

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE SNAIL2 COMO REPRESOR DE  
CADHERINA-E Y COMO REGULADOR DEL PROCESO DE CARCINOGENESIS  
QUÍMICA.**

PATRICIA MOLINA ORTIZ

Madrid, 2010



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE SNAIL2 COMO REPRESOR DE  
CADHERINA-E Y COMO REGULADOR DEL PROCESO DE CARCINOGENESIS  
QUÍMICA.**

Patricia Molina Ortiz  
Licenciada en Bioquímica,  
presenta esta memoria para optar al título de Doctor  
por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de tesis:

Dra. Amparo Cano García. Catedrática de la Universidad Autónoma de Madrid  
Dr. Francisco Portillo Pérez. Profesor Titular de la Universidad Autónoma de Madrid

La presente tesis ha sido realizada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Madrid  
“Alberto Sols” (CSIC-UAM), y financiada por una Beca de Formación del Personal  
Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Madrid, 2010





## **RESUMEN Y ABSTRACT**

---



La pérdida de expresión de la proteína de adhesión intercelular cadherina-E es un evento esencial en el proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) que permite la migración celular durante el desarrollo embrionario y la invasión de las células tumorales de origen epitelial (carcinomas). La represión transcripcional es uno de los principales mecanismos de regulación de la expresión de cadherina-E, tanto en el desarrollo embrionario como durante la progresión tumoral. En los últimos años se han caracterizado diferentes represores transcripcionales del gen de *cadherina-E*, que a su vez inducen TEM, entre los que se encuentran los factores de dedos de zinc de la familia Snail (Snail1 y Snail2) y ZEB (ZEB-1 y ZEB-2), así como los factores de la familia bHLH (E47, E2-2 y Twist). Estudios previos de nuestro laboratorio de análisis de perfiles de expresión génica demostraron que los factores Snail1, Snail2 y E47 inducen programas genéticos comunes y específicos, apoyando un papel no redundante de los distintos factores, en particular de Snail1 y Snail2, en la invasión y progresión tumoral. En estudios previos se había caracterizado el mecanismo de represión de Snail1 y puesto de manifiesto diferencias significativas en la afinidad de los factores Snail1 y Snail2 por las cajas-E del promotor de *cadherina-E*. Sin embargo, se desconocen los mecanismos específicos de represión mediados por Snail2.

Esta tesis ha analizado los mecanismos transcripcionales utilizados por Snail2 para la represión transcripcional de *cadherina-E* así como su papel en el proceso de carcinogénesis química. Los estudios bioquímicos mostraron que Snail2 precisa de los dominios SNAG (dominio común a Snail y Gfi-1) y SLUG para el reclutamiento de distintos co-represores, como mSin3A, NCoR y CtBP1. Estos co-represores interactúan entre sí durante la represión transcripcional de *cadherina-E*. Además, se han identificado diferentes residuos fosforilables de Snail2 *in vivo* capaces de regular su actividad represora. Finalmente, el análisis funcional de los dedos de zinc desveló que si bien el segundo dedo de zinc de Snail2 es esencial para la represión de cadherina-E, el quinto dedo de zinc tiene una función dependiente del contexto del promotor, modificando la capacidad de represión de Snail2 según la estructura del mismo. Estos resultados señalan diferencias entre los mecanismos de represión transcripcional de Snail1 y Snail2, apoyando las diferencias funcionales entre ambos factores.

Los estudios de proliferación realizados en la piel de ratones control y Snail2<sup>-/-</sup> mostraron que Snail2 es esencial para la proliferación de los queratinocitos *in vitro* y el programa de diferenciación *in vivo*. Sin embargo, la ausencia de Snail2 aumenta significativamente el número de lesiones y la progresión maligna de tumores inducidos por carcinogénesis química, mediante el protocolo de DMBA/TPA. El análisis detallado de las lesiones reveló que la ausencia de Snail2 favorece la proliferación e inhibe parcialmente la diferenciación terminal en las lesiones, contribuyendo así a la progresión tumoral. El tratamiento de ratones carentes de Snail2 con antiinflamatorios reduce la progresión maligna de las lesiones inducidas por DMBA/TPA pero no la aparición y el crecimiento de lesiones benignas. Estos resultados sugieren una alteración importante de la respuesta inflamatoria en ausencia de Snail2, que a su vez puede contribuir en la mayor progresión maligna.

\_\_\_\_\_

Loss of expression of the intercellular adhesion protein E-cadherin is a key event in the process of epithelial-mesenchymal transition (EMT), which allows cell migration during embryonic development and invasion of tumor cells of epithelial origin (carcinomas). One of the main mechanisms of negative regulation of *E-cadherin* expression during both embryonic development and tumor progression is transcriptional repression. Recently, different transcriptional repressors of *E-cadherin* gene, which in turn induce TEM, have been identified including the zinc finger family of Snail (Snail1 and Snail2) and ZEB (ZEB-1 and ZEB-2) factors and the bHLH family (E47, E2-2 and Twist). Previous gene expression profiles studies from our laboratory, identified common and specific genetic programs induced by Snail1, Snail2 and E47, supporting a non redundant role for these factors, particularly for Snail1 and Snail2, during invasion and tumor progression. Previous studies about Snail1 repression mechanism revealed significant differences in the affinity of Snail1 and Snail2 for the E-boxes of *E-cadherin* promoter. However, the specific repression mechanisms mediated by Snail2 are unknown.

In this thesis the mechanisms used by Snail2 for transcriptional repression of *E-cadherin* and its role in the process of chemical carcinogenesis in mice have been analyzed.

Biochemical approaches have shown that the SNAG (Snail and Gfi-1) and SLUG domains of Snail2 are required for the recruitment of different co-repressors, such as mSin3A, NCoR and CtBP1. These co-repressors functionally interact during transcriptional repression of *E-cadherin* gene. In addition, several *in vivo* phosphorylated residues able to modulate Snail2 functional activity have been identified. Finally, functional analysis of the zinc fingers of Snail2 revealed that while the second zinc finger is essential for the repression activity of Snail2, the fifth zinc finger is required depending on the promoter context and structure. These results highlight the differences between the mechanisms of transcriptional repression of Snail and Snail2, supporting the non redundant function of both factors.

On the other hand, proliferation and wound healing studies in the skin of control or Snail2 *-/-* mice showed that Snail2 is essential for *in vivo* proliferation of keratinocytes and for their differentiation program end. However, the absence of Snail2 significantly increases malignant progression of tumors induced by DMBA/TPA protocol of skin chemical carcinogenesis. In-depth analysis of the lesions revealed that the absence of Snail2 favors proliferation and partial inhibition of their terminal differentiation, thereby contributing to tumor progression. Anti-inflammatory treatment of Snail2 *-/-* mice reduces malignant progression of the lesions induced by DMBA/TPA but not the emergence and growth of benign lesions. These results suggest significant alterations of the inflammatory response in the absence of Snail2, which in turn may be causing the acute malignant progression.



