5/6 (Figura 13C) [31], [32].

Aquesta activació dels receptors de Wnt que afavoreix la formació del complex signalosoma, promou l'estabilització de la β -catenina a través de la inhibició de l'activitat de la GSK-3 sobre β -catenina. Diferents models per explicar aquesta inhibició de la GSK-3 s'han descrit a l'apartat 2.2.1.2.3. L'efecte de Wnt no es limita a estabilitzar la β -catenina, sinó que també regula senyals addicionals que es requereixen per una resposta completa. Així, la p120-catenina alliberada del signalosoma de Wnt afavoreix l'activació transcripcional de la β -catenina de dues maneres diferents. Per una banda, la p120-catenina activa la GTPasa Rac1 que fosforilarà la β -catenina a través de la quinasa JNK, promovent la translocació de la β -catenina al nucli [61]. Per l'altra banda, la p120-catenina és necessària per l'export nuclear del repressor transcripcional Kaiso, permetent que es formi el

complex transcripcional entre la β -catenina, el TCF-4 i el promotor i que es puguin activar els gens dependents de la via de Wnt (Figura 13D) [35].

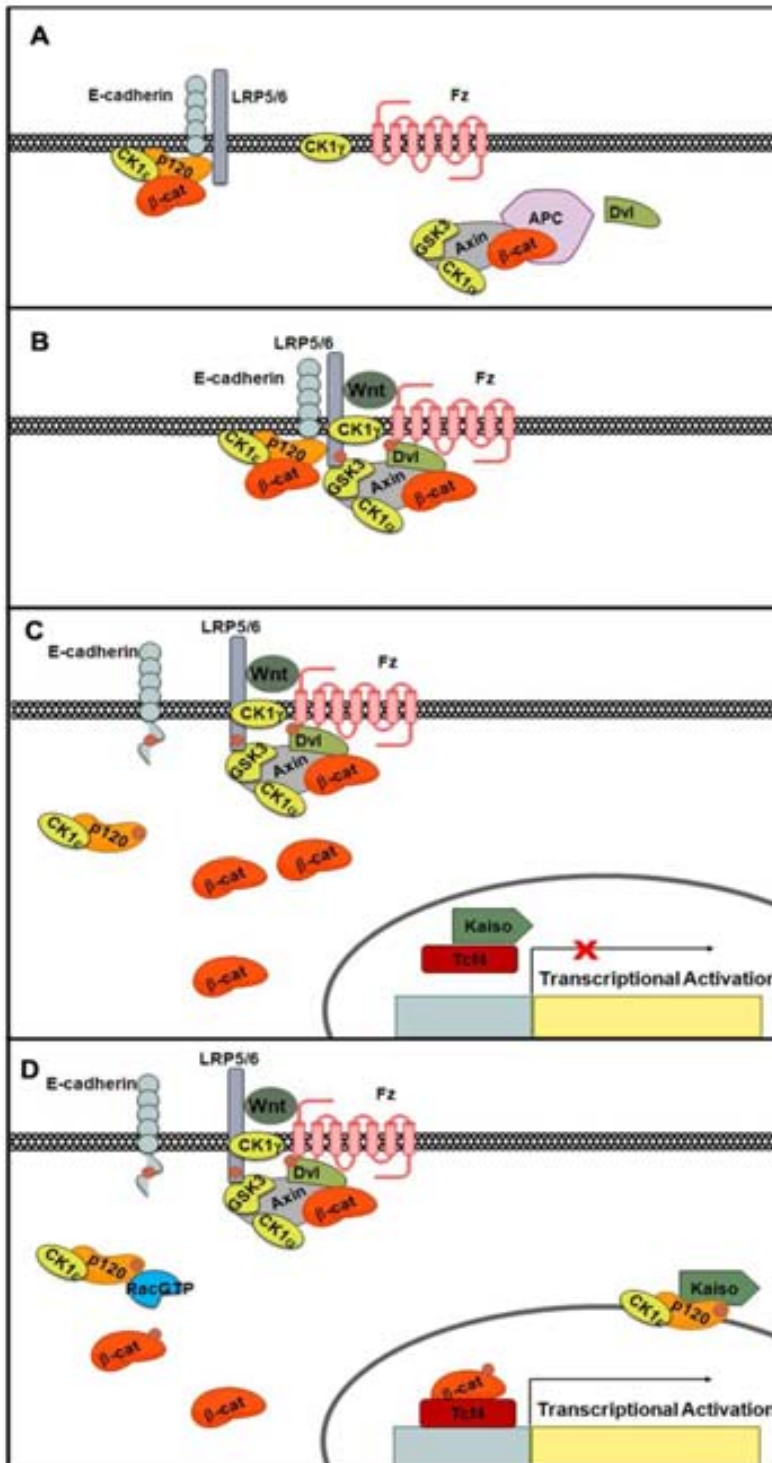


Figura 13: Implicació de les unions adherents en l'activació de la via de Wnt. Els diferents passos estan descrits al text.

2.3 Via no canònica de Wnt

La via no canònica de Wnt o independent de β -catenina, s'activa per factors Wnt com el Wnt5a i el Wnt11a i pot iniciar diferents cascades de senyalització. Les vies més descrites són la via *Planar cell polarity* (PCP) i la via Ca^{2+} , tot i que n'hi ha d'altres.

La via PCP promou la polarització dins del pla d'un determinat teixit, que significa que les cèl·lules s'organitzen en una orientació particular respecte l'axis del cos. Aquesta via està regulada pel receptor Fz i el receptor *tyrosine kinase-like orphan receptor 2* (Ror-2), a més de Dvl-2, i activa proteïnes G com Rac i Rho que indueixen canvis en el citoesquelet [166](Figura 14).

La via Ca^{2+} promou la migració cel·lular a través de l'augment de calci intracel·lular que activa quinases com la *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase* (CaMK) i la *protein kinase C* (PKC) [167](Figura 14).

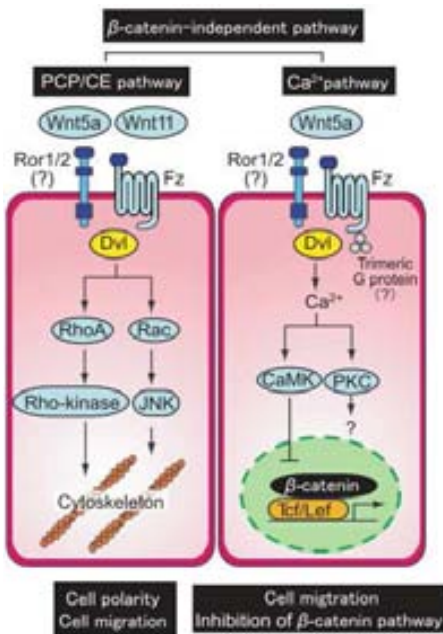


Figura 14: Esquema de la via no canònica de Wnt. Wnt no canònic s'activa per la via PCP/CE i per la via Ca^{2+} . Figura adaptada de [166].

2.4 Regulació funcional de la via de Wnt

2.4.1 Senyalització de Wnt a l'intestí

Inicialment, els estudis de la via de Wnt es van focalitzar en el seu paper en el seu desenvolupament animal (Revisat a [168]). Més endavant és va descobrir que

aquesta via està involucrada també en adults, en el manteniment de les criptes intestinals i en d'altres processos, com en la regulació de la homeòstasi de la pell [169], [170].

L'epiteli de l'intestí presenta una constant renovació cel·lular i representa el teixit adult d'animals amb una taxa de proliferació més elevada. Està format per un gran nombre de vellositats (per maximitzar la superfície d'absorció de nutrients) i de criptes. Les cèl·lules mare resideixen a la part basal de la cripta, on romanen estàtiques. Aquestes cèl·lules, que cicleu lentament, produeixen les cèl·lules progenitores capaces de diferenciar-se a tots els tipus cel·lulars epitelials. Les cèl·lules progenitores de la cripta i les diferenciades de la vellositat formen una capa contínua en constant moviment cap a la part apical de la vellositat. En arribar allà, les cèl·lules diferenciades indueixen el procés d'apoptosi [68] (Figura 15).

Aquests processos de proliferació i de regulació del destí cel·lular estan coordinats per la via de Wnt. Les cèl·lules de la cripta presenten nivells elevats de β -catenina nuclear, i aquests nivells disminueixen de forma gradual a mida que s'arriba a la part apical de la vellositat [171]. Aquest gradient de Wnt regula l'organització espacial de l'epiteli, a través de l'expressió de gens diana com els receptors d'efrina (EphB2 i EphB3) [172].

Estudis recents demostren que les cèl·lules mare de la base de la cripta expressen de forma diferencial el receptor LGR. Aquest promou l'activació de la via de Wnt a través del seu lligand R-spondin i sinèrgicament amb el receptor LRP5/6 [173]. També s'ha vist que les cèl·lules mare de la cripta estan intercalades amb les cèl·lules Paneth, que formen part del nínxol de les cèl·lules mare. Aquestes proveeixen de senyals com Wnt3a, Egf, Tgf a les cèl·lules LGR⁺ perquè es pugui seguir mantenint el fenotip de cèl·lula mare [174] (Figura 15).

L'activació anormal de la via de Wnt en l'intestí i en el colon causa càncer colorectal. La majoria d'aquests càncers estan provocats per una mutació del gen APC [175] però també poden ser provocats per mutacions de l'Axina2 [176] o mutacions puntuals en les serines de la β -catenina que regulen la seva degradació [177]. Tot i que la hiperactivació de la via de Wnt provoca la iniciació de pòlips al colon, es requereixen mutacions addicionals perquè es produeixi un adenocarcinoma.

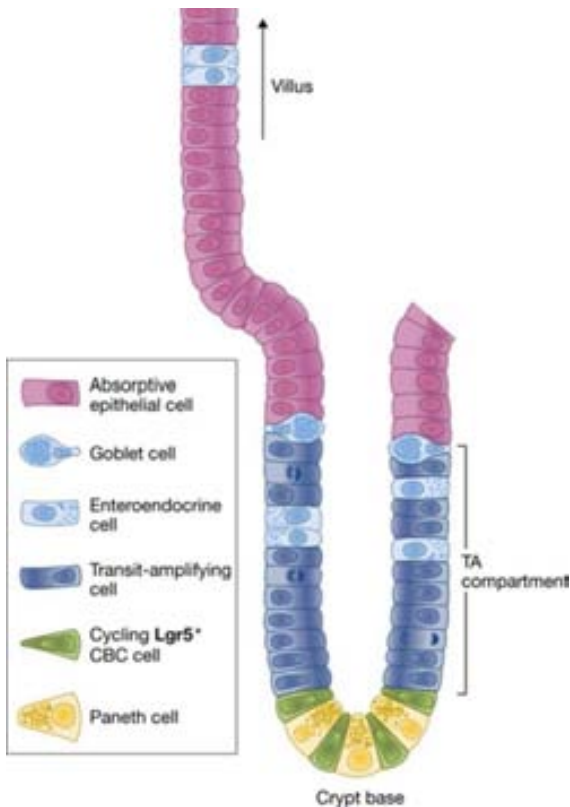


Figura 15: Esquema de la cripta i part de la vellositat de l'intestí prim. Les cèl·lules mare LGF^+ estan a la base de la cripta i empenyen la progènie cap a la vellositat. (Figura de [178]).

2.4.2 Senyalització de Wnt a l'adipogènesi

La via de Wnt també regula l'estat d'autorenovació de les cèl·lules mare mesenquimals (MSC) i el control de la diferenciació d'aquestes a osteoblasts, adipòcits, condrocits o mioblasts (Revisat a [179]).

En aquest treball, com a exemple de model funcional on actua Wnt, s'ha utilitzat la regulació de l'adipogènesi. L'adipogènesi és el procés de diferenciació de les cèl·lules mare mesenquimals (MSC) primerament a preadipòcits i finalment a adipòcits madurs. Aquests últims contenen gotes de lípids i tenen la capacitat de respondre davant d'hormones com la insulina [166].

S'ha descrit que la via canònica de Wnt té un paper important en inhibir l'adipogènesi. Per una banda s'ha observat que la inactivació de la via Wnt/ β -catenina és necessària per l'inici de l'adipogènesi [180], i també s'ha vist que l'activació canònica de la via mitjançant el lligand Wnt1 o Wnt10 impedeix la diferenciació a adipòcits madurs [181].

3 Procés d'endocitosi i trànsit de membranes

L'endocitosi s'ha considerat tradicionalment com un mecanisme per disminuir els nivells dels receptors cel·lulars i impedir l'activació de diferents vies. Recentment, però, s'ha demostrat que l'endocitosi també actua com a activadora de la senyalització. Un exemple és en la via de Wnt canònica, on diferents models proposen que l'endocitosi del correceptor l'LRP5/6 o l'endocitosi de tot el complex del signalosoma és necessari per a l'activació de la via [124], [125], [182].

La internalització de les proteïnes i lípids de membrana segueix diferents rutes, les més caracteritzades són l'endocitosi dependent de clatrina i la dependent de caveolina (Figura 16).

L'endocitosi dependent de clatrina s'inicia amb la unió de la proteïna clatrina a la membrana plasmàtica i la invaginació d'una part d'aquesta que conté el receptor que s'endocita. Tot seguit, la proteïna clatrina encapsula tot aquest complex i forma les vesícules amb revestiment de clatrina dins del citoplasma. Aquest procés requereix d'altres proteïnes, com l'AP-2 i la dinamina. Un cop formada la vesícula, aquesta se separa de la clatrina i es fusiona amb els endosomes primerencs, orgànuls multifuncionals que regulen el transport entre la membrana plasmàtica i diferents components intracel·lulars. D'aquesta manera, les vesícules que arriben als endosomes primerencs poden retornar a la membrana plasmàtica, connectar-se amb l'aparell de Golgi o ser transportades als endosomes tardans. Els endosomes primerencs i tardans es poden distingir a nivell morfològic. Mentre que els endosomes primerencs són tubulars i es localitzen a la perifèria cel·lular, els endosomes tardans són més esfèrics i s'orienten prop del nucli. A més, els endosomes tardans poden presentar vesícules intraluminals, i és per això que també se'ls anomena cossos multivesiculars (MVBs) [183]. Les proteïnes que es dirigeixen als cossos multivesiculars han estat prèviament ubiquitinades per lligases E3 específiques. Aquesta ubiquitinació és reconeguda pel complex ESCRT (*endosomal sorting complex for transport*) a la membrana endosomal que promourà la formació de vesícules intraluminals dins de les MVBs. Finalment, les proteïnes presents en aquests orgànuls seran degradades via lisosomal (Revisat a [184], [185]).

L'endocitosi dependent de caveolina es basa en la formació de les invaginacions conegudes com a *caveolae* als microdominis rics en colesterol i en esfingolípids de

la membrana plasmàtica, on hi ha concentrades diferents proteïnes de membrana. La formació de la *caveolae* depèn de la proteïna caveolina que s'uneix directament al colesterol i recobreix la invaginació. S'ha demostrat que aquest tipus d'endocitosi comparteix moltes característiques amb la dependent de clatrina, com el requeriment de proteïnes com la dinamina pel procés. A més, tot i que aquest mecanisme no ha estat tan caracteritzat com el procés d'endocitosi dependent de clatrina, diferents estudis mostren que el tràfic intracel·lular de l'endocitosi de caveolina és paral·lel al de la clatrina, i les vesícules també es fusionen amb els endosomes primerencs [186]–[188].

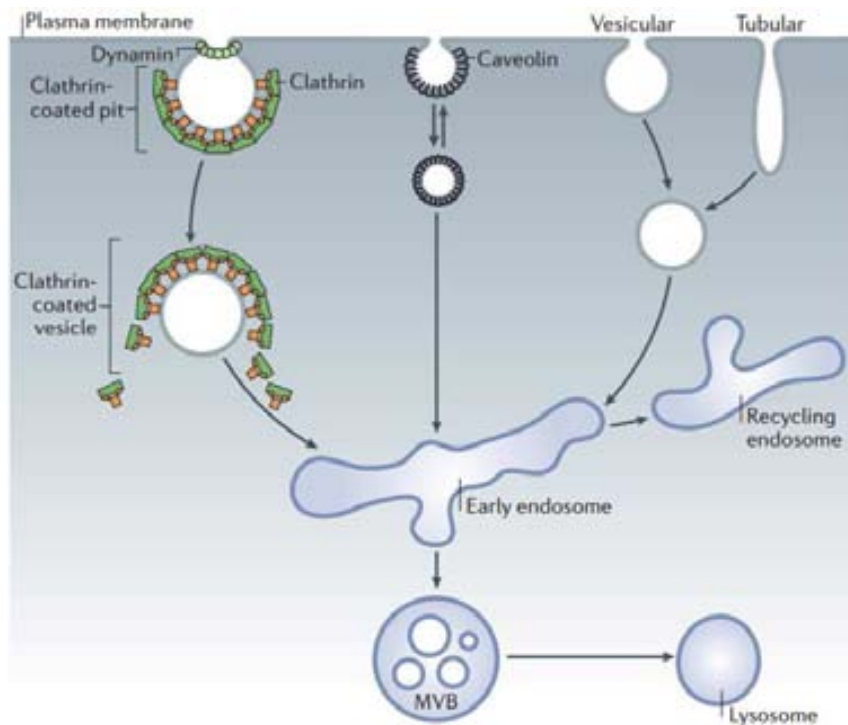


Figura 16: Procés d'endocitosi dependent de clatrina o de caveolina. Les proteïnes s'endociten a través de clatrina o caveolina, entre d'altres. Les vesícules formades al citoplasma es fusionen amb els endosomes primerencs (*early endosome*). D'aquí, les vesícules es reciclen o es dirigeixen als endosomes tardans o cossos multivesiculars (MVBs). Les proteïnes que arriben als MVBs són degradades al lisosoma. Figura extreta de [189].

OBJECTIUS

OBJECTIUS

Estudis recents al nostre laboratori han demostrat que la via de senyalització de Wnt està directament connectada amb les proteïnes de les unions adherents, i que aquestes són necessàries per a la regulació de la via. La p120-catenina juntament amb la quinasa CK1 ϵ que porta unida, estan associades al correceptor de Wnt i són essencials per a l'activació de la senyalització i per afavorir l'acumulació citosòlica de β -catenina, un pas determinant de la via canònica. A més, la p120-catenina també regula l'activitat transcripcional de la β -catenina en estadis més tardans de la via canònica de Wnt.

A partir d'aquests antecedents, els objectius d'aquesta tesi doctoral han estat els següents:

- Caracteritzar a nivell molecular com un mutant de deleció del correceptor LRP5/6 activa la via Wnt/ β -catenina de manera constitutiva i en absència de lligand, i el possible requeriment de la p120-catenina en aquesta activació.
- Identificar la fosfatasa que activa la quinasa CK1 ϵ , un dels primers esdeveniments en la via de Wnt, ja que la desfosforilació del seu domini autoinhibitori és essencial per a la senyalització.
- Caracteritzar quins esdeveniments moleculars promouen l'estabilització de la β -catenina i l'endocitosis de GSK-3 induïdes per Wnt. Recentment s'ha descrit que aquesta estabilització és deguda a la internalització de GSK-3 en multivesícules, facilitant així que la β -catenina no es degradi i es pugui acumular al citosol. Es vol validar aquest model i caracteritzar si les unions adherents estan involucrades en la internalització de GSK-3 induïda per Wnt.

RESULTATS

1 El mutant de l'LRP constitutivament actiu (CA-LRP) permet diferenciar efectes inicials i tardans de la p120-catenina en la via de Wnt

Prèviament s'havia descrit que un mutant del correceptor LRP5/6 que li falta tot el domini extracel·lular, és un potent activador de la via canònica de Wnt [106]. Abans d'utilitzar aquest mutant com a eina alternativa d'aquesta via, es van analitzar els esdeveniments moleculars de l'activació i es van comparar amb els descrits al laboratori obtinguts amb el lligand Wnt.

1.1 El CA-LRP imita els senyals de Wnt en l'activació de la via

1.1.1 El CA-LRP promou la formació del signalosoma de Wnt i la separació de p120-catenina i N-cadherina de l'LRP5/6

L'activació de la via de Wnt promou la formació del signalosoma a nivell inicial. La unió de Dvl-2, Axina i CK1 α al correceptor LRP5/6 es pot observar per immunoprecipitació després de l'estimulació amb el lligand Wnt3a durant 30 minuts [32]. Es va investigar si la transfecció del mutant CA-LRP també promou la formació d'aquest signalosoma en absència del lligand Wnt. Es van utilitzar cèl·lules HEK293T que responen a l'activació de la via, i es va immunoprecipitar l'LRP5/6 endogen de cèl·lules prèviament transfectades amb el mutant CA-LRP o amb un control. Tal i com es mostra a la Figura 17, la transfecció del CA-LRP promou la unió de Dvl-2, Axina i CK1 α a l'LRP5/6 endogen, i també augmenta la fosforilació de LRP5/6 en la Thr 1479 i en la Ser 1490, altres respostes inicials de la via i relacionades amb l'activació del correceptor.

El mutant CA-LRP també promou respostes més tardanes de la via de Wnt. Està descrit que un cop el complex del signalosoma està format després de l'estimulació amb el lligand Wnt, la p120-catenina i la Cadherina es fosforilen per la CK1 α provocant la seva separació dels receptors de Wnt [31]. La Figura 18 mostra a través d'una immunoprecipitació de l'LRP5/6, que s'observen els mateixos resultats quan s'activa la via amb el CA-LRP.

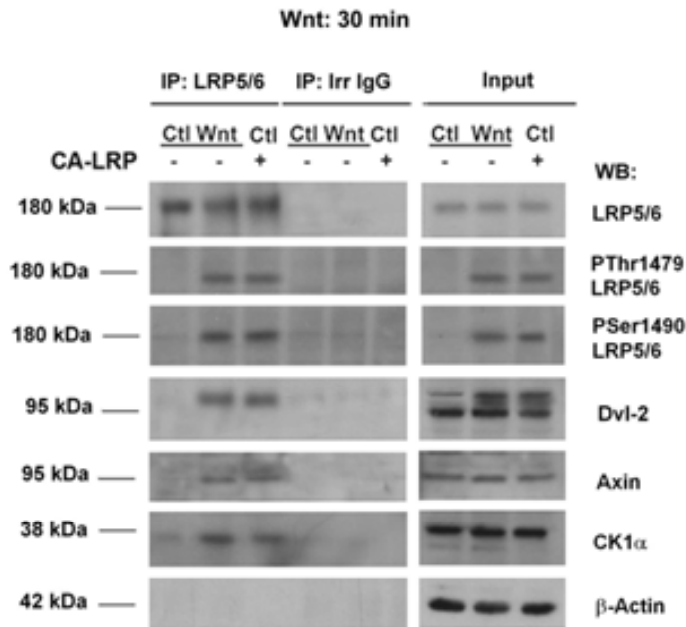


Figura 17: L'activació de la via de Wnt amb el lligand Wnt o amb el mutant CA-LRP promou la formació del signalosoma. Es van transfectar les cèl·lules HEK293T amb el mutant CA-LRP o amb un vector buit i van ser tractades amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt) durant 30 minuts. El coreceptor LRP5/6 endogen es va immunoprecipitar d'extractes cel·lulars obtinguts amb tampó lisi amb digitonina i les proteïnes es van analitzar per Western Blot.

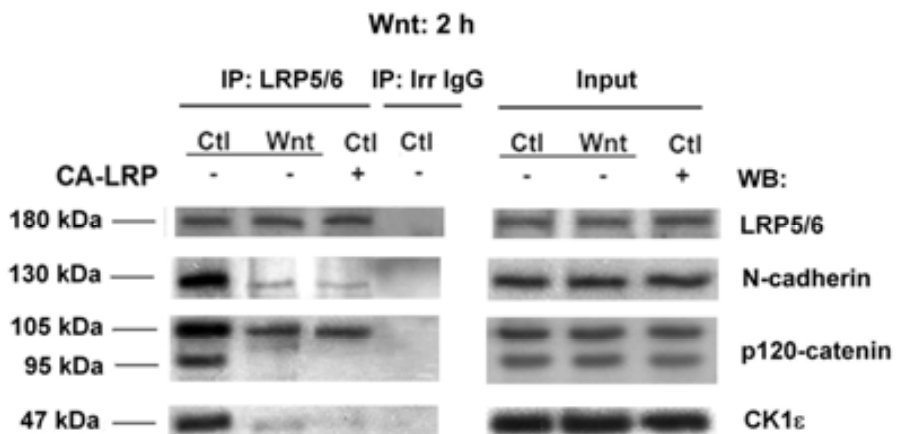


Figura 18: La p120-catenina i l'N-cadherina es separen de l'LRP5/6 quan s'activa la via de Wnt amb el lligand Wnt o amb el mutant CA-LRP. Cèl·lules HEK293T transfectades amb el mutant CA-LRP o amb un vector buit van ser tractades amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt) durant 2 hores. El coreceptor LRP5/6 endogen es va immunoprecipitar d'extractes cel·lulars obtinguts amb tampó lisi amb digitonina i les proteïnes es van analitzar per Western Blot.

1.1.2 El mutant CA-LRP promou l'estabilització i la translocació nuclear de la β -catenina

Ja que una etapa central de la via canònica de Wnt és l'acumulació de β -catenina, es va explorar que succeeix quan s'activa la via amb el mutant CA-LRP.

En resposta al CA-LRP, els nivells de β -catenina augmenten al citosol i al nucli, de la mateixa manera que quan s'activa la via amb el lligand Wnt3a (Figura 19 i [61]).

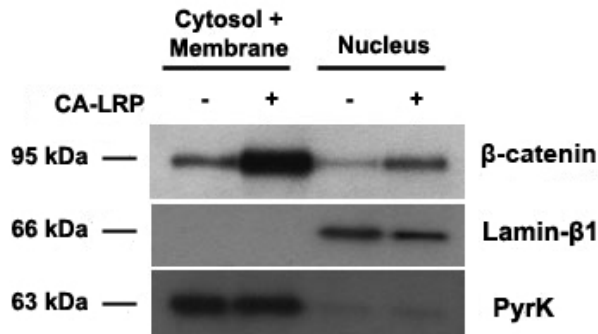


Figura 19: El mutant CA-LRP promou l'estabilització i la translocació nuclear de la β -catenina. Es va realitzar un assaig de subfraccionament cel·lular en cèl·lules HEK293T transfectades amb un plasmidi control o amb el vector CA-LRP. La distribució subcel·lular es va analitzar per Western Blot, utilitzant la Piruvat quinasa (PyrK) i la Lamina B (Lamin B), com a marcadors citosòlics i nuclears, respectivament.

1.1.3 El CA-LRP promou l'activitat transcripcional de la β -catenina i l'activació de gens diana de la via de Wnt

Per analitzar l'activitat transcripcional de la β -catenina es va utilitzar el plasmidi TOP-FLASH en cèl·lules prèviament transfectades amb el mutant CA-LRP, i es va comparar amb cèl·lules estimulades amb medi condicionat Wnt3a. El plasmidi TOP-FLASH és un promotor sintètic sensible a l'activitat del complex β -catenina-TCF4, i conté tres còpies de la seqüència d'unió del TCF4 al DNA que controlen l'expressió de Luciferasa.

La Figura 20A mostra que l'activitat transcripcional de la β -catenina augmenta amb CA-LRP i que els nivells són similars als obtinguts després d'estimular les cèl·lules amb medi condicionat Wnt3a durant 24 hores.

També es va analitzar si les cèl·lules transfectades amb el CA-LRP activen l'expressió d'un dels gens diana representatius de la via de Wnt, l'*AXIN2* [140]. Es va extreure l'RNA de cèl·lules HEK293T transfectades amb el plasmidi CA-LRP o estimulades amb el medi condicionat Wnt3a, es va realitzar una retrotranscripció i es va analitzar l'activació de l'*AXIN2* mitjançant PCR-quantitativa. Els resultats mostrats a la Figura 20B, indiquen que el CA-LRP activa gens diana de manera similar a l'estimulació del lligand Wnt3a durant 24 hores.

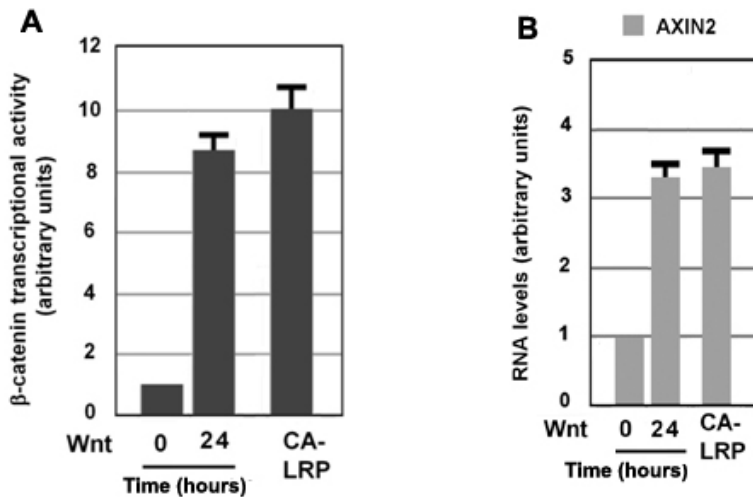


Figura 20: El lligand Wnt i el mutant CA-LRP incrementen l'activitat transcripcional de la β -catenina i l'activació del gen diana *AXIN2* de la via de Wnt. (A) L'activitat transcripcional de la β -catenina es determina utilitzant el plasmidi TOP-FLASH en cèl·lules HEK293T transfectades amb el CA-LRP o tractades amb medi condicionat Wnt3a durant 24 hores i prèviament a la lisis cel·lular. (B) Es va aïllar RNA procedent de cèl·lules HEK293T transfectades amb el CA-LRP o tractades amb Wnt durant el temps indicat. L'expressió d'*AXIN2* es va mesurar mitjançant PCR-RT quantitativa.

1.2 La p120-catenina no és necessària pels esdeveniments inicials quan s'activa la via amb el CA-LRP

1.2.1 La p120-catenina no és necessària per la formació del signalosoma quan s'activa la via amb CA-LRP

Resultats previs del laboratori havien demostrat que la p120-catenina és essencial per activar la via de Wnt [31]. Es va analitzar si la p120-catenina també és necessària quan s'activa la via amb el mutant CA-LRP.

Es va immunoprecipitar LRP5/6 de cèl·lules HEK293T deplecionades de p120-catenina i posteriorment transfectades amb CA-LRP o tractades amb medi condicionat Wnt3a, i es va analitzar el reclutament de Dvl-2. El resultat de la Figura 21 indica que Dvl-2 es recluta a l'LRP5/6 en cèl·lules deplecionades de p120-catenina i activades amb el CA-LRP, a diferència del que succeeix quan s'activa la via amb el lligand Wnt.

En aquest cas el comportament és diferent entre el mutant CA-LRP i el lligand Wnt3a.

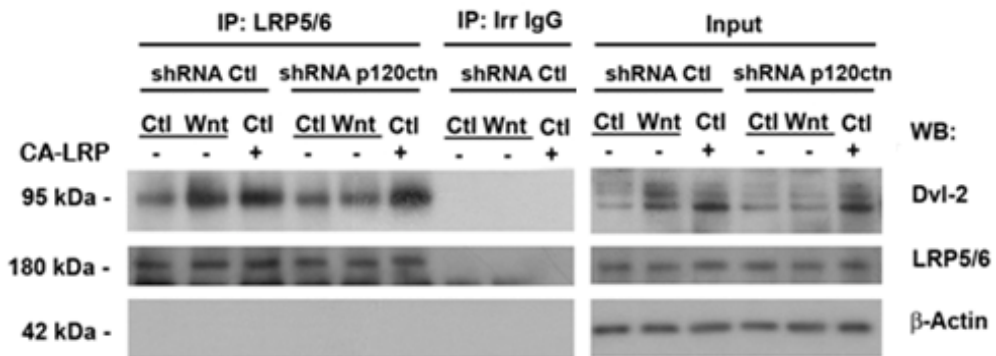


Figura 21: Dvl-2 s'uneix a l'LRP5/6 en cèl·lules deplecionades de p120-catenina en activar la via amb el CA-LRP. Cèl·lules HEK293T transfectades amb el shRNA control o shRNA p120-catenina i transfectades amb el mutant CA-LRP o amb un vector buit van ser tractades amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt) durant 30 minuts. El coreceptor LRP5/6 endogen es va immunoprecipitar d'extractes obtinguts amb tampó lisi amb digitonina i les proteïnes es van analitzar per Western Blot.

1.2.2 No es requereix p120-catenina per a l'estabilització de β -catenina en transfectar CA-LRP

Ja que la p120-catenina no és necessària per a la formació del signalosoma activant la via amb el CA-LRP, a continuació es va estudiar si aquesta proteïna és requerida per esdeveniments més tardans de la via, com l'estabilització de β -catenina. Tal i com es mostra a la Figura 22A, els nivells de β -catenina de cèl·lules activades amb el CA-LRP són similars en les cèl·lules control comparades amb les deplecionades de p120-catenina. És a dir, a diferència del que passa en activar la via amb el lligand Wnt, no es requereix p120-catenina per a l'estabilització de β -catenina quan s'activa la via amb el CA-LRP.

Per altra banda, la p120-catenina és una proteïna d'ancoratge de la quinasa CK1 ϵ , i és aquesta quinasa la que fosforila a Dvl-2 i permet l'inici de la senyalització per Wnt [31], [32]. A la Figura 22B es pot observar que la CK1 ϵ no és necessària per l'estabilització de β -catenina quan s'activa la via amb el CA-LRP, el mateix resultat que s'ha obtingut amb la p120-catenina.

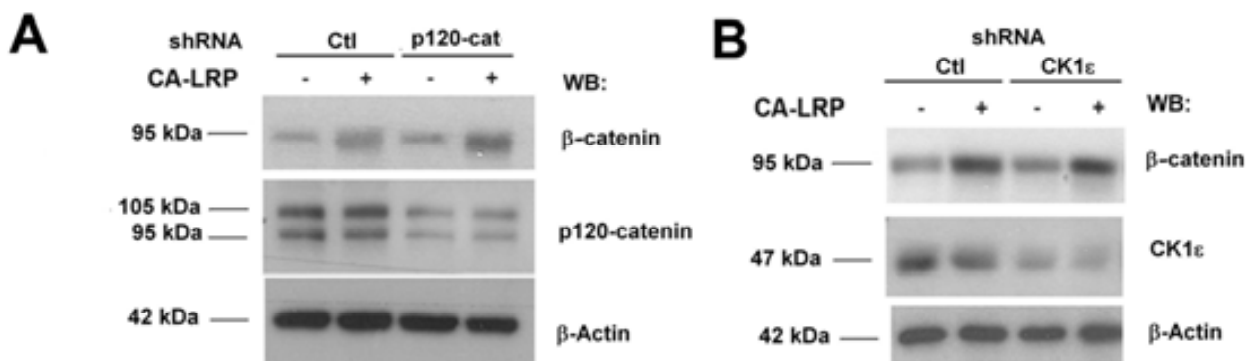


Figura 22: Ni la p120-catenina ni la CK1 ϵ són necessàries per activar la via de Wnt amb el CA-LRP. Les cèl·lules HEK293T van ser transfectades amb shRNA específic per la p120-catenina (p120-cat) (A) o amb shRNA específic per la CK1 ϵ (B), abans de la transfecció amb CA-LRP o amb el vector buit. L'acumulació de β -catenina es va analitzar per Western Blot després de la lisi cel·lular amb tampó SDS 1%.

1.3 La p120-catenina és essencial per esdeveniments més tardans de la via de Wnt activada amb el CA-LRP

Els resultats anteriors mostren que ni la p120-catenina ni la CK1 ϵ són necessàries per l'activació inicial de la via canònica mitjançant el mutant CA-LRP. Ara bé, la p120-catenina intervé en altres processos de la via de Wnt dependents de la seva fosforilació i de la separació de la Cadherina. La p120-catenina alliberada de la Cadherina realitza altres funcions relacionades amb l'activació transcripcional de la β -catenina. Per una banda promou la translocació al nucli de la β -catenina, i per l'altra facilita la formació del complex transcripcional β -catenina/TCF-4, induint l'export nuclear del repressor transcripcional Kaiso que estava unit a TCF-4 [35], [61].

1.3.1 La p120-catenina és necessària per la separació del complex TCF-4/Kaiso en CA-LRP

Primerament es va realitzar una immunoprecipitació de TCF-4 en cèl·lules control o activades amb el mutant CA-LRP. Tal i com es mostra a la Figura 23, el TCF-4 de les cèl·lules control està unit al repressor Kaiso en situació basal, i aquesta unió es perd en activar la via de Wnt amb el CA-LRP, a diferència del que s'observa utilitzant les cèl·lules interferents de p120-catenina, on l'associació de TCF-4 amb el repressor es manté. És a dir, la p120-catenina és necessària per extreure el repressor Kaiso de la unió de TCF-4, encara que s'activi la via de Wnt amb el mutant CA-LRP.

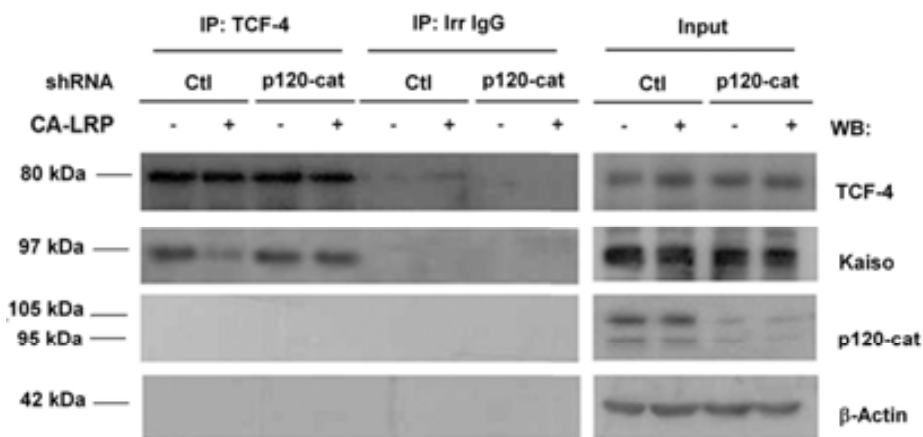


Figura 23: La p120-catenina és necessària per la separació del complex TCF-4-Kaiso en l'activació de la via de Wnt amb CA-LRP. Cèl·lules HEK293T van ser transfectades amb shRNA específic per la p120-catenina (p120-cat), i posteriorment es van transfectar amb CA-LRP o amb vector buit. Es van lisar les cèl·lules i es va immunoprecipitar el TCF-4 endogen dels extractes. Les proteïnes unides al complex es van detectar per Western Blot.

1.3.2 Es requereix p120-catenina per la translocació nuclear de β -catenina en CA-LRP.

A continuació es va analitzar el paper de la p120-catenina en la translocació al nucli de la β -catenina quan la via és activada pel mutant CA-LRP. S'ha descrit prèviament al laboratori que la p120-catenina juntament amb Vav2 és necessària per a l'activació de Rac1 quan la via s'activa amb el lligand Wnt. Aquesta activació de Rac1 és requerida per a l'activació de JNK i per la posterior entrada de β -catenina dins del nucli [61].

Per analitzar l'activació de Rac1 en les diferents condicions, es va realitzar un *Pull-Down* amb l'efector de Rac1, PAK [61]. Aquesta tècnica es basa en el fet de que PAK està unit específicament a Rac1 actiu. Tal i com es mostra a la Figura 24, la transfecció del mutant CA-LRP activa Rac1 en les cèl·lules control, a diferència del que s'observa en les cèl·lules interferides de p120-catenina.

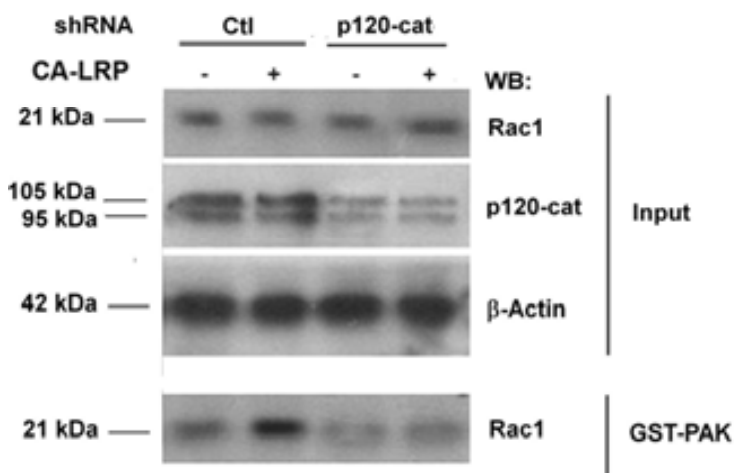


Figura 24: L'activació de Rac1 en la via de Wnt iniciada amb CA-LRP, requereix de p120-catenina. Es va realitzar un *Pull-Down* amb PAK en cèl·lules HEK293T transfectades amb shRNA Control (Ctl) o amb shRNA p120-catenina (p120-cat) i posteriorment transfectades amb el mutant CA-LRP. Els nivells de Rac1 i el de les altres proteïnes van ser detectats per Western Blot.

Per validar el resultat anterior, es van utilitzar les mateixes cèl·lules per estudiar la translocació de la β -catenina al nucli. La Figura 25A mostra que a diferència del que passa en les cèl·lules control, les cèl·lules interferents de p120-catenina no presenten augment de β -catenina nuclear quan s'activa la via amb el mutant CA-LRP. És a dir, la p120-catenina és necessària perquè es produeixi aquesta translocació. Es va repetir el mateix experiment amb cèl·lules deplecionades de CK1 ϵ . Tal i com es veu a la Figura 25B, la CK1 ϵ és prescindible per a la translocació nuclear de la β -catenina en activar la via amb el CA-LRP.

Aquests experiments indiquen que la p120-catenina és necessària per la localització nuclear de la β -catenina, i per permetre la unió d'aquesta a TCF-4. Aquests efectes, a més, serien independents de la funció de la quinasa CK1 ϵ , que regularia únicament l'activació dels esdeveniments més inicials de la via de Wnt.

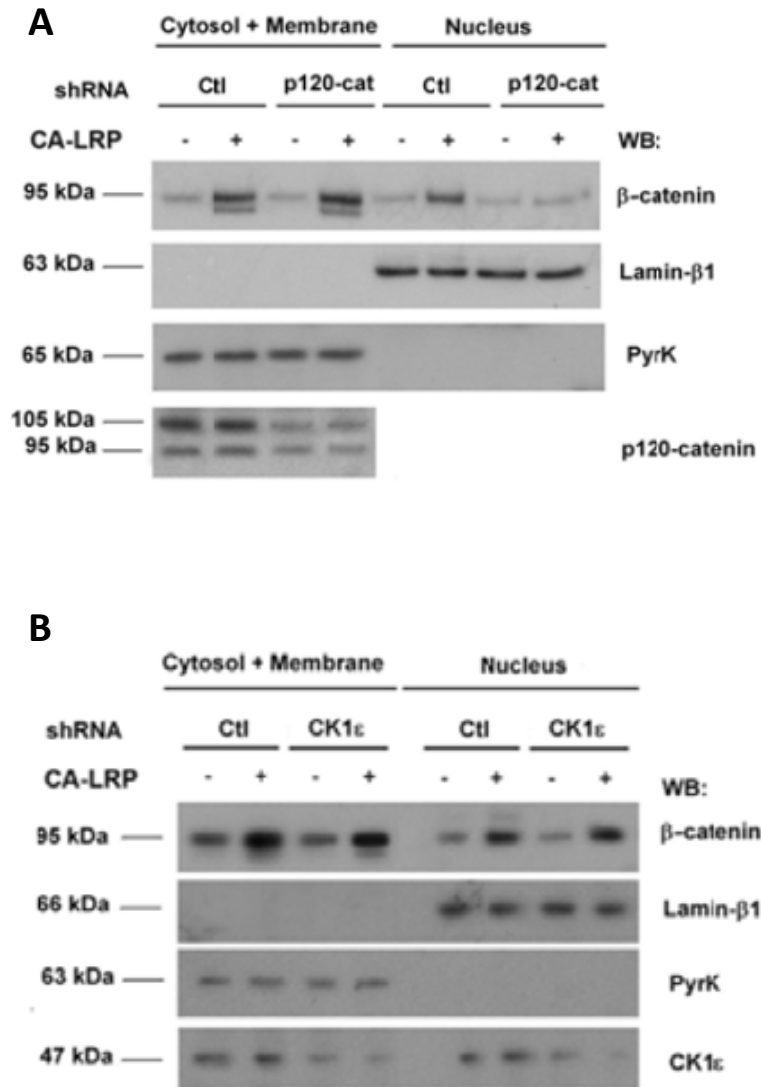


Figura 25: La p120-catenina, a diferència de la CK1 ϵ , és necessària per a la translocació de β -catenina dins del nucli en activar la via amb el CA-LRP. Es va realitzar un assaig de subfraccionament cel·lular en cèl·lules prèviament transfectades amb shRNA control (Ctl), shRNA p120-catenina (A) o shRNA CK1 ϵ (B) i posteriorment transfectades amb un plasmidi control o amb el vector CA-LRP5/6. La distribució subcel·lular es va analitzar per Western Blot, utilitzant la Piruvat quinasa (PyrK) i la Lamina B (Lamin B), com a marcadors citosòlics i nuclears, respectivament.

2 La PR61 ϵ , una subunitat reguladora de la PP2A, promou l'activació de la via de Wnt

2.1 La CK1 ϵ és necessària pel reclutament de Dvl-2 a l'LRP5/6 en Wnt

Tal i com s'ha comentat a la introducció, el lligand Wnt3a promou la unió del receptor Fz amb el correceptor LRP5/6, i conseqüentment amb la Cadherina i la p120-catenina. A continuació la quinasa CK1 ϵ , que està constitutivament unida a la p120-catenina, s'activa per la defosforilació del seu domini autoregulator per una fosfatasa que encara no està descrita [154]. Una vegada activa, aquesta quinasa promou la fosforilació de Dvl-2 i el reclutament d'aquesta proteïna a Fz.

A la Figura 26 es mostra que en activar la via amb Wnt apareix una banda de menys mobilitat en el WB corresponent a Dvl-2 fosforilat, i aquesta banda no apareix en estimular cèl·lules interferents de CK1 ϵ amb Wnt. Quan es realitza una IP del correceptor de l'LRP5/6 utilitzant aquestes cèl·lules, s'observa que el Dvl-2 fosforilat s'uneix a l'LRP5/6 en cèl·lules control, però no en cèl·lules shRNA CK1 ϵ .

Aquests resultats suggereixen que la CK1 ϵ és necessària per la fosforilació de Dvl-2 i per la unió d'aquesta proteïna amb l'LRP5/6.

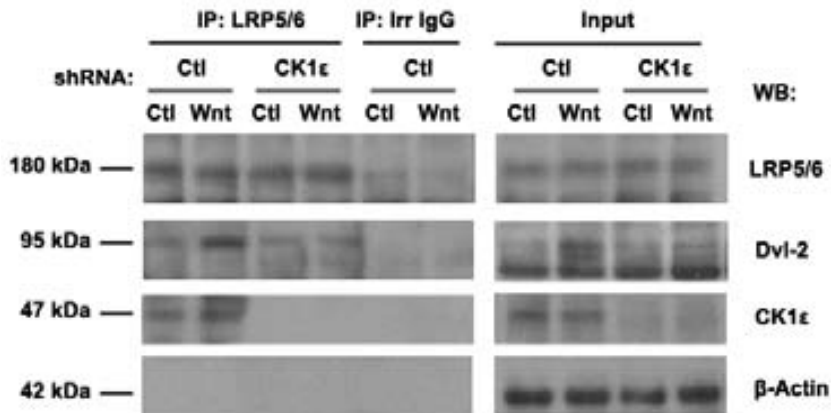


Figura 26. La CK1 ϵ és necessària per la fosforilació de Dvl-2 i pel reclutament de Dvl-2 a l'LRP5/6 en Wnt. Cèl·lules HEK 293T interferides amb l'shRNA Control (Ctl), l'shRNA CK1 ϵ , van ser estimulades durant 30 minuts amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt), es van lisar amb tampó lisi amb digitonina 1% i es va realitzar un assaig de coimmunoprecipitació de l'LRP5/6. El resultat es va analitzar per WB.