## **INDICE**







<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>1. El proceso tumoral y la progresión tumoral</b>	<b>7</b>
<b>2. La transición epitelio-mesénquima</b>	<b>8</b>
<b>3. Moléculas de adhesión celular</b>	<b>9</b>
3.1. La superfamilia de las cadherinas	9
3.1.1. Cadherina-E. Papel en el desarrollo embrionario	10
3.1.2. Cadherina-E durante la progresión tumoral	11
<b>4. Regulación de la expresión de cadherina-E en la TEM y progresión tumoral</b>	<b>11</b>
4.1. Regulación transcripcional del gen de <i>cadherina-E</i> (CDH1)	12
4.1.1. Estructura del promotor de <i>cadherina-E</i>	12
4.1.2. Represores transcripcionales del gen de <i>cadherina-E</i>	12
<b>5. La superfamilia Snail de factores de transcripción</b>	<b>14</b>
5.1. Organización estructural y funcional de la familia Snail	14
5.2. Mecanismos de regulación de los factores de la familia Snail	16
<b>6. Complejos de represión de cadherina-E mediados por proteínas de la familia Snail</b>	<b>17</b>
<b>7. Los factores Snail y la TEM</b>	<b>17</b>
7.1. Expresión de los factores Snail durante el desarrollo embrionario de ratón	17
7.2. Expresión de Snail1/2 en el tejido adulto del ratón	18
<b>8. Características del ratón mutante nulo de <i>snail2</i></b>	<b>19</b>
8.1. Regulación de la hematopoyesis por <i>snail2</i>	20
8.2. <i>Snail2</i> regula la homeostasis epitelial	20
<b>9. La piel</b>	<b>20</b>
9.1. La epidermis	21
<b>10. Modelo de carcinogénesis química de piel de ratón</b>	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>1. Construcciones de DNA</b>	<b>31</b>
1.1. Mutantes puntuales	31
1.2. Mutantes de delección	31
<b>2. Anticuerpos</b>	<b>35</b>
<b>3. Cultivos celulares</b>	<b>35</b>
3.1. Cultivos de líneas celulares establecidas	35
3.2. Cultivos de fibroblastos para generar células nodriza	35
3.3. Aislamiento y cultivo de queratinocitos primarios de ratones neonatos	35
3.3.1. Ensayos de clonogenicidad de queratinocitos primarios	36
3.3.2. Cultivos de queratinocitos primarios	36
<b>4. Transfecciones transitorias</b>	<b>36</b>
<b>5. Ensayos de actividad promotora</b>	<b>37</b>

## INDICE

<b>6. Análisis de proteínas</b>	<b>37</b>
6.1. Inmunofluorescencia de células en cultivo	37
6.2. Ensayos de co-inmunoprecipitación	39
6.3. Electroforesis e inmunotransferencia (Western blot)	39
6.4. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina	39
6.5. Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i>	40
6.6. Ensayos de fosforilación <i>in vivo</i>	40
6.7. Análisis de mapas de fosfopéptidos	40
6.8. Degradación de Edmann	41
<b>7. Genotipado de los ratones para Snail2</b>	<b>41</b>
<b>8. Anestesiado de ratones</b>	<b>42</b>
<b>9. Carcinogénesis química de piel de ratón mediante tratamiento con DMBA/TPA</b>	<b>42</b>
9.1. Tratamiento con dexametasona	42
<b>10. Inducción de fibrosarcomas por inyección de metilcolantreno (MCA)</b>	<b>42</b>
<b>11. Tratamiento de la piel de ratón con TPA</b>	<b>42</b>
<b>12. Ensayos de cicatrización de heridas</b>	<b>43</b>
<b>13. Procesamiento de las muestras obtenidas en las necropsias</b>	<b>43</b>
13.1. Generación de bloques de OCT	43
13.2. Generación de bloques de parafina	43
13.3. TMAs (“Tissue-Micro Arrays”)	43
<b>14. Tinción con Hematoxilina/Eosina (H&amp;E)</b>	<b>44</b>
<b>15. Inmunodetección en tejidos</b>	<b>44</b>
15.1. Inmunohistoquímica	44
15.2. Inmunofluorescencia	44
<b>16. Detección de células apoptóticas en secciones de tejido</b>	<b>45</b>
<b>17. Aislamiento de folículos pilosos de cola de ratón</b>	<b>45</b>
<b>18. Detección de la actividad <math>\beta</math>-galactosidasa en tejidos</b>	<b>45</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>PARTE 1: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS DOMINIOS DE SNAIL2</b>	<b>49</b>
<b>1.1. Caracterización funcional de los dedos de zinc de Snail2</b>	<b>49</b>
<b>1.2. Caracterización de las regiones reguladoras de Snail2</b>	<b>52</b>
<b>1.3. Caracterización de los complejos de represión reclutados por Snail2</b>	<b>54</b>
1.3.1. mSin3A	54
1.3.2. CtBP1	57
1.3.3. NCoR	59
1.3.4. Colaboración funcional entre los distintos complejos represores	60
<b>1.4. Caracterización funcional de la fosforilación de Snail2</b>	<b>60</b>
1.4.1. Fosforilación <i>in vivo</i> de Snail2	60
1.4.2. Efecto de la fosforilación en la actividad represora	64
1.4.3. Efecto de la fosforilación de la serina 4 y la serina 14 en la interacción Snail2/mSin3A	65
<b>PARTE 2: FUNCIÓN DE SNAIL2 EN LA CARCINOGENÉISIS DE PIEL DE RATÓN</b>	<b>68</b>

<b>2.1. Carcinogénesis química de piel de ratón: efecto de la delección de Snail2</b>	<b>68</b>
2.1.1. Caracterización general del proceso	68
2.1.2. Análisis inmunohistoquímico de marcadores de diferenciación y proliferación	68
2.1.3. Análisis indirecto de la expresión de Snail2 en las lesiones	74
<b>2.2. Caracterización de las funciones intrínsecas de los queratinocitos Snail2 -/- e influencia del entorno tumoral</b>	<b>74</b>
2.2.1. Proliferación <i>in vitro</i>	75
2.2.2. Cicatrización de heridas	76
2.2.3. Capacidad proliferativa <i>in vivo</i> en respuesta a TPA	76
2.2.4. Análisis indirecto de la expresión de Snail2 en la piel de los ratones tratados con TPA.	79
<b>2.3. Inflamación, Snail2 y carcinogénesis química</b>	<b>79</b>
<b>2.4. Efecto de la delección de Snail2 en la carcinogénesis inducida por metilcolantreno</b>	<b>83</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>85</b>
<b>1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS DOMINIOS DE SNAIL2 EN LA REPRESIÓN DEL PROMOTOR DE <i>CADHERINA-E</i>.</b>	<b>87</b>
1.1. Regulación de la expresión de <i>cadherina-E</i> a través de los dedos de zinc 2 y 5 de Snail2	87
1.2. Mecanismos de represión de Snail2 sobre el promotor de <i>cadherina-E</i> : Implicación funcional de los dominios SNAG2 y SLUG	88
1.3. Caracterización funcional de la fosforilación de Snail2	90.
<b>FUNCIÓN DE SNAIL2 EN LA CARCINOGENESIS DE PIEL DE RATÓN</b>	<b>92</b>
2.1. Efecto de la ausencia de Snail2 en la carcinogénesis química de piel de ratón	92
2.2. Caracterización de los queratinocitos Snail2 -/-. Efecto del microambiente	93
2.3. Alteraciones en la activación del promotor de <i>Snail2</i> en la capa basal de la epidermis	93
2.4. Inflamación, Snail2 y la carcinogénesis química	94
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>97</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO I: ARTICULOS PUBLICADOS</b>	<b>121</b>