2.2 La PP2A és necessària per l'activació de CK1ε en Wnt

2.2.1 La inhibició de l'activitat de la PP2A impedeix la fosforilació de Dvl-2 i el reclutament de Dvl-2 a l'LRP5/6

Està descrit que la PP2A és una fosfatasa implicada en la regulació de la via de Wnt a diferents nivells, per exemple en el complex de degradació de la β -catenina [190]. És per això que es va testar si aquesta és la fosfatasa que defosforila i activa la CK1ε en la senyalització de Wnt.

Es va utilitzar un inhibidor químic, l'àcid Okadaic (OA), que a concentracions baixes inhibeix específicament la PP2A. Es van tractar les cèl·lules amb OA i posteriorment amb medi condicionat Wnt3a durant 30 minuts, per analitzar la fosforilació de Dvl-2 i el seu reclutament al correceptor l'LRP5/6. Tal i com es mostra a la Figura 27, el tractament amb OA impedeix la fosforilació de Dvl-2, que sí que s'observa en les cèl·lules tractades únicament amb Wnt. A més, aquest inhibidor també impedeix la fosforilació de l'LRP5/6 en la ser1490 i el reclutament de Dvl-2, CK1γ i d'Axina a l'LRP5/6.

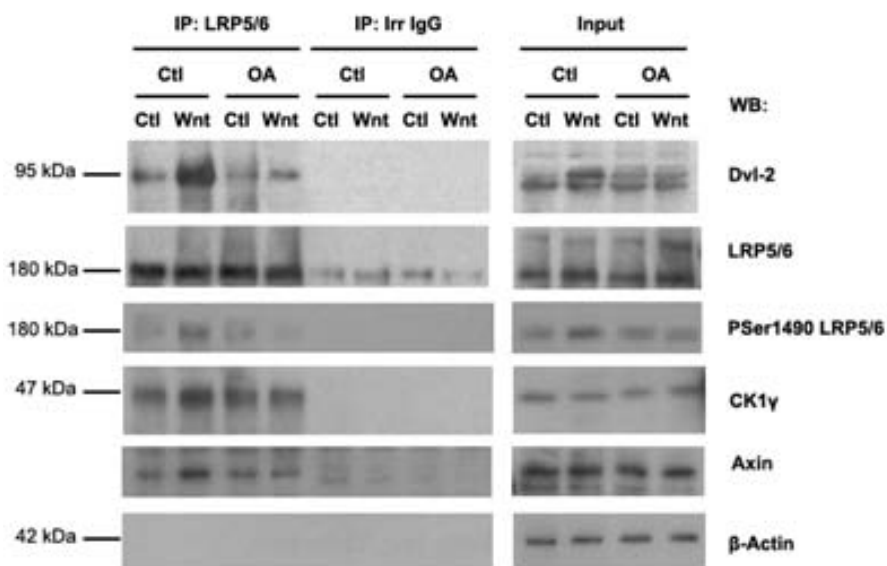


Figura 27: El tractament amb àcid Okadaic impedeix la fosforilació de Dvl-2 i el reclutament de Dvl-2 a l'LRP5/6. Cèl·lules HEK293T prèviament tractades amb 10 nM d'àcid okadaic (OA) durant 1 hora, van ser estimulades durant 30 minuts amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt) juntament amb OA quan s'indica. Les cèl·lules es van lisar amb tampó lisi amb digitonina 1% i es va realitzar un assaig de coimmunoprecipitació de l'LRP5/6. El resultat es va analitzar per WB.

A continuació es va realitzar el mateix experiment interferint les cèl·lules HEK293T de la subunitat catalítica de la PP2A (PP2A_C). La subunitat catalítica és la que confereix d'activitat a la fosfatasa, així que és una altra manera d'inhibir aquesta proteïna. A la Figura 28 s'observen els mateixos resultats que en la Figura anterior. Les cèl·lules shRNA PP2A_C no presenten Dvl-2 fosforilat quan aquestes s'estimulen amb Wnt i tampoc s'observa la interacció de Dvl-2 amb l'LRP5/6 que sí que es produeix en les cèl·lules no deplecionades i activades amb Wnt3a.

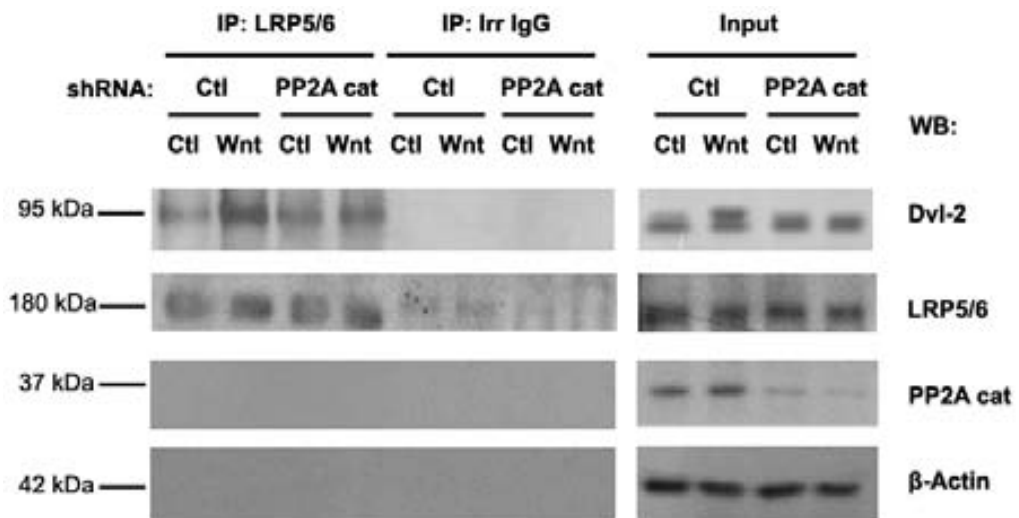


Figura 28: La PP2A_C és necessària per la fosforilació de Dvl-2 i pel reclutament de Dvl-2 a l'LRP5/6. Cèl·lules HEK293T prèviament interferides amb l'shRNA control (Ctl) o l'shRNA PP2A_C van ser estimulades durant 30 minuts amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt). Les cèl·lules es van lisar amb tampó lisi amb digitonina 1% i es va realitzar un assaig de coimmunoprecipitació de l'LRP5/6. El resultat es va analitzar per WB.

2.2.2 La inhibició de l'activitat de la PP2A impedeix l'activació de CK1ε

Tot seguit es va investigar la capacitat d'activació de la CK1ε en condicions on la PP2A està inhibida.

La CK1ε és capaç de fosforilar *in vitro* les serines 268, 269 de la p120-catenina [31], tot i que *in vivo*, és la CK1α la que fosforila la p120-catenina en la via de Wnt. La similitud que presenten les seqüències de les diferents isoformes de la CK1 en la regió catalítica permet que la CK1ε també pugui fosforilar els residus 268, 269 de la p120-catenina *in vitro*.

Degut a que disposàvem d'un anticòs fosfoespecífic contra la serina 268 fosforilada, es va utilitzar la p120-catenina com a substrat de la CK1 ϵ , i es van usar cèl·lules tractades amb OA o deplecionades de PP2A_C per investigar la capacitat d'activació de la CK1 ϵ en aquestes condicions.

Es va immunoprecipitar la CK1 ϵ en cèl·lules prèviament tractades amb OA o amb una solució control, i estimulades 10 minuts amb Wnt (temps necessari per veure la fosforilació de Dvl-2). A continuació es va afegir p120-catenina-GST a la CK1 ϵ immunoprecipitada i la mescla es va posar en les condicions de fosforilació. La Figura 29 mostra que la p120-catenina es fosforila més en el residu 268 quan les cèl·lules es tracten únicament amb Wnt i tenen ATP per permetre la fosforilació. En canvi, la CK1 ϵ de les cèl·lules tractades prèviament amb OA i Wnt, no és capaç de fosforilar tant la p120-catenina.

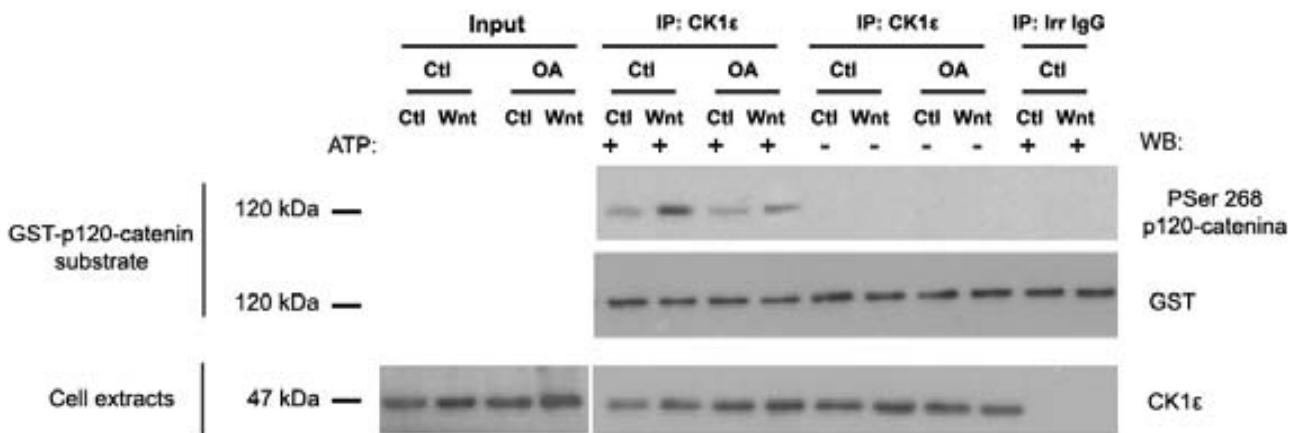


Figura 29: L'àcid Okadaic impedeix l'activació de CK1 ϵ . Cèl·lules HEK293T prèviament tractades amb 10 nM d'àcid okadaic (OA) durant 1 hora o amb solució control (Ctl), van ser estimulades durant 10 minuts amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt) juntament amb OA quan s'indica. Extractes obtinguts de la lisis amb tampó NP40 0,1% van ser immunoprecipitats amb anticòs CK1 ϵ i es va realitzar *un assaig de fosforilació utilitzant una quinasa purificada de línies cel·lulars* usant 1 pmol de GST-p120-catenina com a substrat. La fosforilació de la Ser268 de la p120-catenina es va analitzar per WB utilitzant un anticòs específic.

Els mateixos resultats s'observen en repetir l'experiment utilitzant cèl·lules interferents de PP2A_C (Figura 30).

En global, aquests resultats suggereixen que la inhibició de l'activitat de la PP2A impedeix l'activació de CK1ε.

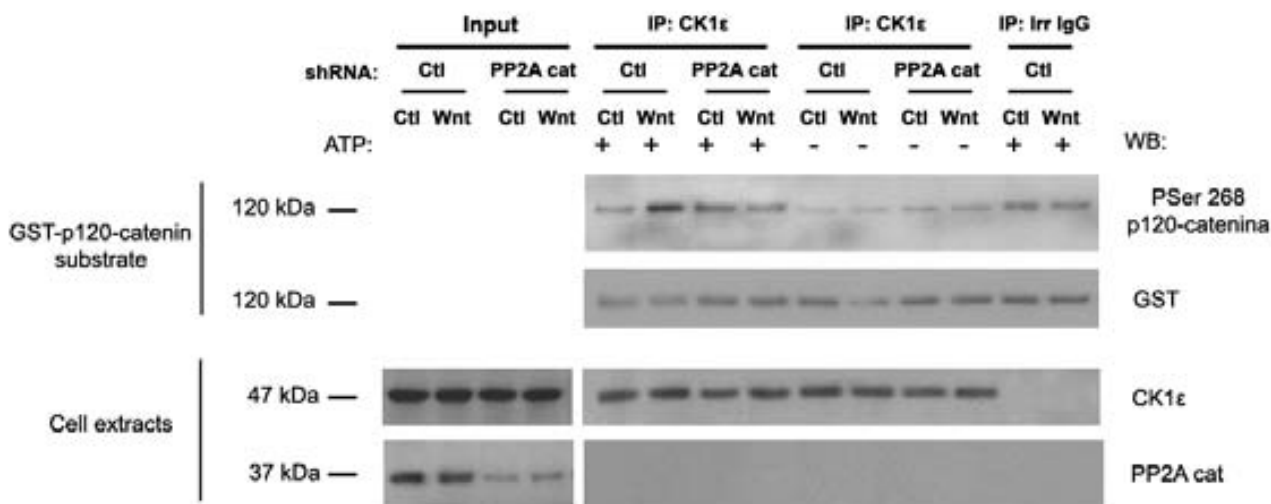


Figura 30: La PP2A_C és necessària per l'activació de CK1ε *in vitro*. Cèl·lules HEK293T prèviament deplecionades de PP2A_C van ser estimulades durant 10 minuts amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt). Extractes obtinguts de la lisis amb tampó NP40 0,1% van ser immunoprecipitats amb anticòs CK1ε i es va realitzar *un assaig de fosforilació utilitzant una quinasa purificada de línies cel·lulars* usant 1 pmol de GST-p120-catenina com a substrat. La fosforilació de la Ser268 de la p120-catenina es va analitzar per WB utilitzant un anticòs específic.

2.3 La subunitat reguladora PR61ε activa la via de Wnt

La fosfatasa PP2A presenta tres subunitats diferents: la catalítica, l'estructural i la reguladora (Veure Introducció). La subunitat reguladora presenta una gran varietat d'isoformes classificades en quatre grans famílies, i és la que confereix l'especificitat de substrat a la fosfatasa [161]. Per trobar quina és la subunitat reguladora que actua en l'activació de la CK1ε es va explorar la família B56/PR61, ja que està descrit que aquesta té un paper destacat a la via de Wnt com a fosfatasa inhibidora o activadora de la via [157].

2.3.1 La PR61 ϵ és essencial per l'activació de CK1 ϵ en Wnt

2.3.1.1 La PR61 ϵ , a diferència de la PR61 α i la PR61 β , és necessària pel reclutament de Dvl-2 a l'LRP5/6

Es van interferir les cèl·lules epitelials SW480 utilitzant shRNA de SIGMA de tres de les cinc isoformes que confereixen la família (α , β i ϵ), i es va realitzar una RT-PCR quantitativa per comprovar aquesta interferència. Tal i com es mostra a la Figura 31, les cèl·lules interferents de les diferents isoformes han reduït l'expressió dels gens aproximadament un 50%. A continuació es va realitzar un experiment d'immunoprecipitació de l'LRP5/6 per observar la fosforilació de Dvl-2 i el reclutament d'aquest a l'LRP5/6 en les diferents cèl·lules deplecionades. La Figura 32 mostra que tant les cèl·lules control com les cèl·lules interferides de PR61 α o de PR61 β activades amb Wnt presenten la banda fosforilada de Dvl-2, a més del reclutament d'aquesta proteïna a l'LRP5/6. En canvi, les cèl·lules deplecionades de PR61 ϵ no presenten Dvl-2 fosforilat després de l'activació de la via, ni hi ha un augment d'unió del complex Dvl-LRP5/6.

Es va validar el resultat utilitzant cèl·lules HEK293T interferents de PR61 ϵ i repetint l'experiment d'immunoprecipitació de l'LRP5/6. Els resultats mostrats en la Figura 33 són els mateixos que en l'experiment anterior. En les cèl·lules shRNA PR61 ϵ Dvl-2 no es fosforila ni es recluta a l'LRP5/6.

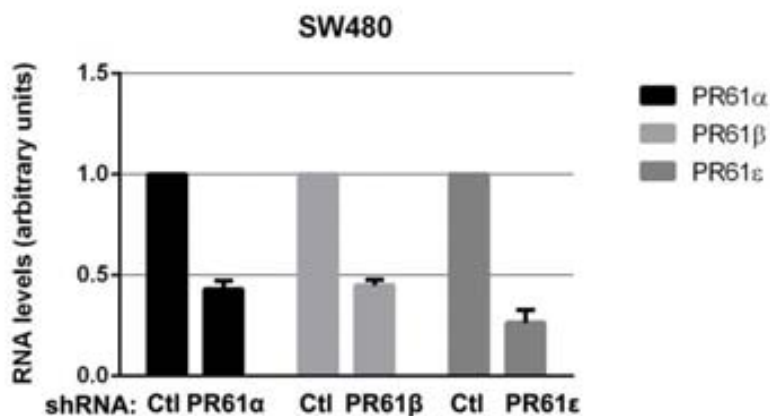


Figura 31: Les cèl·lules SW480 interferides de PR61 α , PR61 β o PR61 ϵ , expressen menys nivells de cada un dels transcrits. Es va aïllar l'RNA de cèl·lules shRNA control (Ctl), shRNA PR61 α , shRNA PR61 β o shRNA PR61 ϵ i es va analitzar l'expressió dels gens *PP2A PR61 α* , *PP2A PR61 β* o *PP2A PR61 ϵ* mitjançant RT-PCR quantitativa.

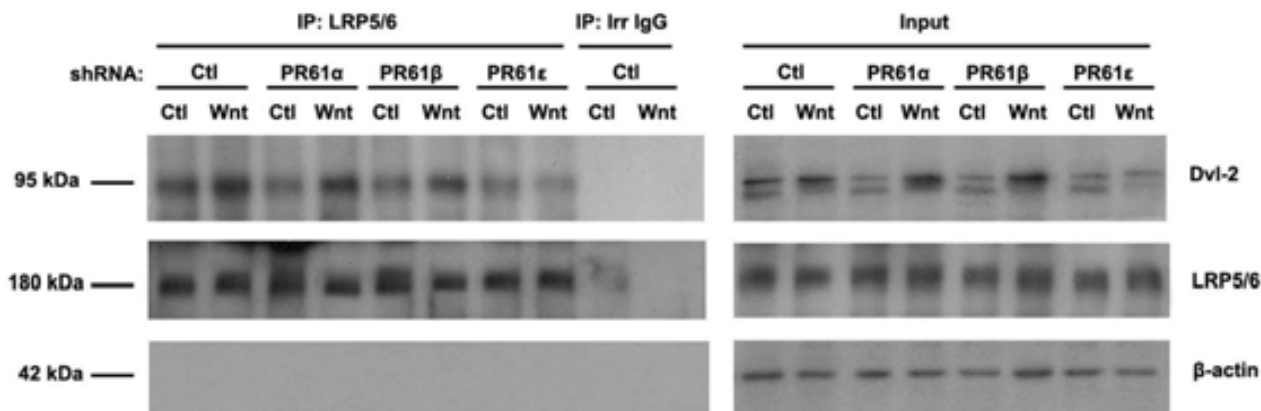


Figura 32: PR61 ϵ , a diferència de la PR61 α i la PR61 β , és necessària per a la fosforilació de Dvl-2 i pel reclutament de Dvl-2 a l'LRP5/6 en Wnt. Cèl·lules SW480 prèviament interferides amb l'shRNA control (Ctl), l'shRNA PR61 α , l'shRNA PR61 β o l'shRNA PR61 ϵ , van ser estimulades durant 30 minuts amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt). Les cèl·lules es van lisar amb tampó lisi amb digitonina 1% i es va realitzar un assaig de coimmunoprecipitació de l'LRP5/6. El resultat es va analitzar per WB.

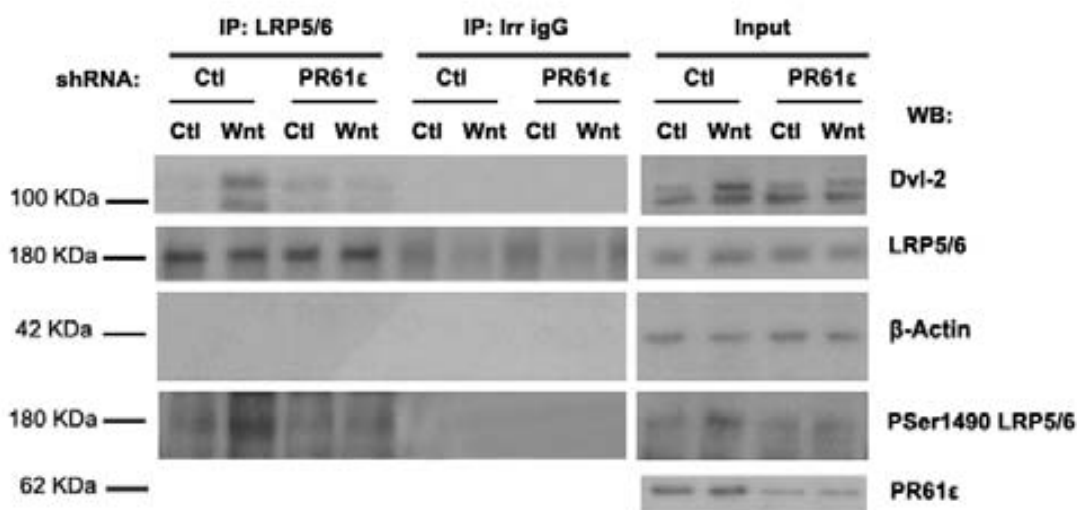


Figura 33: La PR61 ϵ és necessària per la fosforilació de Dvl-2 i pel reclutament de Dvl-2 a l'LRP5/6 en Wnt. Cèl·lules HEK293T prèviament interferides amb l'shRNA control (Ctl), l'shRNA PR61 α , l'shRNA PR61 β o l'shRNA PR61 ϵ , van ser estimulades durant 30 minuts amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt). Les cèl·lules es van lisar amb tampó lisi amb digitonina 1% i es va realitzar un assaig de coimmunoprecipitació de l'LRP5/6. El resultat es va analitzar per WB.

Aquests resultats suggereixen que la PR61ε és la subunitat reguladora de la PP2A que activa la quinasa CK1ε en Wnt.

2.3.1.2 La inhibició de l'activitat de la PR61ε impedeix l'activació de CK1ε

Es va analitzar la capacitat d'activació de la CK1ε en cèl·lules interferides de PR61ε. Es va realitzar l'experiment tal i com s'explica a l'apartat 2.2.2 de *Resultats*, però en aquest cas utilitzant cèl·lules deplecionades de PR61ε. La Figura 34 mostra que la p120-catenina es fosforila millor amb la CK1ε de les cèl·lules control activades amb Wnt, que amb la quinasa de cèl·lules shRNA PR61ε.

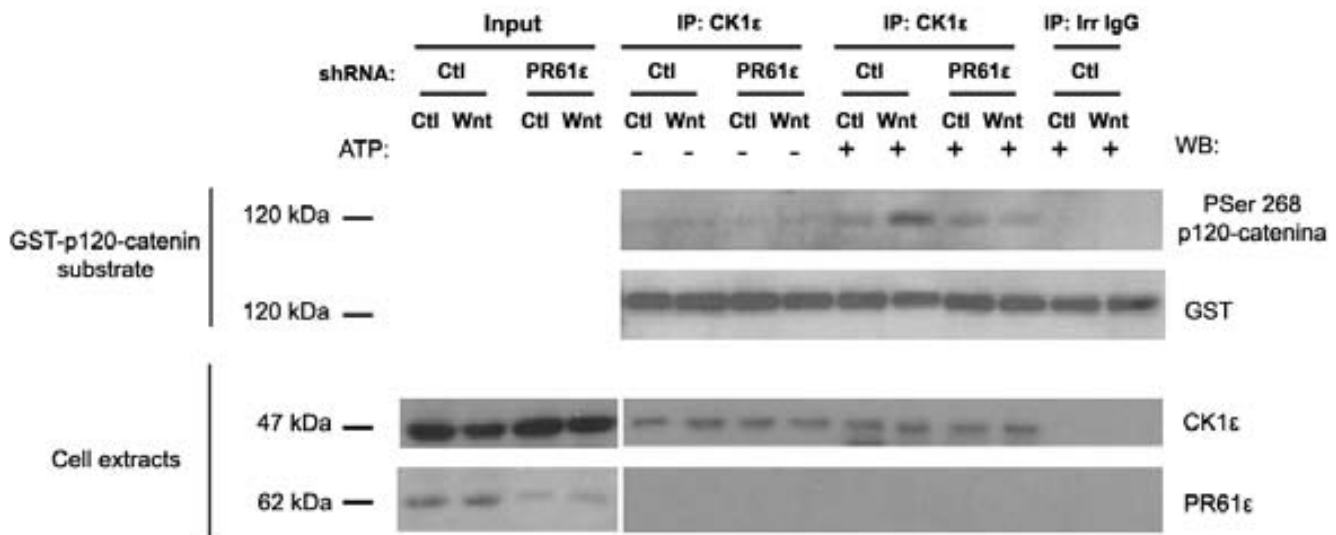


Figura 34: La PR61ε és necessària per l'activació de CK1ε *in vitro*. Cèl·lules HEK293T prèviament deplecionades de PR61ε van ser estimulades durant 10 minuts amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt). Extractes obtinguts de la lisis amb tampó NP40 0,1% van ser immunoprecipitats amb anticòs CK1ε i es va realitzar un assaig de fosforilació utilitzant una quinasa purificada de línies cel·lulars usant 1 pmol de GST-p120-catenina com a substrat. La fosforilació de la ser268 de la p120-catenina es va analitzar per WB utilitzant un anticòs específic.

2.3.2 La PR61ε és necessària per l'estabilització i per l'activitat transcripcional de la β-catenina

Seguidament, es va analitzar el requeriment de la subunitat reguladora PR61ε en efectes més tardans de la via de Wnt.

Cèl·lules HEK293T control i deplecionades de la subunitat PR61ε de la PP2A van ser estimulades amb Wnt3a o activades amb el CA-LRP.

Tal i com es mostra a la Figura 35, els nivells de β-catenina augmenten en les cèl·lules control activades amb el lligand Wnt3a (Carrils 1 i 2). En canvi, en cèl·lules deplecionades de PR61ε, els nivells de β-catenina no augmenten amb el lligand Wnt (Carrils 4 i 5), tot i que sí que ho fan en sobreexpressar-se el mutant CA-LRP (Carrils 4 i 6).

Aquests resultats confirmen que la subunitat PR61ε té un paper essencial en l'activació de la via de Wnt, i que aquesta no és necessària per activar la senyalització en cèl·lules transfectades amb el CA-LRP. Això és degut a que la quinasa CK1ε que és activada per la fosfatasa, tampoc és necessària quan la via s'activa amb el CA-LRP, tal i com s'ha demostrat al *Capítol 1 de Resultats*.

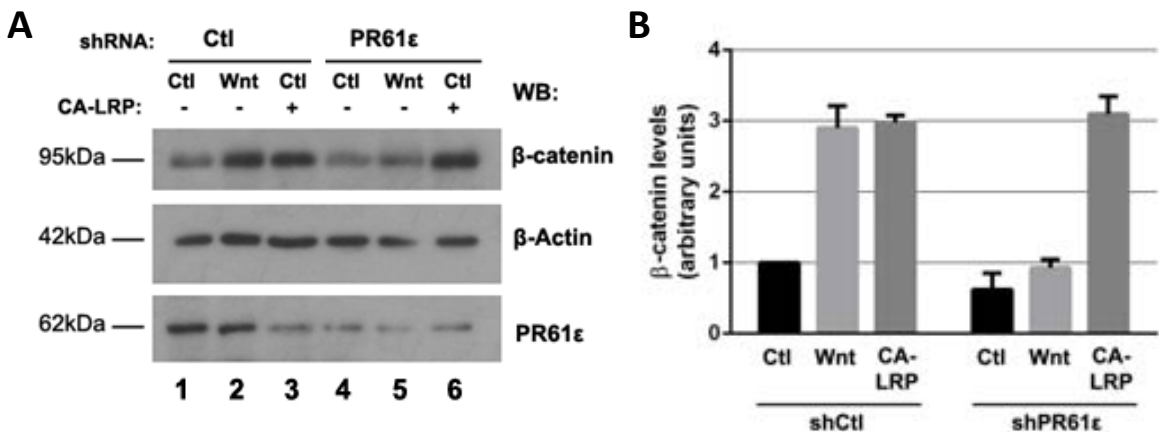


Figura 35: La PR61ε és necessària per l'estabilització de la β-catenina amb el lligand Wnt. (A) Les cèl·lules HEK293T van ser transfectades amb shRNA específic per la PR61ε, abans de la transfecció amb CA-LRP o amb el vector buit. Es van estimular les cèl·lules amb medi condicionat Wnt3a (Wnt) durant 6 hores i l'acumulació de β-catenina es va analitzar per WB després de la lisi cel·lular amb tampó SDS 1%. (B) Autoradiogrames de 3 experiments diferents realitzats en A van ser quantificats. La mitjana i la desviació estàndard van ser calculats en cada condició.

A continuació es va investigar si la PR61 ϵ és requerida per la translocació nuclear de la β -catenina en cèl·lules activades amb Wnt3a o amb el mutant CA-LRP. A la Figura 36 s'observa que la fosfatasa és necessària per veure la β -catenina nuclear amb el lligand Wnt, ja que les cèl·lules shRNA PR61 ϵ presenten menys β -catenina dins del nucli que les cèl·lules control. En canvi, l'absència d'aquesta fosfatasa no impedeix la translocació nuclear de la proteïna en cèl·lules que expressen el CA-LRP, tal i com es pot veure en comparar els carrils 9 i 12. Això es degut a que la translocació nuclear de β -catenina en Wnt és dependent de la p120-catenina, però independent de la quinasa CK1 ϵ (Veure Capítol 1 *Resultats*).

Es van obtenir resultats similars en cèl·lules SW480 shRNA PR61 ϵ , en aquest cas activades únicament amb el lligand Wnt (Figura 37). En aquestes cèl·lules, però, no es veu estabilització de la β -catenina al citosol després de l'activació de Wnt. Això és degut a que les SW480 contenen una mutació d'APC que impedeix la degradació de β -catenina, i presenten nivells elevats d'aquesta proteïna al citosol [177].

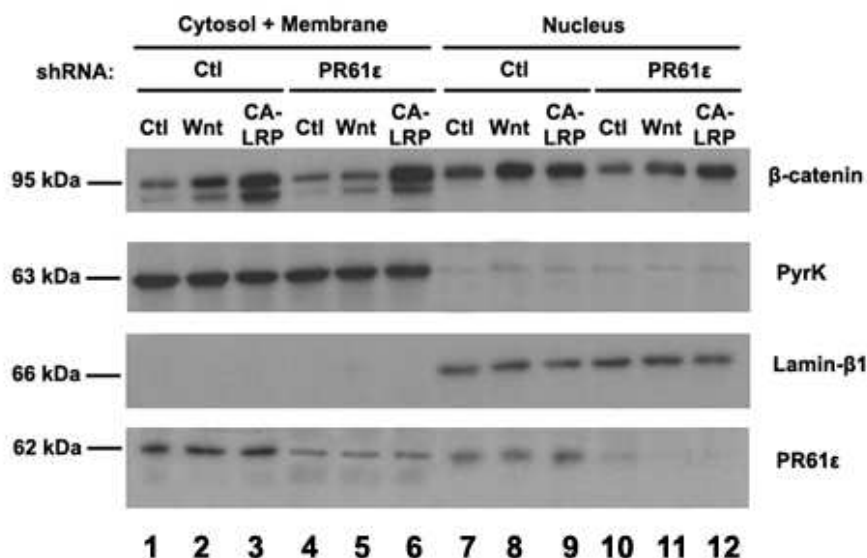


Figura 36: La PR61 ϵ és requerida per la translocació nuclear de la β -catenina en cèl·lules HEK293T quan s'activa la via amb el lligand Wnt, però no amb el CA-LRP. Es va realitzar un assaig de subfraccionament cel·lular en cèl·lules HEK293T transfectades amb shRNA específic per la PR61 ϵ , abans de la transfecció amb CA-LRP o amb el vector buit. Es van estimular les cèl·lules amb medi condicionat Wnt3a (Wnt) durant 6 hores i la distribució subcel·lular es va analitzar per Western Blot.

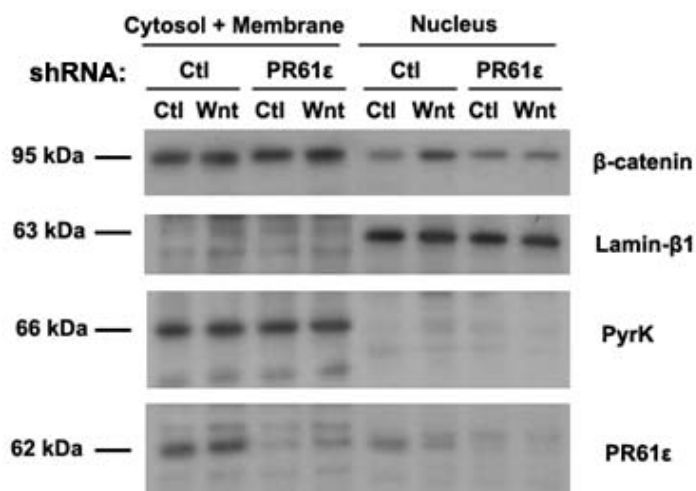


Figura 37: La PR61ε és requerida per la translocació nuclear de la β-catenina en cèl·lules SW480 quan s'activa la via amb el lligand Wnt. Subfraccionament cel·lular en cèl·lules SW480 transfectades amb shRNA específic per la PR61ε. Es van estimular les cèl·lules amb medi condicionat Wnt3a (Wnt) durant 6 hores i la distribució subcel·lular es va analitzar per Western Blot.

2.3.2.1 La inhibició de la PR61ε impedeix l'activitat transcripcional de la β-catenina-TCF-4 i l'activació de gens diana de la via de Wnt

Tot seguit, es va investigar l'activitat transcripcional del complex β-catenina-TCF4 en cèl·lules control i cèl·lules deplecionades de PR61ε, utilitzant el plasmidi TOP-FLASH.

La Figura 38 mostra que les cèl·lules control estimulades amb medi condicionat Wnt3a presenten més activitat transcripcional de β-catenina que les estimulades amb medi control. En canvi, les cèl·lules deplecionades de PR61ε, presenten un augment inferior en ser activades per Wnt3a.

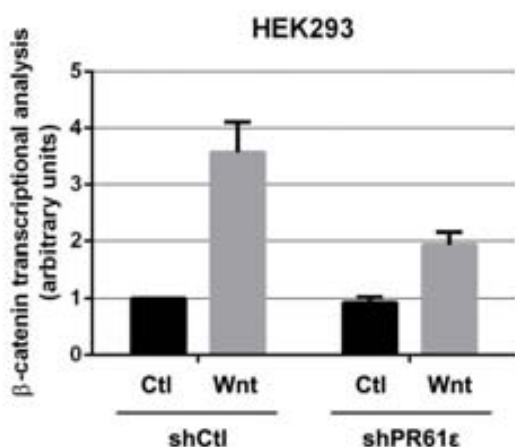


Figura 38: Cèl·lules deplecionades de PR61ε impedeixen l'activitat transcripcional de la β-catenina. L'activitat transcripcional de la β-catenina es determina utilitzant el plasmidi TOP-FLASH en cèl·lules HEK293T prèviament interferides amb l'shRNA PR61ε i tractades amb medi condicionat Wnt3a durant 6 hores.

Finalment es va investigar si l'activació de dos gens diana de la via de Wnt, l'*AXIN2* i *CCND1*, depèn de l'expressió de la proteïna fosfatasa PP2A PR61ε.

Tal i com s'ha observat en els experiments anteriors d'estabilització i translocació de la β-catenina, les cèl·lules shRNA PR61ε estimulades amb el lligand Wnt activen menys els gens diana en comparació amb les cèl·lules control (Figura 39). En canvi, tant les cèl·lules control com les deplecionades de la fosfatasa i activades amb el CA-LRP, expressen nivells similars dels transcrits dels dos gens analitzats.

Tots aquests resultats suggereixen que tot i que la PR61ε és essencial per a l'estabilització de la β-catenina, i per l'activitat transcripcional del complex β-catenina/TCF-4, la fosfatasa no és necessària per l'activació de la via amb el mutant CA-LRP.

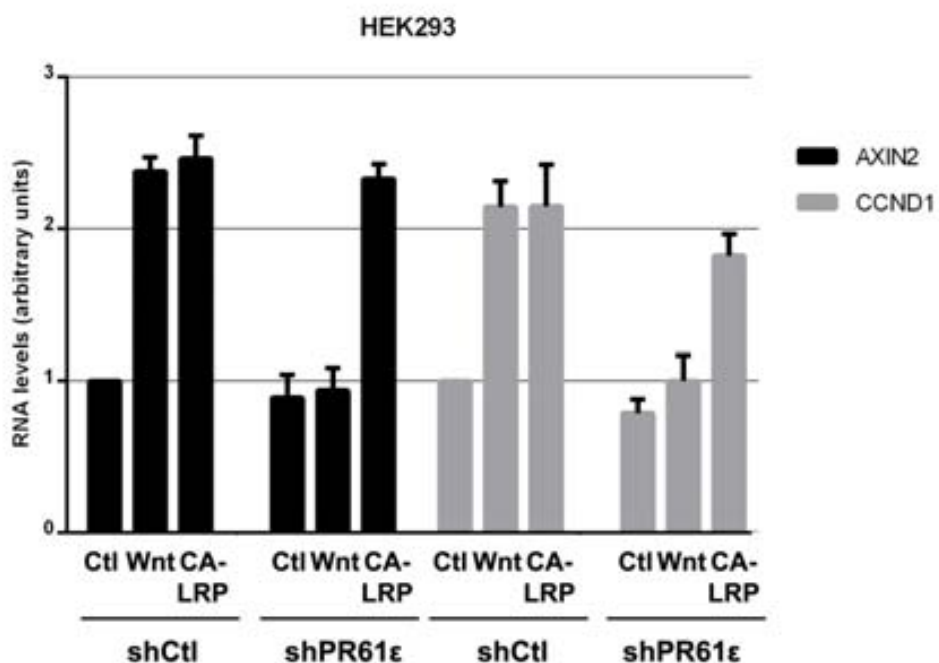


Figura 39: La PR61ε és necessària per l'expressió transcripcional dels gens diana quan s'activa la via amb el lligand Wnt. Cèl·lules HEK293T prèviament interferides amb l'shRNA PR61ε van ser transfectades amb la construcció CA-LRP o amb el vector control. Aquestes cèl·lules van ser estimulades amb medi control (Ctl) o medi Wnt3a (Wnt) durant 16 hores. Es va aïllar l'RNA i es va analitzar l'expressió dels gens *AXIN2* i *CCND1* mitjançant RT-PCR quantitativa.

2.3.3 La PR61ε té un paper rellevant en la diferenciació de les MSC a adipòcits

Per validar la implicació de la PR61ε en la via de Wnt, s'ha utilitzat un model més funcional: la diferenciació de les Mesenchymal Stem Cells (MSC) a adipòcits. Tal i com s'ha comentat a la *Introducció*, la via canònica de Wnt impedeix el pas de MSC a adipòcits madurs, inhibint d'aquesta manera la diferenciació [181].

Aprofitant aquesta funció de Wnt3a, es va realitzar un *assaig de diferenciació a adipòcits* (explicat a Materials i Mètodes). Cèl·lules MSC control o shRNA PR61ε es van posar amb medi de diferenciació juntament amb medi control o medi Wnt3a durant 3 dies. Després d'una setmana des de l'addició dels medis es va analitzar si les cèl·lules havien diferenciat a partir de l'observació dels nivells de Glut4. Aquesta és una proteïna transportadora de glucosa que s'ha descrit que els seus nivells augmenten després de la diferenciació de MSC a adipòcits [191].

A la Figura 40 s'observa que els controls positius han funcionat. Per una banda les cèl·lules MSC expressen més Glut4 quan s'han posat amb medi de diferenciació, en comparació amb les cèl·lules que no han estat estimulades (Carrils 1 i 2). Per altra banda, les cèl·lules MSC shRNA CV expressen menys Glut4 després del tractament amb medi de diferenciació més medi Wnt (Carrils 3 i 4), mostrant que el Wnt3a inhibeix la diferenciació a adipòcits. En canvi, les cèl·lules shRNA PR61ε tenen nivells similars de Glut4 tant si s'han posat a diferenciar juntament amb medi control com amb medi Wnt3a (Carrils 5 i 6).

Aquests resultats suggereixen que la PR61ε és necessària per l'activació de la via canònica, i que la seva depleció promou la diferenciació a adipogènesi, l'efecte contrari del que provoca l'estimulació amb medi Wnt3a.

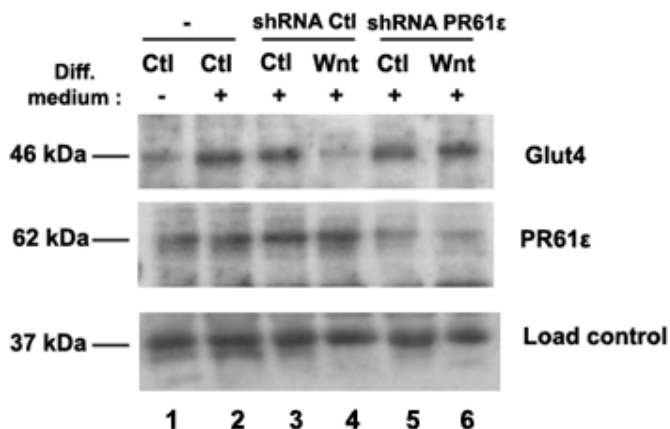


Figura 40: La PR61ε és necessària per l'efecte inhibitor de Wnt3a en l'adipogènesi. MSC han estat transfectades amb el vector shRNA Control (Ctl) o amb el vector shRNA PR61ε i s'han posat amb medi control o medi diferenciació quan s'indica, juntament amb medi condicionat control (Ctl) i medi condicionat Wnt3a (Wnt), tal i com s'explica a *Materials i Mètodes*. La diferenciació s'ha determinat quantitativament a partir de la lisis de les cèl·lules amb tampó RIPA i mitjançant l'ús de l'anticòs anti-Glut4 en un Western Blot.

2.4 La subunitat reguladora PR61ε està unida al receptor de Wnt3a

2.4.1 La PR61ε s'uneix a Fz en situació control i al correceptor LRP5/6 en Wnt

Una vegada demostrat que la subunitat reguladora PR61ε activa la via de Wnt3a a través de l'activació de la CK1ε, es va voler descriure a quina proteïna del complex receptor de Wnt està associada aquesta fosfatasa. Es va immunoprecipitar la PP2A catalítica i es va analitzar la unió amb el receptor de Wnt i el correceptor, a més d'amb la CK1ε, la p120-catenina, la GSK-3β i l'Axina a diferents temps d'estimulació per Wnt.

Els resultats obtinguts mostren que la PP2A catalítica interacciona amb l'Axina, tal i com s'havia descrit prèviament [77]. En canvi no s'observa unió d'aquesta fosfatasa amb les altres proteïnes analitzades, ni en situació control ni en activació de la via de Wnt (Dades no mostrades).

Com que la subunitat reguladora de la PP2A és la que s'uneix directament al substrat [161], es va immunoprecipitar la PR61ε per trobar a quines proteïnes està unida aquesta fosfatasa. Es va observar que el receptor de Wnt3a, Fz, està associat

a la fosfatasa tant en la situació control com en Wnt3a, mentre que l'LRP5/6 s'uneix a la fosfatasa només quan la via està activada (Figura 41).

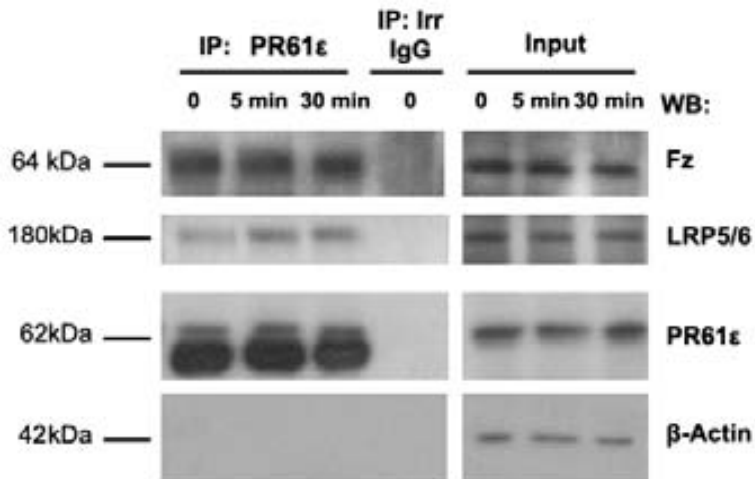


Figura 41: La PR61ε s'uneix a Fz en situació control i al correceptor LRP5/6 en Wnt. Cèl·lules HEK293T van ser estimulades durant el temps indicat amb medi condicionat Wnt3a (Wnt). A continuació es van lisar amb tampó lisi amb digitonina 1% i es va realitzar un assaig de coimmunoprecipitació de la PR61ε. El resultat es va analitzar per WB.

Els mateixos resultats s'obtenen quan es fa un *Pull-Down* utilitzant la GST-PR61ε i extractes obtinguts de cèl·lules HEK293T. A la Figura 42 s'observa que el receptor Fz està constitutivament unit a la PR61ε, mentre que el correceptor LRP5/6 s'uneix a la fosfatasa després de l'estimulació per Wnt3a.

Aquests resultats suggereixen que la PR61ε es troba unida a Fz en situació control, i posteriorment s'uneix indirectament a l'LRP5/6 en Wnt3a degut a la formació del complex Fz-LRP5/6.

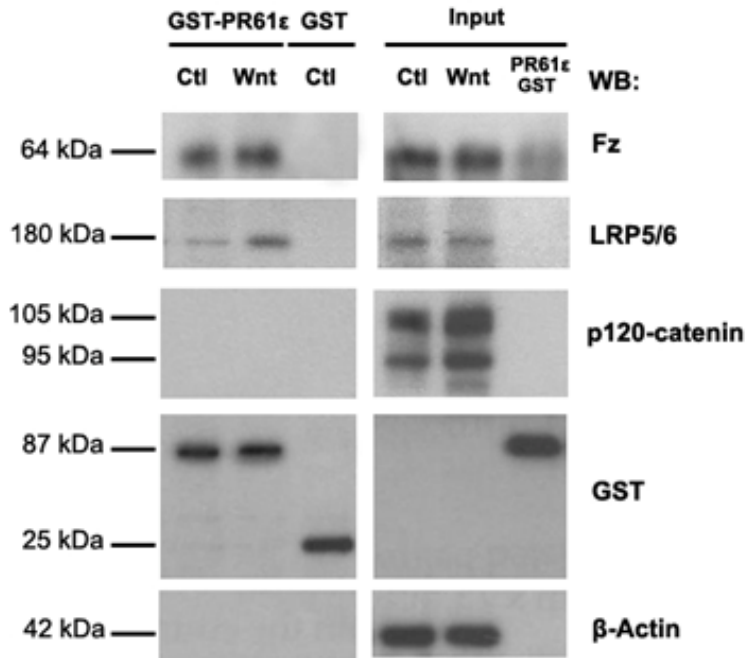


Figura 42: La PR61ε s'uneix a Fz en situació control i al correceptor LRP5/6 en Wnt Es va realitzar un assaig de *Pull-Down* amb GST-PR61ε o GST amb extractes de HEK293T prèviament tractats amb medi control (Ctl) o medi Wnt3a (Wnt) durant 1 hora. Els resultats es van analitzar per Western Blot.

3 La interacció entre les unions adherents i el coreceptor LRP5/6 regula la internalització de GSK-3 dins d'endosomes en la via de Wnt

3.1 L'activació de Wnt indueix la internalització de diferents components de la via dins de cossos multivesiculars

En el decurs d'aquesta tesi el grup de De Robertis va descriure per primera vegada que la inhibició de la fosforilació de GSK-3 induïda per Wnt podia ser deguda a l'endocitosi de la GSK-3, l'Axina i el correceptor LRP5/6 en cossos multivesiculars (MVBs). L'endocitosi d'aquest complex aïllaria la GSK-3 dels seus substrats del citosol i afavoriria l'estabilització de la β -catenina que podria activar els seus gens diana [124].

3.1.1 L'Axina, la GSK-3, LRP i el Dvl-2 s'internalitzen amb l'activació de Wnt, mentre que la p120-catenina i l'N-cadherina no

Vam voler validar aquests resultats i analitzar el comportament de la cadherina i la p120-catenina en aquesta internalització induïda per Wnt. Es van utilitzar les cèl·lules HEK293T com a model, tractades amb medi condicionat Wnt durant 4 hores o amb el mutant CA-LRP. Per detectar les proteïnes dins dels MVBs es va utilitzar la *permeabilització amb digitonina i assaig de protecció de proteasa* (PDPK) descrit a l'apartat 4.4.3.1 de Materials i Mètodes. Aquesta tècnica utilitza la digitonina que solubilitza la membrana plasmàtica però deixa els endosomes intactes, i a continuació el tractament amb la Proteïnasa K que digereix totes les proteïnes contingudes en els compartiments permeabilitzats i deixa intactes les proteïnes de dins dels endosomes (*PK*). Com a control també es tracten cèl·lules amb Tritó i Proteïnasa K (el tritó solubilitza totes les membranes, i per tant, es degraden totes les proteïnes, *PK+TX-100*) i cèl·lules amb aigua (les proteïnes de tots els compartiments es mantindran intactes, *Total Extracts*).

Tal i com es mostra a la Figura 43, les dues isoformes (α i β) de la GSK-3, el Dvl-2, l'Axina i LRP5/6 s'internalitzen quan s'activa la via de Wnt amb lligand Wnt o amb el mutant CA-LRP (Carrils *PK*, 2 i 3). També s'observa internalització de la β -catenina, en concret la internalització de la que està fosforilada en la Ser33, Ser37 i Thr41 (*P- β -catenina*). En canvi, l'anticòs anti- β -actina (que detecta la β -catenina que no està fosforilada en aquests tres residus) no detecta la proteïna dins del MVBs. Com a control positiu de càrrega s'ha utilitzat el marcador d'endosomes

EEA1, ja que s'ha observat prèviament al nostre laboratori que aquesta proteïna queda protegida de la proteïnasa K en cèl·lules permeabilitzades amb digitonina, i no es detecta en ser tractada amb *PK+TX-100* (Carrils 4-6).

No obstant, no es veu internalització de la p120-catenina ni de l'N-cadherina (la cadherina que presenten les cèl·lules HEK293T) o de la ubiquitina lligasa β -TRCP (Carrils PK, 2 i 3). Tampoc s'observa presència de cap proteïna en els carrils PK+TX-100, mostrant que la Proteïnasa K és efectiva degradant les proteïnes.

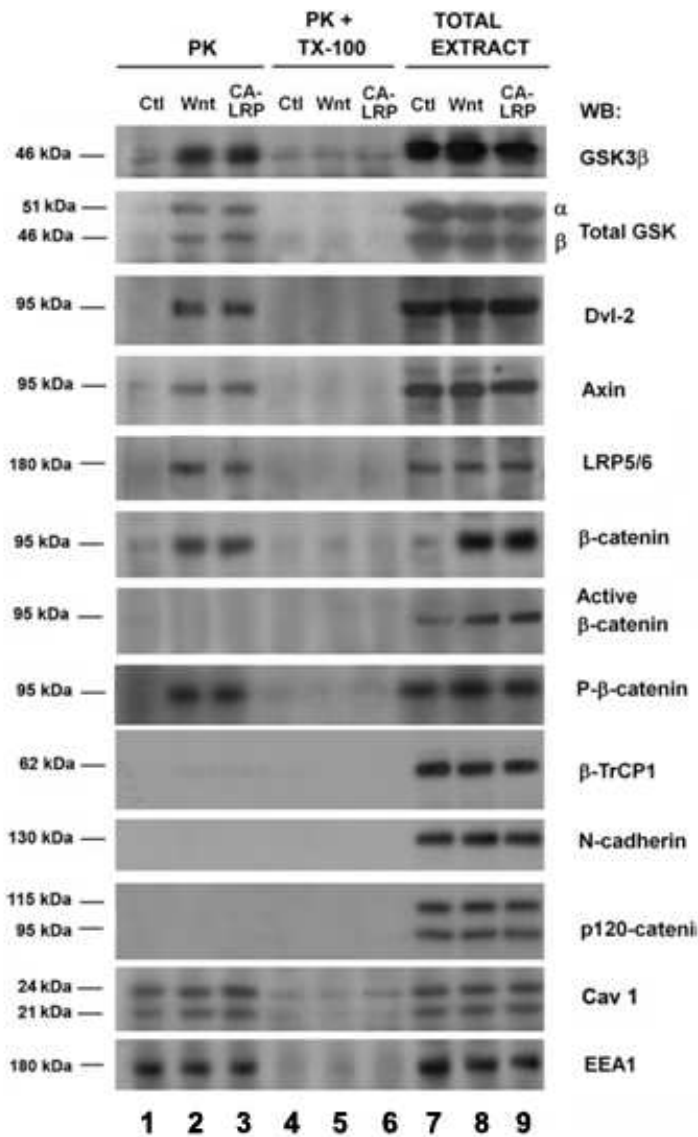


Figura 43: Wnt internalitza el complex de l'LRP5/6, però no internalitza la p120-catenina ni l'N-cadherina. Cèl·lules HEK293T van ser transfectades amb CA-LRP o amb un vector buit, i tractades amb medi control o medi Wnt condicionat durant 4 hores. Tot seguit es va permeabilitzar amb digitonina i es va realitzar un assaig de protecció de proteasa. La presència de les diferents proteïnes es determina per Western Blot en els extractes totals, en la fracció amb Digitonina i Proteïnasa K (PK) o en la fracció amb tritó i amb Proteïnasa K (PK-TX-100).

3.1.2 La internalització de GSK-3 es produeix posteriorment a senyals inicials de la via de Wnt.

Tot seguit es va dur a terme una cinètica d'internalització mitjançant un experiment de protecció de la proteasa a diferents temps d'activació de Wnt. Es va avaluar quan s'inicia la internalització de GSK-3 i quines senyals de Wnt prèviament identificades precedeixen aquesta internalització.

La Figura 44 i la 45 mostren que la internalització de la GSK-3 s'observa a partir de les 2 hores d'activació de la via, i que aquesta és màxima a 4 hores d'estimulació. Aquests resultats, a més, correlacionen amb l'estabilització de la β -catenina. Senyals inicials de la via de Wnt com són la fosforilació de la Ser1490 de l'LRP5/6 o la fosforilació de la p120-catenina en la Ser268 s'observen abans que la internalització de la GSK-3 (veure a extractes totals). Tenint en compte que la fosforilació de la p120-catenina a la Ser268 és necessària per la separació d'aquesta proteïna de la Cadherina, aquests resultats suggereixen que la internalització de la GSK-3 s'iniciaria posteriorment a la separació del complex p120-catenina/Cadherina.

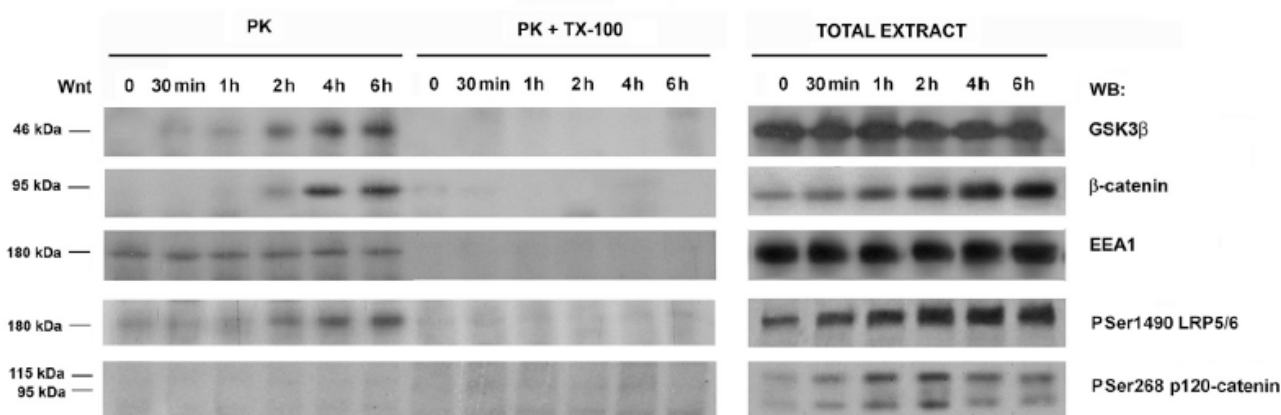


Figura 44: La GSK-3 s'internalitza a partir de 2 hores d'estimulació per Wnt. Les cèl·lules HEK293T van ser estimulades amb medi condicionat Wnt durant el temps que s'indica i es va realitzar una permeabilització de digitonina i un assaig per protecció de la proteasa. Els resultats es van analitzar per Western Blot.

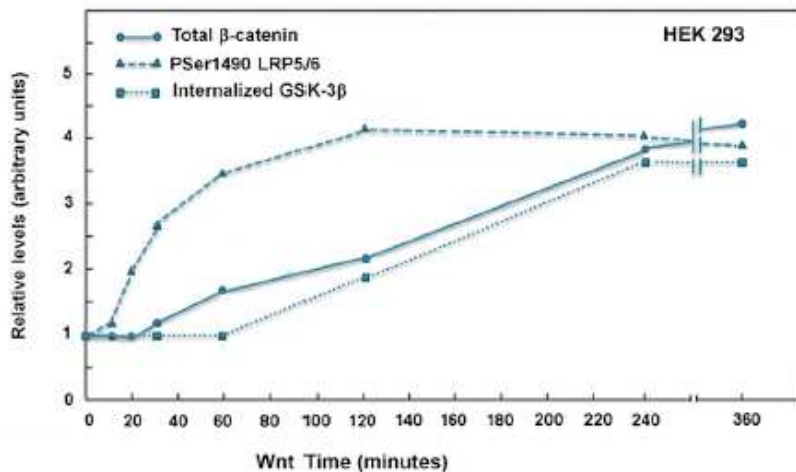


Figura 45: Gràfic d'activació de tres senyals de la via de Wnt. La fosforilació de la Ser1490 de l'LRP5/6, la internalització de la GSK-3 dins de MVBs i els nivells de la β -catenina es van mesurar en cèl·lules HEK293T a diferents temps de tractament amb Wnt.

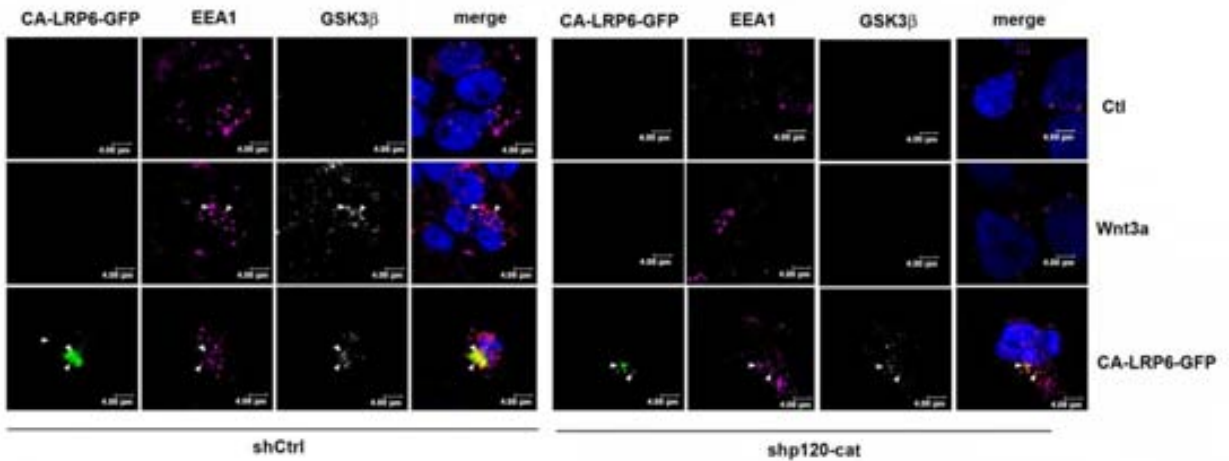
3.2 La p120-catenina i l'N-cadherina són necessàries per la internalització de GSK-3 en cèl·lules activades amb el lligand Wnt

3.2.1 La p120-catenina és necessària per la internalització de GSK-3 quan s'activa la via amb el lligand Wnt, però no quan s'activa amb el mutant CA-LRP.

Tenint en compte que la p120-catenina es troba constitutivament unida a l'LRP5/6 però no s'internalitza amb el complex del correceptor, es va investigar si aquesta és necessària per promoure la internalització. Es va realitzar un assaig de permeabilització amb digitonina i immunofluorescència (veure apartat 4.4.3.2 de *Materials i Mètodes*) activant les cèl·lules amb el lligand Wnt o amb el mutant CA-LRP. Aquest assaig mostra únicament les proteïnes que estan dins dels endosomes, fent ús de la tècnica de la Immunofluorescència. A la Figura 46 s'observa que les cèl·lules activades amb Wnt presenten més GSK-3 β internalitzada que les control, i aquesta correlaciona amb el marcador EEA1. També es detecta GSK-3 β internalitzada quan les cèl·lules deplecionades per p120-catenina són activades amb el mutant CA-LRP. En canvi, no s'observa aquest efecte quan les mateixes cèl·lules interferides de p120-catenina s'activen amb el lligand Wnt. Resultats similars s'observen en realitzar un assaig de PDPK en les mateixes condicions anteriors (Figura 47).

Es van validar els resultats anteriors en cèl·lules MEF, de fenotip fibroblàstic i que també expressen N-cadherina. Tal i com succeeix amb les cèl·lules HEK293T, les cèl·lules MEF internalitzen GSK-3 (tant la isoforma α , com la β) en ser estimulades amb el lligand Wnt. En canvi la GSK-3 no s'internalitza en les cèl·lules shRNA p120-catenina activades amb Wnt (Figura 48).

A



B

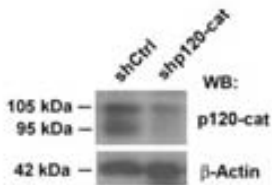


Figura 46: Les cèl·lules shRNA p120-catenina no internalitzen GSK-3 β dins de MVBS quan s'activa la via amb el lligand Wnt3a. (A) Cèl·lules HEK293T transfectades amb shRNA Control (Ctl) o shRNA p120-catenina (shp120-cat) i posteriorment transfectades amb el plasmidi CA-LRP o un plasmidi control van usar-se per un assaig de permeabilització de digitonina i immunofluorescència després de l'estimulació amb medi condicionat control o Wnt durant 4 hores. La tinció del nucli es va realitzar per DAPI. La barra correspon a 4 μ M. (B) Es va realitzar un WB de les cèl·lules utilitzades per l'experiment d'immunofluorescència.

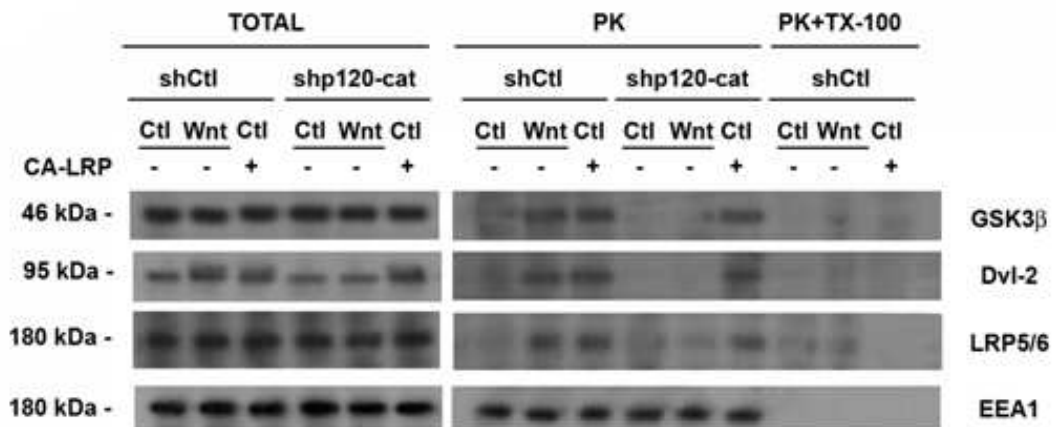


Figura 47: Les cèl·lules HEK293T shRNA p120-catenina no internalitzen GSK-3 β , ni Dvl-2 ni LRP5/6 dins de MVBs quan s'activa la via amb el lligand Wnt3a. Cèl·lules HEK293T transfectades amb shRNA Control (Ctl) o shRNA p120-catenina (shp120-cat) i posteriorment transfectades amb el plasmidi CA-LRP o un plasmidi control van usar-se per un assaig de PDPK després de l'incubació durant 4 hores amb medi condicionat control (Ctl) o Wnt3a (Wnt). Els resultats es van observar mitjançant Western Blot.

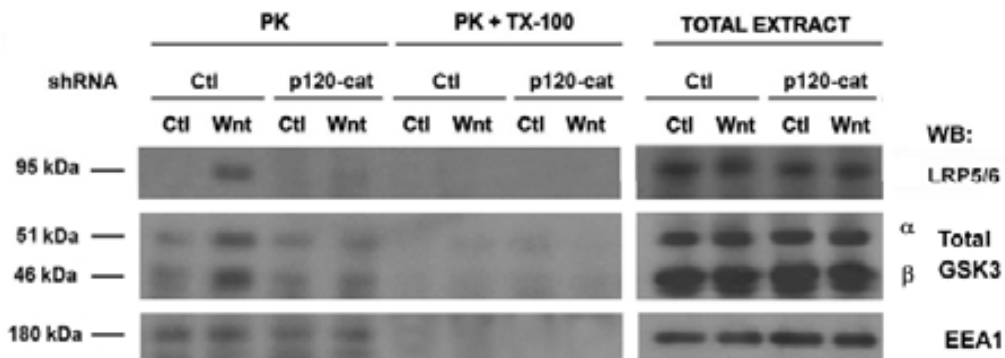


Figura 48: Les cèl·lules MEF shRNA p120-catenina no internalitzen GSK-3 quan s'activa la via amb el lligand Wnt3a. Cèl·lules MEF shRNA p120-catenina transfectades de forma estable amb shRNA Control (Ctl) o shRNA p120-catenina (p120-cat) van usar-se per un assaig de PDPK després de l'incubació durant 4 hores amb medi condicionat control o Wnt. Els resultats es van observar mitjançant Western Blot.

3.2.2 L'N-cadherina és necessària per la internalització de GSK-3 quan s'activa la via tant amb lligand Wnt com amb el CA-LRP.

A continuació es va analitzar si es requereix N-cadherina per a la internalització de GSK-3 β induïda per Wnt. Un assaig de PDPK en cèl·lules control i interferents de l'N-cadherina mostra que aquesta proteïna és necessària per la internalització de GSK-3 β i de Dvl-2 tant si la via s'activa amb el lligand Wnt com si es fa amb el mutant CA-LRP (Figura 49). A més, en aquest experiment es va sobreexpressar l'E-cadherina (carrils 7, 8 i 9) i es va veure que aquesta proteïna és capaç de restablir l'efecte de la internalització. Aquest resultat suggereix que l'E- i l'N-cadherina actuen de forma similar en aquest comportament de la via.

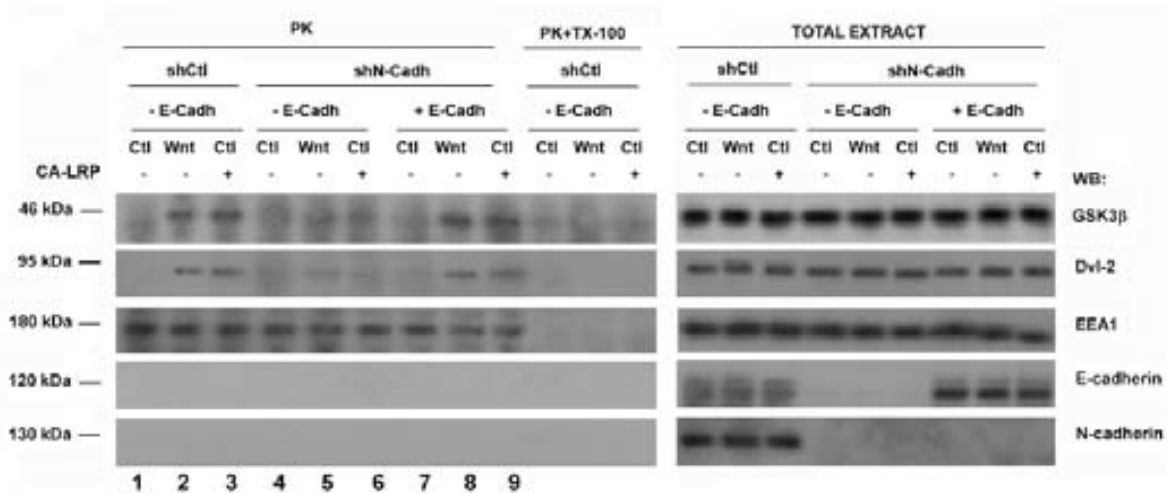


Figura 49: Les cèl·lules shRNA N-cadherina no internalitzen GSK-3 β ni Dvl-2 quan s'activa la via amb el lligand Wnt3a o amb el CA-LRP. Cèl·lules HEK293T transfectades amb shRNA Control (Ctl) o shRNA N-cadherina (shN-Cadh) i posteriorment transfectades amb el plasmidi CA-LRP o amb E-cadherina quan s'indica, van utilitzar-se per un assaig de PDPK després de l'estimulació amb medi Control o Wnt3a durant 4 hores. Els resultats es van observar mitjançant WB.

3.2.2.1 L'N-cadherina és essencial per la unió del mutant CA-LRP a LRP5/6 endogen i pel reclutament de Dvl-2 i Axina en l'activació de Wnt

Experiments no mostrats, indiquen que el mutant CA-LRP s'uneix a l'LRP5/6 endogen formant un clúster de receptors que activa la via de Wnt. Tenint en compte que l'N-cadherina és necessària per activar la via tant amb lligand Wnt com

amb el CA-LRP, es va analitzar el complex CA-LRP/LRP5/6 endogen en deplecionar l'N-cadherina. Es va realitzar una immunoprecipitació de l'LRP5/6 endogen utilitzant un anticòs que detecta un epítop de la regió extracel·lular de la proteïna. Tal i com es mostra a la Figura 50, les cèl·lules deplecionades d'N-cadherina presenten menys unió entre l'LRP5/6 endogen i el CA-LRP. En aquesta mateixa Figura també s'observa que el Dvl-2 i l'Axina en cèl·lules deplecionades d'N-cadherina no es recluten a l'LRP5/6 quan s'activa la via amb el CA-LRP (Comparar carrils 2 i 4).

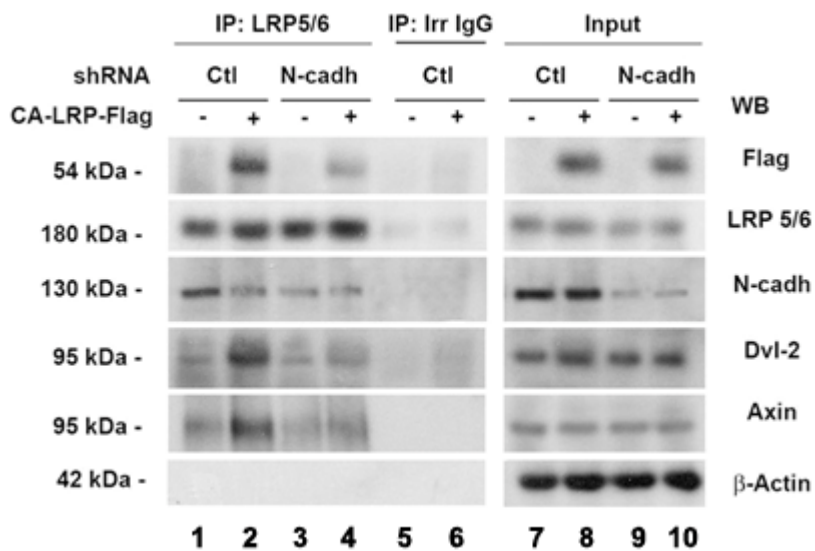


Figura 50: L'N-cadherina és essencial per la unió del mutant CA-LRP a LRP5/6 endogen i pel reclutament de Dvl-2 i Axina en l'activació de Wnt. Es va immunoprecipitar LRP5/6 endogen de cèl·lules HEK293T prèviament transfectades amb shRNA Control (Ctl) o shRNA N-cadherina (N-cadh) i posteriorment transfectades amb CA-LRP o un vector control. Els resultats es van analitzar per WB.

3.2.2.2 L'N-cadherina controla la localització de LRP5/6 a la membrana

Tenint en compte que la depleció d'N-cadherina també afecta la unió del mutant amb l'LRP5/6 endogen, es va hipotetitzar que l'N-cadherina podria estar regulant la localització de l'LRP5/6 a la membrana.

Per demostrar-ho es van interferir les cèl·lules d'N-cadherina i es van realitzar dos assajos diferents de localització de proteïnes a la membrana plasmàtica: un assaig de biotinitiació de la superfície cel·lular i un assaig de digestió de proteïnes de la superfície cel·lular (veure *Materials i Mètodes* apartat 4.4.4). L'experiment de

biotinilació de la Figura 51 ensenya que la biotina prèviament unida a la superfície cel·lular forma un complex amb LRP5/6 en les cèl·lules control, mostrant que el coreceptor es troba a la membrana en aquesta situació. En canvi, LRP5/6 no està unit a la biotina en cèl·lules interferents de l’N-cadherina. En l’experiment que s’observa a la Figura 52 s’utilitza la Proteïnasa K en cèl·lules no solubilitzades, per tant l’enzim només podrà digerir les proteïnes de la membrana plasmàtica. Els resultats són similars als obtinguts amb la biotinilació: l’LRP5/6 només es digereix en presència de PK en les cèl·lules control, i es manté intacte en les cèl·lules shRNA N-cadherina.

En conjunt, aquests resultats mostren que les cèl·lules interferents d’N-cadherina no presenten LRP5/6 a la membrana.

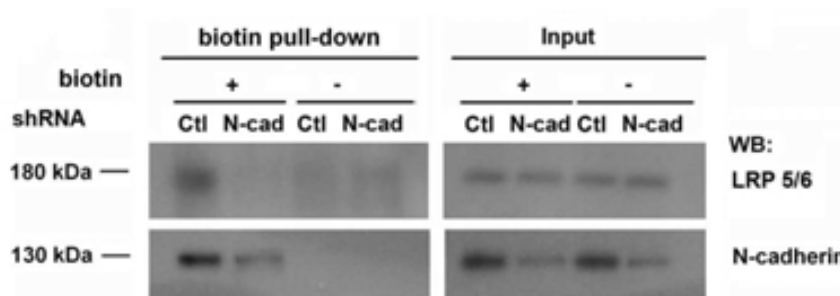


Figura 51: L’N-cadherina controla la localització de LRP5/6 a la membrana. Es va realitzar un assaig de biotinilació de la superfície cel·lular utilitzant cèl·lules HEK293T prèviament transfectades amb shRNA Control (Ctl) o amb shRNA Ncadherina (N-cad).

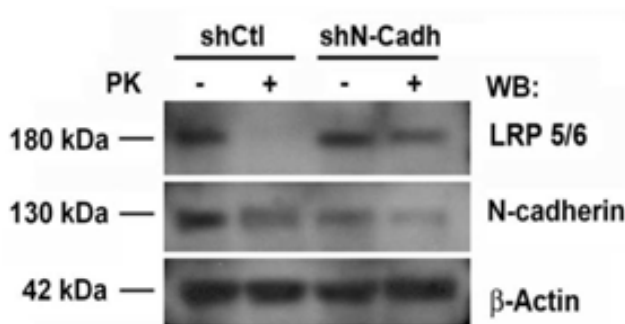


Figura 52: L’N-cadherina controla la localització de LRP5/6 a la membrana. Es va realitzar un assaig de digestió de proteïnes de la superfície cel·lular utilitzant cèl·lules HEK293T prèviament transfectades amb shRNA Control (Ctl) o amb shRNA N-cadherina (N-cad).

3.3 La regulació de la interacció p120-catenina/Cadherina és rellevant per a la internalització de GSK-3

A continuació es va investigar si la p120-catenina podria regular l'endocitosi del complex de degradació de la via de Wnt a través de la interacció amb la Cadherina.

3.3.1 Mutants de la p120-catenina que afecten la interacció p120-catenina/Cadherina, no permeten la internalització de GSK-3

3.3.1.1 El mutant Ser268,269A-p120-catenina no permet la internalització de GSK-3 en Wnt

Es va realitzar un assaig de PDPK en cèl·lules interferents de p120-catenina i rescatades amb una forma salvatge de la p120-catenina (WT) o amb un mutant obtingut al laboratori p120-catenina-Ser268,269A (S268,269A). Aquesta construcció conté una mutació puntual en els residus 268 i 269 de la p120-catenina que impedeix que aquests es fosforilin per CK1 i que la p120-catenina se separi de la Cadherina en activar-se la via de Wnt [31].

A la Figura 53 s'observa que GSK-3, Dvl-2 i Axina s'internalitzen en les cèl·lules control activades amb Wnt3a (veure carril 2) i no es veu cap d'aquests components en MVBs quan s'activa la via en les interferents de p120-catenina (veure carril 4). Quan es sobreexpressa la forma WT de la p120-catenina en cèl·lules shRNA p120-catenina i s'activa la via, es recupera la internalització (veure carril 6), però no en el cas de sobreexpressar el mutant S268,269A (veure carril 8).

Resultats similars s'obtenen quan es transfecta la forma mutada S268,269A en cèl·lules interferents de p120-catenina, s'activa la via amb el mutant CA-LRP i es realitza el mateix experiment PDPK (Veure carril 8 Figura 54). En aquest cas, però, es veu internalització dels diferents components del complex en les cèl·lules shRNA p120-catenina activades amb el CA-LRP (veure carril 4 Figura 54), tal i com s'havia descrit anteriorment en la Figura 47.

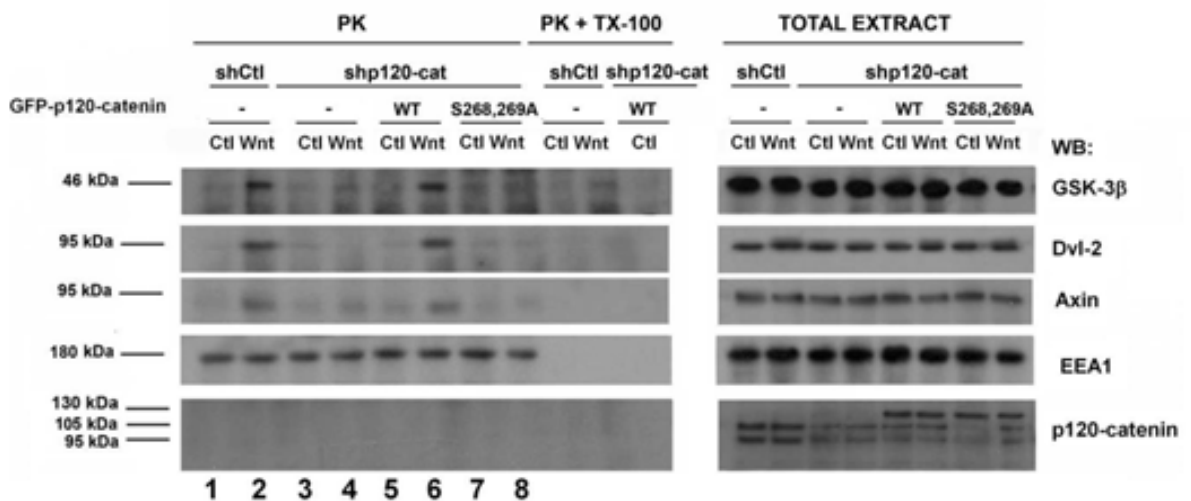


Figura 53: La separació de la p120-catenina de l'N-cadherina és necessària per la internalització de la GSK-3 β quan s'activa la via amb el lligand Wnt. Cèl·lules HEK293T prèviament interferides amb l'shRNA Control (Ctl) o l'shRNA p120-catenina (shp120-cat) van ser transfectades amb la construcció GFP, GFP-p120-catenina (WT) o amb la construcció GFP-Ser268,269A-p120-catenina (S268,269A). Es van estimular les cèl·lules durant 4 hores amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt) i es va realitzar un assaig PDPK.

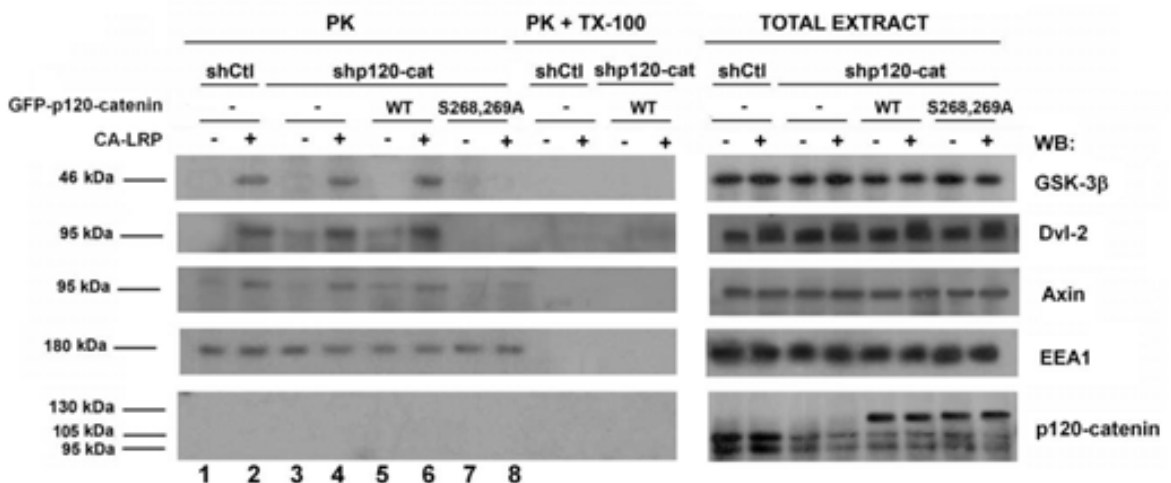


Figura 54: La separació de la p120-catenina de l'N-cadherina és necessària per la internalització de la GSK-3 β quan s'activa la via amb el CA-LRP. Cèl·lules HEK293T prèviament interferides amb l'shRNA Control (Ctl) o l'shRNA p120-catenina (shp120-cat) van ser transfectades amb la construcció GFP, GFP-p120-catenina (WT) o amb la construcció GFP-Ser268,269A-p120-catenina (S268,269A) i amb un plasmidi control o amb CA-LRP. A continuació es va realitzar un assaig PDPK.

Els resultats observats utilitzant la tècnica PDPK es van validar realitzant un assaig de *Permeabilització amb Digitonina i Immunofluorescència*.

Tal i com s'observa a la Figura 55, les cèl·lules shRNA p120-catenina i sobreexpressades amb el mutant S268,269A i amb CA-LRP presenten menys GSK-3 β internalitzada que les cèl·lules rescatades amb la forma WT i activades també amb el CA-LRP.

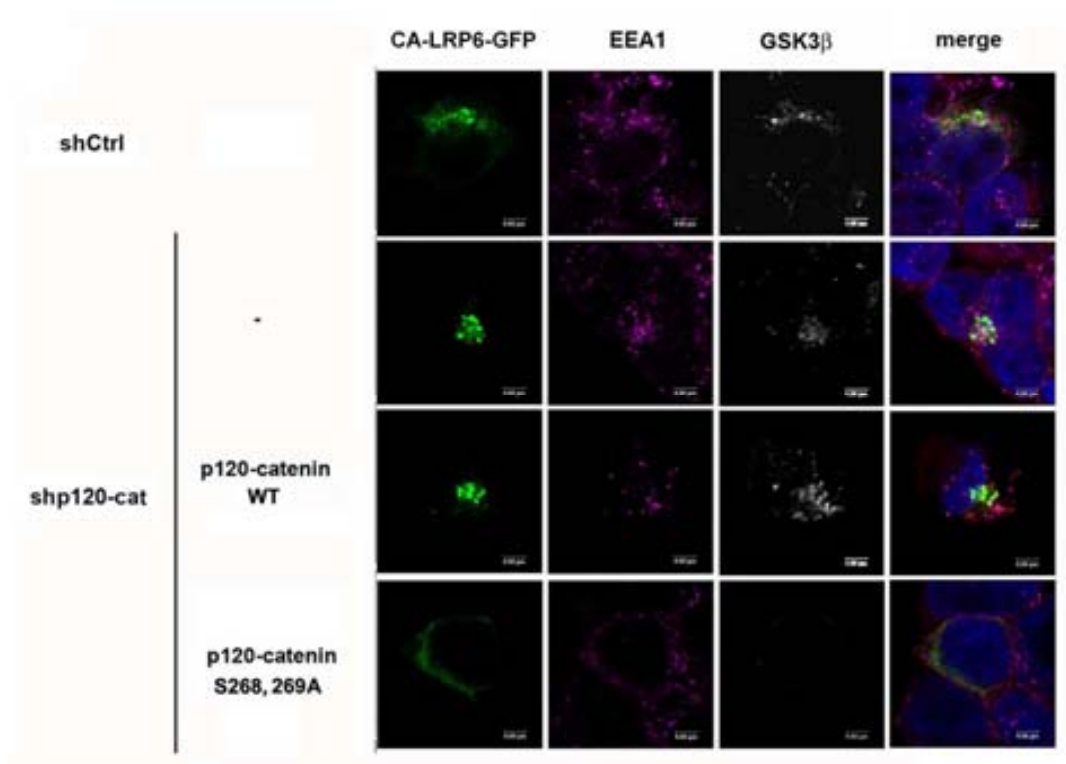


Figura 55: La separació de la p120-catenina de l'N-cadherina és necessària per la internalització de la GSK-3 β quan s'activa la via amb el CA-LRP. Cèl·lules HEK293T transfectades amb shRNA Control (Ctl) o shRNA p120-catenina (shp120-cat) i posteriorment transfectades amb els plasmidis GFP, GFP-p120-catenina (p120-catenina WT), GFP- Ser268,269A-p120-catenina, CA-LRP o un plasmidi control van usar-se per un assaig de permeabilització de digitonina i immunofluorescència. La tinció del nucli es va realitzar per DAPI. La barra correspon a 4 μ M.

3.3.1.2 La isoforma 4 de p120-catenina no permet la internalització de GSK-3 en activar la via amb el CA-LRP

A continuació, es va utilitzar un altre mutant de la p120-catenina que tampoc es separa de la Cadherina en activar-se la via de Wnt. La isoforma 4 de la p120-

catenina s'inicia a l'aminoàcid 324, de manera que a aquest mutant li manca tot el domini N-terminal. Per tant aquesta isoforma no conté els residus 268, 269, que són fosforilats per la CK1 α i que permeten la separació de la Cadherina en l'activació de la via. A més, el mutant tampoc conté la regió d'unió amb la CK1 ϵ que es troba a l'extrem N-terminal, així que la via no podrà ser activada amb el lligand Wnt perquè no es forma el complex p120-catenina-CK1 ϵ . Així doncs, per estudiar l'efecte de la isoforma 4 en la internalització de GSK-3, s'haurà d'activar la via amb el mutant CA-LRP que no requereix de la CK1 ϵ (Veure Figura 22).

En la Figura 56 s'observa el mateix efecte que el descrit amb el mutant S268,269A. Quan es realitza un assaig PDPK en cèl·lules control i shRNA p120-catenina, rescatades amb la forma WT de la p120-catenina o amb la isoforma 4, es mostra que a diferència del que passa en les cèl·lules control activades amb el CA-LRP (veure Carril 2), les cèl·lules shRNA p120-catenina que expressen la isoforma 4 no internalitzen la GSK-3 en activar-se amb el CA-LRP (veure carril 8).

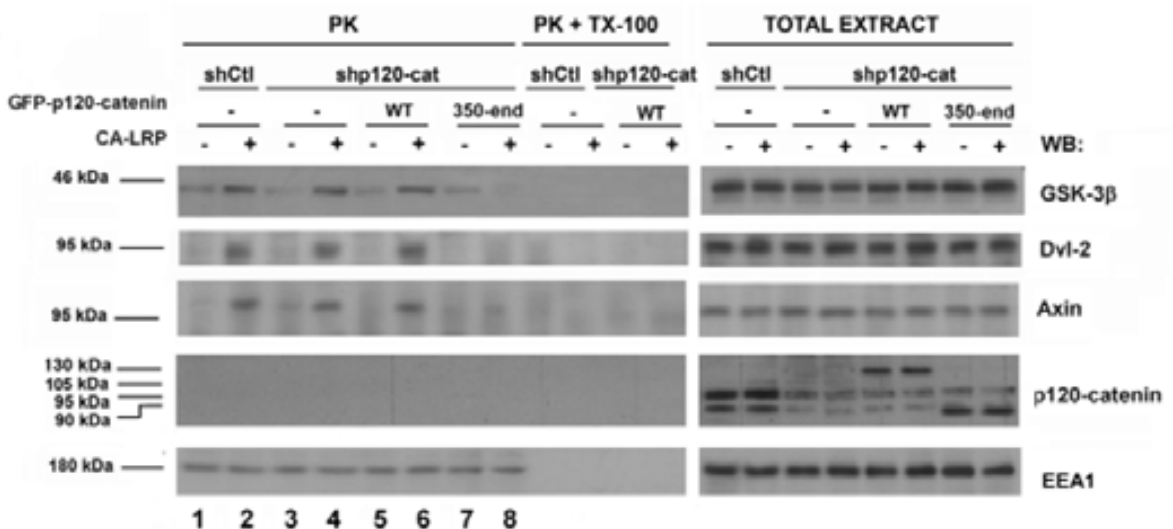


Figura 56: La sobreexpressió de la isoforma 4 de p120-catenina impedeix la internalització de GSK-3 en activar la via amb el CA-LRP. Cèl·lules HEK293T prèviament interferides amb l'shRNA Control (Ctl) o l'shRNA p120-catenina (shp120-cat) van ser transfectades amb GFP, GFP-p120-catenina (WT) o amb la isoforma 4 p120-catenina (350-end) i amb un plasmidi control o amb CA-LRP. A continuació es va realitzar un assaig PDPK.

3.3.2 La separació de p120-catenina de la Cadherina és necessària per una posterior separació de Cadherina amb l'LRP5/6

3.3.2.1 El mutant Ser268,269A-p120-catenina no permet la separació del complex N-cadherina-LRP5/6

Els resultats anteriors indiquen que la separació del complex p120-catenina/Cadherina és essencial per a la internalització de GSK-3 dins de MVBs. A continuació, es va estudiar aquesta interacció i els seus efectes en els esdeveniments de la via de Wnt.

Es va transfectar el mutant S268,269A en HEK293T deplecionades de p120-catenina, i es va immunoprecipitar l'LRP5/6 de cèl·lules estimulades durant 2 hores amb medi control o amb medi condicionat Wnt. A la Figura 57 es mostra que l'N-cadherina i la p120-catenina de cèl·lules tractades amb Wnt3a (Wnt) se separen del correceptor LRP5/6 (Veure carrils 1 i 2), tal i com s'havia descrit prèviament [32]. En canvi, les cèl·lules shRNA p120-catenina no activen la via de Wnt, i no es produeix aquesta separació de proteïnes (Veure carrils 3 i 4), que sí que es produeix en rescatar les cèl·lules deplecionades de p120-catenina amb la proteïna p120-catenina WT (Veure carrils 7 i 8). Tal i com s'esperava, la transfecció del mutant S268,269A impedeix la separació de la p120-catenina del complex en activar-se la via, ja que aquest mutant no es pot fosforilar ni separar de l'N-cadherina. Sorprenentment, la transfecció del mutant S268,269A també impedeix la separació N-cadherina-LRP5/6 en Wnt (Veure carrils 5 i 6).

També es va realitzar la coimmunoprecipitació contrària, una IP d'N-cadherina utilitzant el mutant CA-LRP. A la Figura 58 s'observa que l'LRP5/6 i l'N-cadherina es dissocien en cèl·lules que expressen p120-catenina WT quan s'activen amb el mutant CA-LRP (veure carrils 7 i 8). En canvi, aquesta separació no es produeix en transfectar el CA-LRP en cèl·lules shRNA p120-catenin rescatades amb la S268,269A.

Aquests resultats indiquen que la separació de p120-catenina de l'N-cadherina és necessària per una posterior separació d'N-cadherina amb l'LRP5/6.

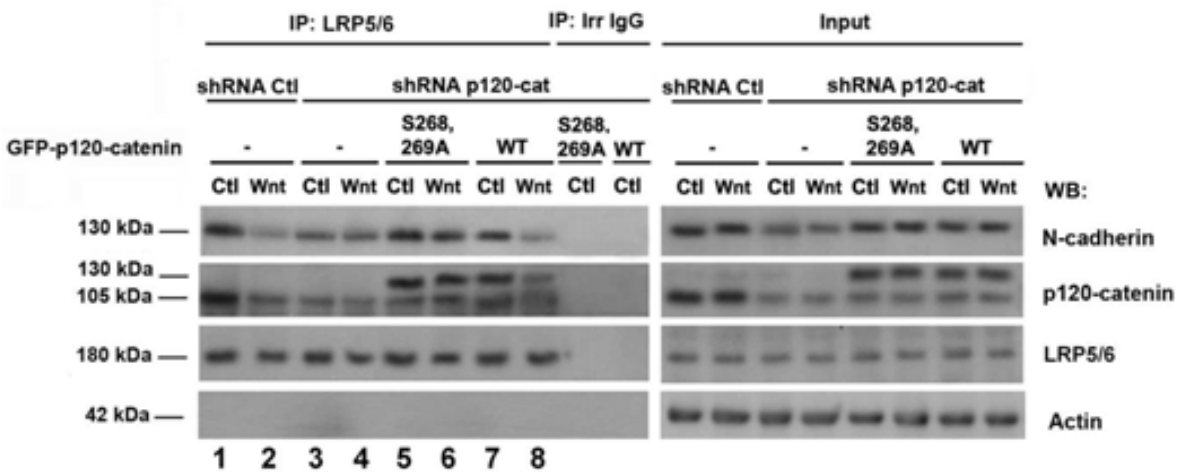


Figura 57: La sobreexpressió del mutant S268,269A no permet la separació del complex N-cadherina-LRP5/6. Cèl·lules HEK293T prèviament interferides amb l'shRNA Control (Ctl) o l'shRNA p120-catenina (shp120-cat) van ser transfectades amb la construcció GFP, GFP-p120-catenina (WT) o amb la construcció GFP-Ser268,269A-p120-catenina (S268,269A). Es van estimular les cèl·lules durant 2 hores amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt), es van lisar amb tampó lisi amb digitonina 1% i es va realitzar un assaig de coimmunoprecipitació de l'LRP5/6.