## **ABREVIATURAS**

---



**bHLH:** motivo básico Hélice-lazo-Hélice.  
**BMPs:** proteínas morfogenéticas de hueso.  
**BMDC:** células derivadas de la médula ósea.  
**BrdU:** 5-bromo-2-deoxiuridina.  
**BSA:** Albúmina de suero bovino  
**CD:** dominio tipo cadherina  
**CBS:** secuencias de unión a cateninas.  
**CDH1:** gen que codifica para cadherina-E humana.  
**cdh1:** gen que codifica para cadherina-E de ratón.  
**Cdk5:** quinasa dependiente de ciclina, 5  
**CID:** motivo de interacción de CtBP.  
**ChIP:** ensayos de inmunoprecipitación de cromatina.  
**CK2:** caseína quinasa 2  
**CM:** célula madre  
**CMV:** citomegalovirus.  
**CtBP:** proteína de unión al extremo carboxilo-terminal.  
**CK:** citoqueratina.  
**DB:** secuencia de destrucción de Snail1  
**DMA:** dimetilapimidato  
**DMBA:** 7, 12-dimetilbenzantraceno.  
**DMEM:** “Dulbeco’s modified essential medium” (medio esencial modificado de Dulbeco)  
**DMSO:** dimetilsilfóxido  
**ECL:** quimioluminiscencia aumentada  
**EGF:** factor de crecimiento epidérmico.  
**EIF:** epidermis interfolicular.  
**EMEM:** “Eagle’s minimum essential medium” (medio mínimo esencial de Eagle)  
**ESE:** potenciador específico de tejido.  
**FGF:** factor de crecimiento fibroblástico.  
**FoxC2:** factor de transcripción Forkhead box C2.  
**FP:** folículo piloso.  
**Gfi-1:** factor de independencia del crecimiento 1.  
**GS:** glándula sebácea.  
**GSK3-β:** Glucógeno sintetasa quinasa 3-β  
**GST:** Glutación S-transferasa.  
**HA:** hemaglutinina  
**HAV:** motivo aminoacídico His-Ala-Val.  
**HDAC:** histona deacetilasa.  
**HRP:** peroxidasa de rábano.  
**IL:** interleuquina.  
**IPH:** tampón de inmunoprecipitación.  
**LacZ:** gen que codifica para el enzima β-galactosidasa.  
**L-CAM:** molécula de adhesión celular de hígado.  
**LOXL2:** proteína similar a lisil oxidasa tipo 2

## ABREVIATURAS

4

**LRC:** “long-retaining cells” (células que retienen durante largos periodos el BrdU).

**MCA:** 3-metilcolantreno.

**MPCD:** dominio proximal de membrana.

**MPED:** dominio extracelular próximo a la membrana.

**NCoR:** co-represor de receptores nucleares.

**NES:** secuencia de exportación nuclear.

**NLS:** secuencia de importación nuclear.

**OCT:** temperatura optima de corte

**p120<sup>ctn</sup>:** catenina p120.

**PAK:** quinasa activada por p21

**PBS:** tampón salino fosfato

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PKC:** proteína quinasa C.

**PKA:** proteína quinasa dependiente de c-AMP.

**PMSF:** fenil-metil-sulfonil fluoruro

**PpA:** proteína con caja-F componente de la ligasa E3.

**SCC:** carcinoma de células escamosas

**SCF:** factor de células madre.

**SDS:** dodecil sulfato sódico.

**SDS-PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

**Smad:** factor de transcripción homólogo a las proteína MAD de *Drosophila melanogaster* y SMA de *Caenorhabditis elegans*.