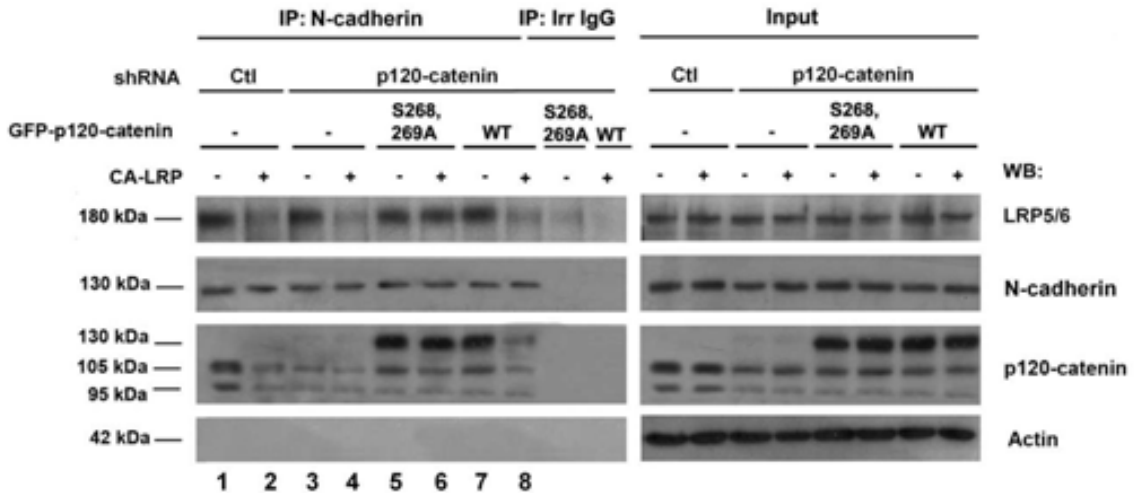


Figura 58: La sobreexpressió del mutant S268,269A no permet la separació del complex N-cadherina-LRP5/6. Cèl·lules HEK293T prèviament interferides amb l'shRNA Control (Ctl) o l'shRNA p120-catenina (shp120-cat) van ser transfectades amb la construcció GFP, GFP-p120-catenina (WT) o amb la construcció GFP-Ser268,269A-p120-catenina (S268,269A). També van ser transfectades amb CA-LRP quan s'indica. Es van lisar amb tampó lisi amb digitonina 1% i es va realitzar un assaig de coimmunoprecipitació de l'N-cadherina.

3.4 La fosforilació de la Cadherina regula la unió amb l'LRP i la internalització de la GSK-3

3.4.1 Els últims aminoàcids de la part C-terminal de l'E-cadherina regulen la interacció amb l'LRP5/6

El fet de que la dissociació p120-catenina/Cadherina reguli la separació posterior de la Cadherina del complex de Wnt, va suggerir que aquesta última separació podria ser l'esdeveniment necessari per la internalització de GSK-3. Per comprovar-ho, es va realitzar un mutant d'E-cadherina que no es dissocia de l'LRP5/6 en Wnt, tenint en compte resultats previs que descriuen que la fosforilació de la Cadherina per CK1 és el que promou aquesta separació [31].

Primer de tot es va determinar la regió d'unió de l'LRP5/6 en l'E-cadherina. Un assaig de *Pull-Down* amb l'LRP-GST citosòlic en cèl·lules sobreexpressades amb el domini citosòlic de l'E-cadherina (Ecad) o el domini citosòlic de l'E-cadherina sense els últims 47 aminoàcids (Ecad Δ C-term end), mostra que l'LRP-GST presenta més afinitat per l'Ecad que per l'Ecad Δ C-term end (Figura 61). És a dir, els aminoàcids de la regió C-terminal de l'E-cadherina reulen la interacció amb l'LRP5/6.

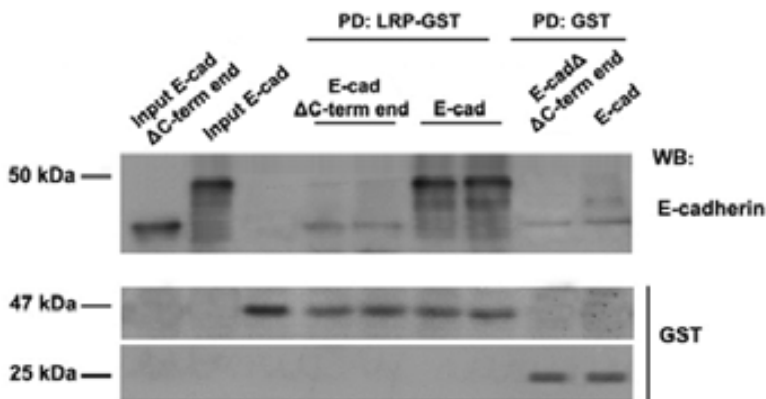


Figura 61: L'eliminació dels últims 47 aminoàcids de l'E-cadherina impedeix la unió amb l'LRP5/6. Es va realitzar un assaig de *Pull-Down* on es van incubar 5 pmols de GST-LRP citosòlic o GST amb extractes HEK293T que sobreexpressaven E-cadherina citosòlica (Ecad) o E-cadherina citosòlica sense els últims 47 aminoàcids (Ecad Δ C-term end). Els resultats es van analitzar per Western Blot.

3.4.2 El mutant E-cadherina Ser-Ala no es fosforila per CK1 ni se separa de l'LRP5/6 *in vitro*

La regió C-terminal de l'E-cadherina (marcada en verd a la Figura 62) conté una seqüència rica en serines que està conservada en la proteïna N-cadherina. A més, moltes d'aquestes serines són llocs de fosforilació putatius per CK1 [23]. Per tant, es va realitzar el mutant d'E-cadherina a partir del canvi de serines a alanines d'aquesta regió. Es van mutar totes les Serines de la construcció GST-E-cadherina citosòlica (E-cadherina WT) de la part C-terminal (marcades en vermell a la Figura 62), a alanines (E cadherina Ser-Ala).

Cytosolic domain of E-cadherin:

MVLLFVTAAGITLGMDELYKSGLSRRRAVVKEPLLPPEDDTRDNVYYYDEEGGGGED
 QDFDL**S**QLHRGLDARPEVTRNDVAP**T**LM**S**VPRYLPRPAN**P**DEIGNFIDENLKAAD**T**D**P****T**A
 PPYD**S**LLFDY**E**GS**G**SEAA**S**SS**L**NS**S**ES**D**KD**K**QD**Y**D**Y**L**N**EW**G**NR**F**KK**L**AD**M**Y**G**GG**E**D**D**

Figura 62: Domini citosòlic de l'E-cadherina. En verd s'ha marcat els 50 aminoàcids que s'han deplecionat en el mutant Ecad Δ C-term end i en vermell les serines mutades a alanines per fer el mutant Ser-Ala.

Utilitzant l'E-cadherina WT o l'E-cadherina Ser-Ala, i la proteïna GST-LRP citosòlica, es va realitzar un assaig d'unió amb proteïnes recombinants. Les construccions d'E-cadherina es van fosforilar, o no, prèviament amb CK1. Tal i com es mostra a la Figura 63, la fosforilació amb CK1 de l'E-cadherina WT redueix l'afinitat d'unió amb l'LRP5/6, al contrari del que succeeix quan es fosforila l'E-cadherina Ser-Ala.

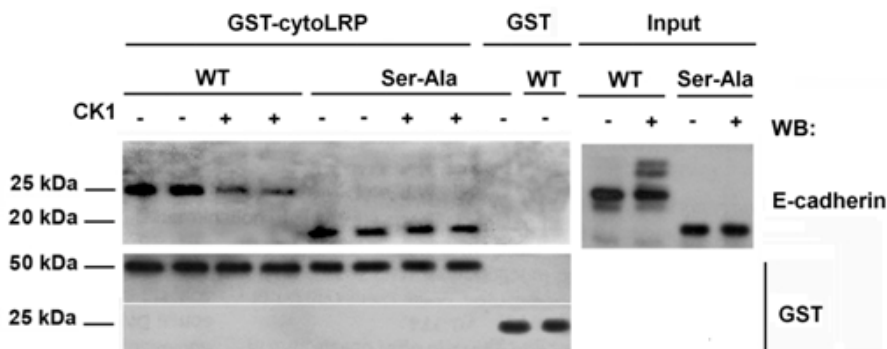


Figura 63: El mutant E cadherina Ser-Ala no perd l'afinitat amb LRP-GST en ésser fosforilat per CK1. Es va realitzar un assaig d'unió amb proteïnes recombinants utilitzant 2 pmols d'E-cadherina WT o E-cadherina Ser-Ala i 1 pmol d'LRP-GST citosòlic. Les proteïnes van ser fosforilades per CK1 quan s'indica.

Abans de realitzar la construcció E-cadherina Ser-Ala on es van canviar fins a 11 serines a alanines (veure Figura 62), es va intentar fer un mutant utilitzant la tècnica de la mutagènesis dirigida. Es va començar canviant una única serina a alanina (la 847), però no es van observar diferències en comparació a la construcció E-cadherina WT en realitzar un assaig d'unió de proteïnes recombinants amb l'LRP5/6 i fosforilant amb CK1 (Experiment no mostrat). Sobre d'aquesta mutació, se'n va fer una altra fins a arribar al mutant (750_847_850_853). En observar que no hi havia diferències de separació de l'LRP5/6 en comparar-ho amb l'E-cadherina WT es va passar a fer el mutant E-cadherina Ser-Ala.

Es va comprovar quina capacitat té el mutant E-cadherina Ser-Ala de fosforilar-se amb la quinasa CK1 en comparació amb la construcció E-cadherina WT. La Figura 64 mostra que el mutant Ser-Ala és fosforilat molt menys que l'E-cadherina WT.

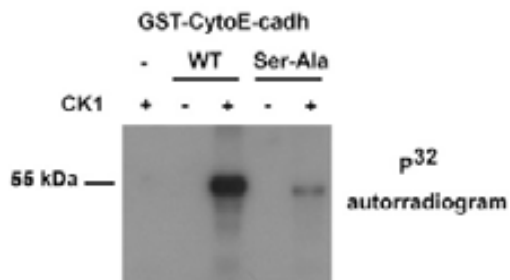


Figura 64: L'E-cadherina WT es fosforila més que l'E-cadherina Ser-Ala per CK1. 0,1 pmols de la GST-E-cadherina WT o de la GST-E-cadherina Ser-Ala citosòliques es van fosforilar amb 10 mU de la quinasa CK1. La fosforilació es va analitzar per autoradiografia.

3.4.3 El mutant E-cadherina Ser-Ala no se separa de l'LRP5/6 quan s'activa la via de Wnt

Tot seguit es va fer un assaig de *Pull Down* amb l'LRP-GST en cèl·lules HEK293T sobreexpressades amb E-cadherina WT o amb E-cadherina Ser-Ala i tractades amb medi condicionat control o medi Wnt3a. Els resultats de la Figura 65 mostren que l'LRP-GST citosòlic perd afinitat per l'E-cadherina WT quan les cèl·lules són estimulades amb Wnt3a. En canvi, hi ha la mateixa unió entre l'LRP-GST i l'E-cadherina Ser-Ala tant en cèl·lules estimulades amb medi control com amb Wnt3a.

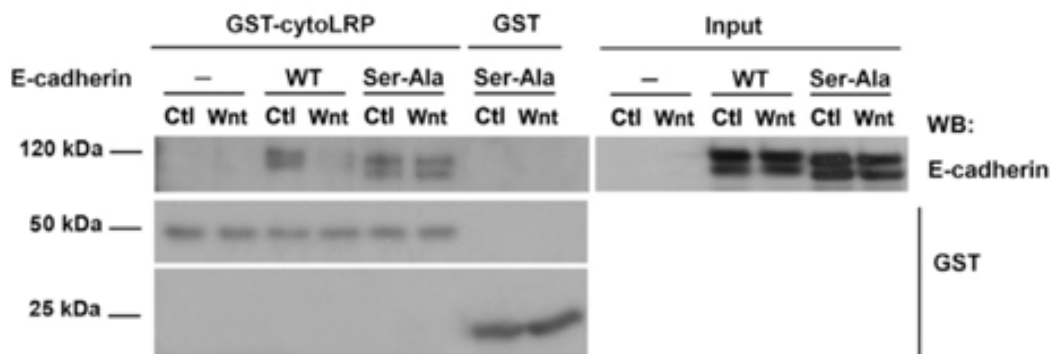


Figura 65: El mutant E cadherina Ser-Ala no perd l'afinitat amb LRP-GST en activar-se la via de Wnt. Es va realitzar un assaig de *Pull-Down* amb GST-LRP citosòlic o GST amb extractes HEK293T sobreexpressant E-cadherina WT (WT) o E-cadherina Ser-Ala (Ser-Ala). Les cèl·lules es van estimular amb medi control (Ctl) o Wnt3a (Wnt) durant 2 hores. Els resultats es van analitzar per Western Blot.

Es va validar el resultat obtingut en el *Pull-Down* mitjançant una coimmunoprecipitació de l'LRP en cèl·lules prèviament deplecionades d'N-cadherina i posteriorment rescatades amb les construccions E-cadherina WT i Ser-Ala. Es van rescatar les cèl·lules shRNA N-cadherina amb E-cadherina, ja que com es mostra a la Figura 49, aquestes tenen funcions similars a la via de Wnt. Tal i com s'observa a la Figura 66, l'E-cadherina WT sobreexpressada en cèl·lules shRNA N-cadherina, presenta menys unió a l'LRP5/6 quan s'estimulen les cèl·lules durant 2 hores amb Wnt (Comparar carrils 5 i 6). En canvi, l'E-cadherina Ser-Ala manté l'afinitat amb l'LRP5/6 després de l'activació de Wnt (Comparar carrils 7 i 8). En aquesta mateixa Figura també es mostra que el mutant E-cadherina Ser-Ala, no afecta els esdeveniments de la via de Wnt que es produeixen prèviament a la separació N-cadherina/LRP. El Dvl-2 no es recluta a l'LRP5/6 quan s'activa la via en cèl·lules shRNA N-cadherina (veure carrils 3 i 4), i aquesta unió es rescata en estimular les cèl·lules que sobreexpressen E-cadherina WT o Ser-Ala amb medi Wnt3a (Veure carrils 5, 6, 7 i 8). El mateix s'observa amb la separació de p120-catenina del complex. Tant les cèl·lules que expressen l'E-cadherina WT, com les que expressen l'E-cadherina Ser-Ala, perden la unió LRP5/6-p120-catenina en ser estimulades amb Wnt (veure carrils 5, 6, 7 i 8). És a dir, la separació N-cadherina LRP5/6 es posterior a la del complex p120-catenina-N-cadherina i no afecta a la interacció d'aquest complex.

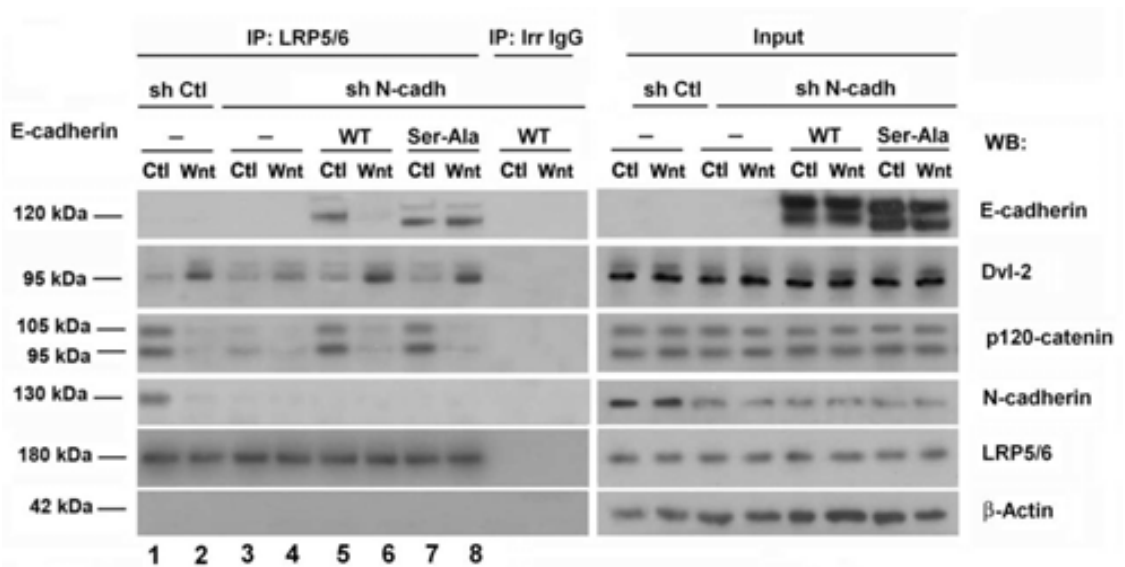


Figura 66: El mutant E-cadherina Ser-Ala no se separa de l'LRP5/6 en activar-se la via de Wnt. Cèl·lules HEK293T deplecionades de l'N-cadherina van ser transfectades amb una construcció control, E-cadherina WT (WT) o amb E-cadherina Ser-Ala (Ser-Ala). Es van estimular les cèl·lules durant 2 hores amb medi condicionat Control (Ctl) o Wnt3a (Wnt), es van lisar amb tampó lisi amb digitonina 1% i es va realitzar un assaig de coimmunoprecipitació de l'LRP5/6.

3.4.4 La separació E-cadherina/LRP és necessària per la internalització de GSK dins dels MVBs

A continuació, es va investigar l'efecte del mutant E-cadherina Ser-Ala en la internalització de GSK-3 en endosomes. En la Figura 67 s'observa que les cèl·lules shRNA N-cadherina + E-cadherina WT internalitzen GSK-3 quan són tractades amb Wnt (Veure carrils 5 i 6), al contrari del que succeeix quan es rescaten les cèl·lules deplecionades d'N-cadherina amb el mutant E-cadherina Ser-Ala (Veure carrils 7 i 8).

Aquests resultats demostren que la internalització de la GSK-3 depèn de la separació de LRP5/6/Cadherina en Wnt.

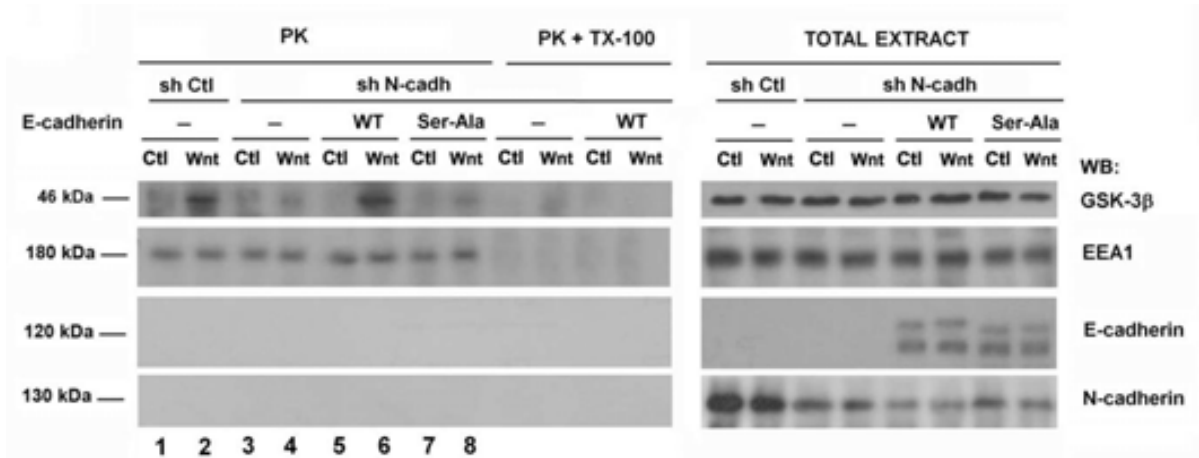


Figura 67: La separació de la p120-catenina de l'E-cadherina és necessària per la internalització de la GSK-3 β quan s'activa la via amb el lligand Wnt. Cèl·lules HEK293T prèviament interferides amb l'shRNA Control (Ctl) o l'N-cadherina (shN-cadh) van ser transfectades amb una construcció control, E-cadherina WT (WT) o amb la construcció E-cadherina Ser-Ala (Ser-Ala). Es van estimular les cèl·lules durant 4 hores amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt) i es va realitzar un assaig PDPK.

3.5 La internalització de GSK-3 dins de MVBs és dependent de caveolina

3.5.1 La depleció de caveolina impedeix la internalització de GSK-3, però no afecta els efectes inicials de la via de Wnt.

Per aprofundir més en l'estudi de la internalització de GSK-3, es va investigar el paper de la caveolina. S'havia descrit que la internalització de l'LRP5/6 via unió directe amb la caveolina, és necessària per l'activació de la via de Wnt [125].

Tenint en compte que les cèl·lules MEF també responen a Wnt i internalitzen GSK-3 dins de MVBs (veure Figura 48), es van utilitzar unes cèl·lules MEF KO de Caveolina per estudiar el paper d'aquesta proteïna en la internalització de GSK-3. Tal i com es mostra a la Figura 68, les cèl·lules MEF WT internalitzen GSK-3, Dvl-2 i β -catenina en ser estimulades amb el lligand Wnt, a diferència de les cèl·lules MEF KO de Caveolina.

Tot i que les cèl·lules KO de Caveolina no internalitzen GSK-3 en Wnt, sí que activen els esdeveniments més inicials de la senyalització per Wnt. Tal i com s'observa a la Figura 69, el reclutament de Dvl-2 i d'Axina a l'LRP5/6 i la fosforilació de la serina 1490 del coreceptor LRP5/6 es produeix quan s'immunoprecipita LRP5/6 tant de cèl·lules MEF WT com de MEF KO de Caveolina.

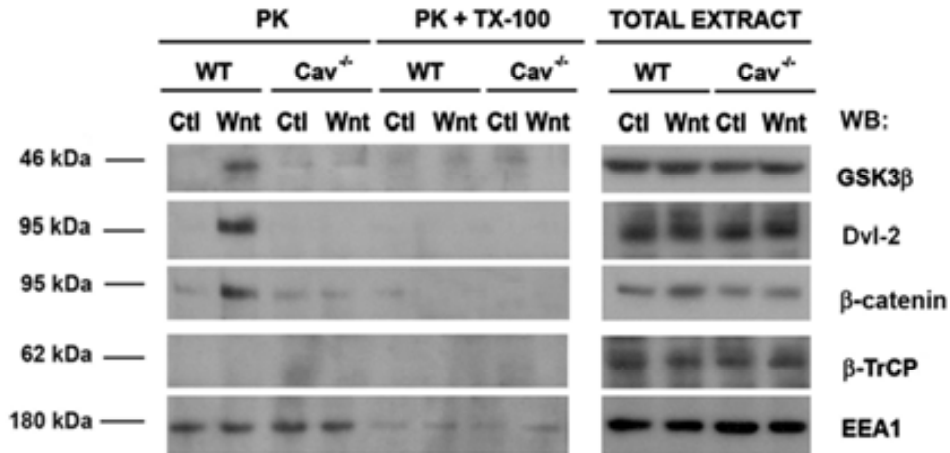


Figura 68: La caveolina és necessària per la internalització de GSK-3β en l'activació de la via de Wnt. Cèl·lules MEF WT o MEF KO Caveolina (Cav^{-/-}) van usar-se per un assaig de PDPK després de l'incubació durant 4 hores amb medi condicionat control (Ctl) o Wnt3a (Wnt). Els resultats es van observar mitjançant Western Blot.

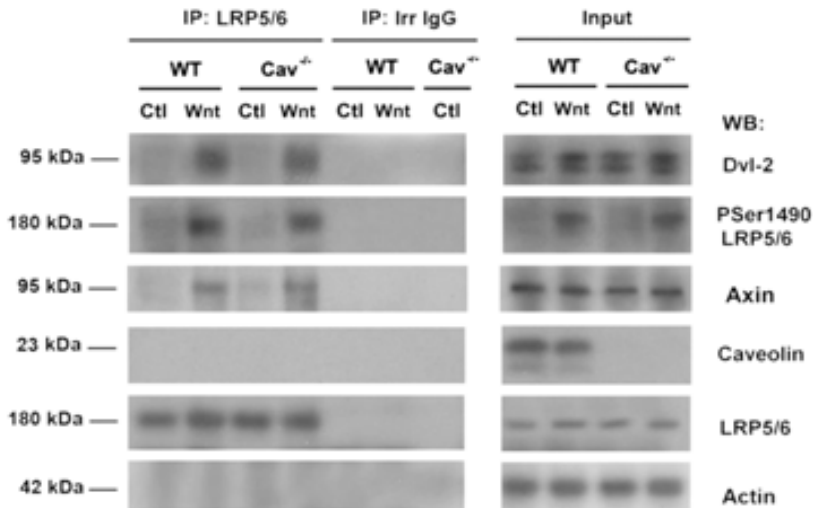


Figura 69: Les cèl·lules KO Caveolina promouen la formació del signalosoma en l'activació de Wnt. Es va immunoprecipitar LRP5/6 d'extractes cel·lulars de MEF WT (WT) o MEF KO Caveolina (Cav^{-/-}) lisats amb tampó de lisis Digitonina 1%. Les cèl·lules havien estat estimulades amb medi control (Ctl) o medi Wnt3a (Wnt) durant 30 minuts.

3.5.2 La caveolina s'uneix a l'LRP

A continuació es va comprovar si la caveolina s'uneix a l'LRP5/6 en Wnt. Tal i com es mostra a la Figura 70 en una immunoprecipitació de caveolina en cèl·lules MEF WT, el tractament de 2 hores de Wnt promou la formació del complex l'LRP5/6-Caveolina, tal i com s'havia descrit prèviament [182]. Com a control negatiu es van utilitzar les cèl·lules MEF KO Caveolina, on no s'observa unió d'LRP5/6 de forma inespecífica.

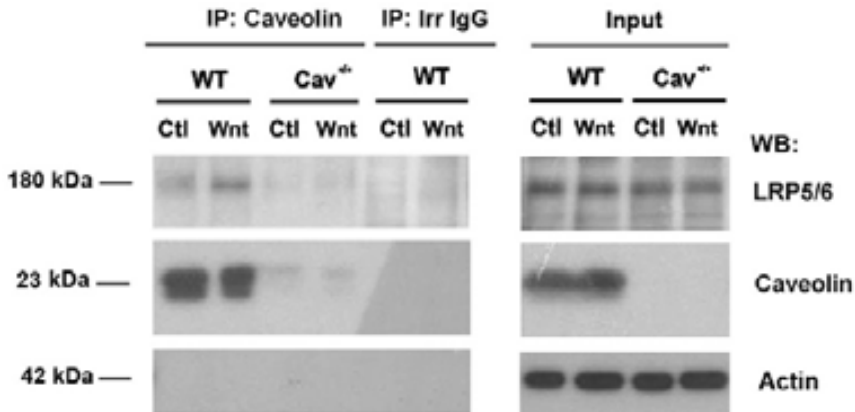


Figura 70: La caveolina s'uneix a l'LRP5/6. Es va immunoprecipitar Caveolina d'extractes cel·lulars de MEF WT (WT) o MEF KO Caveolina (Cav^{-/-}) lisats amb tampó de lisis Digitonina 1%. Les cèl·lules havien estat estimulades amb medi control (Ctl) o medi Wnt3a (Wnt) durant 2 hores.

3.5.3 El mutant Ser268,269A-p120-catenina no permet la formació del complex Caveolina-LRP5/6

Tenint en compte que la separació del complex N-cadherina-LRP5/6 i que la unió LRP5/6-Caveolina es produeix després del tractament de 2 hores amb medi Wnt, es va hipotetitzar que la separació de la Cadherina-LRP5/6 podria promoure la unió de la caveolina al correceptor de Wnt. Per comprovar-ho es va realitzar una IP de caveolina en cèl·lules MEF control o MEF deplecionades de p120-catenina, rescatades amb la construcció WT o amb el mutant Ser268, 269A que impedeix la separació del complex Cadherina-LRP5/6. La Figura 71 mostra que la Caveolina s'uneix a l'LRP5/6 en Wnt (Veure Carrils 1 i 2) i que aquesta unió no es produeix en cèl·lules deplecionades de p120-catenina (Veure Carrils 3 i 4). Quan es rescaten les cèl·lules shRNA p120-catenina amb la forma WT es rescata la unió LRP5/6-

Caveolina en Wnt (Veure Carrils 5 i 6), però aquest complex no es forma en sobreexpressar la forma de la p120-catenina Ser268,269A (Veure Carrils 7 i 8).

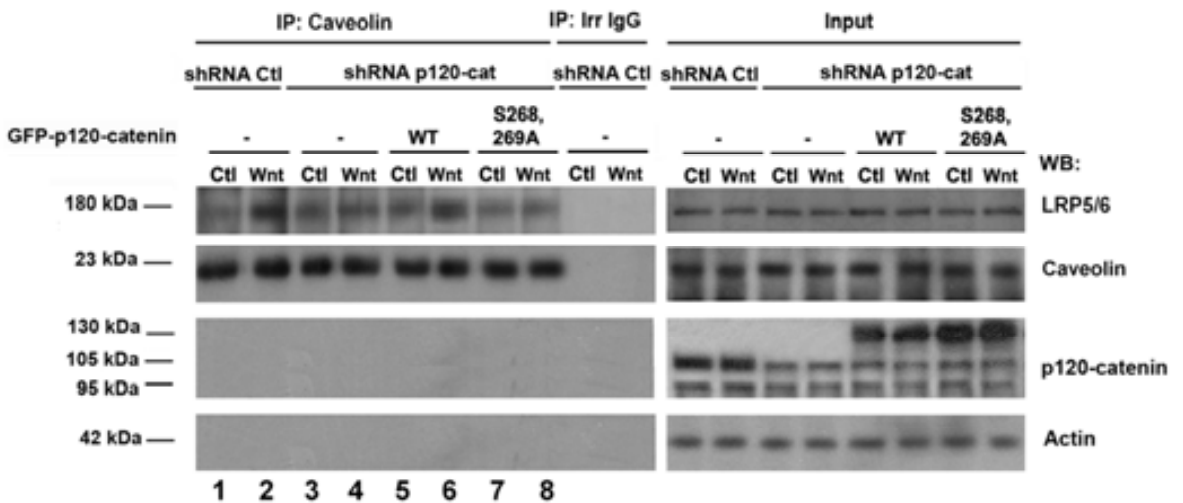


Figura 71: La sobreexpressió del mutant S268,269A no permet la formació del complex Caveolina-LRP5/6. Cèl·lules MEF prèviament interferides de forma estable amb l'shRNA Control (Ctl) o l'shRNA p120-catenina (shp120-cat) van ser transfectades amb la construcció GFP, GFP-p120-catenina (WT) o amb la construcció GFP-Ser268,269A-p120-catenina (S268,269A). Es van estimular les cèl·lules durant 2 hores amb medi control (Ctl) o medi condicionat Wnt3a (Wnt), es van lisar amb tampó lisi amb digitonina 1% i es va realitzar un assaig de coimmunoprecipitació de la Caveolina.

Aquests resultats suggereixen que la separació Cadherina-LRP5/6 seria necessària per la formació del complex Caveolina-LRP5/6.

3.6 La inhibició de la internalització de GSK-3 impedeix la total activació dels efectes tardans de la via de Wnt

3.6.1 La inhibició de la internalització de GSK-3 impedeix la completa estabilització de la β -catenina.

Finalment es van utilitzar els diferents mutants disponibles al laboratori que impedeixen la internalització de GSK-3, per avaluar la contribució d'aquest mecanisme en un dels efectes tardans de la via de Wnt, l'estabilització de β -catenina.

3.6.1.1 La inhibició de la internalització usant els mutants de la p120-catenina disminueix, però no elimina per complet, l'acumulació de β -catenina en l'activació de la via per Wnt3a o CA-LRP

Les cèl·lules HEK293T estableixen β -catenina en activar-se amb Wnt3a o amb el CA-LRP (Veure carrils 2 i 3 Figura 72). Quan s'interfereixen les cèl·lules de p120-catenina, la β -catenina no s'estabilitza després de l'estimulació amb Wnt3a però sí que s'acumula amb el CA-LRP (Veure carrils 5 i 6 i apartat 1.2.2 de *Resultats*). Quan es sobreexpressa la forma WT de la p120-catenina en cèl·lules shRNA p120-catenina, es rescaten els nivells de β -catenina en Wnt i en CA-LRP (Veure carrils 11 i 12). En canvi, la sobreexpressió del mutant S268,269A de p120-catenina promou l'acumulació de β -catenina, però aquests nivells d'estabilització són més baixos que els comparats amb el rescat usant p120-catenina WT (Veure carrils 17 i 18). Els resultats obtinguts del rescat de β -catenina amb el mutant S268,269A, són els mateixos usant tant el lligand Wnt com el CA-LRP. En ambdós casos s'inhibeix la internalització de la GSK-3 (Veure apartat 3.3.1.1 de *Resultats*).

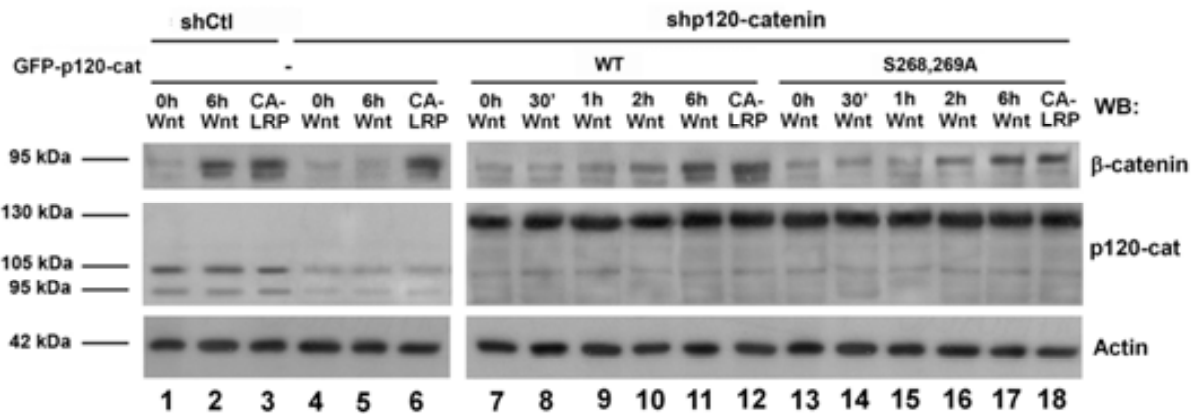


Figura 72: La sobreexpressió del mutant S268,269A en cèl·lules HEK293T shRNA p120-catenina disminueix però no elimina per complet l'acumulació de β -catenina en l'activació de la via per Wnt3a o CA-LRP. Cèl·lules HEK293T prèviament interferides amb l'shRNA Control (shCtl) o l'shRNA p120-catenina van ser transfectades amb la construcció GFP, GFP- p120-catenina (WT) o amb la construcció GFP-Ser268,269A-p120-catenina (S268,269A) i amb un plasmidi control o amb CA-LRP. Les cèl·lules van ser estimulades amb medi Wnt3a el temps indicat i a continuació es van lisar amb tampó lisis SDS 1%. L'acumulació de β -catenina es va analitzar per Western Blot.

Es va realitzar el mateix experiment rescatant els efectes de la depleció de p120-catenina amb la isoforma 4. Els resultats observats a la Figura 63 són similars als obtinguts amb el mutant S268,269A. El CA-LRP estabilitza la β -catenina en cèl·lules shRNA p120-catenina + isoforma 4 de la p120-catenina, però en menys quantitat que quan s'usa la forma WT. Tal i com s'ha comentat a l'apartat 3.3.1.2 de *Resultats*, els efectes del rescat amb la isoforma 4 de la p120-catenina només es poden observar utilitzant el CA-LRP, ja que el lligand Wnt no és capaç d'activar la via en aquesta situació.

La quantificació dels resultats de l'estabilització de la β -catenina utilitzant el mutant S268, 269A o la isoforma 4 de la p120-catenina en HEK293T estan representats en un gràfic de barres en la Figura 74.

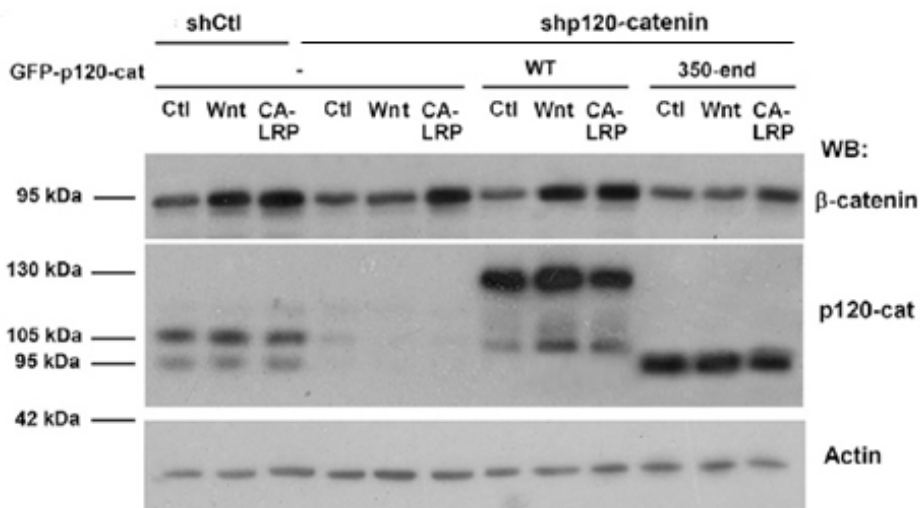


Figura 73: La sobreexpressió de la isoforma 4 de la p120-catenina en cèl·lules HEK293T shRNA p120-catenina disminueix però no elimina per complet l'acumulació de β -catenina en l'activació de la via per CA-LRP. Cèl·lules HEK293T prèviament interferides amb l'shRNA Control (shCtl) o l'shRNA p120-catenina van ser transfectades amb la construcció GFP, GFP- p120-catenina (WT) o amb la construcció GFP-Ser268,269A-p120-catenina (S268,269A) i amb un plasmidi control o amb CA-LRP. Les cèl·lules van ser estimulades amb medi control (Ctl) o medi Wnt3a (Wnt) durant 6 hores i a continuació es van lisar amb tampó lisis SDS 1%. L'acumulació de β -catenina es va analitzar per Western Blot.

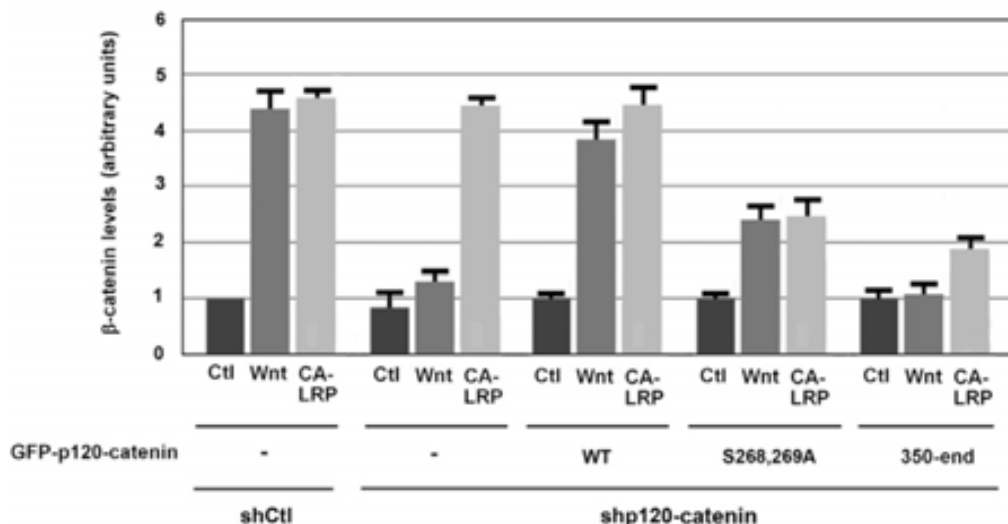


Figura 74: La inhibició de la internalització usant els mutants de la p120-catenina en cèl·lules HEK293T shRNA p120-catenina disminueix però no elimina per complet l'acumulació de β -catenina en l'activació de la via per Wnt3a o CA-LRP. Autoradiogrames de 4 experiments diferents realitzats en la Figura 72 i 73 van ser quantificats. La mitjana i la desviació estàndard van ser calculats en cada condició.

Aquests resultats es van validar utilitzant una línia cel·lular més epitelial i que respon també a l'activació de Wnt, les HeLa. Tal i com es mostra a la Figura 75, les cèl·lules HeLa shRNA p120-catenina rescatades amb el mutant S268,269A acumulen menys β -catenina en Wnt que les shRNA p120-catenina que expressen la p120-catenina WT.

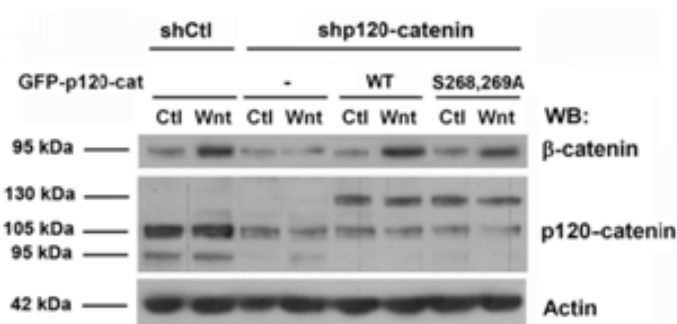


Figura 75: La sobreexpressió del mutant S268,269A en cèl·lules HeLa shRNA p120-catenina disminueix però no elimina per complet l'acumulació de β -catenina en l'activació de la via per Wnt3a. Cèl·lules HeLa interferides de forma estable amb l'shRNA Control (shCtl) o l'shRNA p120-catenina van ser transfectades amb la construcció GFP, GFP-p120-catenina (WT) o amb la construcció S268,269A de la p120-catenina i van ser estimulades amb medi Wnt3a durant 6 hores. A continuació es van lisar amb tampó lisis SDS 1% i l'acumulació de β -catenina es va analitzar per Western Blot.

3.6.1.2 La inhibició de la internalització utilitzant el mutant Ser-Ala de l'E-cadherina disminueix, però no elimina per complet, l'acumulació de β -catenina en l'activació de la via per Wnt3a o CA-LRP

Es va utilitzar l'altre mutant que també inhibeix la internalització de GSK-3, el Ser-Ala de l'E-cadherina, per mirar l'efecte d'aquesta inhibició en l'estabilització de β -catenina.

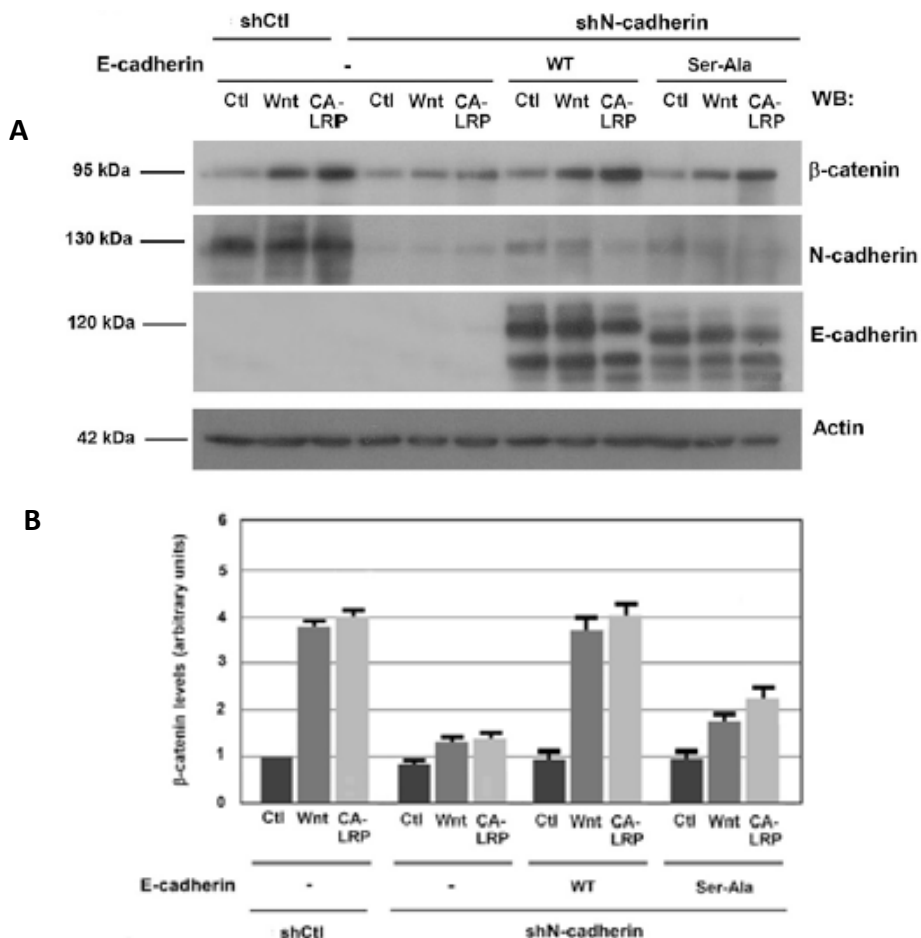


Figura 76: La sobreexpressió del mutant Ser-Ala en cèl·lules HEK293T shRNA N-cadherina disminueix però no elimina per complet l'acumulació de β -catenina en l'activació de la via. (A) Cèl·lules HEK293T prèviament interferides amb l'shRNA Control (shCtl) o l'shRNA N-cadherina van ser transfectades amb una construcció control, E-cadherina WT (WT), amb la construcció Ser-Ala de l'E-cadherina i amb un plasmidi control o CA-LRP quan s'indica. Aquestes cèl·lules van ser estimulades amb medi Wnt3a durant 6 hores. A continuació es van lisar amb tampó lisis SDS 1% i l'acumulació de β -catenina es va analitzar per Western Blot. (B) Autoradiogrames de 4 experiments diferents representats en (A) van ser quantificats. La mitjana i la desviació estàndard van ser calculats en cada condició.

En la Figura 76 s'observa que l'acumulació de β -catenina es rescata completament en cèl·lules deplecionades d'N-cadherina que expressen E-cadherina WT, però la β -catenina no s'estabilitza de forma total quan es transfecten les cèl·lules shRNA N-cadherina amb el mutant Ser-Ala. Aquests resultats són molt similars als obtinguts utilitzant els mutants de la p120-catenina que també impedeixen la internalització de GSK-3.

Finalment, també es van validar els resultats obtinguts amb el mutant Ser-Ala utilitzant cèl·lules HeLa. En aquest cas es van utilitzar cèl·lules interferides de forma estable amb E-cadherina, ja que aquestes cèl·lules expressen aquesta cadherina enlloc de l'N-cadherina. La Figura 77 mostra que els resultats obtinguts són similars als obtinguts amb les HEK293T. La sobreexpressió del mutant Ser-Ala juntament amb l'estimulació amb medi Wnt3a, disminueix però no elimina per complet l'acumulació de β -catenina, comparant-ho amb les cèl·lules activades per Wnt i que expressen E-cadherina WT.

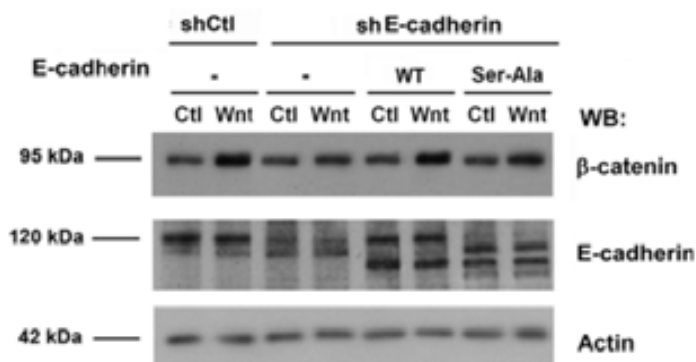


Figura 77: La sobreexpressió del mutant Ser-Ala en cèl·lules HeLa shRNA E-cadherina disminueix però no elimina per complet l'acumulació de β -catenina en l'activació de la via per Wnt3a. Cèl·lules HeLa interferides de forma estable amb l'shRNA Control (shCtl) o l'shRNA E-cadherina van ser transfectades amb una construcció control, E-cadherina WT (WT) o amb la construcció Ser-Ala de l'E-cadherina. Aquestes cèl·lules van ser estimulades amb medi Wnt3a durant 6 hores, es van lisar amb tampó lisis SDS 1% i l'acumulació de β -catenina es va analitzar per Western Blot.

En conjunt aquests resultats indiquen que la inhibició de la internalització de GSK-3 afecta l'acumulació de β -catenina al citosol, un efecte tardà de l'activació de la via de Wnt.

3.6.1.3 La inhibició de la internalització utilitzant les cèl·lules MEF KO Caveolina disminueix, però no elimina per complet, l'acumulació de β -catenina en l'activació de la via per Wnt3a

També es varen utilitzar cèl·lules MEF per l'estudi de l'acumulació de β -catenina. Tal i com es mostra a la Figura 78, la interferència de la p120-catenina impedeix l'estabilització de la β -catenina en Wnt, suggerint que les cèl·lules MEF activen la via de forma similar a les HEK293T i HeLa.

Tot seguit es va estudiar com s'estabilitza la β -catenina en cèl·lules MEF KO Caveolina. Tal i com s'ha comentat a l'apartat 3.5.1 de *Resultats*, aquestes cèl·lules no internalitzen la GSK-3 dins de MVBs, tot i que els efectes inicials de la via de Wnt sí que es produeixen. A la Figura 79 s'observa que les cèl·lules completament deplecionades de Caveolina i estimulades amb Wnt3a presenten acumulació de β -catenina, tot i que els nivells són més baixos que els obtinguts després d'activar la via amb el lligand Wnt en les cèl·lules MEF WT.

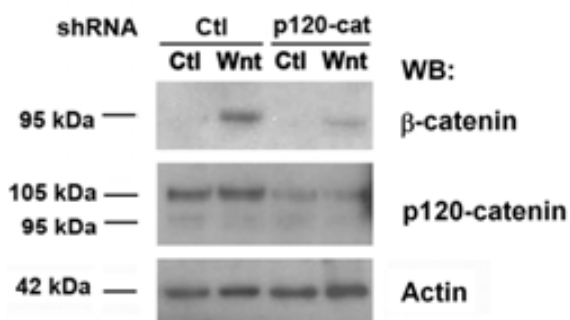


Figura 78: La p120-catenina és necessària per activar la via de Wnt en les cèl·lules MEF. Les cèl·lules MEF van ser transfectades de forma estable amb shRNA específic per la p120-catenina (p120-cat) i posteriorment van ser estimulades amb medi control (Ctl) o medi Wnt3a (Wnt) durant 6 hores. L'acumulació de β -catenina es va analitzar per Western Blot després de la lisi cel·lular amb tampó SDS 1%.

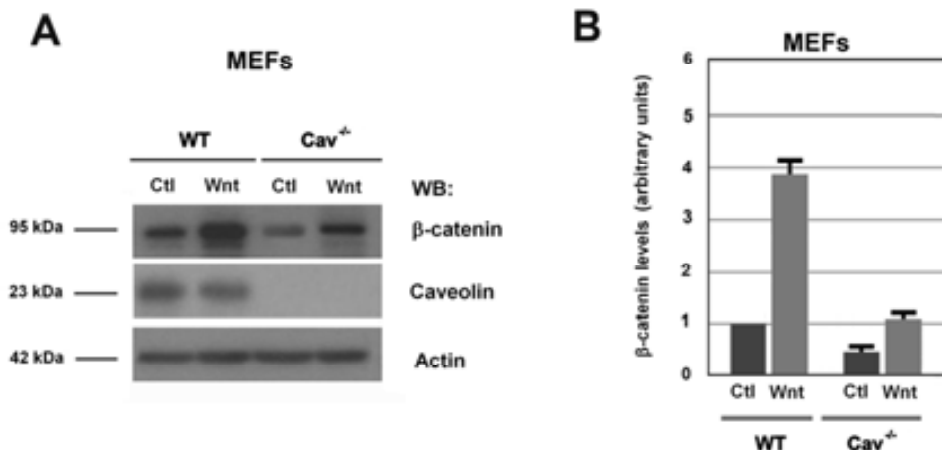


Figura 79: La caveolina és necessària per la completa estabilització de la β -catenina en l'activació de la via de Wnt. (A) Cèl·lules MEF WT (WT) o MEF KO Caveolina (Cav^{-/-}) van ser estimulades amb medi Wnt3a durant 6 hores. A continuació es van lisar amb tampó lisis SDS 1% i l'acumulació de β -catenina es va analitzar per Western Blot. (B) Autoradiogrames de 4 experiments diferents representats en (A) van ser quantificats. La mitjana i la desviació estàndard van ser calculats en cada condició.

3.6.2 La internalització de GSK-3 és necessària per la total activació transcripcional de la β -catenina i per a l'activació de gens diana de Wnt

Després d'avaluar la contribució de la internalització de GSK-3 en l'estabilització de la β -catenina, es va analitzar els efectes d'aquest mecanisme en l'activitat transcripcional de la β -catenina mitjançant la utilització del plasmidi TOP-Flash.

En la Figura 80A s'observa que tal i com està descrit prèviament [31], la depleció de p120-catenina no augmenta l'activitat transcripcional del complex β -catenina/TCF-4 que sí que s'observa en cèl·lules tractades amb Wnt3a. La sobreexpressió de la forma WT de p120-catenina augmenta l'activitat transcripcional de la β -catenina en Wnt3a, mentre que les cèl·lules que expressen la p120-catenina S268,269A activen el TOP a nivells similars al de les cèl·lules shRNA p120-catenina. Aquests resultats s'expliquen perquè aquest mutant impedeix la internalització de la GSK-3, però també perquè en inhibir-se la separació de p120-catenina de l'N-cadherina, la p120-catenina no pot activar els esdeveniments més tardans de la via de Wnt necessaris per l'activitat transcripcional de la β -catenina (Veure Capítol 1 *Resultats*).

En la mateixa Figura 80A també s'observa que l'activació de Wnt en cèl·lules deplecionades d'N-cadherina i que expressen el mutant Ser-Ala, fa augmentar els

nivells d'activitat transcripcional de β -catenina, tot i que aquests no són tan alts com els de la forma E-cadherina WT. A diferència del que succeeix amb el mutant de la p120-catenina S268,269A, el mutant Ser-Ala impedeix la internalització de la GSK-3, però aquest mutant sí que permet la separació del complex p120-catenina-N-cadherina, així que els esdeveniments més tardans de la via com l'entrada al nucli de la β -catenina o la separació del repressor Kaiso de TCF-4 es podran realitzar.

En la Figura 80B es va investigar l'activitat transcripcional de la β -catenina/TCF-4, en cèl·lules MEF KO de Caveolina tractades amb Wnt. Els resultats són similars als observats utilitzant el mutant de l'E-cadherina Ser-Ala. Bàsicament, les cèl·lules MEF KO Caveolina tractades amb Wnt presenten més activitat transcripcional de β -catenina que les cèl·lules no tractades, però aquesta és més baixa que l'activitat de les cèl·lules MEF WT estimulades amb Wnt.

Resultats similars van ser observats en analitzar els nivells transcripcionals d'alguns gens diana de la via de Wnt. Es van analitzar els gens *AXIN1* i *CCND1* en les cèl·lules HEK293T i els gens *Ephb3* i *Tcf7* en les cèl·lules MEF. Els resultats de la Figura 81A indiquen que la sobreexpressió del mutant Ser-Ala en cèl·lules shRNA N-cadherina i estimulades amb Wnt, activa la transcripció de gens diana de la via de Wnt, però en menor mesura que en la comparació amb les cèl·lules control. A més, la Figura 81B mostra en les cèl·lules MEFs, que la Caveolina és necessària per la total activació transcripcional dels gens diana de Wnt.

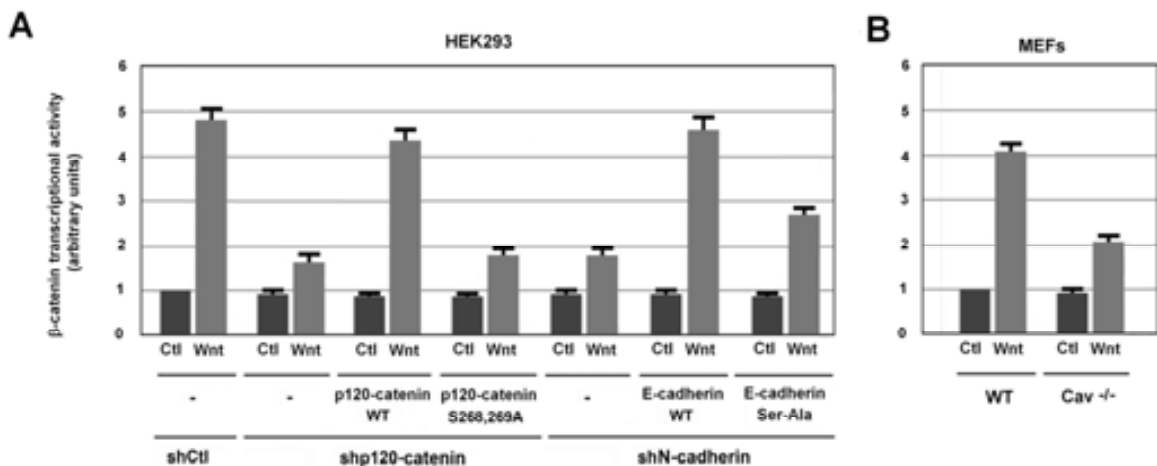


Figura 80: La internalització de la GSK-3 és necessària per la total activació transcripcional de β -catenina. (A) Cèl·lules HEK293T interferides de l'shRNA p120-catenina o l'shRNA N-cadherina van ser transfectades amb el plasmidi TOP-Flash i el plasmidi RK-Renilla, a més d'amb una construcció control, GFP-p120-catenina, p120-catenina S268,269A, E-cadherina WT (WT), o E-cadherina Ser-Ala de l'E-cadherina. Aquestes cèl·lules van ser estimulades amb medi control (Ctl) o medi Wnt3a (Wnt) durant 16 hores. A continuació es va analitzar l'activitat transcripcional de la β -catenina tal i com s'indica a *Materials i Mètodes*. (B) Cèl·lules MEF WT o MEF KO Caveolina (Cav^{-/-}) van ser transfectades amb el plasmidi TOP-Flash i el plasmidi RK-Renilla. Les cèl·lules van ser estimulades amb medi control (Ctl) o medi Wnt3a (Wnt) durant 16 hores i es va procedir com en l'apartat A.

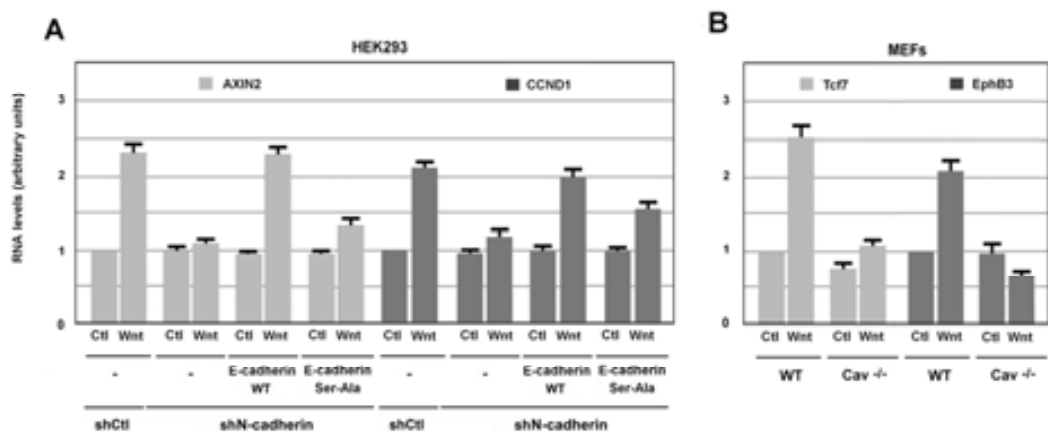


Figura 81: La internalització de la GSK-3 és necessària per a la total expressió transcripcional dels gens diana de la via de Wnt (A) Cèl·lules HEK293T shRNA N-cadherina transfectades amb una construcció control, E-cadherina WT (WT), o E-cadherina Ser-Ala de l'E-cadherina, i cèl·lules MEF WT o MEF KO Caveolina (Cav^{-/-}) (B); van ser estimulades amb medi control (Ctl) o medi Wnt3a (Wnt) durant 16 hores. Es va aïllar l'RNA i es va analitzar l'expressió dels gens *AXIN2* i *CCND1*, *Ephb3* i *Tcf7* mitjançant RT-PCR quantitativa.

DISCUSSIÓ

1 La subunitat reguladora PR61 ϵ de la PP2A activa la CK1 ϵ en la via canònica de Wnt

La via de senyalització Wnt/ β -catenina ha estat àmpliament analitzada pel seu paper en diferents processos com la proliferació o la regulació de l'homeòstasi cel·lular, però sobretot per la seva implicació en el desenvolupament del càncer [75]. Les proteïnes de membrana Fz i LRP5/6 són crucials per l'activació d'aquesta via i actuen com a receptor i correceptor respectivament, iniciant la senyalització a partir de la unió amb el lligand Wnt i la posterior formació del signalosoma [101], [117]. Aquestes proteïnes, a més, estan associades a d'altres que regulen la capacitat d'activació d'aquesta via. Un exemple és l'associació del receptor i marcador de cèl·lules mare LGR5 amb el correceptor LRP5/6 en determinats llocs com a les criptes del colon o en el fol·licle capil·lar. L'LGR5 quan s'uneix amb el seu lligand R-spondin actua augmentant la senyalització de Wnt [173], [192].

Al nostre laboratori i a un altre grup, s'ha descrit que el complex receptor de Wnt també està directament associat a les proteïnes de les unions adherents [30], [31]. Tal i com s'ha comentat a la *Introducció*, el correceptor LRP5/6 es troba unit directament a la Cadherina de les cèl·lules i amb la p120-catenina i la β -catenina a través d'aquesta [31]. La p120-catenina juntament amb la quinasa CK1 ϵ són necessàries per activar la via, ja que la seva depleció impedeix activar la senyal de Wnt. En el mateix treball també s'ha descrit que la cadherina és necessària per a aquesta activació [31].

Així doncs, la senyalització de la via de Wnt requereix de l'activació de la quinasa serina/treonina CK1 ϵ [31], [32]. Aquesta quinasa, juntament amb les isoformes de la mateixa família α i γ , promou la fosforilació de l'LRP5/6 necessària per la transducció del senyal de Wnt, i també fomenta la desestabilització del complex de degradació de la β -catenina reduint l'associació de la PP2A en aquest complex [105], [150]. A més, la quinasa CK1 ϵ està involucrada en els inicis de la via de Wnt. Després de la unió del lligand Wnt3a als receptors Fz i LRP5/6, la CK1 ϵ s'activa i fosforila la proteïna Dvl-2 promovent l'activació de la via [112], [145], [193]. El paper d'aquesta fosforilació encara no està del tot definit [113]. Un estudi suggereix que aquesta facilitaria la unió amb el cofactor Frat afavorint l'estabilització de la β -catenina [119].

Els resultats del nostre laboratori mostren que la depleció de la quinasa CK1 ϵ inhibeix la fosforilació de Dvl-2 i impedeix que aquest s'associï al correceptor l'LRP5/6 per formar el signalosoma (Figura 26 i [32]). Aquestes dades proposen que la fosforilació de Dvl-2 per CK1 ϵ seria necessària perquè es produís el reclutament, àmpliament descrit, de Dvl-2 cap al receptor Fz [101], [117]. Podria ser que la fosforilació de la proteïna augmentés l'afinitat de Dvl-2 per Fz, ja que s'ha demostrat que aquesta associació és dèbil [194]. La fosforilació de Dvl-2 també podria promoure la unió directa d'aquesta proteïna amb l'LRP5/6, enfortint l'afinitat del complex Fz-LRP5/6-Dvl-2. La depleció de la CK1 α , a més, no inhibeix aquests efectes [32], suggerint que la isoforma CK1 ϵ realitza aquestes funcions de forma específica.

Dvl-2 és un substrat de diferents quinases i es fosforila per CK1 δ , CK2 i PAR-1, a més de per CK1 ϵ , durant l'activació canònica de Wnt [193]. Per a poder observar la fosforilació de Dvl-2 per CK1 ϵ , hem analitzat l'aparició d'un *shift* en la mobilitat de la proteïna quan es realitza una electroforesi, ja que s'ha descrit que aquest *shift* es mostra quan es fosforila Dvl-2 amb CK1 i quan s'activa la via de Wnt [195], [196]. Recentment, però, s'ha publicat que la fosforilació dels residus que creen el *shift* inhibeix la senyalització canònica de Wnt [113]. Els resultats d'aquest treball coincideixen amb estudis realitzats per un altre grup que afegeixen que l'activació de la CK1 ϵ en Wnt té una funció dual com a activadora i com a repressora de la via de Wnt. Per una banda la CK1 ϵ fosforila les serines 280 i 311 del domini PDZ i activa la via de Wnt i l'activitat transcripcional de la β -catenina [197], [198]. Tenint en compte que el domini PDZ és el que s'uneix a Fz, aquesta fosforilació podria ser la que afavorís la interacció Fz-Dvl-2 que s'observa en els nostres resultats. Per altra banda, la CK1 ϵ també fosforila residus de la regió C-terminal de Dvl-2, que són els implicats amb l'aparició del *shift* de Dvl-2. Aquesta fosforilació disminueix l'homopolimerització de Dvl-2 necessària per a l'activació de la via, i actua inhibint Wnt com a sistema de *feed-back* negatiu [113], [197], [198]. Per tant, tot i que el *shift* observat en Dvl-2 és indicador d'inhibició en Wnt/ β -catenina, nosaltres hem utilitzat la visualització d'aquest com a marcador de l'activació de la CK1 ϵ i de la fosforilació del seu substrat Dvl-2 en els diferents residus.

La CK1 ϵ , a diferència de les isoformes α i γ , presenta un domini en C-terminal que s'autofosforila i inhibeix el domini quinasa de la pròpia proteïna. Per tant, la CK1 ϵ requereix d'una fosfatasa que la defosforili i l'activi en estimular-se les cèl·lules

amb el lligand Wnt [146], [147]. Tal i com s'ha comentat a l'apartat *Introducció*, no està publicat quina fosfatasa defosforilaria la CK1 ϵ , tot i que s'ha descrit que inhibidors de la PP1, PP2A i PP2B bloquegen l'activació de la quinasa quan s'activa Wnt [154]. A més, diferents estudis mostren que la PP2A realitza diverses funcions en la via de Wnt/ β -catenina [157].

Els nostres resultats indiquen que la PP2A és necessària per l'activació de la CK1 ϵ després de l'estimulació amb el lligand Wnt. S'ha demostrat que la inhibició o depleció de la subunitat catalítica de la fosfatasa impedeix la fosforilació del seu substrat Dvl-2 i el reclutament d'aquest cap als receptors (Figura 27 i 28). A més, també es mostra que aquesta subunitat catalítica es requereix perquè la CK1 ϵ augmenti la seva activitat després de l'estimulació amb el lligand Wnt3a, i d'aquesta manera pugui fosforilar la p120-catenina (Figura 29 i 30).

Així doncs, en aquest treball proposem que l'activació de la CK1 ϵ que s'observa en Wnt, és deguda a la defosforilació de l'extrem inhibitori de la quinasa per la PP2A. Aquesta fosfatasa activaria la quinasa juntament amb altres factors al·lostèrics que també serien requerits. Recentment s'ha descrit que l'helicasa d'RNA DDX3 s'uneix directament a la CK1 ϵ i l'activa [155]. En aquest mateix treball també es mostra que la DDX3 és necessària per a l'activació de la quinasa, però que l'activació és molt major en un mutant de la CK1 ϵ que no presenta la cua autoinhibitòria, confirmant els nostres resultats (Figura 82B).

La PP2A és un holoenzim format per tres components diferents. A part de la subunitat catalítica, el formen la subunitat estructural i la subunitat reguladora [157]. Aquesta última és la que confereix l'especificitat de la fosfatasa, i tal com s'ha comentat a la introducció, en humans hi ha fins a 26 variants diferents d'aquesta subunitat classificades en 4 famílies [161]. A partir d'un cribatge utilitzant les isoformes α , β i ϵ de la família PR61, hem demostrat per primera vegada que la subunitat reguladora PR61 ϵ està implicada en l'activació de CK1 ϵ (Figura 32). En les cèl·lules shRNA PR61 ϵ no s'observa el *shift* de Dvl-2 després de l'activació de la via de Wnt i aquest no es recluta als receptors de la via, similar al que succeeix en les cèl·lules deplecionades de PP2Ac (Figura 33). A més, la PR61 ϵ és necessària perquè la CK1 ϵ s'activi com a resposta de l'estimulació amb medi condicionat Wnt3a i pugui fosforilar la p120-catenina (Figura 34).

Es va realitzar el cribatge utilitzant les proteïnes de la família PR61, perquè s'havia descrit prèviament que aquesta família està involucrada en la senyalització de Wnt. Diversos treballs proposen que les isoformes de la família PR61 actuen a nivell del complex de degradació de la β -catenina inhibint la via de Wnt [95], [162]. Per altra banda, també s'han publicat resultats obtinguts de Yang i col·laboradors que demostren en *Xenopus* que la PR61 ϵ actuaria de forma positiva en Wnt, per sobre de Dvl-2 i promovent l'estabilització de la β -catenina [163], [199]. Aquests últims resultats juntament amb els que s'han obtingut en aquest treball serien contradictoris amb els que proposen que les diferents isoformes de la PR61, inclosa la PR61 ϵ , inhibirien la via de Wnt. La diferència es podria explicar pel fet de que en els primers articles es sobreexpressen les isoformes de la PR61, al contrari del que es realitza en els nostres experiments i en els de Yang i col·laboradors on es deplecionen les fosfatases (Figura 32 i [163]). Tenint en compte que les subunitats α i δ sí que inhibeixen la via de Wnt [157], el fet de tenir nivells molt més elevats que els fisiològics després de la sobreexpressió de la PR61 ϵ , podria promoure que aquesta subunitat actués com les altres a nivell del complex de degradació.

La CK1 ϵ juntament amb la p120-catenina, també són essencials per la formació del signalosoma i la posterior acumulació de β -catenina que activa el senyal de Wnt [31], [32]. Per tant la fosfatasa PP2A PR61 ϵ que defosforila la quinasa també és necessària per permetre la senyalització de la via. A la Figura 27 es mostra que la inhibició de la PP2Ac impedeix la formació del signalosoma: l'LRP5/6 no es fosforila i les proteïnes Dvl-2, Axina i CK1 γ no s'uneixen als receptors de la via. Quan s'utilitzen les cèl·lules deplecionades de PR61 ϵ també s'observa que el correceptor no es fosforila en els dominis PPSPxS i que el Dvl-2 no s'uneix als receptors de Wnt (Figura 33).

A nivell més tardà, les cèl·lules deplecionades de PR61 ϵ no estableixen la β -catenina en resposta a l'activació de la via de Wnt (Figura 35). La β -catenina d'aquestes cèl·lules tampoc es transloca al nucli i presenta una reducció de l'activitat transcripcional quan es compara amb les cèl·lules control (Figura 36-38). A més, les cèl·lules shRNA PR61 ϵ no activen l'expressió de gens diana de la via de Wnt (Figura 39). Aquests resultats demostren que la PP2A PR61 ϵ és necessària per l'activació dels inicis de la via de Wnt, i que la depleció d'aquesta impedeix que l'element clau de la via, la β -catenina, s'estabilitzi i promogui el seu efecte a nivell transcripcional.

També s'ha usat el mutant CA-LRP que no requereix de la CK1 ϵ per formar el signalosoma i activar la via de Wnt (Capítol 1 *Resultats*); per demostrar que els efectes de la PR61 ϵ es produeixen a nivell de l'activació de la CK1 ϵ i fosforilació de Dvl-2. Les Figures 35, 36 i 39 mostren que les cèl·lules shRNA PR61 ϵ activades amb el CA-LRP estableixen la β -catenina igual que les cèl·lules control, i que aquesta es transloca al nucli i activa l'expressió de gens diana de la via. Aquests resultats confirmen que la PR61 ϵ exerceix la seva funció en l'activació inicial de la via de Wnt, ja que el CA-LRP pot activar la via i rescatar l'estabilització de la β -catenina en cèl·lules deplecionades de PR61 ϵ sense requerir de la subunitat reguladora. Tots aquests experiments s'han realitzat utilitzant cèl·lules interferents de PR61 ϵ i no s'han usat cèl·lules deplecionades de PP2Ac perquè aquesta fosfatasa realitza altres funcions a la via de Wnt, la majoria inhibint aquesta senyalització. De fet, la utilització de l'àcid okadaic (un inhibidor específic de la PP2A a determinades concentracions) estableix la β -catenina quan s'afegeix a les cèl·lules [95].

Finalment, el requeriment de la PR61 ϵ també s'ha analitzat en un model més funcional: en el pas de les MSC a adipòcits, procés conegut com a adipogènesi. S'ha descrit que la via canònica de Wnt impedeix el pas de MSC a adipòcits madurs, inhibint la diferenciació [180], [181]. S'ha aprofitat aquesta funció de la via per estudiar l'efecte de la PR61 ϵ en la via de Wnt/ β -catenina. Després de deplecionar les MSC de PR61 ϵ i haver posat aquestes cèl·lules a diferenciar en medi Wnt, s'ha pogut observar que a diferència de les cèl·lules no interferents, les shRNA PR61 ϵ promouen el pas de les MSC a adipòcits madurs (Figura 40). Aquests resultats confirmen el requeriment de la fosfatasa PP2A PR61 ϵ en la via de Wnt, ja que la inhibició de la proteïna promou l'adipogènesi, l'efecte contrari del que provoca l'estimulació amb Wnt3a.

En global tots aquests experiments demostren que la PR61 ϵ és necessària per l'activació de la CK1 ϵ i per veure els efectes de la senyalització de la via de Wnt/ β -catenina (Figura 82). Tenint en compte que la fosforilació de Dvl-2 i el reclutament d'aquest a Fz és un element comú tant en la via canònica com en la no canònica de Wnt [113], seria interessant en un futur estudiar el paper de la CK1 ϵ en l'activació d'aquesta última, i analitzar si també es regula per PP2A PR61 ϵ . S'han presentat evidències de que una subunitat reguladora de la família PR61 en *Drosophila* facilita l'activació de la via *planar cell polarity* a nivell de la proteïna Dvl-2 [200],

suggerint que la PR61 ϵ també podria tenir un paper destacat en la regulació de la via no canònica de Wnt.

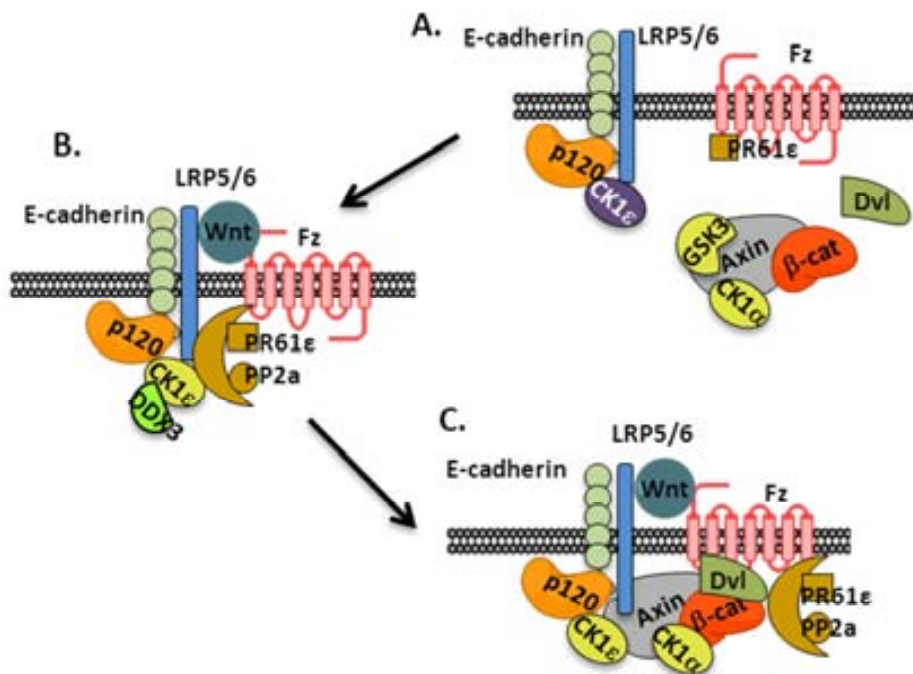


Figura 82: La subunitat reguladora PR61 ϵ de la PP2a activa la CK1 ϵ en la via canònica de Wnt. (A) La subunitat reguladora PR61 ϵ de la PP2a està associada al receptor Fz de la via de Wnt en cèl·lules no estimulades. La cadherina, la p120-catenina i la CK1 ϵ inhibida per la seva fosforilació en C-terminal (marcada en lila) estan unides al correceptor de la via, l'LRP5/6. (B) La unió del lligand Wnt associa Fz amb l'LRP5/6 i promou que la PR61 ϵ unida a la subunitat catalítica de la PP2a defosforili la regió C-terminal de la CK1 ϵ i activi la quinasa (marcada en groc). L'helicasa DDX3 també s'associa a la CK1 ϵ i en promou l'activació. (C) L'activació de la CK1 ϵ facilita la fosforilació de Dvl-2 i el reclutament d'aquest cap a Fz. L'Axina també es recluta com a conseqüència de la fosforilació del correceptor LRP5/6.

Per altra banda, a part de demostrar que la PR61 ϵ activa la CK1 ϵ en Wnt, en aquest treball també es mostra que aquesta subunitat reguladora està unida al receptor Fz en la situació control, i que s'associa amb el correceptor LRP5/6 després de l'estimulació amb el lligand Wnt (Figura 41, 42, 82). Així doncs, s'explica perquè l'associació del receptor Fz amb l'LRP5/6 després de la unió del lligand Wnt, permet la ràpida activació de la CK1 ϵ i la fosforilació del seu substrat Dvl-2 [32].

Mitjançant l'associació amb l'LRP5/6, la fosfatasa podrà activar la CK1 ϵ que es troba formant un complex amb el correceptor, juntament amb la cadherina i la p120-catenina [31].

Tot i que s'ha descrit a quines proteïnes està unida la PR61 ϵ després de l'activació de Wnt, no s'ha pogut determinar el mateix amb la subunitat catalítica de la PP2A. Aquesta proteïna només s'ha trobat associada amb l'Axina del complex de degradació, tal i com s'havia descrit prèviament [190], però no apareix unida ni amb Fz ni amb l'LRP5/6. Aquest resultat es podria explicar tenint en compte que la subunitat reguladora és la que s'uneix directament al substrat [157]. Com que la subunitat catalítica s'associa a la proteïna que es defosforila a través de la subunitat reguladora, és més difícil tècnicament demostrar la connexió de la PP2Ac amb el substrat. A més la unió subunitat reguladora-catalítica no és constant, sinó que es regula per la fosforilació de la part catalítica [161]. En concret la fosforilació en la Tyr 307 de la subunitat catalítica impedeix que aquesta s'associï amb les subunitats reguladores α , β , ϵ [160], [201]. Podria ser que en les cèl·lules no estimulades de Wnt la PR61 ϵ estigués unida a Fz, però no a la PP2Ac. La unió del lligand amb els receptors defosforilaria la subunitat catalítica fomentant l'associació d'aquesta amb la PR61 ϵ i l'activació de la quinasa CK1 ϵ (Figura 82).

2 El mutant CA-LRP diferencia efectes inicials i tardans de p120-catenina en la via canònica de Wnt

Per a l'estudi de la via canònica de Wnt s'han utilitzat diferents eines per activar la senyalització, com el tractament de les cèl·lules amb medi condicionat Wnt3a, la transfecció cel·lular de plasmidis per la sobreexpressió del lligand Wnt3a o l'expressió de mutants que activen la via de forma constitutiva. El CA-LRP és un exemple de proteïna que promou l'activació de la via de Wnt canònica després de la seva sobreexpressió [106], [202].

El mutant CA-LRP conté la part transmembrana i intracel·lular del correceptor de la via LRP5/6 i li manca tota la regió extracel·lular. La seva sobreexpressió activa la via de Wnt, a diferència del que succeeix quan s'expressa l'LRP5/6 *wild type* [103], [106]. En aquest treball s'ha estudiat com activa aquesta via el mutant i s'ha comparat amb la senyalització de quan es tracten les cèl·lules amb el lligand Wnt3a.

En concordança amb altres estudis, s'ha observat que l'estimulació de cèl·lules tant amb el lligand Wnt3a com amb el CA-LRP provoca l'estabilització de la β -catenina, i la seva translocació nuclear que dota la proteïna d'activitat transcripcional (Figura 19, 20 i [31], [106], [202]). Els nostres resultats, a més, afegeixen que l'inici de l'activació de la via també es produeix de forma similar utilitzant les dues eines. Proteïnes com Dvl-2, Axina, CK1 α i GSK-3 es recluten al correceptor LRP5/6 endogen i aquest es fosforila en la Thr1479, i en la Ser1490 promovent un major reclutament d'Axina (Figura 13B i 17). Un cop la CK1 α ha estat reclutada, aquesta fosforila la p120-catenina i la cadherina i promou la separació de les dues proteïnes del correceptor (Figura 18).

En aquest treball també s'ha demostrat que la p120-catenina i la quinasa CK1 ϵ que porta associada, no són necessàries per l'activació dels efectes inicials de la via canònica quan s'usa el CA-LRP (Figura 21 i 22), en contraposició als resultats previs obtinguts usant el lligand Wnt [32].

Per altra banda, s'ha demostrat que la p120-catenina, al contrari que la CK1 ϵ , sí que és necessària per l'activació de l'activitat transcripcional de β -catenina quan s'activa la via amb el CA-LRP. La p120-catenina és requerida per l'activació de la GTPasa Rac1 que permet la translocació al nucli de la β -catenina (Figura 24 i 25) i per extreure el repressor Kaiso de TCF-4 quan s'activa la via amb el CA-LRP (Figura 23). Aquests resultats concorden amb el que s'havia descrit prèviament al laboratori utilitzant el lligand Wnt i requereixen de la separació de la p120-catenina de la Cadherina ([35], [61] i veure *Introducció*).

També s'ha observat que la sobreexpressió del mutant CA-LRP promou que aquest s'associï a l'LRP endogen juntament amb Dvl-2 i Axina tot formant un complex (Figura 50). A més, un altre grup ha descrit que el mutant CA-LRP presenta la serina 1490 i la treonina 1479 del domini intracel·lular fosforilades de forma constitutiva [109].

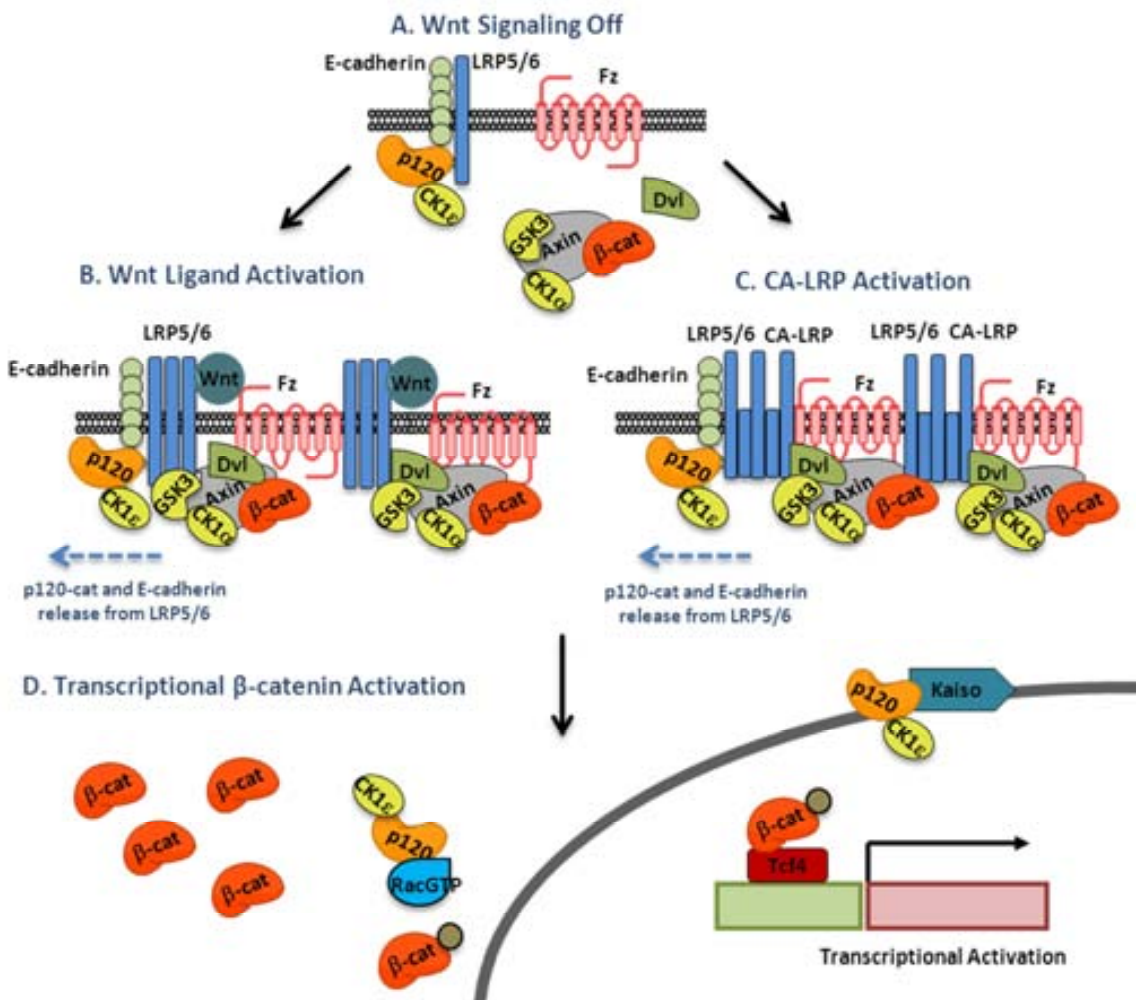


Figura 83: Model de formació del signalosoma en activar la via amb el lligand Wnt o amb el CA-LRP. (A) En cèl·lules que no estan actives, la cadherina i el complex p120-catenina-CK1ε estan units a l'LRP5/6. (B) L'estimulació amb el lligand Wnt promou l'associació de Fz i l'LRP5/6 i l'activació de CK1ε que facilita la formació del complex Fz-LRP5/6-Dvl-2, i el reclutament d'Axina unida a CK1α i a GSK-3. Posteriorment, la CK1α fosforila la p120-catenina i la cadherina i les separa del correceptor LRP5/6. (C) El CA-LRP s'uneix directament a l'LRP endogen formant un agrupament lateral de receptors i promovent la formació d'un gran complex amb Fz i Dvl que no requereix del lligand Wnt ni del complex p120-catenina-CK1ε. L'LRP5/6 endogen es fosforila en els motius PPSPxS i permet la unió amb l'Axina associada a GSK-3 i a CK1α. En aquesta situació la CK1α també fosforila la p120-catenina i la cadherina i les separa del correceptor LRP5/6. (D) La p120-catenina alliberada de la membrana després de l'activació per Wnt o pel CA-LRP afavoreix l'activació transcripcional de la β-catenina, fomentant la translocació nuclear de la proteïna a través de l'activació de Rac1, i extraient el repressor Kaiso de TCF-4.

A partir d'aquí proposem un model d'activació de la via de Wnt dependent del correceptor LRP5/6. La regió extracel·lular del correceptor actuaria inhibint la fosforilació de la regió intracel·lular del mateix LRP5/6, juntament amb el que es proposa en altres estudis [105]. Es requereix la unió del lligand Wnt3a perquè Fz s'uneixi a l'LRP5/6 i en conseqüència la CK1 ϵ s'activi i faciliti la formació del complex Fz-LRP-Dvl, que permetrà la fosforilació de l'LRP5/6 i l'activació de la via (Figura 83B). En canvi, quan es sobreexpressa el CA-LRP aquest s'uneix directament a l'LRP endogen formant un agrupament lateral de receptors i promovent la formació d'un gran complex amb Fz i Dvl-2 que no requereix del lligand Wnt. L'LRP5/6 es fosforila en els motius PPSpXS sense que prèviament es necessiti la fosforilació de Dvl-2 per la quinasa del complex p120-catenina-CK1 ϵ , segurament perquè el CA-LRP ja agrupa el complex. Això permetria la formació del signalosoma que reclutaria també l'Axina juntament amb la GSK-3 i la CK1 α , necessàries per la senyalització de Wnt (Figura 83C).

Aquests resultats evidencien que la p120-catenina és essencial en la via de Wnt, i mostren els diferents papers de p120-catenina en aquesta activació. Per una banda aquesta proteïna està associada a la quinasa CK1 ϵ i promou el reclutament de Dvl-2 a l'LRP5/6 i la formació del complex del signalosoma. Aquest efecte no és necessari quan s'activa la via amb el mutant CA-LRP, ja que aquest indueix l'agrupament lateral de receptors LRP5/6 independentment de la unió del lligand Wnt i sense requerir la fosforilació prèvia de Dvl-2 per la CK1 ϵ .

Per altra banda, la fracció de p120-catenina alliberada de la cadherina és necessària en etapes posteriors de la via per l'activitat transcripcional del complex β -catenina/TCF-4. La p120-catenina és requerida per la translocació al nucli de la β -catenina i per la separació del repressor Kaiso de TCF-4, tant si la via s'activa amb el lligand Wnt com amb el CA-LRP (Figura 83D). Aquests efectes tardans, a més, serien independents de la funció de la quinasa CK1 ϵ , que regularia únicament l'activació dels esdeveniments més inicials de la via de Wnt.

A part de la p120-catenina, la cadherina associada a l'LRP5/6, que pot ser l'E-cadherina o l'N-cadherina, també és necessària per l'activació de la via canònica (Figura 77). L'E-cadherina i l'N-cadherina difereixen en la seva localització tissular (l'E-cadherina s'expressa en cèl·lules epitelials mentre que l'N-cadherina s'expressa en cèl·lules mesenquimals i neuronals) i en les seves funcions dins de cada teixit [203]. Tot i això ambdues proteïnes són similars a nivell estructural i són

necessàries per l'activació de la via de Wnt [31], [32]. A més, la seva similitud estructural permet que la sobreexpressió de l'E-cadherina en cèl·lules HEK293T deplecionades d'N-cadherina rescati de nou l'estabilització de β -catenina (Figura 76).

Els nostres resultats mostren que la cadherina és necessària per la localització del correceptor a la membrana plasmàtica (Figura 51 i 52). Com a conseqüència s'observa que la depleció de la cadherina impedeix la formació de l'agrupament lateral de receptors i del signalosoma en cèl·lules que expressen el mutant CA-LRP (Figura 50). El mecanisme de com la cadherina regula la localització de l'LRP5/6 encara no ha estat estudiat. Una possible explicació seria que la cadherina impedis l'endocitosi del receptor LRP5/6 a través de la unió directe amb aquest. Diferents estudis del grup del Dr. Kikuchi demostren que el correceptor LRP s'endocita via caveolina en l'activació de la via de Wnt [109], [125], [126]. Aquests estudis també demostren que la fosforilació dels dominis PPSPxS de l'LRP5/6 i la internalització del correceptor són esdeveniments independents i necessaris per l'acumulació de la β -catenina. Podria ser que la unió LRP-cadherina impedis l'associació de la caveolina a l'LRP5/6. Com a conseqüència, l'LRP5/6 s'endocitaria via caveolina en cèl·lules deplecionades de cadherina, però en no estar LRP5/6 fosforilat, el signalosoma no s'hauria format i no hi hauria senyalització de Wnt.

3 El complex LRP5/6 s'internalitza dins de MVBs en Wnt

L'estabilització de la β -catenina és el pas determinant de la via canònica de senyalització Wnt. Tal i com s'ha descrit a la *Introducció*, s'han proposat diferents models per explicar com es trasllada l'activació dels receptors Fz i LRP5/6 i la formació del signalosoma, en l'estabilització de la β -catenina. Un dels models suggereix que la β -catenina s'acumula al citosol després de que la GSK-3, la quinasa que la fosforila, s'internalitza dins de cossos multivesiculars (MVBs) i així s'impedeix la fosforilació del seu substrat β -catenina i la posterior degradació de la proteïna (Figura 84 i [124]). Els nostres resultats concorden amb el model presentat, i afegeixen que no només s'internalitza la GSK-3, sinó que el receptor LRP5/6, el Dvl-2, l'Axina i una part de la β -catenina també es localitzen dins dels MVBs en estimular-se les cèl·lules durant 4 hores amb Wnt3a o després de transfectar-se amb el CA-LRP. Per altra banda ni les proteïnes de les unions

adherents p120-catenina i cadherina; ni la E3 lligasa β -TRCP s'internalitzen (Figura 43).

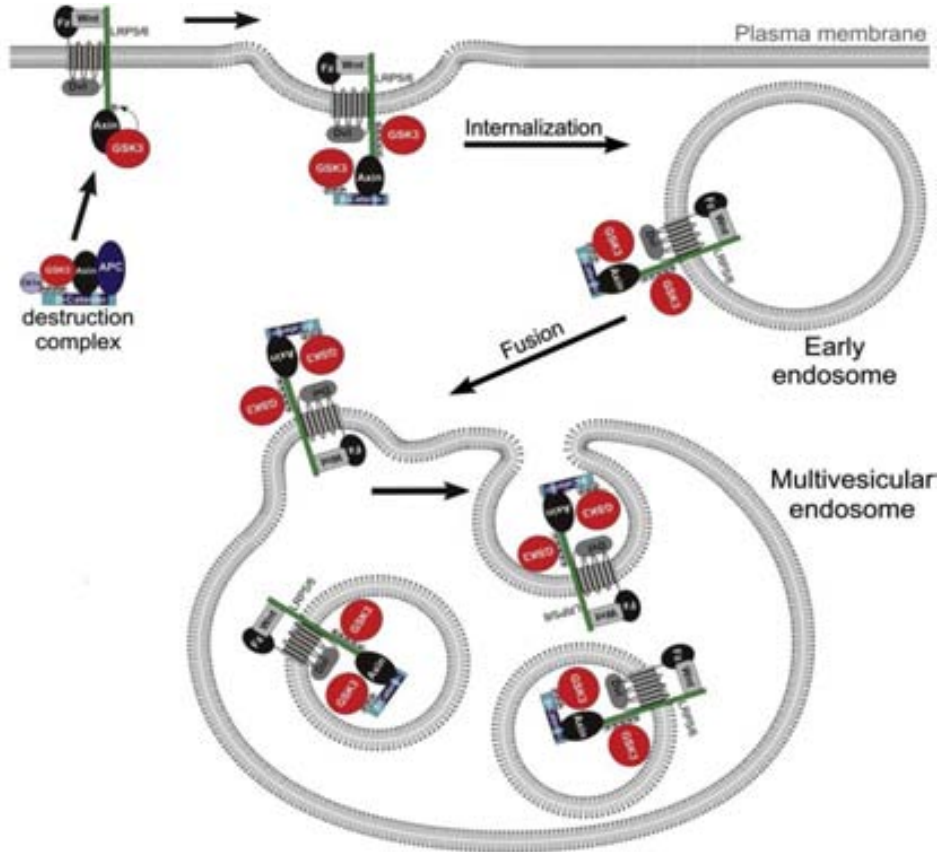


Figura 84: Model d'activació de la via canònica a través de la internalització del complex de Wnt dins de cossos multivesiculars (MVBs). La internalització del complex de Wnt (format per la GSK-3, l'LRP5/6, la β -catenina, Dvl-2 i Axina) dins de cossos multivesiculars (en anglès multivesicular endosomes), causa l'estabilització de la β -catenina. Figura adaptada de [124].