**SNAG:** dominio común a Snail y Gfi-1.

**SLUG:** dominio específico de la subfamilia Snail2

**SPR:** región rica en serinas y prolinas.

**SPARC:** gen que codifica para osteonectina.

**SpCC:** carcinoma de células fusiformes.

**SRD:** dominio rico en serinas.

**TA:** célula progenitora transitoria.

**TEM:** transición epitelio mesénquima.

**TGFβ:** factor de crecimiento transformante β.

**TMA:** “tissue microarrays” (micromatriz tisular).

**TME:** transición mesénquima epitelio.

**TNFα:** factor de necrosis tumoral α.

**TPA:** ester de forbol, 12-O-tetra-decanoilforbol-13-acetato.

**UVR:** radiación ultravioleta.

**Wnt:** proteína de señalización homólogo a las proteínas Wingless e Int de *Drosophila*.

**X-gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido.

**YB-1:** factor de transcripción de unión a cajas-Y

**ZEB:** factores de transcripción de dedos de zinc y unión a cajas-E.

**ZF:** dedo de zinc.

---



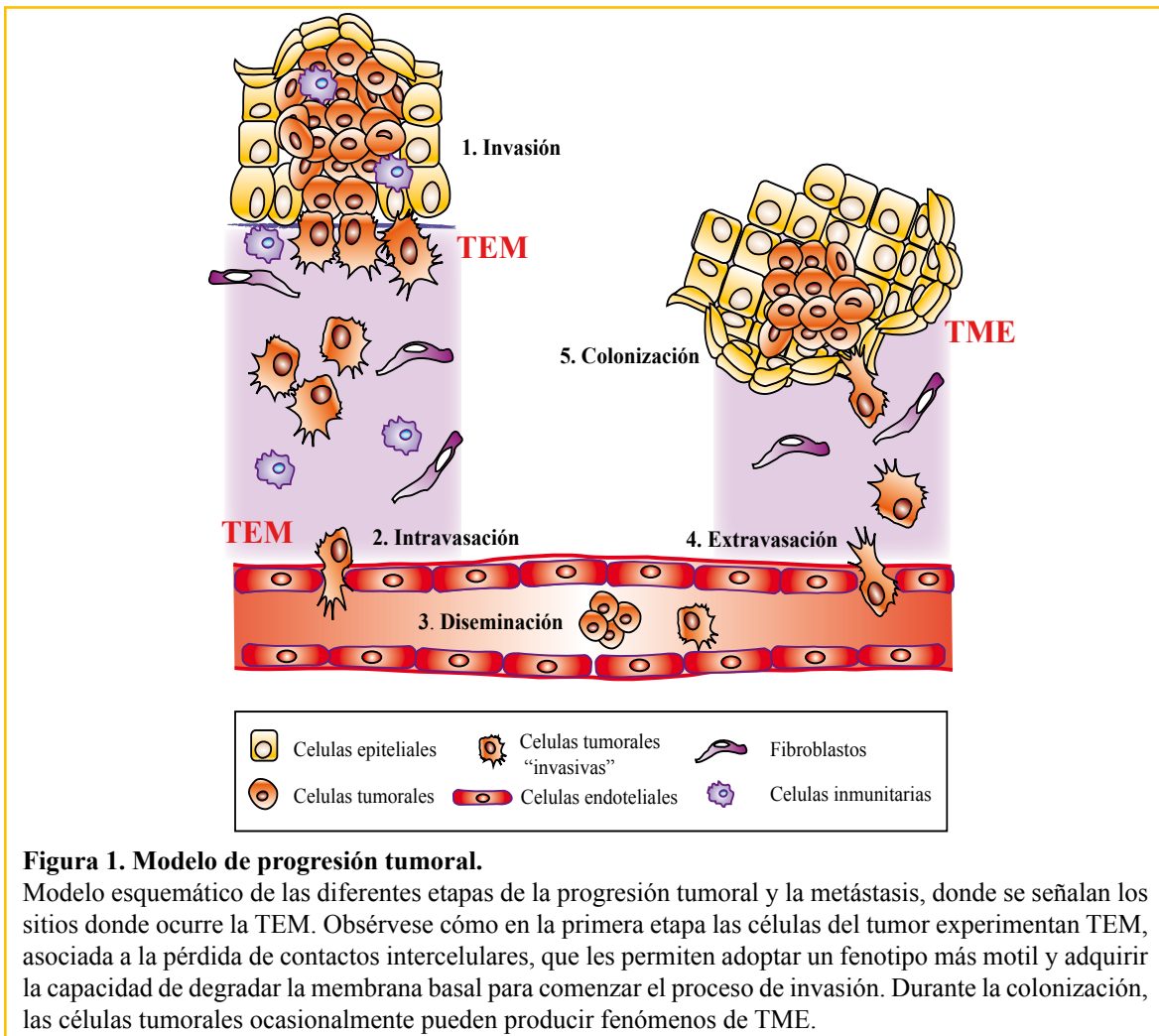
## **INTRODUCCIÓN**





1. EL PROCESO TUMORAL Y LA PROGRESIÓN TUMORAL

Según la Organización mundial de la salud, el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y el número de casos sigue aumentando en todo el mundo. En los últimos años se han hecho grandes esfuerzos para comprender los procesos de formación de tumores y metástasis. El término cáncer abarca un gran número de enfermedades caracterizadas por la existencia de una proliferación anormal de células que adquieren la capacidad de invadir órganos y tejidos y diseminarse a distancia. Se considera que la transformación maligna de las células normales tiene lugar mediante la adquisición progresiva de una serie de alteraciones moleculares que les confieren una ventaja para el desarrollo de la enfermedad y son comunes a todos los tipos de cánceres: 1) autosuficiencia en el crecimiento, 2) resistencia a estímulos antiproliferativos, 3) evasión de la apoptosis, 4) capacidad replicativa ilimitada, 5) capacidad angiogénica sostenida, y 6) capacidad de invasión y metástasis (Hanahan and Weinberg, 2000). El 90% de los cánceres humanos derivan de células epiteliales, que originan tumores denominados carcinomas. La adquisición de capacidad metastásica por las células de los carcinomas se



**Figura 1. Modelo de progresión tumoral.**

Modelo esquemático de las diferentes etapas de la progresión tumoral y la metástasis, donde se señalan los sitios donde ocurre la TEM. Obsérvese cómo en la primera etapa las células del tumor experimentan TEM, asociada a la pérdida de contactos intercelulares, que les permiten adoptar un fenotipo más motil y adquirir la capacidad de degradar la membrana basal para comenzar el proceso de invasión. Durante la colonización, las células tumorales ocasionalmente pueden producir fenómenos de TME.

puede subdividir en varias etapas (Figura 1). En la primera, la invasión, las células tumorales sufren profundas alteraciones en los procesos de adhesión celular, incluyendo la pérdida o debilitamiento de las adhesiones célula-célula, adquieren capacidad mótil y abandonan el sitio donde se originó el tumor primario para invadir tejidos adyacentes (Condeelis and Segall, 2003; Hanahan and Weinberg, 2000). En la segunda etapa, denominada intravasación, las células atraviesan la barrera endotelial entrando en

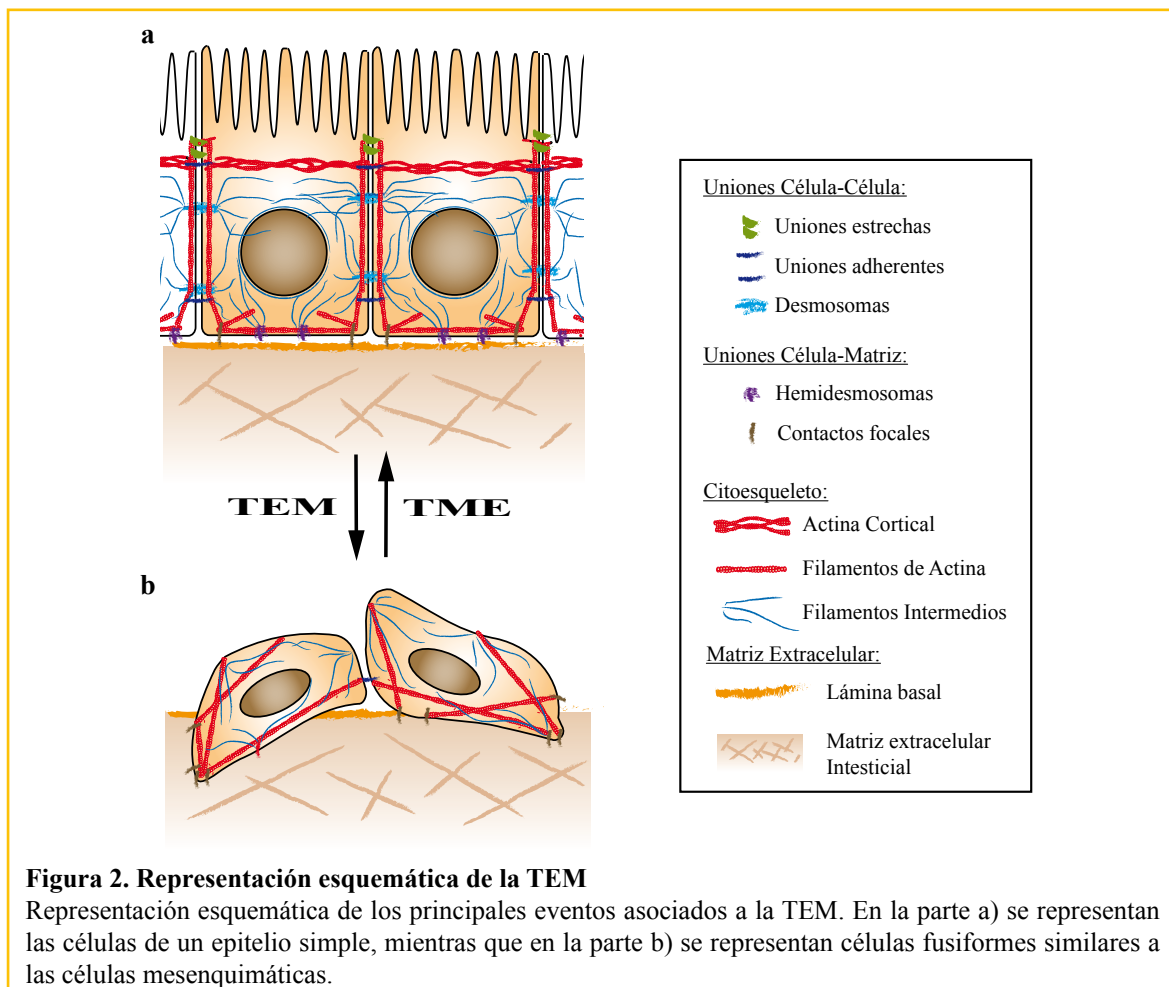
# INTRODUCCIÓN

el torrente circulatorio. Las células capaces de sobrevivir viajan a través del torrente circulatorio para abandonarlo en lugares alejados del foco original en el proceso conocido como extravasación. La última etapa, la colonización, tiene lugar cuando las células tumorales son capaces de crecer y formar un nuevo tumor secundario en el tejido de destino (Chambers et al., 2002; Fidler, 2003).