La β -catenina que es troba als MVBs és la que és reconeguda per l'anticòs que detecta la proteïna fosforilada per GSK-3 i que és marcada per la degradació. Aquesta β -catenina segurament s'internalitza unida a l'Axina i prové del complex de degradació. En canvi, la β -activa (la que no està fosforilada en els residus on ho fa la GSK-3) no es troba dins dels MVBs (Figura 43). Així doncs, un cop internalitzada la GSK-3, la β -catenina de nova síntesi s'acumula al citosol sense poder ser fosforilada per la quinasa que està present dins dels endosomes. En canvi, la β -catenina que ja estava unida a l'Axina al complex de degradació,

s'endocita juntament amb tot el complex. El fet de que la β -catenina present dins dels MVBs estigui fosforilada, suggereix que la quinasa GSK-3 de dins dels endosomes manté la seva activitat quinasa, tal i com s'havia descrit prèviament [124]. A més, l'observació de que la β -TRCP que ubiquitina la β -catenina, no es troba dins dels cossos multivesiculars, confirma el model proposat prèviament per Li i col·laboradors. Aquest demostra que durant l'activació de la via de Wnt la β -catenina es fosforila però no es degrada degut a que la β -TRCP no s'uneix al complex del receptor LRP5/6 [100].

La primera observació de que els receptors de membrana es poden endocitar i localitzar dins de MVBs, va ser a través de l'estudi de la internalització del receptor *epidermal growth factor* (EGFR) dins de MVBs [204]. També s'ha descrit el mateix mecanisme en receptors Tyr quinasa (RTKs) o en receptors associats a proteïna G (GPCRs). En tots aquests casos, la disminució de la localització del receptor a la membrana concorda amb l'atenuació de la senyalització [183].

Tot i que l'endocitosi de proteïnes s'ha considerat tradicionalment com un mecanisme per disminuir la senyalització de diferents vies, hi ha treballs que suggereixen que la localització de receptors de membrana dins dels MVBs també pot ser activadora de senyals.

Diferents estudis demostren que la via de Notch es controlaria a través de l'endocitosi de la proteïna. Diversos models s'han proposat per explicar el requeriment de la localització de Notch dins dels MVBs que permetria l'alliberament de la regió intracel·lular de la proteïna (NICD) i la translocació nuclear d'aquesta regió [205]. Un d'aquests models suggereix que la localització de Notch dins de MVBs, facilitaria la posterior degradació lisosomal de la regió extracel·lular i l'alliberament de NICD, que podria entrar al nucli i activar la transcripció gènica. També s'han publicat evidències que el segrest de l'inhibidor d'NF- κ B (I κ B) dins de MVBs és necessari perquè l'NF- κ B es transloqui al nucli i pugui activar la transcripció gènica [206]. Els nostres resultats juntament amb els de Taelman i col·laboradors concorden amb aquestes evidències i demostren que la internalització del correceptor LRP5/6 dins d'endosomes no inhibeix la senyalització, sinó que promou l'activació de Wnt [124].

Per visualitzar la GSK-3 i les altres proteïnes dins dels MVBs després de l'activació de Wnt, s'han realitzat experiments de *Permeabilització amb digitonina i assaig de*

protecció de proteasa (veure *Materials i Mètodes*), de la mateixa manera que s'havia fet en l'article de Taelman i col·laboradors [124]. Paral·lelament, també s'han utilitzat tècniques d'Immunofluorescència per mostrar que el complex s'endocita dins d'endosomes activant la via tant amb el lligand Wnt com amb el CA-LRP, i utilitzant el marcador d'endosomes EEA1 (Figura 46). Prèviament a l'immunofluorescència les cèl·lules s'han permeabilitzat amb digitonina per visualitzar únicament les proteïnes contingudes dins dels endosomes (veure *Materials i Mètodes*). D'aquesta manera només s'observa la GSK-3 endocitada i es pot demostrar que les estructures en forma de punts observades en l'immunofluorescència no són degudes únicament a l'homopolimerització de Dvl-2 que es produeix al citosol, com s'havia proposat en alguns treballs [207]–[209], sinó que les proteïnes realment es troben dins de vesícules endocítiques.

L'endocitosis de proteïnes dins dels endosomes tardans o MVBs, és el pas previ per la localització de les proteïnes dins del lisosoma, així que el complex format s'hauria de degradar via lisosomal. Tot i això, es requereixen més experiments que demostrin si les proteïnes es degraden realment, ja que amb els resultats presentats en aquest treball no es pot concloure res. Tenint en compte que només un 3-5% de la GSK-3 total està associada al complex de degradació de la β -catenina [210], és molt complicat observar si els nivells totals de la proteïna GSK-3 disminueixen després de l'activació de Wnt com a conseqüència de la degradació lisosomal.

Recentment, s'ha descrit que les proteïnes contingudes dins dels MVBs podrien retornar a la membrana exterior d'aquests i secretar-se al citosol en un procés anomenat com a *back fusion* [211], [212]. Podria ser que el complex LRP5/6-GSK-3 realitzés aquest procediment i d'aquesta manera les proteïnes no es degradarien, sinó que podrien retornar al citosol un cop hagués finalitzat la senyalització de Wnt.

La fosforilació per GSK-3 és important en diferents vies de senyalització a part de Wnt, com en Hedgehog o BMP [213]. Així doncs, la compartimentació de la quinasa és important per regular aquestes vies de diferent manera. El model d'internalització de GSK-3 dins de MVBs explicaria perquè la via de Wnt inhibeix únicament l'activitat de la porció de GSK-3 associada al complex de degradació, que és la que s'internalitza dins d'endosomes. La GSK-3 que roman al citosol pot seguir fosforilant efectors d'altres vies de senyalització. Aquest model de

compartimentació també explicaria perquè la via *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)-AKT regula la GSK-3 a través de la fosforilació en serines de la quinasa durant la senyalització d'insulina, sense interferir en l'acumulació de β -catenina promoguda per Wnt [88].

4 La dissociació de la p120-catenina i la cadherina del correceptor LRP5/6 és necessària per la internalització de la GSK-3 via caveolina

La proteïna p120-catenina es fosforila majoritàriament en el seu domini regulador i controla la unió amb diverses proteïnes. La fosforilació en tirosines regula la seva interacció amb la proteïna Rho [214] i controla l'associació amb l'E-cadherina [37], entre d'altres. La p120-catenina també es fosforila per la CK1 α en dues serines (la 268 i la 289) després de l'estimulació de Wnt [31]. Aquesta fosforilació promou la separació del complex p120-catenina-cadherina, i permet que la p120-catenina desenvolupi altres funcions relacionades amb l'activitat transcripcional de la β -catenina (Veure apartat 2 de la *Discussió*).

Sumat al fet de que la p120-catenina actua com a reguladora de la via de Wnt, s'ha observat que aquesta es fosforila i es separa de la cadherina prèviament a l'inici de la internalització de la GSK-3 en endosomes (Figura 44). Així doncs en aquest treball s'ha estudiat la rellevància de la dissociació p120-catenina-cadherina en la internalització de la GSK-3.

Els resultats mostren que la separació de la p120-catenina de la cadherina és necessària per promoure la internalització de la GSK-3 dins d'endosomes (Figura 53-56). S'han utilitzat dos mutants diferents de la p120-catenina que no es poden fosforilar per CK1 α i que per tant no es poden separar de la cadherina en Wnt: el mutant puntual Ser268, 269Ala i la isoforma 4 de la p120-catenina que no conté les serines fosforilables per la quinasa. En ambdós casos els resultats obtinguts són similars, indicant que la inhibició de la separació p120-catenina-cadherina impedeix la internalització del complex.

Tot i això, la capacitat per poder activar la via de Wnt difereix en cada mutant. El mutant Ser268,269Ala s'uneix a la quinasa CK1 ϵ i s'activa la via després de l'estimulació amb medi condicionat, de la mateixa manera que succeix amb la p120-catenina WT (Figura 59). En canvi, a la isoforma 4 de la p120-catenina li

manca la regió reguladora per unir-se a la quinasa, i només es podrà iniciar la senyalització a través de la sobreexpressió del mutant CA-LRP que no requereix de la CK1ε (Veure apartat 2 *Discussió*). Aquests mutants s'han utilitzat en cèl·lules deplecionades de p120-catenina que no poden activar els efectes inicials de la via de Wnt [31], i que per tant, tampoc poden internalitzar la GSK-3 en tractar-se amb medi condicionat Wnt3a (Figura 46-48).

La utilització d'aquests dos mutants de la p120-catenina, ha elucidat que la separació p120-catenina-cadherina és requerida també per una posterior separació cadherina-LRP5/6 (Figura 57, 58 i 60). Mitjançant un mutant de la cadherina que impedeix la dissociació del complex cadherina-LRP5/6, s'ha demostrat que aquesta separació és crucial per a la internalització del complex dins d'endosomes (Figura 67). A més a més, també s'ha descrit que la internalització és dependent de caveolina i que aquesta proteïna s'associa a l'LRP5/6 després de la separació de la p120-catenina i la cadherina del correceptor (Figura 71 i 85).

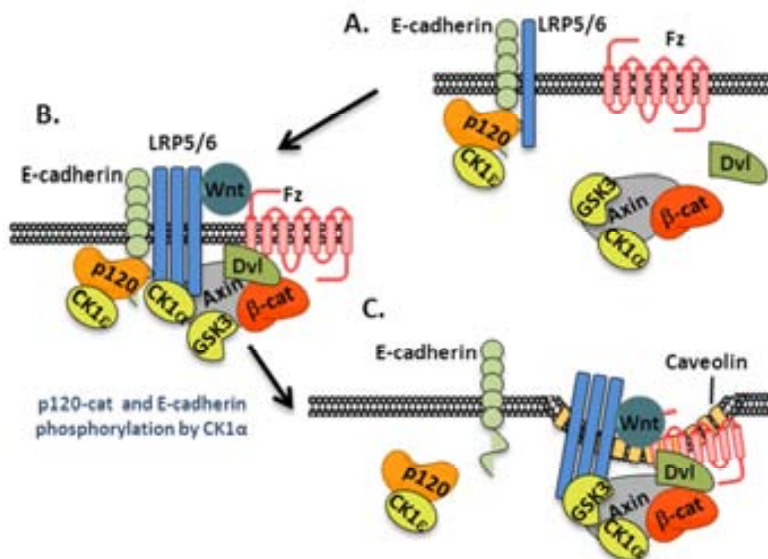


Figura 85. La dissociació de la p120-catenina i la cadherina del correceptor LRP5/6 és necessària per la internalització de la GSK-3 via caveolina. (A) En cèl·lules control, la p120-catenina i la cadherina estan formant un complex amb l'LRP5/6. (B) Wnt promou la formació del signalosoma, i el reclutament de la quinasa CK1α, entre d'altres proteïnes. (C) La CK1α promou la dissociació de la p120-catenina i la cadherina de l'LRP5/6 i la unió de la caveolina a l'LRP5/6, que iniciarà el procés d'endocitosis del complex de Wnt.

El mutant de la cadherina que bloqueja la separació LRP5/6-cadherina, es va realitzar a partir de la informació obtinguda d'experiments realitzats al nostre laboratori. S'havia demostrat que l'estimulació de Wnt promou la separació de p120-catenina-cadherina i la dissociació de la cadherina de l'LRP5/6, a través de la fosforilació per CK1 α [32]. A més es va observar que la cadherina s'uneix a l'LRP5/6 per la regió C-terminal, i que ambdues proteïnes es dissocien després de la fosforilació *in vitro* per CK1 ([31] i Figura 61). Així doncs, es va realitzar un mutant que conté totes les serines de la regió terminal de la cadherina mutades a alanines i que no es separa de l'LRP5/6 després de la fosforilació *in vitro* de la CK1 (Figura 63) o després de l'activació de Wnt (Figura 65 i 66).

El fet de que l'LRP5/6 s'uneixi a l'extrem C-terminal de la cadherina, significa que s'associa a la cadherina per un domini similar al de β -catenina [20] tot i que LRP5/6 i la β -catenina no competeixen per la unió a la cadherina i es troben formant un complex en cèl·lules no activades per Wnt [31]. Experiments de cristal·lització utilitzant la cadherina, la β -catenina i el domini citoplasmàtic de l'LRP5/6 permetrien elucidar com s'uneixen aquestes proteïnes realment, i si es necessita també que la cadherina dimeritzi perquè es produeixi aquesta unió.

Tot i que els nostres resultats indiquen que la p120-catenina s'ha de separar de la cadherina per permetre la posterior separació cadherina-LRP5/6, no s'ha estudiat el perquè del requeriment de la dissociació prèvia de la catenina. Podria ser que la unió p120-catenina-cadherina impedisís l'acció de la CK1 α sobre la cadherina i la posterior separació d'aquesta de l'LRP5/6. Tenint en compte que la p120-catenina és una proteïna acobladora de diferents quinasas i fosfatases [53], una altra hipòtesi seria que alguna serina/treonina fosfatasa unida a la p120-catenina defosforilés les serines prèviament fosforilades per la CK1 α .

Per altra banda, la internalització de tot el complex depèn de caveolina. Els nostres resultats demostren que l'LRP5/6 s'uneix a caveolina després de 2 hores d'estimulació amb el lligand Wnt (Figura 70), temps necessari per observar la dissociació de la p120-catenina i la cadherina de l'LRP5/6 (Figura 18 i [32]). També s'ha mostrat que aquesta separació és necessària per la unió de la caveolina i que aquesta proteïna és requerida perquè es pugui internalitzar la GSK-3 i les altres proteïnes del complex dins dels MVBs (Figura 68 i 71). Aquests experiments concorden amb els publicats en altres treballs, on es mostra que l'associació de la caveolina amb l'LRP5/es produeix després d'1-3 hores de l'estimulació amb el medi

condicionat Wnt3a, i que és necessària per l'estabilització de la β -catenina [125], [182].

Tots aquests resultats reforcen la hipòtesi que s'ha discutit anteriorment, basada en que la unió de la cadherina a l'LRP5/6 impedeix la connexió de la caveolina al correceptor i la posterior endocitosi d'aquest. Tant les cèl·lules deplecionades de cadherina, com les que han estat activades per Wnt i per tant l'LRP5/6 no està unit a la cadherina, afavoririen l'endocitosi del correceptor via caveolina. La diferència estaria en què en el primer cas la via de Wnt no s'hauria activat i el correceptor s'endocitaria no fosforilat i sense haver estat unit a tot el complex reclutat. En canvi, les cèl·lules activades per Wnt internalitzen l'LRP5/6 associat a tot el complex dins d'endosomes, i la GSK-3 no pot fosforilar la β -catenina. Aquest procés d'endocitosi seria similar al que s'ha descrit per la cadherina, que queda protegida de l'endocitosi via clatrina quan aquesta està unida a la p120-catenina [13].

Diferents estudis que demostren que l'endocitosi de l'LRP5/6 via caveolina és un pas necessari per l'activació de la via de Wnt, també suggereixen com a model que la unió LRP5/6-caveolina és necessària pel reclutament d'Axina, tot i que no ho demostren [125], [215]. En aquesta tesi s'ensenya que tot i que la caveolina és necessària per la internalització de la GSK-3 i de tot el complex, aquesta no és requerida per la fosforilació de l'LRP5/6 als motius PPSPxS ni pel reclutament de proteïnes com l'Axina o el Dvl-2 (Figura 69). La caveolina s'uneix a l'LRP5/6 quan el complex ja està format i en promou la internalització (Figura 85).

5 La internalització de la GSK-3 dins de MVBs és essencial per l'acumulació de β -catenina en Wnt, però no és l'únic procés que regula els nivells d'aquesta proteïna

Els mutants que impedeixen la total internalització de la GSK-3 i de tot el complex en MVBs s'han utilitzat per avaluar la contribució d'aquest mecanisme en l'estabilització de la β -catenina. Els experiments realitzats en cèl·lules HEK293T i en HeLa activades amb el lligand Wnt o amb el CA-LRP, mostren que quan s'inhibeix la internalització de la GSK-3, la β -catenina s'acumula menys (Figures 72-77). Tot i que es veu una clara disminució de l'acumulació de β -catenina, en la majoria dels casos també s'observa que aquesta disminució no és total, sinó que és aproximadament d'un 50% (Figura 74 i 76B). L'excepció s'obté quan s'usa la

isoforma 4 de la p120-catenina en cèl·lules activades amb el lligand Wnt, ja que tal i com s'ha comentat anteriorment, aquesta isoforma no es pot unir a la quinasa CK1ε, i per tant la via no es pot activar.

Quan s'utilitzen cèl·lules MEF KO de Caveolina per impedir la internalització de la GSK-3 s'observen els mateixos resultats. En activar la via de Wnt, la β-catenina s'estabilitza menys, tot i que els nivells d'aquesta proteïna són superiors als comparats amb la situació control (Figura 79). Aquests resultats concorden amb els publicats en un article de Yamamoto i col·laboradors, que descriuen que un dominant negatiu de la proteïna dinamina necessària per l'endocitosi de la caveolina, impedeix la total acumulació de la β-catenina en Wnt, tot i que s'observa part d'aquesta proteïna estabilitzada [125].

Tots aquests resultats demostren que la internalització de la GSK-3 en MVBs és essencial per l'estabilització de la β-catenina, i que l'aïllament d'aquesta quinasa dins dels endosomes impedeix la degradació de part de la β-catenina. Aquests experiments, però, també suggereixen que hi ha un altre procés a part de la internalització de la quinasa GSK-3 que promou l'estabilització de la β-catenina, i que explicaria perquè no s'aboleix totalment l'acumulació de la β-catenina en inhibir la internalització (discutit més avall).

Els mateixos mutants també s'han utilitzat per analitzar l'activitat transcripcional de la β-catenina, a partir d'assajos d'activació del TOP i d'activació dels gens diana de la via de Wnt. Els resultats observats han estat similars als obtinguts en analitzar l'estabilització de la β-catenina. La inhibició de la internalització disminueix l'activitat transcripcional de la β-catenina, però aquesta no s'impedeix totalment (Figura 80 i 81). En aquest cas, l'ús dels mutants de la p120-catenina no aporta informació sobre la contribució del mecanisme de l'internalització en l'activitat transcripcional de la β-catenina. Això és degut a que aquests no es separen de la cadherina i per tant impedeixen l'internalització de la GSK-3, però també eviten l'activació de Rac1 i la unió amb el repressor Kaiso que són esdeveniments necessaris per la formació del complex transcripcional de la β-catenina (veure apartat 2 de la *Discussió*).

L'article de Taelman i col·laboradors demostra que la inhibició de proteïnes del complex ESCRT necessari per la formació de MVBs, impedeix l'activació del TOP en cèl·lules estimulades amb Wnt [124]. A, més un altre grup també ha analitzat

l'activitat transcripcional de la β -catenina en cèl·lules shRNA caveolina activades amb Wnt, i han mostrat que aquesta activitat es redueix considerablement però sense abolir-se del tot [125]. Tots aquests resultats afegeixen més evidències a que la internalització de la GSK-3 és important per permetre l'activació transcripcional de la β -catenina, però que no és l'únic procés que en regularia l'activitat.

En global, els nostres resultats mostren que la quinasa GSK-3 s'internalitza dins dels MVBs, i expliquen en part l'acumulació d'aquesta β -catenina al citosol, en concordança amb el treball publicat de Taelman i col·legues [124]. A més, nosaltres afegim dades novedoses que demostren que la internalització de la GSK-3 es produeix conjuntament amb tot el complex format al receptor LRP5/6 i que aquest procés és dependent de la dissociació de la p120-catenina i cadherina de l'LRP5/6. En aquest treball també es demostra que aquesta endocitosi del complex és dependent de caveolina, en correlació amb els treballs publicats prèviament sobre l'endocitosi del correceptor LRP5/6 [109], [125].

Els resultats obtinguts també indiquen que la β -catenina es comença a estabilitzar després d'1 hora d'estimulació amb medi condicionat Wnt, quan encara no s'observa GSK-3 internalitzada dins d'endosomes (Figura 44). Aquest fet sumat a que la inhibició de la internalització de GSK-3 no aboleix del tot l'acumulació de β -catenina al citosol, suggereix que aquest mecanisme d'internalització dins d'endosomes coexisteix amb un altre que també regula els nivells de β -catenina, i que segurament s'inicia prèviament a l'endocitosi.

Diferents grups han proposat un model basat en que la fosforilació del domini intracel·lular de l'LRP5/6 inhibeix directament l'activitat de la GSK-3 quan aquesta es recluta al complex [115], [122]. Aquesta associació LRP5/6-GSK-3, però, té una afinitat baixa, i la inhibició de la quinasa desapareix després de l'estimulació de la via durant 1-2 hores [88], probablement per l'efecte de la regulació de les fosfatases unides a l'Axina [91]. La inhibició de la GSK-3 després de la formació del signalosoma podria explicar la ràpida estabilització de la β -catenina que s'observa després d'1 hora de Wnt.

Alguns estudis també plantegen que l'inhibidor Frat podria tenir un paper rellevant en l'estabilització de la β -catenina. S'ha descrit que la fosforilació de Dvl-2 per CK1 ϵ podria induir la unió de Frat amb Dvl-2 i bloquejar la degradació de la β -catenina, ja que aquest inhibidor actua desplaçant la GSK-3 de l'Axina i inhibint la quinasa [87],

[119], [216]. Així, la fosforilació de Dvl-2 en els estadis més inicials de la via ja facilitaria l'estabilització de la β -catenina. Tot i això, el triple *knockout* dels tres gens *Frat* produeix ratolins viables, suggerint que *Frat* és prescindible per a l'activació de la via [217].

A partir de totes les dades obtingudes en aquest treball, i del que s'ha descrit prèviament al laboratori (Figura 13), proposem un model de com s'estabilitza la β -catenina a partir de l'activació dels receptors del senyal de Wnt (Figura 86).

L'estimulació de Wnt3a promou l'associació de tot el complex format per l'LRP5/6, la cadherina, la p120-catenina i la CK1 ϵ amb el receptor Fz, que està unit directament a la PR61 ϵ . Aquesta fosfatasa defosforila i activa la CK1 ϵ i es promou el reclutament de Dvl-2 al complex de Fz-LRP5/6. L'Axina unida a GSK-3 i a CK1 α també es recluta com a conseqüència de la fosforilació de l'LRP5/6. A més, la interacció directa de la GSK-3 amb l'LRP5/6 inhibeix aquesta quinasa de forma transitòria i es promou l'estabilització de la β -catenina (Figura 86B). La CK1 α reclutada al complex fosforila la p120-catenina a les serines 268, 269, i tot seguit a la cadherina, facilitant la separació d'aquestes dues proteïnes del correceptor (Figura 86C). LRP5/6 no unit a la cadherina s'endocita via caveolina dins dels MVBs, conjuntament amb tot el complex reclutat. D'aquesta manera s'evita que la GSK-3 fosforili la β -catenina del citosol (Figura 86D). La p120-catenina alliberada de la membrana afavoreix l'activació transcripcional de la β -catenina, fomentant la translocació nuclear de la proteïna a través de l'activació de Rac1, i extraient el repressor Kaiso de TCF-4.

Tal i com s'indica a la Figura 86, la GSK-3 s'inhibiria directament per la unió de l'LRP5/6 facilitant l'estabilització de la β -catenina, però per mantenir els nivells elevats d'aquesta proteïna al citosol seria necessària la internalització de la GSK-3 dins dels endosomes. A la mateixa figura també queda representat que la GSK-3 present dins dels MVBs estaria de nou activa i amb la capacitat de fosforilar la β -catenina reclutada dins de les vesícules endocítiques, tal i com ja s'havia plantejat en altres estudis [100], [124].

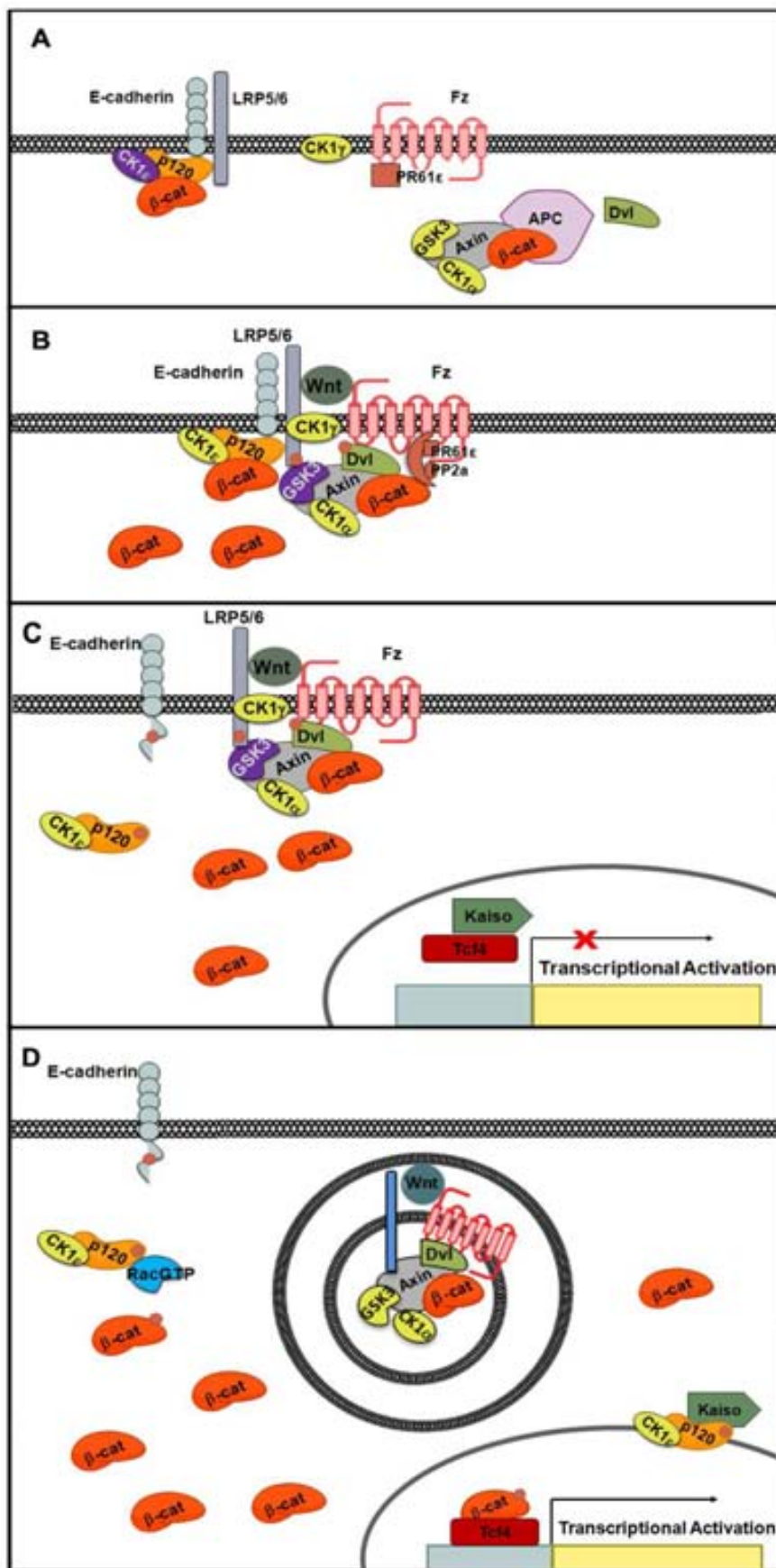


Figura 86: Model d'activació de la via de Wnt i implicació de les proteïnes de les unions adherents. (A) En cèl·lules no estimulades amb Wnt, la p120-catenina, la cadherina i la CK1 ϵ inactiva (marcada en lila) estan unides a l'LRP5/6. Els nivells de β -catenina al citosol es controlen pel complex de degradació. (B) Wnt promou la formació del complex Fz, LRP5/6, Dvl-2, Axina, CK1 α i GSK-3. La quinasa GSK-3 s'inhibeix (marcada en lila) a través de la unió directe amb l'LRP5/6 i la β -catenina es pot estabilitzar. (C) La CK1 α promou la dissociació de la p120-catenina i la cadherina de l'LRP5/6 i s'endocita tot el complex dins de MVBs (D) La GSK-3 no fosforila la β -catenina del citosol i aquesta s'estabilitza. Per altra banda, la p120-catenina dota la β -catenina d'activitat transcripcional.

Així doncs, suggerim que diferents mecanismes que descriuen l'estabilització de la β -catenina poden succeir alhora. Hi hauria una activació inicial de la via de Wnt que començaria a acumular la β -catenina, i una altra de més tardana o crònica que allargaria la senyalització de la via facilitant l'activació de diferents processos fisiològics. Per exemple, s'ha suggerit que l'activació crònica de la via a través del segrest de GSK-3 dins de MVBs seria necessària per la diferenciació de l'axis en el desenvolupament de vertebrats [215]. És possible que tal i com han comentat altres autors, l'activació d'una senyalització més inicial o més crònica de la via depengui de l'extensió d'aquest senyal i de determinats elements de la via, com per exemple de la quantitat de receptors presents a la cèl·lula [124], [207].

Tot i això, els diversos models que s'han plantejat en aquest treball no expliquen perquè els nivells de β -catenina no s'acumulen indefinidament al llarg de la senyalització de Wnt. Està àmpliament establert que la β -catenina s'acumula al citosol en activar-se la via i que a partir d'unes 4-6 hores d'estimulació per Wnt aquesta no segueix augmentant els seus nivells ([100], [218] i Figura 44). En canvi, el nostre model proposat es basa en la inhibició de la fosforilació de la β -catenina sintetitzada *de novo* ja que la quinasa GSK-3 no és accessible al seu substrat. Degut a que s'ha publicat que la síntesi de β -catenina no varia al llarg de l'estimulació de Wnt [218], [219], els nivells d'aquesta proteïna haurien de seguir augmentant. A més, s'ha descrit que la mateixa β -catenina realitza un procés de *feed-back* positiu incrementant la senyalització, fet que acumularia més β -catenina al citosol [124].

Recentment, s'ha publicat un article a partir de models matemàtics i basats en diferents experiments bioquímics. Els autors conclouen que la via de Wnt requereix que s'inhibeixi la fosforilació de la β -catenina, però que aquesta inhibició ha de ser parcial per tal de que els nivells d'aquesta proteïna no augmentin indefinidament

[218]. Així, mostren que l'activació del senyal Wnt disminueix la fosforilació i ubiquitinació de la β -catenina en els estadis inicials de la via, però que aquests processos es recuperen a partir de dues hores d'estimulació amb Wnt3a, suggerint que part de la GSK-3 ha de ser accessible a la β -catenina per a poder-la fosforilar. S'han de realitzar més estudis per demostrar el que succeeix realment, però una hipòtesi seria que el complex un cop internalitzat dins dels MVBs realitzés el procés de *back fusion* [211] i pogués retornar al citosol durant l'activació de la via de Wnt. D'aquesta manera, amb Wnt actiu hi hauria part de la GSK-3 separada de la β -catenina, però una altra part la podria anar fosforilant, tot contribuint al manteniment dels nivells estables de β -catenina.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- La PP2A PR61ε està unida a Fz en la situació control, i s'associa al complex LRP5/6-p120-catenina-CK1ε en Wnt. La fosfatasa defosforila i activa la CK1ε que facilita el reclutament de Dvl-2 als receptors Fz-LRP5/6.
- El mutant constitutivament actiu CA-LRP diferencia els efectes inicials i tardans de la p120-catenina en la ruta Wnt.
- L'activació de la via de Wnt promou la internalització de GSK-3 i de tot el complex del signalosoma dins de MVBs. Aquesta internalització depèn de caveolina i de la dissociació prèvia de p120-catenina i de cadherina del correceptor LRP5/6.
- La inhibició de la internalització de la GSK-3 disminueix l'acumulació de β-catenina induïda per Wnt.

MATERIALS I
MÈTODES

1 Cultius Cel·lulars

1.1 Línies cel·lulars eucariotes

1.1.1 Línies cel·lulars utilitzades

En aquest treball s'han utilitzat les següents línies cel·lulars com a model pels experiments:

| Línia | Procedència | Característiques |
|------------------------------|---|--|
| HEK 293-T | Cèl·lules embrionàries de ronyó humanes | <ul style="list-style-type: none">• Fenotip epitelial• Expressen N-cadherina• Transformades amb adenovirus 5 |
| SW-480 | Adenocarcinoma de colon humà | <ul style="list-style-type: none">• Fenotip epitelial• Tenen la proteïna APC mutada• Presenten nivells de β-catenina elevats al citosol |
| HeLa | Carcinoma cervical humà | <ul style="list-style-type: none">• Fenotip epitelial• Expressen E-cadherina |
| MEF | Fibroblasts embrionaris de ratolí | <ul style="list-style-type: none">• Fenotip fibroblàstic• Expressen N-cadherina |
| MEF KO Caveolin | Fibroblasts embrionaris de ratolí | <ul style="list-style-type: none">• Cedit pel Dr. Albert Pol (Universitat de Barcelona) |
| Cèl·lules L | Teixit connectiu subcutani de ratolí. | <ul style="list-style-type: none">• Fenotip fibroblàstic• Deriven de la línia cel·lular L-M(TK) |
| Cèl·lules L-Wnt3a | Teixit connectiu subcutani de ratolí. | Clons estables i seleccionats on s'ha integrat un plasmidi codificant pel factor Wnt3a. |
| mMSC (Cultiu primari) | MSC de medul·la òssia de ratolí. | <ul style="list-style-type: none">• Fenotip mesenquimal• Poden diferenciar a adipòcits, condrocits o a osteoblasts. |

Taula 1: Enumeració i característiques de les línies cel·lulars utilitzades.

1.1.2 Manteniment, recompte i congelació de cèl·lules

Les diferents línies cel·lulars es mantenen amb Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM, Invitrogen) suplementat amb 10% de sèrum de fetus boví (FBS, GIBCO), 4,5 g/l de Piruvat sòdic (Life Technologies), 2mM Glutamina, 56 U/ml Penicil·lina, 56 µg/l Estreptomicina, i amb aminoàcids no essencials (Life Technologies). Les cèl·lules es mantenen a 37°C amb 5% de CO₂.

Les cèl·lules creixen en flascons de plàstic tractat, i quan arriben a confluència es renten amb PBS i posteriorment es tracten amb tripsina 0,5% (Life Technologies) per sembrar-les en nous flascons (per manteniment) o en plaques (per experiments).

Per determinar el nombre de cèl·lules presents en un flascó s'utilitza un microscopi òptic i una càmera de Neubauer. L'adició de *Trypan Blue* (Sigma) a la barreja permet controlar, a més, la integritat i la supervivència cel·lular.

Les cèl·lules es conserven en nitrogen líquid amb un 10% de DMSO, com a crioprotector. El procés de congelat es fa de manera progressiva.

1.1.3 Obtenció de medi condicionat amb Wnt3a

El medi condicionat amb Wnt3a, així com el seu control, s'obté de les cèl·lules L-Wnt3a i de les cèl·lules L parentals. El manteniment de les línies cel·lulars es realitza en condicions normals i afegint selecció de G418 en les cèl·lules L-Wnt3a.

Per obtenir el medi condicionat, es sembren cèl·lules L i cèl·lules L-Wnt3a en dos flascons diferents que contenen medi normal sense cap antibiòtic de selecció. Al cap de 4 i 7 dies es recull el medi sobrenedant dels flascons i es centrifuga per eliminar les cèl·lules L o L-Wnt3a que puguin estar presents en el medi. Aquest medi es guarda a 4°C durant un màxim d'un mes.

1.1.4 Tractaments cel·lulars

En aquest treball, s'han aplicat diferents tractaments a les cèl·lules segons l'experiment a realitzar:

- Tractament amb medi condicionat Wnt3a: Les cèl·lules es tracten amb el medi condicionat que conté el lligand Wnt3a per tal d'activar la via canònica de Wnt. La durada d'aquest tractament varia entre 5 minuts i 24 hores i s'especifica en cada experiment.

- Tractament amb MG132 (Inhibidor del proteosoma): Les cèl·lules es tracten amb l'MG132 per inhibir el proteosoma, i per tant, per inhibir la degradació de totes les proteïnes que es degraden per aquesta via. S'utilitza a una concentració de 10 µM i la durada varia entre 3 i 5 hores i s'especifica en cada experiment.
- Tractament amb àcid Okadaic: Les cèl·lules es tracten amb àcid okadaic per inhibir únicament la fosfatasa PP2A a la concentració de 10 nM utilitzada. La durada del tractament varia segons l'experiment realitzat.

1.2 Cultiu bacterià

1.2.1 Soques bacterianes utilitzades

En aquest treball s'han utilitzat dues soques bacterianes diferents, depenent de la seva aplicació posterior. La soca d' *Escherichia coli* DH5α s'ha utilitzat per transformar plasmidis dels quals es volia obtenir DNA. En canvi, la soca d' *Escherichia coli* BL21 DE3 RIL s'ha utilitzat per obtenir proteïna recombinant amb alta eficiència. Les soques de BL21 s'han de mantenir en cloramfenicol per conservar els plasmidis que contenen.

1.2.2 Medi de cultiu bacterià

Les diferents soques bacterianes creixen en medi *Luria Broth* (LB), un medi ric, en forma líquida o sòlida (LB i LB-Agar respectivament). El medi s'esterilitza en un autoclau durant 20 minuts a 120°C. Per a la selecció dels bacteris s'afegeixen diferents antibiòtics al medi segons la resistència del plasmidi transformat i a la següent concentració: Ampicil·lina a 150 mg/l, Kanamicina a 30 mg/l i cloramfenicol a 50 mg/l.

El cultiu bacterià es fa créixer a 37°C i en agitació de 200 rpm en el cas del medi líquid. Les colònies s'emmagatzemen a 4°C durant setmanes per les que estan en medi sòlid, i a -80°C i complementat amb glicerol al 15% durant anys per les colònies crescudes en medi líquid.

2 Mètodes d'obtenció, manipulació i anàlisi del DNA

2.1 Transformació i extracció del DNA plasmídic

Per transformar DNA dins d'E.Coli, s'utilitzen les soques d'Ultracompetents d'E.Coli (Inove Methods). Alíquotes d'Ultracompetents es guarden a -80°C , i es descongelen en gel. S'utilitzaran $100\mu\text{l}$ d'aquestes competents per un màxim de $10\mu\text{l}$ de DNA (5-50ng). La barreja s'incuba durant 60 segons en gel, i tot seguit es realitza un xoc tèrmic de 90 segons a una temperatura de 42°C . Tot seguit, s'incuben les cèl·lules durant 5 minuts en gel, s'afegeixen $900\mu\text{l}$ d'LB, i s'incuba 1h a $37^{\circ}\text{C}/220$ rpm. Finalment les cèl·lules es sembren en plaques de LB-agar + l'antibiòtic que li confereix la resistència al plasmidi.

Per aïllar DNA plasmídic a partir d'un cultiu saturat de bacteris s'utilitzen els kits comercials *Wizard Plus SV Minipreps* (Promega) o *Maxipreps* (Qiagen).

2.2 Modificació del DNA

2.2.1 Per subclonatge

Per poder modificar el DNA i obtenir nous plasmidis a partir de diferents vectors i inserts, s'ha seguit el següent esquema general:

- 2.2.1.1. Obtenció de l'insert i del vector linealitzat
- 2.2.1.2. Purificació de bandes en gel d'agarosa
- 2.2.1.3. Desfosforilació del vector
- 2.2.1.4. Lligació

2.2.1.1 Obtenció de l'insert i del vector linealitzat

Per obtenir un determinat insert i vector linealitzat per dur a terme la clonació, s'han digerit els plasmidis amb enzims de restricció per tal d'alliberar l'insert i linealitzar el vector necessari. Els enzims i reactius que s'han utilitzat són de *New England Biolabs*, i la quantitat de DNA usada ha estat d'uns $2\mu\text{g}$ en un volum final de $50\mu\text{l}$.

En determinades clonacions, s'ha utilitzat primer la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) per extreure fragments de DNA dels plasmidis i per afegir dianes necessàries per la posterior digestió amb enzims de restricció. La PCR s'ha realitzat en un volum final de $50\mu\text{l}$ partint d'uns 100ng de DNA. S'ha utilitzat 1 unitat de la

Taq polymerase (NE Biolabs), oligonucleòtids encebadors a una concentració de 0,2µM i els desoxiribonucleòtids trifosfat (dNTPS; Invitrogen) a una concentració 0,3µM. Els cicles d'oscil·lació de temperatura utilitzats en el termociclador han estat els següents:

1. 2 minuts a 95°C
2. 15 segons a 95°C
3. 30 segons 50-55°C, la temperatura dependrà dels oligonucleòtids encebadors utilitzats.
4. 1 minut per kb a 68°C

(Els passos 2, 3 i 4 es repeteixen 30 cicles per aconseguir l'amplificació exponencial del fragment).

5. 2 minuts a 68°C

2.2.1.2 Purificació de bandes en gel d'agarosa

Els fragments de DNA obtinguts d'una digestió són separats electroforèticament utilitzant un gel d'agarosa. Per aïllar el fragment d'interès es talla la banda i es purifica utilitzant el kit *GFX-PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham), seguint el protocol de purificació del DNA a partir de bandes en gels d'agarosa.

2.2.1.3 Desfosforilació dels vectors

La desfosforilació dels vectors es realitza per evitar la relligació del vector sobre si mateix. S'afegeix 0,5 unitats de fosfatasa alcalina intestinal bovina (*calf intestinal phosphatase*, CIP) (New England Biolabs) per cada µg de DNA de vector, juntament amb el tampó adequat proporcionat per la casa comercial. S'incuba a 37°C durant 60 minuts, i finalment es purifica utilitzant el kit *GFX-PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham), seguint el protocol de purificació de DNA a partir d'una solució.

2.2.1.4 Lligació

S'utilitza el vector linealitzat, desfosforilat i digerit amb enzims de restricció compatibles amb els utilitzats en el cas de l'insert. Es barreja una relació molar de 3:1 insert:vector en un medi que conté tampó de lligació i 1 unitat de T4-DNA *Ligase* (Roche). Finalment s'incuba durant 16h a 16°C. El producte resultant de la lligació es transformarà tal i com està explicat a l'apartat 2.1.

2.2.2 A partir de mutagènesis dirigida

En aquest procés s'utilitzen dos oligonucleòtids complementaris que anellen en la regió on es vol introduir la mutació. Aquests oligonucleòtids ja contenen la mutació desitjada per tal de que quedi incorporada als nous fragments que es produiran per PCR. L'esquema que es segueix és el següent:

- Es duu a terme una PCR utilitzant el plasmidi que es vol mutar i els oligonucleòtids específics per realitzar la mutació puntual. La PCR es realitza en un volum final de 50 µl partint d'uns 100ng de DNA, 1 unitat de la polimerasa *Platinum^R PfxDNA Polymerase* (Invitrogen), els oligonucleòtids encebadors a una concentració de 0,2µM i els desoxiribonucleòtids trifosfat (dNTPS; Invitrogen) a una concentració 0,3µM. Els cicles d'oscil·lació de temperatura que s'utilitzen en el termociclador són els mateixos que els que s'especifiquen a l'apartat 2.2.1.1.
- S'obté com a producte de la PCR noves cadenes circulars de DNA amb la mutació ja incorporada. Tot seguit s'afegeix en el tub DpnI (New England Biolabs), un enzim que digereix i talla exclusivament les cadenes metilades procedents de cultiu de bacteris, sense reconèixer les noves cadenes de DNA generades per PCR.
- Es transformen els nous plasmidis obtinguts per PCR en cèl·lules competents.

2.3 Tècniques d'anàlisi del DNA

2.3.1 Anàlisi en gels d'agarosa

Per analitzar i identificar els diferents fragments de DNA s'utilitzen gels d'agarosa en condicions no desnaturalitzants. Per preparar els gels d'agarosa s'utilitzen diferents concentracions d'agarosa 0,5-1,5%, depenent de la mida dels fragments que es volen analitzar. El tampó TAE s'utilitza com a tampó per la electroforesi i s'utilitza la tinció per Bromur d'Etidi (BrEt, Sigma) per la detecció de bandes del DNA (a una concentració de 5µg/ml en el gel d'agarosa). Com a marcador de pes molecular conegut s'utilitza *el DNA 1kb Ladder* (New England Biolabs).

2.3.2 Seqüenciació del DNA

Per poder seqüenciar el DNA, s'han enviat les mostres al Servei de Genòmica de la UAB, que realitzen una seqüenciació automàtica de DNA desenvolupada per

Applied biosystems i utilitzant la metodologia de *Sanger* amb una polimerasa termostable que permet una reacció de seqüenciació cíclica.