Actualmente, se considera que uno de los procesos claves para la generación de la metástasis es la Transición Epitelio-Mesénquima.

## 2. LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNOUIMA

Un epitelio está formado por una o varias capas de células unidas entre sí y a la lamina basal a través de distintas moléculas de adhesión. En los epitelios simples estas adhesiones permiten una polarización ápico-basal (Figura 2a), permitiendo al epitelio actuar de barrera homeostática. Por el contrario, las células mesenquimáticas no forman capas organizadas, no se asocian estrechamente a la lamina basal y su polaridad es la de una célula migratoria (Figura 2b).



La transición epitelio-mesénquima (TEM) consiste en la conversión de una célula epitelial en una célula con características mesenquimáticas. Durante la TEM las células epiteliales sufren la pérdida funcional de proteínas de adhesión célula-célula (como cadherina-E, componentes de uniones desmosomales y uniones estrechas) y otros marcadores epiteliales, pasando a expresar marcadores mesenquimáticos (como vimentina y fibronectina, entre otros). Como consecuencia, la célula sufre un reordenamiento del citoesqueleto celular que favorecerá su capacidad mótil (Figura 2). En los últimos

años se ha avanzado mucho en la caracterización de los procesos moleculares que tienen lugar durante la TEM, identificándose algunas de las moléculas críticas para este proceso. Así, la cadherina-E es una de las moléculas esenciales en el proceso de TEM. La pérdida funcional de cadherina-E es uno de los primeros procesos que tienen lugar durante la TEM y conlleva la pérdida de otras proteínas de adhesión celular y cambios en el citoesqueleto de la célula (Peinado et al., 2004a).

La TEM tiene un papel esencial durante la embriogénesis, participando en la gastrulación y la migración de las células de la cresta neural (Acloque et al., 2009; Gilbert, 2003; Thiery et al., 2009). En el adulto, el proceso de TEM ocurre durante la regeneración epitelial como en el proceso de reparación de heridas y en situaciones patológicas como la fibrosis y el cáncer (Thiery et al., 2009). Estudios sobre desarrollo embrionario han ayudado a comprender el proceso de TEM y han servido de base para estudiar su participación en la progresión tumoral y la metástasis (Shook and Keller, 2003; Thiery, 2002; Thiery et al., 2009).

Es importante indicar que la TEM es un proceso reversible. Al proceso inverso se le denomina transición mesénquima-epitelio (TME) y sucede durante la organogénesis y la implantación de nuevos focos tumorales. Este proceso supone, entre otros eventos, la re-expresión de cadherina-E y otras proteínas epiteliales y la pérdida de marcadores mesenquimáticos (Peinado et al., 2007; Polyak and Weinberg, 2009; Shook and Keller, 2003; Thiery, 2002; Thiery et al., 2009).

### **3. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR**

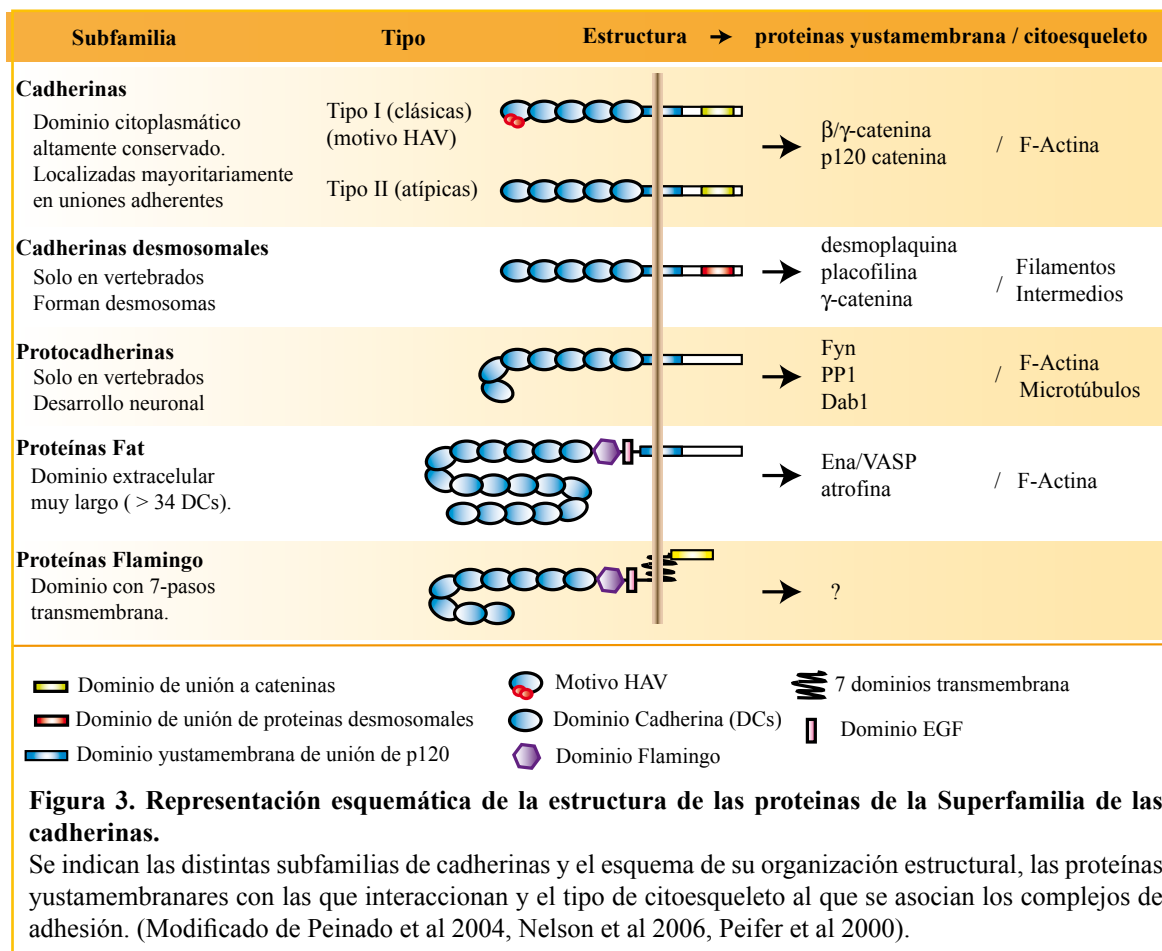
---

Las adhesiones celulares son esenciales para el mantenimiento de la estructura y función de los tejidos, y están constituidas por complejos multiproteicos que permiten la unión entre dos células adyacentes y entre la célula y la matriz extracelular. Estos complejos se componen principalmente de receptores de adhesión celular, proteínas de la matriz extracelular y proteínas intracelulares yuxtamembrana.

#### **3.1. La superfamilia de las cadherinas**

Las cadherinas representan los principales receptores de adhesión célula-célula, y son receptores dependientes de calcio (Gumbiner and Yamada, 1995; Takeichi, 1988; Takeichi, 1990). La mayoría de las cadherinas son proteínas transmembrana, con varios dominios tipo cadherina (DC) en la región extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio citoplasmático corto por el que se asocian a proteínas citoplasmáticas (Takeichi, 1990; Yap et al., 1997) que actúan de nexo con las diferentes redes del citoesqueleto celular (Figura 3). Dependiendo de a qué proteínas se asocian las cadherinas, se generan uniones de adhesión muy diferentes, como las uniones adherentes y los desmosomas (Takeichi, 1990; Yap et al., 1998).

Se han identificado más de 80 miembros de la superfamilia de las cadherinas en vertebrados e invertebrados que se han dividido en cinco subfamilias en función de su estructura y/o organización funcional (Nollet et al., 2000; Peinado et al., 2004a). Estas subfamilias comprenden: 1) las cadherinas tipo-I ó clásicas (Kemler, 1992; Tanihara et al., 1994), 2) las cadherinas tipo-II o atípicas (Munro and Blaschuk, 1986; Tanihara et al., 1994), 3) las cadherinas desmosomales (Buxton et al., 1993; Koch and Franke, 1994), 4) las protocadherinas, implicadas en el desarrollo neural (Frank and Kemler, 2002; Sano et al., 1993), y 5) otras proteínas relacionadas con las cadherinas, como las cadherinas Flamingo (Nollet et al., 2000; Usui et al., 1999) y tipo Fat (Cox et al., 2000; Mahoney et al., 1991) (Figura 3).



3.1.1 Cadherina-E. Papel en el desarrollo embrionario

La cadherina-E pertenece a la subfamilia de las cadherinas tipo-I o clásicas y es el receptor mayoritario de las uniones adherentes en todos los tejidos epiteliales, formando interacciones homotípicas dependientes de calcio con otras moléculas de cadherina-E de células adyacentes (Takeichi, 1988).

Fue la primera cadherina identificada y se denominó L-CAM en pollo (Gallin et al., 1983) y uvomorulina en ratón (Schuh et al., 1986). Los ratones mutantes nulos para *cadherina-E* presentan letalidad embrionaria ya que está impedida la implantación y la formación del blastocisto (Larue et al., 1994; Riethmacher et al., 1995). En el embrión temprano de ratón, la expresión de cadherina-E es necesaria para la compactación de la mórula. Durante el desarrollo embrionario, la expresión de cadherina-E es esencial para el establecimiento de la polaridad celular y el mantenimiento de la morfología y arquitectura de todos los epitelios (Larue et al., 1996; Takeichi, 1991; Takeichi, 1995). La expresión de cadherina-E se pierde en procesos que implican la movilización de las células epiteliales y su conversión en células mesenquimáticas, como la gastrulación, la delaminación de la cresta neural y el cierre del paladar (Takeichi, 1988; Takeichi, 1995), es decir en situaciones que conllevan un proceso de TEM. No obstante, la cadherina-E se re-expresa en aquellos procesos del desarrollo que implican la formación de nuevas estructuras epiteliales, como en la organogénesis de riñón y dientes que implican un proceso de TME (Takeichi, 1988; Takeichi, 1995). Además de su papel en la morfogénesis y la homeostasis de los tejidos epiteliales, la cadherina-E participa en vías de señalización implicadas en la regulación del crecimiento, supervivencia y motilidad celular (Braga, 1999; Day et al., 1999; Fukata and Kaibuchi, 2001; Kandikonda et al., 1996; Takahashi and Suzuki, 1996; Yap and Kovacs, 2003).

### 3.1.2. Cadherina-E durante la progresión tumoral

Las modificaciones en las interacciones célula-célula que ocurren durante el desarrollo embrionario, en particular las alteraciones en la expresión de cadherina-E, también tienen lugar en procesos patológicos como la carcinogénesis. Durante la progresión de los carcinomas, se ha detectado la pérdida de expresión o función de cadherina-E (Birchmeier and Behrens, 1994; Gamallo et al., 1993; Navarro et al., 1991; Takeichi, 1993), frecuentemente asociada a la adquisición de un fenotipo invasivo por parte de las células del carcinoma (Christofori and Semb, 1999) y más recientemente asociado a la inducción de procesos de TEM (Peinado et al., 2004a; Thiery, 2002; Thiery and Sleeman, 2006). En estas situaciones patológicas se produce, además, la expresión aberrante de algunas cadherinas. Por ejemplo, en carcinomas de páncreas y diferentes líneas celulares derivadas de carcinoma se expresan las cadherinas mesenquimáticas cadherina-N y cadherina-11 en lugar de la cadherina-E. Estos fenómenos se conocen como “intercambio de cadherinas”, donde la cadherina mayoritaria es sustituida por otra cadherina con menor capacidad de adhesión célula-célula (Nieman et al., 1999; Rosivatz et al., 2002; Tomita et al., 2000). Los estudios iniciales realizados en diferentes sistemas celulares (Behrens et al., 1989; Frixen et al., 1991; Navarro et al., 1991; Vleminckx et al., 1991) y en modelos animales de progresión tumoral (Cano et al., 1996; Perl et al., 1998) apoyaban fuertemente un papel anti-invasivo para cadherina-E, lo que se ha visto reforzado por la relación entre la invasión tumoral y la TEM. No obstante, al igual que ocurre en el desarrollo embrionario, la pérdida de cadherina-E en situaciones patológicas puede ser un proceso reversible. Así, en los tumores secundarios se ha observado frecuentemente la re-expresión de cadherina-E (Bukholm et al., 2000; Caulin et al., 1996; Palacios et al., 1995), lo que está de acuerdo con la reversibilidad del proceso de TEM y el planteamiento de la existencia de procesos de TME en los focos metastásicos (Polyak and Weinberg, 2009; Thiery, 2002).

La relevancia del proceso de invasión tumoral y su regulación negativa por cadherina-E ha estimulado un gran interés por conocer los mecanismos que regulan la expresión y/o función de cadherina-E durante la progresión tumoral.

## **4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CADHERINA-E EN LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESEÑQUIMA Y PROGRESIÓN TUMORAL**

El gen de *cadherina-E* ha sido mapeado en el cromosoma 16 humano (CDH1) (Mansouri et al., 1988) y en el cromosoma 8 murino (*cdh1*) (Eistetter et al., 1988). Ambos genes presentan una gran homología con su ortólogo de pollo (Sorkin et al., 1988) en cuanto a su organización en 16 exones.

Como ya hemos comentado, durante la progresión tumoral se produce una pérdida de expresión de cadherina-E que puede deberse a regulaciones a nivel proteico, a nivel del procesamiento del mRNA, o a nivel génico. Dentro de la regulación génica de *cadherina-E*, los mecanismos pueden incluir:

1) Mutaciones del gen, las cuales se han detectado exclusivamente en algunos tipos de tumores como carcinomas gástricos difusos, carcinomas lobulillares de mama y sarcomas sinoviales (Berx et al., 1995; Guilford et al., 1998; Strathdee, 2002).

2) Regulaciones a nivel epigenético, que provocan el silenciamiento del gen de *cadherina-E* mediante la metilación de islas CpG de su promotor (Cheng et al., 2001; Grady et al., 2000; Graff et al., 2000; Kang et al., 2002; Sarrío et al., 2003; Strathdee, 2002; Tamura, 2002).



3) Mecanismos de regulación transcripcional, donde factores de transcripción específicos pueden reprimir la expresión del gen de *cadherina-E* (Peinado et al., 2004a; Peinado et al., 2007).