2.4 Descripció dels vectors i de les construccions de DNA utilitzades

2.4.1 Vectors utilitzats

| Vector | Característiques |
|---|---|
| pGEX-6P (Amersham) | <ul style="list-style-type: none"> • S'expressa en procariotes • S'utilitza per l'expressió de proteïnes recombinants en tres pautes de lectura • El producte s'expressa com a proteïna de fusió amb GST (Glutatió-S-Transferasa) • Conté el promotor Tac que s'indueix químicament amb IPTG • Té resistència a Ampicil·lina • Conté un lloc de reconeixement per la proteasa PreScission protease (PSP) per poder tallar entre la GST i la proteïna d'interès. |
| pHRGFP.N1 (Stratagene) | <ul style="list-style-type: none"> • S'expressa en eucariotes • El producte s'expressa com a proteïna de fusió amb hrGFP. • Té resistència a ampicil·lina |
| pEGFP-C1 (Addgene) | <ul style="list-style-type: none"> • S'expressa en eucariotes • El producte s'expressa com a proteïna de fusió amb GFP, que es troba en N-terminal • Té resistència a kanamicina i a neomicina |
| pBATEM2 (cedit pel Dr. Hèctor Palmer) | <ul style="list-style-type: none"> • S'expressa en eucariotes • Conté cDNA de l'E-cadherina de ratolí • Té resistència a ampicil·lina |
| pLKO (Sigma) | <ul style="list-style-type: none"> • S'expressa en eucariotes • Expressa shRNAs per tal de disminuir els nivells d'una proteïna endògena contra la qual s'han dissenyat els shRNAs • Té resistència a ampicil·lina i a puromicina |
| pCS2 (cedit pel Dr. Jing Yang) | <ul style="list-style-type: none"> • S'expressa en eucariotes • El producte es pot expressar amb o sense Tag Flag, segons la variant de vector utilitzada. • Té resistència a ampicil·lina |

Taula 2: Vectors utilitzats

2.4.2 Construccions de DNA utilitzades

| Construcció | Obtenció |
|--|---|
| pGEX-6P | |
| pGEX-6P3 CytoE-cadherina (aminoàcids 732-883) | Extret del vector PSM-2 (que conté E-cadherina humana) per PCR incorporant dianes BamHI/EcoRI i clonat dins de pGEX-6P3 obert amb BamHI/EcoRI. |
| pGEX-6P3 CytoE-cadherina Ser-Ala (aminoàcids 732-883) | Obtingut a partir de la síntesis de DNA (Genscript) del fragment citosòlic (732-883) mutant les serines a alanines marcades en la Figura 62 de <i>Resultats</i> i incorporant dianes BamHI/EcoRI. Clonat dins de pGEX-6P3 obert amb BamHI/EcoRI. |
| pGEX-6P1 Cyto-LRP56 (aminoàcids 732-883) | Extret del plasmidi LRP6-pCDNA3 (cedit pel Dr.J.M. Gonzalez-Sancho) per PCR utilitzant els següents oligonucleòtids encebadors: 5'-GCGGATCCCATAATGTGGATTGCAGTG ACAAGTCAGATGAACTGGATT-3' i 5'-GCGCGTCGAGGCC GCTCTCAGGAGCACACAGAA-3'. Es van incorporar dianes BamHI/Sall i es va clonar dins de pGEX-6P1 obert amb BamHI/Sall. |
| pGEX-6P1 p120-catenina (aminoàcids 1-911) | Extret de p120-catenina (1-911)-pCDNA3 per digestió amb EcoRI/NotI i clonat dins del vector pGEX-6P1 obert amb els mateixos enzims. |
| pGEX-6P1 PR61ε | Cedit pel Dr. Jing Yang |
| phrGFP.N1 | |
| phrGFP.N1 p120-catenina (1-911) | Extret de p120-catenina (1-911)-pGEX per PCR incorporant dianes EcoRI/SacII i clonat dins de phrGFP.N1 obert amb EcoRI/SacII. |
| phrGFP.N1 p120-catenina (1-911) (268-269A) | Extret de p120-catenina (1-911) S268-269A-pGEX per PCR incorporant dianes EcoRI/SacII i clonat dins de phrGFP.N1 obert amb EcoRI/SacII. |
| phrGFP.N1 p120-catenina (350-911) | Extret de p120-catenina (350-911)- pGEX per PCR incorporant dianes EcoRI/SacII i clonat dins de phrGFP.N1 obert amb EcoRI/SacII. |
| pEGFP-C1 | |
| pEGFP-C1 CytoE-cadherina (aminoàcids 732-883) | Cedit pel Dr. Hèctor Palmer |
| pEGFP-C1 CytoE-cadherina ΔCTerm | Cedit pel Dr. Hèctor Palmer |
| pBATEM2 | |
| E-cadherina | Cedit pel Dr. Hèctor Palmer |
| E-cadherina Ser-Ala | Obtingut a partir de la síntesis de DNA (Genscript) del fragment citosòlic (732-883) mutant les serines a |

| | |
|----------------------------|---|
| | alanines marcades en la Figura 62 de <i>Resultats</i> i incorporant dianes BstEII/KpnI. Clonat dins de pBATEM2-E-cadherina obert amb BstEII/KpnI. |
| pLKO | |
| pLKO shRNA-non target | SIGMA |
| pLKO shRNA-p120 catenin | SIGMA |
| pLKO shRNA-CK1 ϵ | SIGMA |
| pLKO shRNA-N-cadherin | SIGMA |
| pLKO shRNA-E-cadherin | SIGMA |
| pLKO shRNA-CK1 α | SIGMA |
| pLKO shRNA-PP2A catalytic | SIGMA |
| pLKO shRNA-PR61 α | SIGMA |
| pLKO shRNA-PR61 β | SIGMA |
| pLKO shRNA-PR61 ϵ | SIGMA |
| pCS2 | |
| pCS2-PR61 ϵ | Cedit pel Dr. Jing Yang |
| pCS2-flag+GFP-CALRP | Cedit pel Dr. Akira Kikuchi |

Taula 3: Construccions de DNA utilitzades en el projecte

3 Mètodes d'expressió i purificació de proteïnes

3.1 Expressió i purificació de proteïnes recombinants en procarïotes

Les proteïnes de fusió amb GST s'expressen en *E. Coli* i es purifiquen per cromatografia d'afinitat utilitzant resina de Glutatió-Sefarosa.

Inicialment es fa créixer un cultiu de l'*stock* de bacteris que conté la proteïna desitjada durant tota la nit a 37°C i en LB-ampicil·lina. El dia següent el cultiu es dilueix 100 vegades i es deixa créixer a 37°C fins a assolir la fase exponencial de creixement (Absorbància de 0,6 a 600nm de longitud d'ona) en el que s'induirà l'expressió de proteïnes mitjançant l'addició de 0,1mM d'IPTG (isopropil β -D-tiogalactòsid). Després de 2 hores d'inducció es centrifuguen les cèl·lules a 8000 rpm durant 10 minuts i a una temperatura de 4°C.

Depenent de la solubilitat de la proteïna, es lisen les proteïnes de dues maneres diferents:

1. Proteïnes solubles: El *pellet* es resuspèn en PBS, es sonica 5 vegades en períodes alternats de sonicació/repòs de 30 segons, i s'hi afegeix Tritó X-100 (Sigma) a una concentració final de l'1%. El cultiu es deixa agitant durant 30 minuts a 4°C i es centrifuga a 10000 rpm durant 10 minuts a 4°C.
2. Proteïnes poc solubles: El *pellet* es resuspèn en tampó STE + 0,1µg/ml lisozima i es deixa reposar durant 15 minuts a 4°C. S'afegeix Sarcozyl a l'1% de concentració final i es vorteja durant 1 minut. A continuació el cultiu es sonica 5 vegades en períodes alternats de sonicació/repòs de 30 segons, s'hi afegeix Tritó X-100 (Sigma) a una concentració final de l'1% i es centrifuga a 10000 rpm durant 20 minuts a 4°C. Es descarta el *pellet*, s'afegeix un 2% més de Tritó X-100 i es vorteja 2 minuts més.

S'afegeix un volum 1:100 de resina *Glutathione-Sepharose-4B* (Pharmacia) al sobrenedant, es deixa el cultiu agitant durant 1 hora amb la resina i es realitzen 3 rentats amb PBS (la resina es centrifuga durant 1 minut a 1000 rpm i a 4°C). Segons si la proteïna es vol obtenir unida o tallada de la GST, es procedeix de dues maneres diferents:

1. Proteïna unida a GST: la resina s'incuba amb tampó d'elució de glutatió (*glutathion elution buffer*, GEB) durant 1 hora a 4°C. La GST se separa del glutatió unit a la resina. Per eliminar tot el glutatió del medi, el sobrenedant es posa en un sac de diàlisi i es dialitza durant 20 hores a 4°C.
2. Proteïna sense GST: la resina s'incuba amb el tampó de tall de la PreScission Protease (PSP) (Amersham-Pharmacia). S'afegeix una unitat de PSP per cada 50 µg de proteïna de fusió i es manté la barreja agitant durant 16 hores a 4°C.

Es recull el sobrenedant i es congela en alíquotes a -20°C. Per quantificar la proteïna i valorar-ne la seva puresa, s'utilitza l'electroforesi de gels de poliacrilamida i la posterior tinció utilitzant Comassie Blue (Sigma).

3.2 Expressió de proteïnes en línies cel·lulars eucariotes

3.2.1 Transfecció transitòria

Es sembren les cèl·lules en plaques de diferent mida segons l'experiment que s'ha de realitzar i es deixa que les cèl·lules s'adhereixin durant 8-24 hores fins que arriben a una confluència del 40-80% i poden ser transfectades.

Per a realitzar la transfecció s'utilitza PEI (Polyethylamine, Polysciences, Inc.), medi D-MEM sense antibiòtics ni sèrum i DNA de la proteïna que es vol transfectar. La quantitat de DNA que s'utilitza per transfectar depèn de la mida de les plaques on les cèl·lules estan sembrades:

| Diàmetre placa | Superfície placa | DNA |
|----------------|--------------------|--------|
| 10 cm | 60 cm ² | 12 µg |
| 60 mm | 20 cm ² | 3-4 µg |
| 6 pous | 10 cm ² | 2 µg |

Taula 4: Quantitat de DNA transfectada segons la mida de la placa

El DNA i 100µl de DMEM per cada µg de DNA transfectat es barregen en un tub. S'afegeixen a la mescla 10µl de PEI per cada µg de DNA i es vorteja durant 15 segons. Es deixa reposar la barreja a temperatura ambient durant 20 minuts i s'afegeix a la placa de cèl·lules. De 6-12 hores després de la transfecció es canvia el medi per evitar la toxicitat del PEI. S'utilitzaran les cèl·lules després de 24-72 hores de la transfecció, segons el plasmidi utilitzat i l'experiment que s'hagi de realitzar.

3.2.2 Transfecció estable (Infecció lentiviral)

Les cèl·lules HEK293T es sembren en flascons T-75 a una confluència del 80-90% en D-MEM 10% FBS, i es deixen durant 6 hores perquè s'adhereixin a la placa. (La transfecció és més eficient si les cèl·lules estan sembrades poques hores abans de la transfecció). La barreja que es prepara per a cada flascó és la següent:

- 2,5µg plàsmid empaquetador PRSV-REV (Addgene)
- 7,5µg plàsmid empaquetador pMDLg/pRRE (Addgene)
- 2,5µg plàsmid "Envelope" PCMV-VSVG (Addgene)
- 12,5µg Vector d'interès pLKO (Sigma)

Les cèl·lules es transfecten amb PEI (tal i com s'explica anteriorment) en una campana de flux laminar i es deixen 24 hores a 37°C i a 5% de CO₂ i en un incubador apte per infecció amb lentivirus. El dia següent es canvia el medi de les cèl·lules i se n'afegeix 7 ml. Paral·lelament, es sembra la línia cel·lular que es voldrà infectar en flascons T-75 i a una confluència del 50%. 24 hores després es recull el medi de les HEK293T (que contindrà els lentivirus), es filtra per eliminar les cèl·lules dels virus (diàmetre del porus de 0,45µm), i s'hi afegeix Polybrene (Sigma) per afavorir l'entrada dels virus dins les cèl·lules. Finalment s'afegeix aquest medi als flascons de les cèl·lules que es volen infectar. El mateix procés es repeteix 24 hores més tard, eliminant les cèl·lules HEK293T productores de virus amb lleixiu. 24 hores després, es canvia el medi de les cèl·lules infectades amb medi fresc i contenint puromicina a una concentració de 2µg/ml per seleccionar les cèl·lules que han estat infectades.

Una setmana després es farà un *Western Blot* per comprovar que les cèl·lules expressen la construcció infectada, i en cas afirmatiu, es podran utilitzar per realitzar els experiments. Les cèl·lules es mantindran amb medi que conté puromicina a una concentració d'1µg/ml.

4 Tècniques per a l'estudi de proteïnes

4.1 Electroforesi i Western Blot

Per tal d'analitzar els resultats obtinguts en els experiments, s'utilitza l'electroforesi en gels de poliacrilamida i SDS. S'usen gels d'1,5mm de gruix i d'un percentatge d'acrilamida que varia entre el 8-12% amb el sistema *Mini-Protean III/Tetra* (Bio-Rad). Abans de carregar les mostres al gel se'ls hi afegeix tampó de càrrega i es bullen durant 5 minuts. Els gels corren a un voltatge comprès entre els 100-200V en tampó Tris-Glicina-SDS (TGS 10x, Bio-Rad). El marcador de pes molecular utilitzat és el *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad).

Per visualitzar directament les mostres en el gel després de l'electroforesi, es fa una tinció d'aquest submergint-lo durant 30 minuts en una solució de *Comassie Brilliant Blue* en agitació. Posteriorment es fan rentats del gel amb el tampó de destenyir, i finalment s'hi afegeix aigua.

Per visualitzar les proteïnes en una membrana mitjançant electrotransferència del gel i immunodetecció, es realitza un Western Blot. Després de l'electroforesi, les proteïnes es transfereixen a un filtre de PVDF (*Immobilion-P Transfer Membrane* 0,45µM; Millipore) en una càmera de transferència humida (Bio-Rad) a 100V durant 70 minuts en tampó de transferència. La membrana de PVDF es bloqueja amb 1% BSA en TTBS durant una hora a temperatura ambient. A continuació s'incuba la membrana amb l'anticòs primari requerit diluït en 0,1% BSA-TTBS i a una dilució especificada pel fabricant, durant 2 hores a temperatura ambient o durant 16 hores a 4°C.

Els anticossos primaris utilitzats en aquest treball són els següents:

| Anticòs primari | Organisme | Epítop | Dilució | Casa Comercial |
|----------------------------|---------------|------------------------|---------|----------------------|
| CK1α | <i>Goat</i> | C-terminal | 1/500 | Santa Cruz |
| CK1ε | <i>Mouse</i> | 248-414 | 1/2000 | BD Transduction Labs |
| CK1Y | <i>Rabbit</i> | 170-393 | 1/1000 | Abcam |
| Dvl-2 | <i>Rabbit</i> | 623-697 | 1/500 | Santa Cruz |
| Axina-1 | <i>Goat</i> | 210-410 | 1/1000 | R/D Systems |
| Frizzled | <i>Rabbit</i> | 301-400 | 1/500 | Santa Cruz |
| E-cadherina | <i>Mouse</i> | 735-883 | 1/1000 | BD Transduction Labs |
| N-cadherina | <i>Mouse</i> | C-terminal | 1/1000 | BD Transduction Labs |
| GST | <i>Goat</i> | - | 1/5000 | Amersham |
| Lamina B1 | <i>Rabbit</i> | 400-500 | 1/1000 | Abcam |
| Piruvat quinasa | <i>Goat</i> | - | 1/2000 | Sigma |
| Kaiso | <i>Mouse</i> | 103-584 | 1/1000 | Upstate/Abcam |
| LRP5/6 | <i>Rabbit</i> | 1314-1613 | 1/1000 | Santa Cruz |
| pLRP5/6 Thr1479 | <i>Rabbit</i> | pThr 1479 | 1/500 | Abnova |
| pLRP5/6 Ser1490 | <i>Rabbit</i> | PSer1490 | 1/500 | Cell Signalling |
| p120-catenina | <i>Mouse</i> | 326-632 | 1/1000 | BD Transduction Labs |
| p120-catenina-pS268 | <i>Mouse</i> | pS268 | 1/500 | Santa Cruz |
| β-actina | <i>Mouse</i> | N-terminal | 1/10000 | Sigma |
| β-catenina | <i>Mouse</i> | 696-750 | 1/1000 | BD Transduction Labs |
| Active β-catenina | <i>Mouse</i> | Ser33,37,Thr41 No-P | 1/500 | Millipore |
| P-beta-catenin | <i>Rabbit</i> | pSer33,37,Thr41 | 1/500 | Cell Signalling |
| GSK-3β | <i>Mouse</i> | 1-160 | 1/2000 | BD Transduction |

| | | | | |
|--|---------------|---------|--------|----------------------|
| GSK-3α/β | <i>Mouse</i> | 1-420 | | Santa Cruz |
| β-TRCP | <i>Rabbit</i> | - | 1/1000 | Santa Cruz |
| EAA1 | <i>Mouse</i> | 3-281 | 1/500 | BD Transduction Labs |
| Caveolina | <i>Rabbit</i> | 1-178 | 1/1000 | BD Transduction Labs |
| PP2A Sub. Catalítica | <i>Mouse</i> | 295-309 | 1/1000 | Millipore |
| PP2A Sub. Reg. PR61ϵ | <i>Rabbit</i> | - | 1/500 | Cedit Jing Yang |

Taula 5: Anticossos primaris utilitzats

Després de la incubació de l'anticòs primari, es fan tres rentats de 10 minuts cada un amb TTBS per eliminar l'excés d'anticòs, i tot seguit s'incuba amb l'anticòs secundari (anti-IgG conjugat amb HRP) a una dilució d'1/10000 durant una hora. Tot seguit es tornen a realitzar tres rentats de 10 minuts amb TTBS, i la membrana es revela utilitzant el kit *ImmobilonTM Western Chemiluminiscent HRP Substrate* (Millipore) i pel·lícules fotogràfiques (Kodak).

Per utilitzar la mateixa membrana més d'una vegada amb diferents anticossos, es necessari extreure l'anticòs primari de la membrana abans de tornar-la a incubar amb un altre anticòs primari. Per extreure l'anticòs, la membrana s'incuba durant 20 minuts a 55°C amb tampó d'*stripping*, es fa un rentat amb TTBST, es torna a bloquejar i finalment la membrana ja es pot tornar a incubar amb un altre anticòs primari.

4.2 Preparació d'extractes cel·lulars

Per extreure les proteïnes de les cèl·lules plaquejades, aquestes són rentades dues vegades amb PBS, i tot seguit s'hi afegeix el tampó de lisi (la quantitat depèn de la superfície de la placa), juntament amb els inhibidors de proteases i fosfatases següents: 3mM d'aprotinina, 10mM de leupeptina, 10mM de pepstatina, 1mM d'AESBF, 30mM de glicerol-2-fosfat, 0,5mM Va³⁺ i 1mM NaF. Es fa un *scraping* de les plaques i el lisat es recull en un tub. El tampó de lisi utilitzat dependrà de cada experiment i del que es necessiti solubilitzar:

1. Tampó lisi Kemler: S'utilitza per aconseguir una lisi suau i extreure bàsicament les proteïnes solubles, conservant la majoria d'interaccions

proteiques. S'homogeneïtzen els extractes amb xeringa per tal de trencar els nuclis i es centrifuguen 10 minuts a 14000 rpm i a 4°C.

2. Tampó lisi NP40 0,5%: S'utilitza per solubilitzar més quantitat de proteïna de membrana i citoesquelet. Els extractes es centrifuguen durant 10 minuts a 14000 rpm i a 4°C.
3. Tampó lisi RIPA: S'utilitza per aconseguir una lisi més forta i extracció de gairebé totes les proteïnes cel·lulars, conservant només les interaccions més fortes. S'homogeneïtza amb xeringa i es centrifuga durant 10 minuts a 14000 rpm i a 4°C.
4. Tampó lisi SDS 1%: S'utilitza per solubilitzar la totalitat dels components cel·lulars. Degut a que el tampó conté SDS les proteïnes es troben desnaturalitzades, i com a conseqüència, les interaccions es perden. S'utilitza bàsicament per observar els nivells de proteïna total que hi ha en uns determinats extractes cel·lulars. Aquests extractes s'escalfen durant 5 minuts a 95°C per fer desaparèixer la consistència mucosa que tenen degut al DNA. Finalment es centrifuguen 10 minuts a 14000 rpm.
5. Tampó lisi amb digitonina: S'utilitza per mantenir la integritat de les proteïnes de membrana. Es centrifuguen 10 minuts a 14000rpm.

4.3 Assaig d'interacció proteïna-proteïna

4.3.1 Assaig d'unió amb proteïnes recombinants

Aquest assaig consisteix en l'anàlisi de la unió de dues o més proteïnes recombinants dins d'un tub i després d'un temps determinat d'incubació. S'utilitza una proteïna que conté el tag de la GST (que s'unirà a la resina), i proteïnes que no tenen GST i que s'estudiarà si tenen la capacitat d'unir-se a la que sí que conté el tag.

S'afegeix la quantitat indicada de les diferents proteïnes en un volum final de 200 µl de Tampó de *Binding* i s'incuba a RT durant 30 minuts. Tot seguit, els complexos formats s'aïllen afegint 20 µl de resina efectiva Glutatió-Sefarosa (que s'unirà específicament a la GST de la proteïna) i s'incuba durant 30 minuts més. A continuació, la resina es renta 3 vegades utilitzant 500 µl de PBS-NP40 0,1% per eliminar la proteïna que no està unida a la proteïna amb GST. Els complexos que

queden units a la resina es solubilitzen utilitzant tampó de càrrega i bullint-los durant 5 minuts. Aquests productes solubilitzats s'analitzen utilitzant electroforesis per gels d'acrilamida i SDS, i posteriorment es transfereixen a una membrana de PVDF per poder realitzar un Western Blot.

En tots els casos d'assaig d'unió amb proteïnes recombinants, s'utilitza com a control negatiu l'addició de proteïna GST sola, juntament amb les proteïnes que no contenen GST. A més, aquest assaig també es pot realitzar després de la fosforilació d'una o més proteïnes amb el protocol que es descriu més avall.

4.3.2 Assaig de Pull-Down

Aquest assaig consisteix en l'anàlisi de la unió d'una proteïna recombinant que conté GST amb proteïnes presents en uns determinats extractes cel·lulars, després d'un temps d'incubació.

S'afegeix la quantitat indicada de proteïna recombinant i d'extractes cel·lulars obtinguts utilitzant un dels diferents tampons de lisi, en un volum final de 300- 500 µl. Tot seguit s'incuba tota la mescla 30 minuts a RT o 2 hores a 4°C. Els complexos formats s'aïllen afegint 20 µl de resina efectiva Glutatió-Sefarosa i s'incuba durant 30 minuts més a RT o 1 hora a 4°C. A continuació, la resina es renta 3 vegades utilitzant 500 µl de PBS-NP40 0,1% per eliminar les proteïnes no unides a la proteïna amb GST. Els complexos que queden units a la resina es solubilitzen utilitzant tampó de càrrega i bullint-los durant 5 minuts. Aquests productes s'analitzaran mitjançant Western Blot.

En alguns casos es fosforila la proteïna recombinant abans de realitzar l'assaig de *Pull-Down*.

4.3.3 Assaig de Coimmunoprecipitació (CoIP)

Aquest assaig consisteix en l'anàlisi de la unió d'una proteïna continguda en uns determinats extractes cel·lulars amb altres proteïnes i complexos de proteïnes presents en els mateixos extractes cel·lulars. La proteïna d'anàlisi s'uneix a un anticòs que la reconeix específicament. Per fer aquest assaig es poden utilitzar proteïnes endògenes o d'altres de sobreexpressades.

400-800 µg d'extractes cel·lulars s'incuben amb 2 µg/ml de l'anticòs apropiat en un volum final de 300-500 µl del tampó de lisi utilitzat i durant 3-16 hores en rotació i

a 4°C. Després de la incubació amb l'anticòs s'elimina el material que precipita mitjançant una centrifugació a 14000 rpm durant 10 minuts. El sobrenedant s'incuba amb 20 µl de resina efectiva Gammabind-Sefarosa (GE-Healthcare) durant 2 hores. A continuació, la resina es renta 3 vegades utilitzant 500 µl de PBS-NP40 0,1%, i els complexos que queden units a la resina es solubilitzen utilitzant tampó de càrrega i bullint-los durant 5 minuts. Aquests productes s'analitzaran mitjançant Western Blot utilitzant anticossos específics.

4.4 Assaig de localització cel·lular de proteïnes

4.4.1 Subfraccionament cel·lular

S'utilitza per extreure proteïnes de compartiments cel·lulars concrets. En aquest cas, la fracció nuclear s'aïlla de la fracció que conté citosol, membrana i citoesquelet.

Les cèl·lules es lisen utilitzant el tampó 1 més inhibidors de proteases i fosfatases. Els extractes es deixen en gel durant 15 minuts i tot seguit es centrifuguen a 500xg durant 15 minuts i a 4°C. El sobrenedant conté la fracció del citosol, membrana i citoesquelet.

El *pellet* es renta 2 vegades amb tampó 1 i es lisa amb la meitat del tampó 1 utilitzat inicialment, més SDS a una concentració final del 0,5%. Els extractes es soniquen durant 5 segons i es centrifuguen a 14000 rpm durant 15 minuts i a 4°C. El sobrenedant conté la fracció nuclear.

Les proteïnes s'analitzen per Western Blot, carregant el doble de volum de mostra en el gel d'electroforesi pel citosol-membrana-citoesquelet que per el nucli, ja que la fracció nuclear es resuspèn en la meitat de volum que l'altra fracció.

4.4.2 Immunofluorescència

La immunofluorescència s'utilitza per estudiar la localització d'una proteïna utilitzant un anticòs específic.

Les cèl·lules es sembren en plaques de 24 pous i sobre cobreobjectes estèrils tractats amb polilisina. Després de l'aplicació del tractament adequat a cada pou, les cèl·lules es fixen amb paraformaldehid al 4% durant 10 minuts i es renten 3 vegades amb PBS. Tot seguit es permeabilitzen les membranes per tal de permetre la unió dels anticossos amb les proteïnes a estudiar. Per fer aquesta

permeabilització es tracten les cèl·lules amb una solució de 0,2% de Tritó X-100 en PBS durant 5 minuts, i es fan 3 rentats amb PBS. Tot seguit es bloqueja amb BSA 3% en TBS 30 minuts a RT, i s'incuba amb una dilució 1/50 de l'anticòs primari que es vol utilitzar durant 1 hora a RT. Els controls negatius de l'experiment es posen en les mateixes condicions però no s'incuben amb anticòs primari. A continuació, els cobreobjectes es renten 3 vegades amb PBS, i s'incuben amb l'anticòs secundari a una concentració de 2 µg/µl en tampó de bloqueig durant una hora a RT. Els anticossos secundaris que s'utilitzen estan marcats amb fluoròfors, per tant, a partir d'aquest punt els cobreobjectes s'han de protegir de la llum per impedir la degradació d'aquests fluoròfors. Els anticossos secundaris que s'utilitzen són l'*Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG* i l'*Alexa Fluor 547 goat anti-mouse IgG* (Life Technologies). Les cèl·lules es renten de nou amb PBS i s'incuben durant 10 minuts amb DAPI a una concentració de 500 ng/ml en PBS, per tal de tenyir els nuclis. Després de 2 rentats amb PBS, els cobreobjectes es munten sobre els portaobjectes amb Mowiol (Calbiochem).

Un cop el medi de muntatge ha solidificat s'observen les cèl·lules en un microscopi confocal Leica (*LEICA spectral confocal TCS-SL*), excitant els fluorocroms amb el làser adient per als fluoròfors utilitzats.

4.4.3 Assaig de localització de proteïnes dins de cossos multivesiculars

4.4.3.1 Permeabilització amb digitonina i assaig de protecció de proteasa

Aquest assaig s'utilitza per extreure proteïnes que es troben dins de cossos multivesiculars, i es realitza tal i com està descrit prèviament [124], [220]. Es basa en la permeabilització de cèl·lules amb digitonina (que solubilitza el colesterol present a la membrana plasmàtica, i deixa els endosomes intactes), i en el posterior assaig de protecció de proteasa. Per fer aquest assaig de protecció s'utilitza la proteïnasa K que degrada totes les proteïnes contingudes dins dels compartiments permeabilitzats, de manera que es permet la detecció de les proteïnes intraluminals presents en els cossos multivesiculars.

Les cèl·lules sembrades en plaques de 10 cm i tractades en diferents condicions es tripsinitzen i es *pelletegen*. Tot seguit, les cèl·lules es resuspenen en tampó de resuspensió més digitonina a una concentració de 65 µg/ml, i s'incuben durant 5 minuts a RT i posteriorment durant 30 minuts en gel. A continuació, s'extreu la solució de digitonina mitjançant una centrifugació a 3000 rpm durant 5 minuts i a

4°C. Les cèl·lules permeabilitzades es resuspenen en tampó de resuspensió sense digitonina i es divideixen en 3 tubs d'*eppendorf* diferents que contenen reactius per obtenir una concentració final de:

- 1 µg/ml de Proteïnasa K (Invitrogen): Es digeriran les proteïnes de la membrana i el citosol i es deixaran intactes les que es troben dins dels cossos multivesiculars.
- 1 µg/ml de Proteïnasa K + 0,1% Tritó: El tritó solubilitzarà totes les membranes, així que la Proteïnasa K digerirà totes les proteïnes. S'utilitza com a control.
- Aigua: Les proteïnes de tots els compartiments es mantindran intactes.

S'incuben els diferents tubs 10 minuts a RT i la reacció s'atura afegint una concentració de 20mM d'inhibidor proteic AESBF i tampó de càrrega calent.

Les proteïnes presents en els cossos multivesiculars s'analitzen per Western Blot carregant volums iguals de les diferents condicions en un gel d'electroforesi.

4.4.3.2 Permeabilització amb digitonina i immunofluorescència

Aquest assaig s'utilitza per visualitzar únicament les proteïnes que es troben dins dels endosomes, fent ús de la tècnica de la immunofluorescència.

El procediment és el mateix que el que es realitza per fer una immunofluorescència convencional, però afegint un pas de permeabilització de les cèl·lules amb tampó de resuspensió contenint digitonina, just abans de la fixació de les cèl·lules amb paraformaldehid. Les cèl·lules es permeabilitzen amb digitonina per eliminar totes les proteïnes que no estan contingudes dins dels endosomes, de manera que només es podran visualitzar aquelles proteïnes que es troben dins d'aquests. La permeabilització es realitza amb tampó de resuspensió juntament amb una concentració de 65 µg/ml de digitonina i s'incuba durant 5 minuts a RT.

4.4.4 Assaig de localització de proteïnes a la membrana plasmàtica

4.4.4.1 Assaig de biotinitiació de la superfície cel·lular

S'utilitza per analitzar quines proteïnes es troben a la membrana plasmàtica.

Les cèl·lules plaquejades s'incuben amb una concentració de 0,5 mg/ml de *sulfo-NHS-LC-biotin* (Pierce, Rockford, IL) durant 30 minuts a 4°C, afavorint l'adhesió de

biotina a les proteïnes de la superfície de la cèl·lula, ja que aquesta es troba intacta. Tot seguit, s'inactiva l'excés de biotina amb la incubació durant 2 minuts d'una concentració de 50 mM de NH_4Cl , i les cèl·lules es lisen amb tampó digitonina per mantenir la integritat de les proteïnes de membrana. Els extractes cel·lulars s'incuben amb resina *Streptavidin-Agarose* (Sigma) durant 2 hores a 4°C que s'uneix a la biotina, i per tant a les proteïnes de la membrana prèviament marcades amb aquesta proteïna. A continuació es fan 3 rentats de la resina amb PBS-0,1% NP40, i les proteïnes s'analitzen per Western Blot utilitzant anticossos específics. Mitjançant aquest assaig, es detectaran únicament les proteïnes que estan localitzades a la membrana plasmàtica.

4.4.4.2 Assaig de digestió de proteïnes de la superfície cel·lular

S'utilitza, de la mateixa manera que l'assaig anterior, per analitzar quines proteïnes es troben a la membrana plasmàtica. Es basa en l'assaig de protecció de la proteasa en condicions on les membranes no estan solubilitzades, i per tant, la proteasa només pot tallar les proteïnes que es troben a la membrana plasmàtica.

Les cèl·lules sembrades en plaques de 10 cm i tractades en diferents condicions es tripsinitzen i es *pelletegen*. Tot seguit, aquestes cèl·lules es resuspenen en tampó de resuspensió i es tracten amb proteïnasa K a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durant 10 minuts a RT. S'afegeix SDS a una concentració final de l'1% i l'inhibidor de proteases AEBSF a una concentració de 20mM per aturar la reacció.

Les proteïnes s'analitzen per Western Blot carregant volums iguals de les diferents condicions en un gel d'electroforesi. Aquelles proteïnes que es digereixen després de l'addició de la proteïnasa K, estan localitzades a la membrana plasmàtica.

4.5 Assaig de fosforilació

4.5.1 Utilitzant una quinasa recombinant

En aquest assaig una proteïna recombinant es fosforila amb una quinasa recombinant comercial. La proteïna recombinant fosforilada que s'obté es pot utilitzar per realitzar diferents assaigs posteriors com assaigs d'unió amb proteïnes recombinants o assaig de *Pull Down*.

Els assaigs de fosforilació es realitzen en un volum final de 25 μl , en un tampó de fosforilació específic per cada quinasa i una concentració de 0,1 mM d'ATP. La

proteïna recombinant, la quinasa utilitzada i els mateixos inhibidors de proteases i fosfatases utilitzats en la preparació d'extractes cel·lulars, s'afegeixen a la mescla. Tot seguit, s'incuba a la temperatura i temps necessari per a cada quinasa.

Pels experiments realitzats en aquest projecte, s'ha utilitzat el domini catalític de la quinasa CK1 (*CK1 δ C-terminal truncated*, *New England Biolabs*) per fosforilar les proteïnes recombinants. Aquesta quinasa requereix les següents condicions de fosforilació:

| | Quinasa CK1 |
|--|-------------|
| Temperatura | 30 °C |
| Temps | 40 minuts |
| Concentració reacció (mU/pmol substrat) | 10-50 mU |
| Substrat | 2-10 pmols |
| Volum | 25 μ l |

Taula 6: Condicions fosforilació quinasa CK1

L'assaig de fosforilació amb una quinasa recombinant també es pot realitzar per observar la fosforilació sobre una proteïna recombinant mitjançant autoradiografia. Es realitza el mateix procediment explicat anteriorment però en aquest cas s'utilitza gamma-32P-ATP. Després de la incubació a la temperatura i temps requerit, s'atura la reacció afegint tampó de càrrega i es realitza una electroforesi en gel de poliacrilamida. Tot seguit, s'asseca el gel amb paper Whatman 3.0, s'exposa en un autoradiograma i es manté el *cassette* a -80°C durant 2 hores.

4.5.2 Utilitzant una quinasa purificada de línies cel·lulars

Per tal de realitzar un experiment de fosforilació a partir d'una quinasa provinent d'extractes cel·lulars, s'immunoprecipita la quinasa tal i com s'explica a l'apartat de coimmunoprecipitació, però en aquest cas s'incuben els extractes cel·lulars i l'anticòs específic de la quinasa durant 2 hores a 4°C, per impedir que la quinasa perdi activitat.

Després de rentar la resina, es fa un rentat extra amb tampó de fosforilació per tal de canviar les concentracions d'electròlits presents per les adequades per l'assaig de fosforilació. S'afegeix al tub el tampó de fosforilació suplementat amb 0,1 mM d'ATP, i la proteïna recombinant que es vol fosforilar i es procedeix tal i com s'explica a l'apartat 4.5.1.

4.6 Assaigs reporters

Aquest assaig s'utilitza per analitzar l'activitat transcripcional de la β -catenina. S'usa el plasmidi TOP-FLASH que conté un promotor sintètic amb tres còpies de la seqüència d'unió del TCF4 al DNA i un promotor mínim del gen Fos controlant l'expressió de la Luciferasa de *Firefly*.

Es sembren les cèl·lules en plaques de 6 cm i 6 hores després es transfecten, tal i com s'explica a l'apartat transfecció transitòria i si l'experiment ho requereix, amb els plasmidis d'interès (plasmidis per interferir una o més proteïnes). 24 hores després es transfecten les cèl·lules amb 1 μ g de DNA per placa de 6 cm de plasmidi TOP-FLASH, i amb 0,2 μ g per placa de plasmidi control pTK-Renilla. Aquest plasmidi conté el gen de la luciferasa de *Renilla* sota el control del promotor de la Timidina Quinasa, un promotor constitutivament actiu. Aquests dos plasmidis també es poden transfectar conjuntament amb un altre plasmidi per sobreexpressar una proteïna determinada si l'experiment ho requereix. En aquest cas, es transfecta de 100 ng a 1 μ g de DNA de la proteïna que es vol sobreexpressar. 24 hores després, es tripsinitzen les cèl·lules i es sembren en plaques de 96 pous. 6 hores després de la transfecció s'afegeixen els diferents tractaments a les cèl·lules.

Després del tractament, les cèl·lules es lisen amb el kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega) i l'activitat de les luciferases es llegeix amb el luminòmetre FB-12 (Berthold Detection Systems). L'activitat relativa de les luciferases de *Firefly* i *Renilla* donen la diferència d'activitat transcripcional entre els gens induïbles i regulats per Tcf4 i els d'expressió constitutiva. Aquest control es realitza per evitar les diferències de resultats degudes a la variació en l'eficiència de la transfecció entre les diferents mostres. Cada punt es fa per quintuplicat i s'expressa la mitjana.

5 Aïllament i anàlisi d'RNA per RT-PCR quantitativa

Per poder purificar l'mRNA de les cèl·lules, aquestes es lisen utilitzant el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) després d'haver estat plaquejades i tractades en les diferents condicions requerides. A continuació s'aïlla l'RNA amb el mateix kit, i es quantifica mitjançant *NanoDropTM Spectrophotometer* (Thermo Scientific). Tot seguit l'RNA es retrotranscriu usant els oligo dT i el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit*

(Roche), seguint les instruccions del protocol i partint de 2 µg d'RNA per cada mostra.

Finalment s'utilitza el cDNA obtingut de la retrotranscripció per fer una RT-PCR quantitativa. L'anàlisi es realitza per triplicat, amb 100 ng de cDNA per cada punt i utilitzant el *LightCycler 480 Real Time PCR System* (Roche). Els oligonucleòtids que s'han utilitzat en aquest treball per a la RT-PCR quantitativa són els següents:

| Oligonucleòtids | Seqüència |
|-----------------|---|
| CCND1 humà | 5'-CTCAGACTTGCGCGTCACAG-3' i 5'-CAGAACACGGCTCACGCTTA-3' |
| AXIN2 humà | 5'-TGTCTTAAAGGTCTTGAGGGTTGAC-3' i 5'-CAACAGATCATCCCATCCAACA-3 |
| TCF7 humà | 5'-ACCAAGAATCCACCACAGAGAC-3' i 5'-TCACATCTGCACCAAGGCAA-3 |
| Tcf7 ratolí | 5'-CGCGGGATAACTACGGAAAGA-3' i 5'-TAGCAAGCAGTTCTGTGGGG-3' |
| EPHB3 humà | 5'-GCATCGCCTCCACAGTGACC-3' i 5'-ACGAAGACAAGCCCAGCTGTA-3' |
| Ephb3 ratolí | 5'-GTGCCTAACCAGAGGCATGA-3' i 5'-GGGGTCACCTGGTATGGTGT-3' |
| PR61α humà | 5'-TCAGGTTGCAGAAAGGGCAT-3' i 5'-ACAATGGTCGGATTCCAGTGT-3' |
| PR61β humà | 5'-AGGAGCACTGGAACCAAACC-3' i 5'-TGCCATAACTCCTGACGCTC-3' |
| PR61ε humà | 5'-AAGCTTCAAGGGATATGTCCTCAG-3' i 5'-TGCTCTGAGGATGGAACGTC-3' |
| HPRT | 5'-GGCCAGACTTTGTTGGATTTG-3' i 5'-TGCCTCATCTTAGGCTTTGT-3' |

Taula 7: Seqüència dels diferents oligonucleòtids utilitzats en aquest projecte. El primer és *forward* i el segon és *reverse*.

6 Diferenciació de mMSC a adipòcits

Per estudiar la diferenciació de les cèl·lules mare mesenquimals murines (mMSC) a adipòcits, aquestes es sembren utilitzant medi DMEM 10% FBS en plaques de 6 pous, i es posen a diferenciar 24 hores després d'arribar a confluència. El medi de diferenciació utilitzat és DMEM 10% FBS o medi condicionat control/Wnt3a segons les condicions, i suplementat amb 1µM dexametasona, 0,2mM indometacina, 0,1mg/ml insulina i 1mM 3-isobutil-1-metilxantina. Al cap de 72 hores s'extreu el medi de diferenciació i s'afegeix medi DMEM 10% + 0,1mg/ml d'insulina, que es va

canviant cada dos dies. 15 dies després de l'inici de la diferenciació es lisen les cèl·lules amb tampó lisi RIPA. La diferenciació de les cèl·lules s'analitza per Western Blot utilitzant el marcador Glut4.

Prèviament a la diferenciació, es poden transfectar les cèl·lules per interferir o sobreexpressar una determinada proteïna. El protocol de transfecció utilitzat és el que es detalla a l'apartat 3.2.1.

7 Reactius i solucions

LB: 0,5% p/v extractes de llevat, 1% p/v bacto-triptona, 170mM NaCl pH 7.0.

LB Agar: 0,5% p/v extractes de llevat, 1% p/v bacto-triptona, 170mM NaCl pH 7.0, 1,5% Agar 7.0.

PBS: 140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄/1,8mM KH₂PO₄ (pH 7.4).

Glutathione Elution Buffer, GEB: 20mM glutatona reduïda (Sigma), 50mM Tris-HCl pH 8.5, 100mM NaCl.

Tampó de diàlisis: 25mM Tris pH 8.3, 120mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT.

PEI: 1mg/ml PEI a pH 7.0.

Tampó de càrrega: 100mM Tris pH 6.8, 4% glicerol, 2%SDS, 0,06%, 2-β-Mercaptoetanol.

Comassie Brilliant Blue: 0,1% Comassie Brilliant Blue, 40% metanol, 10% àcid acètic.

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

Tampó de Binding: 50mM Tris pH 7.8, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 3mM MgCl₂, 0,1% p/v TX-100.

TTBS: 25mM Tris-HCl pH 7.5, 0,1% Tween-20, 135mM NaCl.

Tampó d'stripping: 2% SDS 62.5mM Tris pH 6.8, 100mM β-mercaptoetanol.

Tampó STE: 10mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA.

Tampó 1 (fraccionament cel·lular): 50mM Tris pH 7.5, 1% TX-100, 137mM NaCl, 10% Glicerol.

Tampó lisi Kemler: 25mM Tris pH 7.6, 210mM NaCl, 1mM EGTA, 0,1% Nonidet-40, 5mM MgCl₂, 1mM DTT.

Tampó lisi NP40 0,1%: 140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄/1,8mM KH₂PO₄ (pH 7.4), 0,1% Nonidet-40.

Tampó lisi RIPA: 25mM Tris pH7.6, 210mM NaCl, 1mM EGTA, 1% Nonidet-40, 0.5% Deoxicolat de sodi, 0,1% SDS.

Tampó lisi SDS 1%: 25mM Tris pH 7.6, 210mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 1% SDS.

Tampó lisi amb digitonina: 25mM Tris pH 7.6, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Digitonina.

Trypan Blue: 0,4% *Trypan* Blue en PBS p/v.

Tampó de transferència: 192 mM glicina, 25mM Tris, metanol 10%.

Tampó TAE: 40mM Tris-acetat, 0,1mM EDTA pH 8.3.

Tampó tall PSP: 50mM Tris pH 7.8, 300mM NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA.

Tampó de resuspensió: 100mM K₂HPO₄ /KH₂PO₄, pH 6.7, 5mM MgCl₂ i 250mM sucrosa.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- [1] W. J. Nelson, "Remodeling epithelial cell organization: transitions between front-rear and apical-basal polarity.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, no. 1, p. a000513, Jul. 2009.
- [2] W. J. Nelson, "Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity.," *Nature*, vol. 422, no. 6933, pp. 766–74, Apr. 2003.
- [3] M. G. Farquhar and G. E. Palade, "Junctional complexes in various epithelia.," *J. Cell Biol.*, vol. 17, pp. 375–412, 1963.
- [4] J. M. Halbleib and W. J. Nelson, "Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis.," *Genes Dev.*, vol. 20, no. 23, pp. 3199–214, Dec. 2006.
- [5] M. Takeichi, "The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis.," *Development*, vol. 102, no. 4, pp. 639–55, Apr. 1988.
- [6] L. Shapiro, A. M. Fannon, P. D. Kwong, A. Thompson, M. S. Lehmann, G. Grübel, J. F. Legrand, J. Als-Nielsen, D. R. Colman, and W. A. Hendrickson, "Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins.," *Nature*, vol. 374, no. 6520, pp. 327–37, Mar. 1995.
- [7] P. Hulpiau, I. S. Gul, and F. van Roy, *New insights into the evolution of metazoan cadherins and catenins.*, vol. 116. 2013, pp. 71–94.
- [8] Y. Zhang, S. Sivasankar, W. J. Nelson, and S. Chu, "Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 1, pp. 109–14, Jan. 2009.
- [9] T. J. Boggon, J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B. M. Gumbiner, and L. Shapiro, "C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms.," *Science*, vol. 296, no. 5571, pp. 1308–13, May 2002.
- [10] M. Takeichi, "Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 59, pp. 237–52, 1990.

- [11] C. M. Niessen and B. M. Gumbiner, "Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity.," *J. Cell Biol.*, vol. 156, no. 2, pp. 389–399, Jan. 2002.
- [12] Y. Wu, X. Jin, O. Harrison, L. Shapiro, B. H. Honig, and A. Ben-Shaul, "Cooperativity between trans and cis interactions in cadherin-mediated junction formation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 41, pp. 17592–7, Oct. 2010.
- [13] N. Ishiyama, S.-H. Lee, S. Liu, G.-Y. Li, M. J. Smith, L. F. Reichardt, and M. Ikura, "Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion.," *Cell*, vol. 141, no. 1, pp. 117–28, Apr. 2010.
- [14] A. Ratheesh and A. S. Yap, "A bigger picture: classical cadherins and the dynamic actin cytoskeleton.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 10, pp. 673–9, Oct. 2012.
- [15] L. Shapiro and W. I. Weis, "Structure and biochemistry of cadherins and catenins.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, no. 3, p. a003053, Sep. 2009.
- [16] H. Aberle, S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler, and H. Hoschuetzky, "Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins.," *J. Cell Sci.*, vol. 107, pp. 3655–63, Dec. 1994.
- [17] A. S. Yap, C. M. Niessen, and B. M. Gumbiner, "The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn.," *J. Cell Biol.*, vol. 141, no. 3, pp. 779–89, 1998.
- [18] E. Batlle, E. Sancho, C. Francí, D. Domínguez, M. Monfar, J. Baulida, and a García De Herreros, "The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 2, no. 2, pp. 84–9, Feb. 2000.
- [19] L. Hinck, I. S. Näthke, J. Papkoff, and W. J. Nelson, "Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly.," *J. Cell Biol.*, vol. 125, no. 6, pp. 1327–40, Jun. 1994.