### 4.1. Regulación transcripcional del gen de *cadherina-E* (CDH1)

Durante la última década se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de la regulación transcripcional del gen de *cadherina-E*, especialmente a nivel de represión, habiéndose caracterizado varios factores de transcripción implicados en la represión del promotor de *cadherina-E* (Batlle et al., 2000; Bolos et al., 2003; Cano et al., 2000; Comijn et al., 2001, Eger et al., 2005, Grootclaes and Frisch, 2000; Perez-Moreno et al., 2001; Sobrado et al., 2009; Yang et al., 2004) que se comentan más adelante.

#### 4.1.1 Estructura del promotor de *cadherina-E*

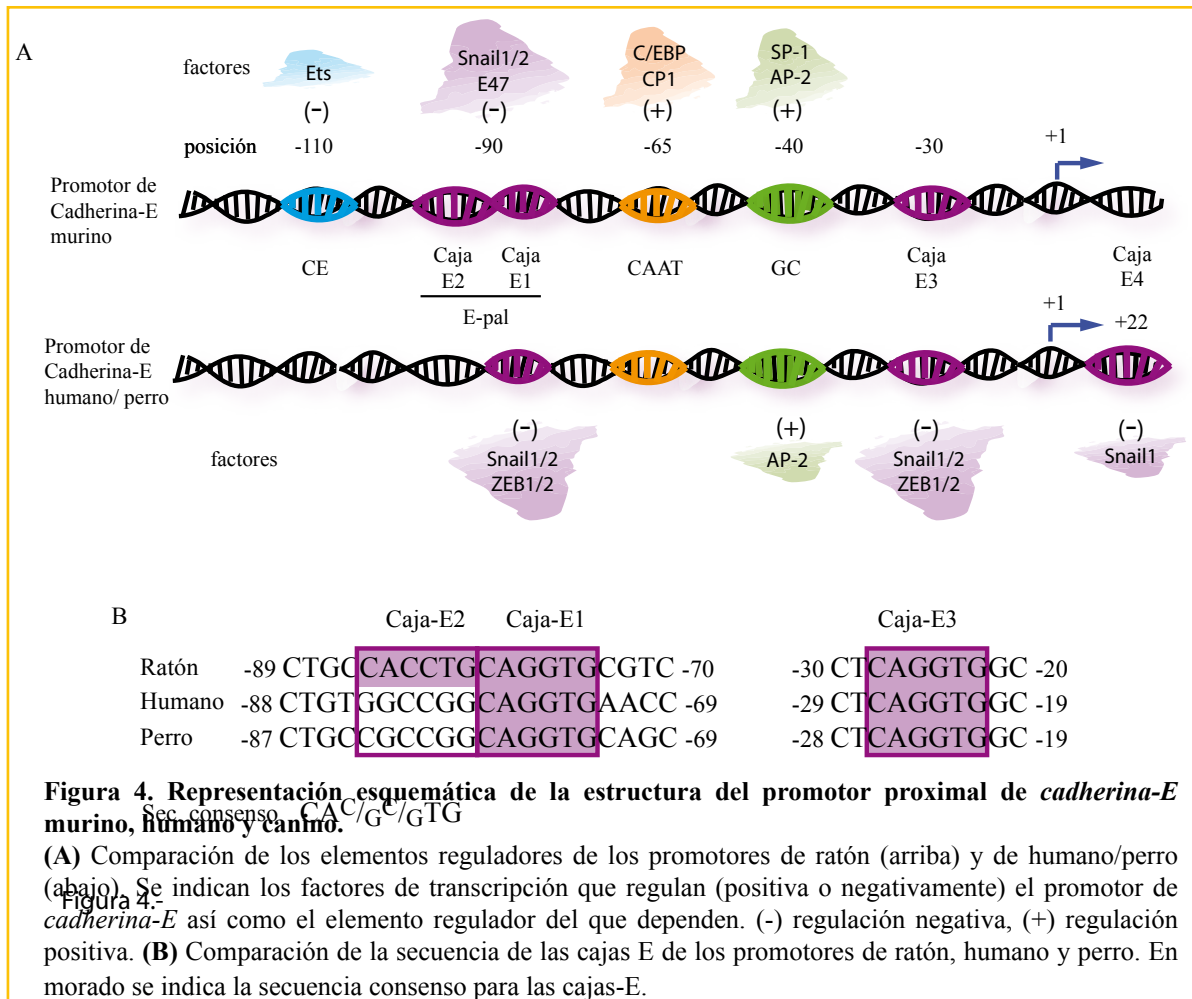
El promotor proximal del gen de *cadherina-E* murino presenta varios elementos de regulación, entre los que se incluye una región rica en GC (-40), una caja CAAT (-65), un elemento palindrómico denominado E-pal (-70 a -90), constituido por dos cajas-E adyacentes (caja-E1 y caja-E2) (CA<sup>G</sup>/c<sup>G</sup>/cTG) flanqueadas por cuatro nucleótidos invertidos, y una tercera caja-E (caja-E3) (CACCTG) próxima al inicio de transcripción (-30) (Behrens et al., 1991; Hennig et al., 1996) (Figura 4A y B). Otros elementos reguladores identificados incluyen un elemento regulador negativo denominado CE, próximo al elemento E-pal (Rodrigo et al., 1999), y una secuencia localizada en el primer intrón del gen de *cadherina-E* de ratón, denominada potenciador específico de tejido epitelial (ESE), necesaria para mantener los niveles de expresión de *cadherina-E* en células epiteliales (Hennig et al., 1996) (Figura 4A). La región rica en GC parece ser una región responsable del mantenimiento de la actividad de este promotor (Behrens et al., 1991, Faraldo et al., 1997) y la caja CAAT podría estar colaborando en el mantenimiento de la actividad basal (Faraldo et al., 1997; Hennig et al., 1996; Niewiadomska et al., 1999). Por otro lado, el elemento E-pal fue inicialmente descrito como un regulador positivo específico de tejido epitelial (Behrens et al., 1991) y posteriormente se describió como un elemento de regulación negativa (Faraldo et al., 1997, Hennig et al., 1996; Rodrigo et al., 1999). Ensayos de protección de DNAsa *in vivo* del promotor murino mostraron que factores transcripcionales presentes en células *cadherina-E* negativas interactuaban con el promotor y que esta interacción ocurría a través del elemento E-pal (mayoritariamente de la caja-E1) (Rodrigo et al., 1999). Estudios comparativos entre los promotores de *cadherina-E* murino, humano y canino (Comijn et al., 2001; Girolodi et al., 1997; Hennig et al., 1996) mostraron que la caja CAAT, la región rica en GC y las cajas-E1 y E3 están conservadas en la misma posición (Figura 4A y B), mientras que la caja-E2 del promotor murino no existe en el promotor humano ni canino (Figura 4A y B). Por otro lado, los promotores humano y canino poseen una caja-E4 adicional detrás del inicio de transcripción (+30) (Batlle et al., 2000) (Figura 4A).