- [20] a H. Huber and W. I. Weis, "The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin.," *Cell*, vol. 105, no. 3, pp. 391–402, May 2001.
- [21] Y. T. Chen, D. B. Stewart, and W. J. Nelson, "Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells.," *J. Cell Biol.*, vol. 144, no. 4, pp. 687–99, Feb. 1999.
- [22] H. Lickert, "Casein Kinase II Phosphorylation of E-cadherin Increases E-cadherin/beta -Catenin Interaction and Strengthens Cell-Cell Adhesion.," *Biol. Chem.*, vol. 275, no. 7, pp. 5090–5095, Feb. 2000.
- [23] S. Dupre-Crochet, A. Figueroa, C. Hogan, E. C. Ferber, C. U. Bialucha, J. Adams, E. C. N. Richardson, and Y. Fujita, "Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 10, pp. 3804–16, May 2007.
- [24] a K. Perl, P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb, and G. Christofori, "A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma.," *Nature*, vol. 392, no. 6672, pp. 190–3, Mar. 1998.
- [25] A. Gheldof and G. Berx, *Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition.*, 1st ed., vol. 116. Elsevier Inc., 2013, pp. 317–36.
- [26] S. Miyatani, K. Shimamura, M. Hatta, a Nagafuchi, a Nose, M. Matsunaga, K. Hatta, and M. Takeichi, "Neural cadherin: role in selective cell-cell adhesion.," *Science*, vol. 245, no. 4918, pp. 631–5, Aug. 1989.
- [27] Y. Luo, M. Ferreira-Cornwell, H. Baldwin, I. Kostetskii, J. Lenox, M. Lieberman, and G. Radice, "Rescuing the N-cadherin knockout by cardiac-specific expression of N- or E-cadherin.," *Development*, vol. 128, no. 4, pp. 459–69, Feb. 2001.
- [28] M. C. Ferreira-Cornwell, Y. Luo, N. Narula, J. M. Lenox, M. Lieberman, and G. L. Radice, "Remodeling the intercalated disc leads to cardiomyopathy in mice misexpressing cadherins in the heart.," *J. Cell Sci.*, vol. 115, no. Pt 8, pp. 1623–34, Apr. 2002.
- [29] L. Libusova, M. P. Stemmler, A. Hierholzer, H. Schwarz, and R. Kemler, "N-cadherin can structurally substitute for E-cadherin during intestinal

- development but leads to polyp formation.," *Development*, vol. 137, no. 14, pp. 2297–305, Jul. 2010.
- [30] E. Haÿ, E. Laplantine, V. Geoffroy, M. Frain, T. Kohler, R. Müller, and P. J. Marie, "N-cadherin interacts with axin and LRP5 to negatively regulate Wnt/beta-catenin signaling, osteoblast function, and bone formation.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 29, no. 4, pp. 953–64, Feb. 2009.
- [31] D. Casagolda, B. Del Valle-Pérez, G. Valls, E. Lugalde, M. Vinyoles, J. Casado-Vela, G. Solanas, E. Batlle, A. B. Reynolds, J. I. Casal, A. G. de Herreros, and M. Duñach, "A p120-catenin-CK1epsilon complex regulates Wnt signaling.," *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. Pt 15, pp. 2621–31, Aug. 2010.
- [32] B. Del Valle-Pérez, O. Arqués, M. Vinyoles, A. G. de Herreros, and M. Duñach, "Coordinated action of CK1 isoforms in canonical Wnt signaling.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 31, no. 14, pp. 2877–88, Jul. 2011.
- [33] J. Hülsken, W. Birchmeier, and J. Behrens, "E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton.," *J. Cell Biol.*, vol. 127, no. 6 Pt 2, pp. 2061–9, Dec. 1994.
- [34] J. P. von Kries, G. Winbeck, C. Asbrand, T. Schwarz-Romond, N. Sochnikova, A. Dell'Oro, J. Behrens, and W. Birchmeier, "Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC.," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 7, no. 9, pp. 800–7, 2000.
- [35] B. Del Valle-Pérez, D. Casagolda, E. Lugalde, G. Valls, M. Codina, N. Dave, A. G. de Herreros, and M. Duñach, "Wnt controls the transcriptional activity of Kaiso through CK1ε-dependent phosphorylation of p120-catenin.," *J. Cell Sci.*, vol. 124, no. Pt 13, pp. 2298–309, Jul. 2011.
- [36] J. Piedra, D. Martinez, J. Castano, S. Miravet, M. Dunach, and a G. de Herreros, "Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 23, pp. 20436–43, Jun. 2001.
- [37] S. Roura, S. Miravet, J. Piedra, a. G. de Herreros, and M. Dunach, "Regulation of E-cadherin/Catenin Association by Tyrosine Phosphorylation," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 51, pp. 36734–36740, Dec. 1999.
- [38] J. Piedra, S. Miravet, J. Castaño, H. G. Pálmer, N. Heisterkamp, A. García de Herreros, and M. Duñach, "p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine

- kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 7, pp. 2287–97, 2003.
- [39] S. Pokutta and W. I. Weis, "Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin.," *Mol. Cell*, vol. 5, no. 3, pp. 533–43, Mar. 2000.
- [40] D. L. Rimm, E. R. Koslov, P. Kebriaei, C. D. Cianci, and J. S. Morrow, "Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 19, pp. 8813–7, 1995.
- [41] S. Pokutta, F. Drees, Y. Takai, W. J. Nelson, and W. I. Weis, "Biochemical and structural definition of the I-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 21, pp. 18868–74, May 2002.
- [42] S. Yamada, S. Pokutta, F. Drees, W. I. Weis, and W. J. Nelson, "Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex.," *Cell*, vol. 123, no. 5, pp. 889–901, Dec. 2005.
- [43] A. Kobiela, H. A. Pasolli, and E. Fuchs, "Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 6, no. 1, pp. 21–30, Jan. 2004.
- [44] K. Abe and M. Takeichi, "EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 1, pp. 13–9, Jan. 2008.
- [45] J. M. Benjamin, A. V Kwiatkowski, C. Yang, F. Korobova, S. Pokutta, T. Svitkina, W. I. Weis, and W. J. Nelson, "AlphaE-catenin regulates actin dynamics independently of cadherin-mediated cell-cell adhesion.," *J. Cell Biol.*, vol. 189, no. 2, pp. 339–52, Apr. 2010.
- [46] A. B. Reynolds, D. J. Roesel, S. B. Kanner, and J. T. Parsons, "Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 9, no. 2, pp. 629–38, 1989.
- [47] A. Kourtidis, S. P. Ngok, and P. Z. Anastasiadis, *P120 Catenin: an Essential Regulator of Cadherin Stability, Adhesion-Induced Signaling, and Cancer Progression.*, 1st ed., vol. 116. Elsevier Inc., 2013, pp. 409–32.

- [48] A. Keirsebilck, S. Bonn , K. Staes, J. van Hengel, F. Nollet, A. Reynolds, and F. van Roy, "Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms.," *Genomics*, vol. 50, no. 2, pp. 129–46, 1998.
- [49] B. Seidel, S. Braeg, G. Adler, D. Wedlich, and A. Menke, "E- and N-cadherin differ with respect to their associated p120ctn isoforms and their ability to suppress invasive growth in pancreatic cancer cells.," *Oncogene*, vol. 23, no. 32, pp. 5532–42, Jul. 2004.
- [50] K. Xiao, D. F. Allison, K. M. Buckley, M. D. Kottke, P. a Vincent, V. Faundez, and A. P. Kowalczyk, "Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells.," *J. Cell Biol.*, vol. 163, no. 3, pp. 535–45, Nov. 2003.
- [51] T. Hoshino, T. Sakisaka, T. Baba, T. Yamada, T. Kimura, and Y. Takai, "Regulation of E-cadherin endocytosis by nectin through afadin, Rap1, and p120ctn.," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 25, pp. 24095–103, Jun. 2005.
- [52] K. Sato, T. Watanabe, S. Wang, M. Kakeno, K. Matsuzawa, T. Matsui, K. Yokoi, K. Murase, I. Sugiyama, M. Ozawa, and K. Kaibuchi, "Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 22, no. 17, pp. 3103–19, Sep. 2011.
- [53] S. Alem  and A. M. Salvatore, "p120 catenin and phosphorylation: Mechanisms and traits of an unresolved issue.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1773, no. 1, pp. 47–58, Jan. 2007.
- [54] L. Kim and T. W. Wong, "The cytoplasmic tyrosine kinase FER is associated with the catenin-like substrate pp120 and is activated by growth factors . The Cytoplasmic Tyrosine Kinase FER Is Associated with the Catenin-Like Substrate pp120 and Is Activated by Growth Factors," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 15, no. 8, pp. 4553–61, 1995.
- [55] M. S. Kinch, G. J. Clark, C. J. Der, and K. Burridge, "Tyrosine phosphorylation regulates the adhesions of ras-transformed breast epithelia.," *J. Cell Biol.*, vol. 130, no. 2, pp. 461–71, Jul. 1995.
- [56] P. Z. Anastasiadis, "p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1773, no. 1, pp. 34–46, Jan. 2007.

- [57] a. Hall, "Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton," *Science (80-.)*, vol. 279, no. 5350, pp. 509–514, Jan. 1998.
- [58] V. M. Braga, L. M. Machesky, a Hall, and N. a Hotchin, "The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts.," *J. Cell Biol.*, vol. 137, no. 6, pp. 1421–31, Jun. 1997.
- [59] P. Z. Anastasiadis, S. Y. Moon, M. a Thoreson, D. J. Mariner, H. C. Crawford, Y. Zheng, and a B. Reynolds, "Inhibition of RhoA by p120 catenin.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 2, no. 9, pp. 637–44, Sep. 2000.
- [60] N. K. Noren, B. P. Liu, K. Burrige, and B. Kreft, "p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases.," *J. Cell Biol.*, vol. 150, no. 3, pp. 567–80, Aug. 2000.
- [61] G. Valls, M. Codina, R. K. Miller, B. Del Valle-Pérez, M. Vinyoles, C. Caelles, P. D. McCrea, A. García de Herreros, and M. Duñach, "Upon Wnt stimulation, Rac1 activation requires Rac1 and Vav2 binding to p120-catenin.," *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. Pt 22, pp. 5288–301, Nov. 2012.
- [62] J. M. Daniel, "Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1773, no. 1, pp. 59–68, Jan. 2007.
- [63] D. B. Stairs, L. J. Bayne, B. Rhoades, M. E. Vega, T. J. Waldron, J. Kalabis, A. Klein-Szanto, J.-S. Lee, J. P. Katz, J. A. Diehl, A. B. Reynolds, R. H. Vonderheide, and A. K. Rustgi, "Deletion of p120-catenin results in a tumor microenvironment with inflammation and cancer that establishes it as a tumor suppressor gene.," *Cancer Cell*, vol. 19, no. 4, pp. 470–83, Apr. 2011.
- [64] D. I. Bellovin, R. C. Bates, A. Muzikansky, D. L. Rimm, and A. M. Mercurio, "Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease.," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 23, pp. 10938–45, Dec. 2005.
- [65] M. Yanagisawa and P. Z. Anastasiadis, "P120 Catenin Is Essential for Mesenchymal Cadherin-Mediated Regulation of Cell Motility and Invasiveness.," *J. Cell Biol.*, vol. 174, no. 7, pp. 1087–96, Sep. 2006.

- [66] B. Titus, M. A. Schwartz, and D. Theodorescu, "Rho proteins in cell migration and metastasis.," *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, vol. 15, no. 2, pp. 103–14, Jan. 2005.
- [67] C. Y. Logan and R. Nusse, "The Wnt signaling pathway in development and disease.," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, pp. 781–810, Jan. 2004.
- [68] H. Clevers, "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease.," *Cell*, vol. 127, no. 3, pp. 469–80, Nov. 2006.
- [69] K. Willert and R. Nusse, "Wnt proteins.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 9, p. a007864, Sep. 2012.
- [70] A. J. Mikels and R. Nusse, "Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context.," *PLoS Biol.*, vol. 4, no. 4, p. e115, Apr. 2006.
- [71] H. Komekado, H. Yamamoto, T. Chiba, and A. Kikuchi, "Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a.," *Genes Cells*, vol. 12, no. 4, pp. 521–34, Apr. 2007.
- [72] C. Y. Janda, D. Waghray, A. M. Levin, C. Thomas, and K. C. Garcia, "Structural basis of Wnt recognition by Frizzled.," *Science*, vol. 337, no. 6090, pp. 59–64, Jul. 2012.
- [73] L. M. Galli, T. L. Barnes, S. S. Secret, T. Kadowaki, and L. W. Burrus, "Porcupine-mediated lipid-modification regulates the activity and distribution of Wnt proteins in the chick neural tube.," *Development*, vol. 134, no. 18, pp. 3339–48, Oct. 2007.
- [74] C. Bänziger, D. Soldini, C. Schütt, P. Zipperlen, G. Hausmann, and K. Basler, "Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells.," *Cell*, vol. 125, no. 3, pp. 509–22, May 2006.
- [75] B. T. MacDonald, K. Tamai, and X. He, "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases.," *Dev. Cell*, vol. 17, no. 1, pp. 9–26, Jul. 2009.
- [76] C. Deal, "Potential new drug targets for osteoporosis.," *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, vol. 5, no. 1, pp. 20–7, Jan. 2009.

- [77] W. Hsu, L. Zeng, and F. Costantini, "Identification of a Domain of Axin That Binds to the Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A and a Self-binding Domain," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 6, pp. 3439–45, 1999.
- [78] S. Ikeda, M. Kishida, Y. Matsuura, H. Usui, and A. Kikuchi, "GSK-3 β -dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by β -catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin," *Oncogene*, vol. 19, no. 4, pp. 537–45, 2000.
- [79] W. Luo, A. Peterson, B. a Garcia, G. Coombs, B. Kofahl, R. Heinrich, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, H. J. Yost, and D. M. Virshup, "Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex.," *EMBO J.*, vol. 26, no. 6, pp. 1511–21, Mar. 2007.
- [80] S. Ikeda, S. Kishida, H. Yamamoto, H. Murai, S. Koyama, and A. Kikuchi, "Axin , a negative regulator of the Wnt signaling pathway , forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin," *EMBO J.*, vol. 17, no. 5, pp. 1371–1384, 1998.
- [81] C. Liu, Y. Li, M. Semenov, C. Han, G. H. Baeg, Y. Tan, Z. Zhang, X. Lin, and X. He, "Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism.," *Cell*, vol. 108, no. 6, pp. 837–47, Mar. 2002.
- [82] H. Yamamoto, T. Hinoi, T. Michiue, a Fukui, H. Usui, V. Janssens, C. Van Hoof, J. Goris, M. Asashima, and a Kikuchi, "Inhibition of the Wnt signaling pathway by the PR61 subunit of protein phosphatase 2A.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 29, pp. 26875–82, Jul. 2001.
- [83] M. Hart, J. P. Concordet, I. Lassot, I. Albert, R. del los Santos, H. Durand, C. Perret, B. Rubinfeld, F. Margottin, R. Benarous, and P. Polakis, "The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell.," *Curr. Biol.*, vol. 9, no. 4, pp. 207–10, Feb. 1999.
- [84] M. Kitagawa, S. Hatakeyama, M. Shirane, M. Matsumoto, N. Ishida, K. Hattori, I. Nakamichi, a Kikuchi, and K. Nakayama, "An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin.," *EMBO J.*, vol. 18, no. 9, pp. 2401–10, May 1999.
- [85] B. W. Doble, "GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase," *J. Cell Sci.*, vol. 116, no. 7, pp. 1175–1186, Apr. 2003.

- [86] B. W. Doble, S. Patel, G. a Wood, L. K. Kockeritz, and J. R. Woodgett, "Functional redundancy of GSK-3alpha and GSK-3beta in Wnt/beta-catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines.," *Dev. Cell*, vol. 12, no. 6, pp. 957–71, Jun. 2007.
- [87] R. Dajani, E. Fraser, S. M. Roe, M. Yeo, V. M. Good, V. Thompson, T. C. Dale, and L. H. Pearl, "Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex.," *EMBO J.*, vol. 22, no. 3, pp. 494–501, Feb. 2003.
- [88] V. W. Ding, R. H. Chen, and F. McCormick, "Differential regulation of glycogen synthase kinase 3beta by insulin and Wnt signaling.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 42, pp. 32475–81, Oct. 2000.
- [89] H. Yamamoto, S. Kishida, M. Kishida, S. Ikeda, S. Takada, and a Kikuchi, "Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 16, pp. 10681–4, Apr. 1999.
- [90] K. Willert, S. Shibamoto, and R. Nusse, "Wnt-induced dephosphorylation of Axin releases β -catenin from the Axin complex.," *Genes Dev.*, vol. 13, pp. 1768–1773, 1999.
- [91] S.-E. Kim, H. Huang, M. Zhao, X. Zhang, A. Zhang, M. V Semonov, B. T. MacDonald, X. Zhang, J. Garcia Abreu, L. Peng, and X. He, "Wnt stabilization of β -catenin reveals principles for morphogen receptor-scaffold assemblies.," *Science*, vol. 340, no. 6134, pp. 867–70, May 2013.
- [92] J. Behrens, "Functional Interaction of an Axin Homolog, Conductin, with -Catenin, APC, and GSK-3," *Science (80-)*, vol. 280, no. 5363, pp. 596–599, Apr. 1998.
- [93] N.-C. Ha, T. Tonzuka, J. L. Stamos, H.-J. Choi, and W. I. Weis, "Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation.," *Mol. Cell*, vol. 15, no. 4, pp. 511–21, Aug. 2004.
- [94] Y. Su, C. Fu, S. Ishikawa, A. Stella, M. Kojima, K. Shitoh, E. M. Schreiber, B. W. Day, and B. Liu, "APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase.," *Mol. Cell*, vol. 32, no. 5, pp. 652–61, Dec. 2008.

- [95] J. M. Seeling, "Regulation of β -Catenin Signaling by the B56 Subunit of Protein Phosphatase 2A," *Science* (80-.), vol. 283, no. 5410, pp. 2089–2091, Mar. 1999.
- [96] B. Rubinfeld, I. Albert, E. Porfiri, S. Munemitsu, and P. Polakis, "Loss of β -Catenin Regulation by the APC Tumor Suppressor Protein Correlates with Loss of Structure Due to Common Somatic Mutations of the Gene," *Cancer Res.*, vol. 57, pp. 4624–30, 1997.
- [97] A. J. Valvezan, F. Zhang, J. A. Diehl, and P. S. Klein, "Adenomatous polyposis coli (APC) regulates multiple signaling pathways by enhancing glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) activity.," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 6, pp. 3823–32, Feb. 2012.
- [98] Y. Xing, W. K. Clements, D. Kimelman, and W. Xu, "Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex.," *Genes Dev.*, vol. 17, no. 22, pp. 2753–64, Nov. 2003.
- [99] D. Kimelman and W. Xu, "Beta-Catenin Destruction Complex: Insights and Questions From a Structural Perspective.," *Oncogene*, vol. 25, no. 57, pp. 7482–91, Dec. 2006.
- [100] V. S. W. Li, S. S. Ng, P. J. Boersema, T. Y. Low, W. R. Karthaus, J. P. Gerlach, S. Mohammed, A. J. R. Heck, M. M. Maurice, T. Mahmoudi, and H. Clevers, "Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex.," *Cell*, vol. 149, no. 6, pp. 1245–56, Jun. 2012.
- [101] B. T. MacDonald and X. He, "Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/ β -catenin signaling.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 12, Dec. 2012.
- [102] X. He, M. Semenov, K. Tamai, and X. Zeng, "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way.," *Development*, vol. 131, no. 8, pp. 1663–77, Apr. 2004.
- [103] K. Tamai, M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J. P. Saint-Jeannet, and X. He, "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction.," *Nature*, vol. 407, no. 6803, pp. 530–5, Sep. 2000.
- [104] H. Jeon, W. Meng, J. Takagi, M. J. Eck, T. A. Springer, and S. C. Blacklow, "Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL

- receptor YWTD-EGF domain pair.," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 8, no. 6, pp. 499–504, Jun. 2001.
- [105] C. Niehrs and J. Shen, "Regulation of Lrp6 phosphorylation.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 67, no. 15, pp. 2551–62, Aug. 2010.
- [106] K. Tamai, X. Zeng, C. Liu, X. Zhang, Y. Harada, Z. Chang, and X. He, "A mechanism for Wnt coreceptor activation.," *Mol. Cell*, vol. 13, no. 1, pp. 149–56, Jan. 2004.
- [107] B. T. MacDonald, C. Yokota, K. Tamai, X. Zeng, and X. He, "Wnt signal amplification via activity, cooperativity, and regulation of multiple intracellular PPPSP motifs in the Wnt co-receptor LRP6.," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 23, pp. 16115–23, Jun. 2008.
- [108] G. Davidson, W. Wu, J. Shen, J. Bilic, U. Fenger, P. Stannek, A. Glinka, and C. Niehrs, "Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction.," *Nature*, vol. 438, no. 7069, pp. 867–72, Dec. 2005.
- [109] H. Yamamoto, H. Sakane, T. Michiue, and A. Kikuchi, "Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta-catenin signaling.," *Dev. Cell*, vol. 15, no. 1, pp. 37–48, Jul. 2008.
- [110] T. Schwarz-Romond, M. Fiedler, N. Shibata, P. J. G. Butler, A. Kikuchi, Y. Higuchi, and M. Bienz, "The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 14, no. 6, pp. 484–92, Jun. 2007.
- [111] M. Umbhauer, A. Djiane, C. Goisset, A. Penzo-Méndez, J. F. Riou, J. C. Boucaut, and D. L. Shi, "The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling.," *EMBO J.*, vol. 19, no. 18, pp. 4944–54, Sep. 2000.
- [112] F. Cong, L. Schweizer, and H. Varmus, "Casein kinase Iepsilon modulates the signaling specificities of dishevelled.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 5, pp. 2000–11, Mar. 2004.
- [113] J. M. González-Sancho, Y. E. Greer, C. L. Abrahams, Y. Takigawa, B. Baljinnyam, K. H. Lee, K. S. Lee, J. S. Rubin, and A. M. C. Brown, "Functional consequences of Wnt-induced dishevelled 2 phosphorylation in canonical

- and noncanonical Wnt signaling.," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 13, pp. 9428–37, Mar. 2013.
- [114] X. Zeng, K. Tamai, B. Doble, S. Li, H. Huang, R. Habas, H. Okamura, J. Woodgett, and X. He, "A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation.," *Nature*, vol. 438, no. 7069, pp. 873–7, Dec. 2005.
- [115] S. Piao, S.-H. Lee, H. Kim, S. Yum, J. L. Stamos, Y. Xu, S.-J. Lee, J. Lee, S. Oh, J.-K. Han, B.-J. Park, W. I. Weis, and N.-C. Ha, "Direct inhibition of GSK-3beta by the phosphorylated cytoplasmic domain of LRP6 in Wnt/beta-catenin signaling.," *PLoS One*, vol. 3, no. 12, p. e4046, Jan. 2008.
- [116] X. Zeng, H. Huang, K. Tamai, X. Zhang, Y. Harada, C. Yokota, K. Almeida, J. Wang, B. Doble, J. Woodgett, A. Wynshaw-Boris, J.-C. Hsieh, and X. He, "Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions.," *Development*, vol. 135, no. 2, pp. 367–75, Jan. 2008.
- [117] J. Bilic, Y.-L. Huang, G. Davidson, T. Zimmermann, C.-M. Cruciat, M. Bienz, and C. Niehrs, "Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation.," *Science*, vol. 316, no. 5831, pp. 1619–22, Jun. 2007.
- [118] X. Liu, J. S. Rubin, and A. R. Kimmel, "Rapid, Wnt-induced changes in GSK-3beta associations that regulate beta-catenin stabilization are mediated by Galpha proteins.," *Curr. Biol.*, vol. 15, no. 22, pp. 1989–97, Nov. 2005.
- [119] S. Hino, T. Michiue, M. Asashima, and A. Kikuchi, "Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 16, pp. 14066–73, Apr. 2003.
- [120] N. S. Tolwinski, M. Wehrli, A. Rives, N. Erdeniz, S. Dinardo, and E. Wieschaus, "Wg / Wnt Signal Can Be Transmitted through Arrow / LRP5 , 6 and Axin Independently of Zw3 / GSK-3-beta Activity," *Dev. Cell*, vol. 4, pp. 407–418, 2003.
- [121] S.-M. a Huang, Y. M. Mishina, S. Liu, A. Cheung, F. Stegmeier, G. a Michaud, O. Charlat, E. Willellette, Y. Zhang, S. Wiessner, M. Hild, X. Shi, C. J. Wilson, C. Mickanin, V. Myer, A. Fazal, R. Tomlinson, F. Serluca, W. Shao, H. Cheng, M.

- Shultz, C. Rau, M. Schirle, J. Schlegl, S. Ghidelli, S. Fawell, C. Lu, D. Curtis, M. W. Kirschner, C. Lengauer, P. M. Finan, J. a Tallarico, T. Bouwmeester, J. a Porter, A. Bauer, and F. Cong, "Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling.," *Nature*, vol. 461, no. 7264, pp. 614–20, Oct. 2009.
- [122] C. S. Cselenyi, K. K. Jernigan, E. Tahinci, C. A. Thorne, L. A. Lee, and E. Lee, "LRP6 transduces a canonical Wnt signal independently of Axin degradation by inhibiting GSK-3 ' s phosphorylation of beta -catenin," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 23, pp. 8032–7, 2008.
- [123] K. Mi, P. J. Dolan, and G. V. W. Johnson, "The low density lipoprotein receptor-related protein 6 interacts with glycogen synthase kinase 3 and attenuates activity.," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 8, pp. 4787–94, Feb. 2006.
- [124] V. F. Taelman, R. Dobrowolski, J.-L. Plouhinec, L. C. Fuentealba, P. P. Vorwald, I. Gumper, D. D. Sabatini, and E. M. De Robertis, "Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes.," *Cell*, vol. 143, no. 7, pp. 1136–48, Dec. 2010.
- [125] H. Yamamoto, H. Komekado, and A. Kikuchi, "Caveolin is necessary for Wnt-3a-dependent internalization of LRP6 and accumulation of beta-catenin.," *Dev. Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 213–23, Aug. 2006.
- [126] H. Sakane, H. Yamamoto, and A. Kikuchi, "LRP6 is internalized by Dkk1 to suppress its phosphorylation in the lipid raft and is recycled for reuse.," *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. Pt 3, pp. 360–8, Mar. 2010.
- [127] B. Kagermeier-Schenk, D. Wehner, G. Ozhan-Kizil, H. Yamamoto, J. Li, K. Kirchner, C. Hoffmann, P. Stern, A. Kikuchi, A. Schambony, and G. Weidinger, "Waif1/5T4 inhibits Wnt/ β -catenin signaling and activates noncanonical Wnt pathways by modifying LRP6 subcellular localization.," *Dev. Cell*, vol. 21, no. 6, pp. 1129–43, Dec. 2011.
- [128] F. M. Townsley, A. Cliffe, and M. Bienz, "Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 6, no. 7, pp. 626–33, Jul. 2004.
- [129] B. R. Henderson, "Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 2, no. 9, pp. 653–60, Sep. 2000.

- [130] K. L. Neufeld, F. Zhang, B. R. Cullen, and R. L. White, "APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export.," *EMBO Rep.*, vol. 1, no. 6, pp. 519–23, Dec. 2000.
- [131] E. Krieghoff, J. Behrens, and B. Mayr, "Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention.," *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. Pt 7, pp. 1453–63, Apr. 2006.
- [132] X. Wu, X. Tu, K. S. Joeng, M. J. Hilton, D. a Williams, and F. Long, "Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling.," *Cell*, vol. 133, no. 2, pp. 340–53, Apr. 2008.
- [133] L. Arce, N. N. Yokoyama, and M. L. Waterman, "Diversity of LEF/TCF action in development and disease.," *Oncogene*, vol. 25, no. 57, pp. 7492–504, Dec. 2006.
- [134] J. Roose, M. Molenaar, J. Peterson, J. Hurenkamp, H. Brantjes, P. Moerer, M. van de Wetering, O. Destrée, and H. Clevers, "The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors.," *Nature*, vol. 395, no. 6702, pp. 608–12, Oct. 1998.
- [135] D. L. Daniels and W. I. Weis, "Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 12, no. 4, pp. 364–71, Apr. 2005.
- [136] B. R. Henderson and F. Fagotto, "The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport.," *EMBO Rep.*, vol. 3, no. 9, pp. 834–9, Sep. 2002.
- [137] J.-I. Park, S. W. Kim, J. P. Lyons, H. Ji, T. T. Nguyen, K. Cho, M. C. Barton, T. Deroo, K. Vleminckx, R. T. Moon, and P. D. McCrea, "Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets.," *Dev. Cell*, vol. 8, no. 6, pp. 843–54, Jun. 2005.
- [138] J. M. Daniel and A. B. Reynolds, "The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 19, no. 5, pp. 3614–23, 1999.
- [139] J. M. Daniel, C. M. Spring, H. C. Crawford, A. B. Reynolds, and A. Baig, "The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 13, pp. 2911–9, Jul. 2002.

- [140] B. Lustig, B. Jerchow, M. Sachs, S. Weiler, T. Pietsch, U. Karsten, M. Van De Wetering, P. M. Schlag, W. Birchmeier, and H. Clevers, "Negative Feedback Loop of Wnt Signaling through Upregulation of Conductin / Axin2 in Colorectal and Liver Tumors Negative Feedback Loop of Wnt Signaling through Upregulation of Conductin / Axin2 in Colorectal and Liver Tumors," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 22, no. 4, pp. 1184–93, 2002.
- [141] J. Roose, "Synergy Between Tumor Suppressor APC and the -Catenin-Tcf4 Target Tcf1," *Science (80-.)*, vol. 285, no. 5435, pp. 1923–1926, Sep. 1999.
- [142] O. Tetsu and F. McCormick, "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells.," *Nature*, vol. 398, no. 6726, pp. 422–6, Apr. 1999.
- [143] M. van de Wetering, E. Sancho, C. Verweij, W. de Lau, I. Oving, A. Hurlstone, K. van der Horn, E. Batlle, D. Coudreuse, A. P. Haramis, M. Tjon-Pon-Fong, P. Moerer, M. van den Born, G. Soete, S. Pals, M. Eilers, R. Medema, and H. Clevers, "The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells.," *Cell*, vol. 111, no. 2, pp. 241–50, Oct. 2002.
- [144] J. K. Cheong and D. M. Virshup, "Casein kinase 1: Complexity in the family.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 43, no. 4, pp. 465–9, Apr. 2011.
- [145] M. A. Price, "CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling.," *Genes Dev.*, vol. 20, no. 4, pp. 399–410, Mar. 2006.
- [146] a Cegielska, K. F. Gietzen, a Rivers, and D. M. Virshup, "Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 3, pp. 1357–64, Jan. 1998.
- [147] A. Rivers, K. F. Gietzen, E. Vielhaber, and D. M. Virshup, "Regulation of casein kinase I epsilon and casein kinase I delta by an in vivo futile phosphorylation cycle.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 26, pp. 15980–4, Jun. 1998.
- [148] H. Flotow and P. J. Roach, "Synergistic phosphorylation of Rabbit Muscle Glycogen Synthase by Cyclic AMP-dependent Protein Kinase and Casein Kinase I," *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 16, pp. 9126–9128, 1989.

- [149] O. Marin, V. H. Bustos, L. Cesaro, F. Meggio, M. a Pagano, M. Antonelli, C. C. Allende, L. a Pinna, and J. E. Allende, "A noncanonical sequence phosphorylated by casein kinase 1 in beta-catenin may play a role in casein kinase 1 targeting of important signaling proteins.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 18, pp. 10193–200, Sep. 2003.
- [150] Z.-H. Gao, J. M. Seeling, V. Hill, A. Yochum, and D. M. Virshup, "Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 3, pp. 1182–7, Feb. 2002.
- [151] J. M. Peters, R. M. McKay, J. P. McKay, and J. M. Graff, "Casein kinase I transduces Wnt signals.," *Nature*, vol. 401, no. 6751, pp. 345–50, Sep. 1999.
- [152] C. Sakanaka, P. Leong, L. Xu, S. D. Harrison, and L. T. Williams, "Casein kinase iepsilon in the wnt pathway: regulation of beta-catenin function.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 22, pp. 12548–52, Oct. 1999.
- [153] H. Matsubayashi, S. Sese, J. Lee, T. Iwatsubo, T. Tomita, T. Shirakawa, and S. Yanagawa, "Biochemical Characterization of the Drosophila Wingless Signaling Pathway Based on RNA Interference," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 5, pp. 2012–24, 2004.
- [154] W. Swiatek, I.-C. Tsai, L. Klimowski, A. Pepler, J. Barnette, H. J. Yost, and D. M. Virshup, "Regulation of casein kinase I epsilon activity by Wnt signaling.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 13, pp. 13011–7, Mar. 2004.
- [155] C.-M. Cruciat, C. Dolde, R. E. a de Groot, B. Ohkawara, C. Reinhard, H. C. Korswagen, and C. Niehrs, "RNA helicase DDX3 is a regulatory subunit of casein kinase 1 in Wnt- β -catenin signaling.," *Science*, vol. 339, no. 6126, pp. 1436–41, Mar. 2013.
- [156] D. G. R. Yim and D. M. Virshup, "Unwinding the Wnt action of casein kinase 1.," *Cell Res.*, vol. 23, no. 6, pp. 737–8, Jun. 2013.
- [157] P. J. a Eichhorn, M. P. Creighton, and R. Bernards, "Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1795, no. 1, pp. 1–15, Jan. 2009.
- [158] T. Fellner, D. H. Lackner, H. Hombauer, P. Piribauer, I. Mudrak, K. Zaragoza, C. Juno, and E. Ogris, "A novel and essential mechanism determining

- specificity and activity of protein phosphatase 2A (PP2A) in vivo.," *Genes Dev.*, vol. 17, no. 17, pp. 2138–50, Sep. 2003.
- [159] U. S. Cho and W. Xu, "Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme.," *Nature*, vol. 445, no. 7123, pp. 53–7, Jan. 2007.
- [160] J. Chen, B. L. Martin, and D. L. Brautigan, "Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation.," *Science*, vol. 257, no. 5074, pp. 1261–4, Aug. 1992.
- [161] P. Seshacharyulu, P. Pandey, K. Datta, and S. K. Batra, "Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer.," *Cancer Lett.*, vol. 335, no. 1, pp. 9–18, Jul. 2013.
- [162] X. Li, H. J. Yost, D. M. Virshup, and J. M. Seeling, "Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in *Xenopus*.," *EMBO J.*, vol. 20, no. 15, pp. 4122–31, Aug. 2001.
- [163] J. Yang, J. Wu, C. Tan, and P. S. Klein, "PP2A:B56epsilon is required for Wnt/beta-catenin signaling during embryonic development.," *Development*, vol. 130, no. 23, pp. 5569–78, Dec. 2003.
- [164] W. Zhang, J. Yang, Y. Liu, X. Chen, T. Yu, J. Jia, and C. Liu, "PR55 alpha, a regulatory subunit of PP2A, specifically regulates PP2A-mediated beta-catenin dephosphorylation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 34, pp. 22649–56, Aug. 2009.
- [165] J. Götz, a Probst, C. Mistl, R. M. Nitsch, and E. Ehlert, "Distinct role of protein phosphatase 2A subunit Calpha in the regulation of E-cadherin and beta-catenin during development.," *Mech. Dev.*, vol. 93, no. 1–2, pp. 83–93, May 2000.
- [166] a Kikuchi, H. Yamamoto, a Sato, and S. Matsumoto, "Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases.," *Acta Physiol. (Oxf)*, vol. 204, no. 1, pp. 17–33, Jan. 2012.
- [167] M. T. Veeman, J. D. Axelrod, and R. T. Moon, "A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling.," *Dev. Cell*, vol. 5, no. 3, pp. 367–77, Sep. 2003.

- [168] K. M. Cadigan and R. Nusse, "Wnt signaling: a common theme in animal development," *Genes Dev.*, vol. 11, no. 24, pp. 3286–3305, Dec. 1997.
- [169] V. Korinek, N. Barker, P. Moerer, E. van Donselaar, G. Huls, P. J. Peters, and H. Clevers, "Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4.," *Nat. Genet.*, vol. 19, no. 4, pp. 379–83, Aug. 1998.
- [170] T. Reya and H. Clevers, "Wnt signalling in stem cells and cancer.," *Nature*, vol. 434, no. 7035, pp. 843–50, Apr. 2005.
- [171] C. Kosinski, V. S. W. Li, A. S. Y. Chan, J. Zhang, C. Ho, W. Y. Tsui, T. L. Chan, R. C. Mifflin, D. W. Powell, S. T. Yuen, S. Y. Leung, and X. Chen, "Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 39, pp. 15418–23, Sep. 2007.
- [172] E. Batlle, J. T. Henderson, H. Beghtel, M. M. W. Van Den Born, E. Sancho, G. Huls, J. Meeldijk, J. Robertson, M. Van De Wetering, T. Pawson, and H. Clevers, "beta-Catenin and TCF Mediate Cell Positioning in the Intestinal Epithelium by Controlling the Expression of EphB / EphrinB," *Cell*, vol. 111, pp. 251–263, 2002.
- [173] K. S. Carmon, X. Gong, Q. Lin, A. Thomas, and Q. Liu, "R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt / β -catenin signaling," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 28, pp. 2–7, 2011.
- [174] T. Sato, J. H. van Es, H. J. Snippert, D. E. Stange, R. G. Vries, M. van den Born, N. Barker, N. F. Shroyer, M. van de Wetering, and H. Clevers, "Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts.," *Nature*, vol. 469, no. 7330, pp. 415–8, Jan. 2011.
- [175] K. W. Kinzler and B. Vogelstein, "Lessons from hereditary colorectal cancer.," *Cell*, vol. 87, no. 2, pp. 159–70, Oct. 1996.
- [176] W. Liu, X. Dong, M. Mai, R. S. Seelan, K. Taniguchi, K. K. Krishnadath, K. C. Halling, J. M. Cunningham, L. A. Boardman, C. Qian, E. Christensen, S. S. Schmidt, P. C. Roche, D. I. Smith, and S. N. Thibodeau, "Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling.," *Nat. Genet.*, vol. 26, no. 2, pp. 146–7, Oct. 2000.

- [177] P. J. Morin, "Activation of beta -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in beta -Catenin or APC," *Science (80-.)*, vol. 275, no. 5307, pp. 1787–1790, Mar. 1997.
- [178] J. Schuijers and H. Clevers, "Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins.," *EMBO J.*, vol. 31, no. 12, pp. 2685–96, Jun. 2012.
- [179] L. Ling, V. Nurcombe, and S. M. Cool, "Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells.," *Gene*, vol. 433, no. 1–2, pp. 1–7, Mar. 2009.
- [180] M. Moldes, Y. Zuo, R. F. Morrison, D. Silva, B.-H. Park, J. Liu, and S. R. Farmer, "Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis.," *Biochem. J.*, vol. 376, no. Pt 3, pp. 607–13, Dec. 2003.
- [181] S. E. Ross, "Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling," *Science (80-.)*, vol. 289, no. 5481, pp. 950–953, Aug. 2000.
- [182] Y. Jiang, X. He, and P. H. Howe, "Disabled-2 (Dab2) inhibits Wnt/ β -catenin signalling by binding LRP6 and promoting its internalization through clathrin.," *EMBO J.*, vol. 31, no. 10, pp. 2336–49, May 2012.
- [183] D. J. Katzmann, G. Odorizzi, and S. D. Emr, "Receptor downregulation and multivesicular-body sorting.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 12, pp. 893–905, Dec. 2002.
- [184] S. D. Conner and S. L. Schmid, "Regulated portals of entry into the cell.," *Nature*, vol. 422, no. 6927, pp. 37–44, Mar. 2003.
- [185] C. Raiborg and H. Stenmark, "The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins.," *Nature*, vol. 458, no. 7237, pp. 445–52, Mar. 2009.
- [186] L. Pelkmans, T. Bürli, M. Zerial, and A. Helenius, "Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic.," *Cell*, vol. 118, no. 6, pp. 767–80, Sep. 2004.
- [187] A. L. Kiss and E. Botos, "Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation?," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, no. 7, pp. 1228–37, Jul. 2009.

- [188] E. Botos, J. Klumperman, V. Oorschot, B. Igyártó, A. Magyar, M. Oláh, and A. L. Kiss, "Caveolin-1 is transported to multi-vesicular bodies after albumin-induced endocytosis of caveolae in HepG2 cells.," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 12, no. 5A, pp. 1632–9.
- [189] H. T. McMahon and E. Boucrot, "Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 12, no. 8, pp. 517–33, Aug. 2011.
- [190] W. Hsu, L. Zeng, and F. Costantini, "Identification of a Domain of Axin That Binds to the Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A and a Self-binding Domain," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 6, pp. 3439–3445, Feb. 1999.
- [191] R. Batlle, L. Alba-Castellón, J. Loubat-Casanovas, E. Armenteros, C. Francí, J. Stanisavljevic, R. Banderas, J. Martin-Caballero, F. Bonilla, J. Baulida, J. I. Casal, T. Gridley, and A. García de Herreros, "Snail1 controls TGF- β responsiveness and differentiation of mesenchymal stem cells.," *Oncogene*, vol. 32, no. 28, pp. 3381–9, Jul. 2013.
- [192] W. de Lau, N. Barker, T. Y. Low, B.-K. Koo, V. S. W. Li, H. Teunissen, P. Kujala, A. Haegbarth, P. J. Peters, M. van de Wetering, D. E. Stange, J. E. van Es, D. Guardavaccaro, R. B. M. Schasfoort, Y. Mohri, K. Nishimori, S. Mohammed, A. J. R. Heck, and H. Clevers, "Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling.," *Nature*, vol. 476, no. 7360, pp. 293–7, Aug. 2011.
- [193] C. Gao and Y.-G. Chen, "Dishevelled: The hub of Wnt signaling.," *Cell. Signal.*, vol. 22, no. 5, pp. 717–27, May 2010.
- [194] H.-C. Wong, A. Bourdelas, A. Krauss, H.-J. Lee, Y. Shao, D. Wu, M. Mlodzik, D.-L. Shi, and J. Zheng, "Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled.," *Mol. Cell*, vol. 12, no. 5, pp. 1251–60, Nov. 2003.
- [195] S. Yanagawa, Y. Matsuda, J.-S. Lee, H. Matsubayashi, S. Sese, T. Kadowaki, and A. Ishimoto, "Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*.," *EMBO J.*, vol. 21, no. 7, pp. 1733–42, Apr. 2002.
- [196] R. M. McKay, J. M. Peters, and J. M. Graff, "The casein kinase I family in Wnt signaling.," *Dev. Biol.*, vol. 235, no. 2, pp. 388–96, Jul. 2001.

- [197] O. Bernatík, K. Sedová, C. Schille, R. Sri Ganji, I. Cervenka, L. Trantírek, A. Schambony, Z. Zdráhal, and V. Bryja, "Functional Analysis of Dishevelled-3 Phosphorylation Identifies Distinct Mechanisms Driven by Casein Kinase 1 α and Frizzled5.," *J. Biol. Chem.*, Jul. 2014.
- [198] O. Bernatik, R. S. Ganji, J. P. Dijksterhuis, P. Konik, I. Cervenka, T. Polonio, P. Krejci, G. Schulte, and V. Bryja, "Sequential activation and inactivation of Dishevelled in the Wnt/beta-catenin pathway by casein kinases.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 12, pp. 10396–410, Mar. 2011.
- [199] Z. Jin, J. Shi, A. Saraf, W. Mei, G.-Z. Zhu, S. Strack, and J. Yang, "The 48-kDa alternative translation isoform of PP2A:B56epsilon is required for Wnt signaling during midbrain-hindbrain boundary formation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 11, pp. 7190–200, Mar. 2009.
- [200] M. Hannus, F. Feiguin, C.-P. Heisenberg, and S. Eaton, "Planar cell polarization requires Widerborst, a B' regulatory subunit of protein phosphatase 2A.," *Development*, vol. 129, no. 14, pp. 3493–503, Jul. 2002.
- [201] S. Longin, K. Zwaenepoel, J. V Louis, S. Dilworth, J. Goris, and V. Janssens, "Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic subunit.," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 37, pp. 26971–80, Sep. 2007.
- [202] K. Brennan, J. M. Gonzalez-Sancho, L. A. Castelo-Soccio, L. R. Howe, and A. M. C. Brown, "Truncated mutants of the putative Wnt receptor LRP6/Arrow can stabilize beta-catenin independently of Frizzled proteins.," *Oncogene*, vol. 23, no. 28, pp. 4873–84, Jun. 2004.
- [203] G. L. Radice, *N-cadherin-mediated adhesion and signaling from development to disease: lessons from mice.*, 1st ed., vol. 116. Elsevier Inc., 2013, pp. 263–89.
- [204] J. A. McKanna, H. T. Haigler, and S. Cohen, "Hormone receptor topology and dynamics: morphological analysis using ferritin-labeled epidermal growth factor.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 76, no. 11, pp. 5689–93, Nov. 1979.
- [205] M. Fürthauer and M. González-Gaitán, "Endocytic regulation of notch signalling during development.," *Traffic*, vol. 10, no. 7, pp. 792–802, Jul. 2009.

- [206] H.-R. Huang, Z. J. Chen, S. Kunes, G.-D. Chang, and T. Maniatis, "Endocytic pathway is required for *Drosophila* Toll innate immune signaling.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 18, pp. 8322–7, May 2010.
- [207] C. Metcalfe and M. Bienz, "Inhibition of GSK-3 by Wnt signalling—two contrasting models.," *J. Cell Sci.*, vol. 124, no. Pt 21, pp. 3537–44, Nov. 2011.
- [208] T. Schwarz-Romond, C. Merrifield, B. J. Nichols, and M. Bienz, "The Wnt signalling effector Dishevelled forms dynamic protein assemblies rather than stable associations with cytoplasmic vesicles.," *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 22, pp. 5269–77, Nov. 2005.
- [209] M. J. Smalley, N. Signoret, D. Robertson, A. Tilley, A. Hann, K. Ewan, Y. Ding, H. Paterson, and T. C. Dale, "Dishevelled (Dvl-2) activates canonical Wnt signalling in the absence of cytoplasmic puncta.," *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 22, pp. 5279–89, Nov. 2005.
- [210] S. S. Ng, T. Mahmoudi, E. Danenberg, I. Bejaoui, W. de Lau, H. C. Korswagen, M. Schutte, and H. Clevers, "Phosphatidylinositol 3-kinase signaling does not activate the wnt cascade.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 51, pp. 35308–13, Dec. 2009.
- [211] T. Falguières, P.-P. Luyet, and J. Gruenberg, "Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics.," *Exp. Cell Res.*, vol. 315, no. 9, pp. 1567–73, May 2009.
- [212] C. S. Von Bartheld and A. L. Altick, "Multivesicular bodies in neurons: distribution, protein content, and trafficking functions.," *Prog. Neurobiol.*, vol. 93, no. 3, pp. 313–40, Mar. 2011.
- [213] L. C. Fuentealba, E. Eivers, A. Ikeda, C. Hurtado, H. Kuroda, E. M. Pera, and E. M. De Robertis, "Integrating patterning signals: Wnt/GSK-3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal.," *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 980–93, Nov. 2007.
- [214] J. Castaño, G. Solanas, D. Casagolda, I. Raurell, P. Villagrasa, X. R. Bustelo, A. García de Herreros, and M. Duñach, "Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 5, pp. 1745–57, Mar. 2007.

- [215] R. Dobrowolski and E. M. De Robertis, "Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 1, pp. 53–60, Jan. 2012.
- [216] C. Yost, G. H. Farr, S. B. Pierce, D. M. Ferkey, M. M. Chen, and D. Kimelman, "GBP, an inhibitor of GSK-3, is implicated in *Xenopus* development and oncogenesis.," *Cell*, vol. 93, no. 6, pp. 1031–41, Jun. 1998.
- [217] R. Van Amerongen, M. Nawijn, J. Franca-koh, J. Zevenhoven, H. Van Der Gulden, J. Jonkers, and A. Berns, "Frat is dispensable for canonical Wnt signaling in mammals," pp. 425–430, 2011.
- [218] A. R. Hernández, A. M. Klein, and M. W. Kirschner, "Kinetic responses of β -catenin specify the sites of Wnt control.," *Science*, vol. 338, no. 6112, pp. 1337–40, Dec. 2012.
- [219] B. Riggleman, P. Schedl, and E. Wieschaus, "Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless.," *Cell*, vol. 63, no. 3, pp. 549–60, Nov. 1990.
- [220] P. a Vanlandingham and B. P. Ceresa, "Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 18, pp. 12110–24, May 2009.
- [221] M. Vinyoles, B. Del Valle-Pérez, J. Curto, R. Viñas-Castells, L. Alba-Castellón, A. García de Herreros, and M. Duñach, "Multivesicular GSK-3 sequestration upon Wnt signaling is controlled by p120-catenin/cadherin interaction with LRP5/6.," *Mol. Cell*, vol. 53, no. 3, pp. 444–57, Feb. 2014.

PUBLICACIONS

Publicació que ha derivat d'aquesta tesi:

M. Vinyoles, B. Del Valle-Pérez, J. Curto, R. Viñas-Castells, L. Alba-Castellón, A. García de Herreros, and M. Duñach, "Multivesicular GSK-3 sequestration upon Wnt signaling is controlled by p120-catenin/cadherin interaction with LRP5/6.," *Mol. Cell*, vol. 53, no. 3, pp. 444–57, Feb. 2014 [221].

Publicacions en les que s'ha participat durant la realització d'aquesta tesi:

D. Casagolda, B. Del Valle-Pérez, G. Valls, E. Lugilde, M. Vinyoles, J. Casado-Vela, G. Solanas, E. Batlle, A. B. Reynolds, J. I. Casal, A. G. de Herreros, and M. Duñach, "A p120-catenin-CK1epsilon complex regulates Wnt signaling.," *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. Pt 15, pp. 2621–31, Aug. 2010 [31].

B. Del Valle-Pérez, O. Arqués, M. Vinyoles, A. G. de Herreros, and M. Duñach, "Coordinated action of CK1 isoforms in canonical Wnt signaling.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 31, no. 14, pp. 2877–88, Jul. 2011 [32].

G. Valls, M. Codina, R. K. Miller, B. Del Valle-Pérez, M. Vinyoles, C. Caelles, P. D. McCrea, A. García de Herreros, and M. Duñach, "Upon Wnt stimulation, Rac1 activation requires Rac1 and Vav2 binding to p120-catenin.," *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. Pt 22, pp. 5288–301, Nov. 2012 [61].