#### 4.1.2 Represores transcripcionales del gen de *cadherina-E*.

En los últimos años se han caracterizado varios factores de transcripción que reprimen el promotor de *cadherina-E*. Entre estos factores se encuentran factores de dedos de zinc de la familia Snail (Snail1 y Snail2) (Batlle et al., 2000; Bolos et al., 2003; Cano et al., 2000; Hajra et al., 2002), dos factores de la familia ZEB (“Zinc finger and E-box binding”), ZEB1 ( $\delta$ EF1/TCF8) y ZEB-2 (SIP-1) (Comijn et al.,



2001; Eger et al., 2005; Grootclaes and Frisch, 2000; Vandewalle et al., 2009), factores de la familia bHLH, como E47, E2-2 y Twist (Perez-Moreno et al., 2001; Sobrado et al., 2009; Yang et al., 2004) y los factores de transcripción embrionarios FoxC2 y Goosecoid (Hartwell et al., 2006; Mani et al., 2007). Hay que resaltar que los factores identificados como represores de *cadherina-E*, especialmente los factores Snail1 y Twist, habían sido implicados previamente en el desarrollo embrionario, asociados a la pérdida de expresión de *cadherina-E* (Hemavathy et al., 2000a; Kosman et al., 1991; Nieto, 2002; Thiery et al., 2009).



La caracterización de Snail1 como represor del promotor murino de *cadherina-E* demostró que actuaba a través de su interacción directa con el elemento E-pal (Cano et al., 2000), al igual que sucede con los factores E47 (Perez-Moreno et al., 2001) y Snail2 (Bolos et al., 2003). Sin embargo, Snail2 y E47 tienen menor afinidad por el elemento E-pal que Snail1 (Bolos et al., 2003). El factor E2-2 recientemente caracterizado como represor de promotor de *cadherina-E* parece actuar mediante mecanismos indirectos (Sobrado et al., 2009). Por otra parte, el mecanismo de represión del promotor de *cadherina-E* mediado por el factor Twist (Yang et al., 2004) no ha sido todavía caracterizado, si bien existen indicios en la literatura de una acción indirecta, al igual que sucede con los factores FoxC2 y Goosecoid (Cano and Portillo, 2009; Yang and Weinberg, 2008). En el caso de la represión del promotor de *cadherina-E* humano, que carece del elemento E-pal, se ha demostrado que son necesarias las tres cajas-E para la represión mediada por Snail1 (Batlle et al., 2000). Por último, se sabe que el factor ZEB-2 reprime el promotor humano y murino mediante su interacción simultánea con las cajas-E1 y -E3, mediada por las dos regiones de los dedos de zinc localizadas en los extremos N- y C- terminal del factor, asumiéndose un mecanismo similar en el

caso de ZEB-1 (Comijn et al., 2001; Eger et al., 2005; Grootclaes and Frisch, 2000) (Figura 4A).

Significativamente, los factores descritos más allá de reprimir la expresión de *cadherina-E* actúan como inductores de TEM. Así, la expresión estable de cualquiera de estos factores transcripcionales en células epiteliales produce un proceso de TEM completa y la adquisición *in vitro* e *in vivo* de un fenotipo invasivo y migratorio (revisado en Moreno-Bueno et al., 2009; Moreno-Bueno et al., 2008; Peinado et al., 2007). Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que la TEM inducida por la expresión estable de los factores Snail1, Snail2, E47 o E2-2 en células epiteliales está asociada a la puesta en marcha de programas genéticos comunes pero también específicos (Moreno-Bueno et al., 2006; Sobrado et al., 2009) y la adquisición de propiedades invasivas diferenciales (Peinado et al., 2004; Sobrado et al., 2009), apoyando un papel diferencial para estos factores en la progresión y la invasión tumoral.

### 5. LA SUPERFAMILIA SNAIL DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

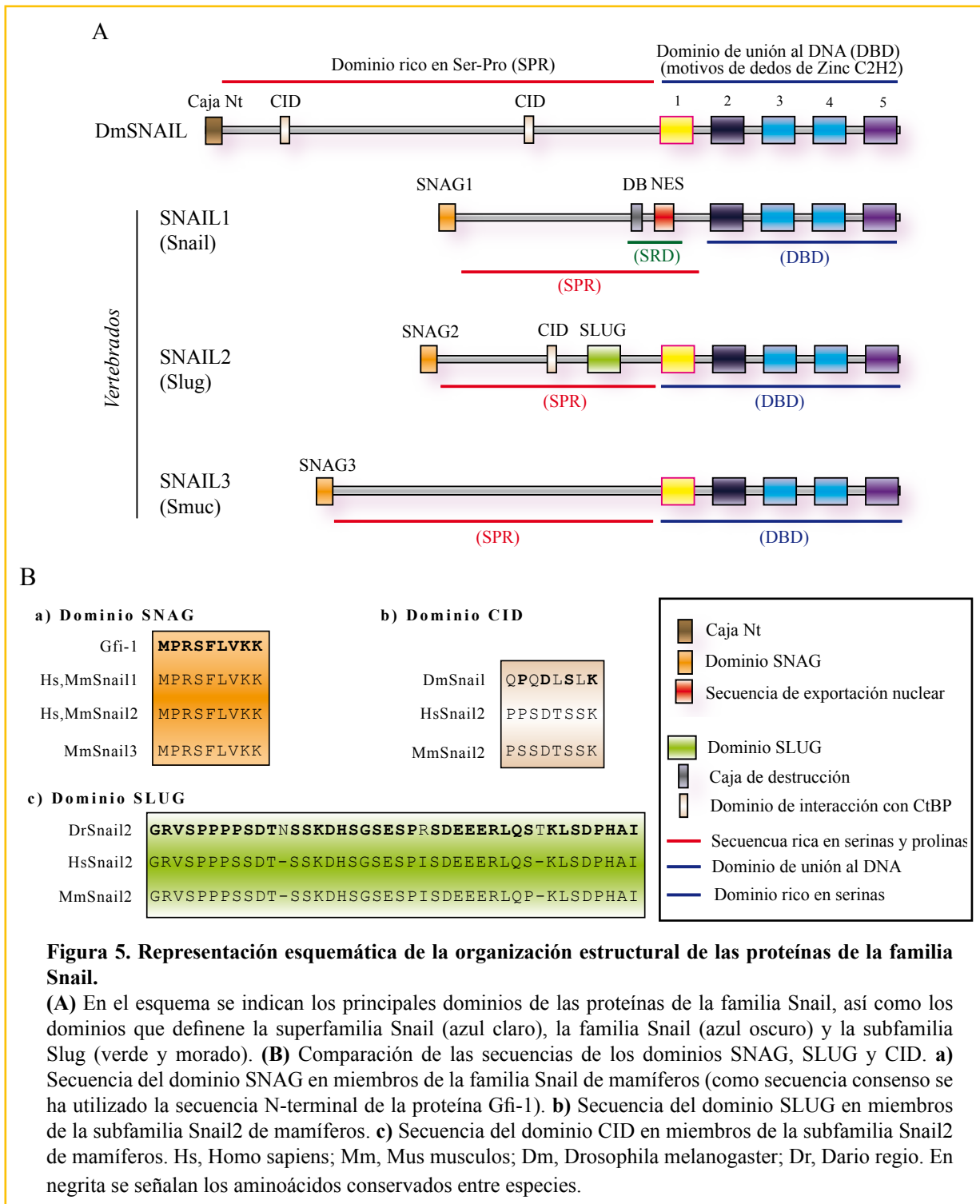
Los factores de la superfamilia Snail fueron descritos inicialmente como represores transcripcionales en varios sistemas experimentales (Hemavathy et al., 2000a; Nieto, 2002). La superfamilia Snail está formada por factores de transcripción con motivos de dedos de zinc C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> para el reconocimiento de secuencias consenso de DNA del tipo cajas-E (CA<sup>G</sup>/c<sup>G</sup>/cTG) (Fuse et al., 1994; Mauhin et al., 1993).

Estudios filogenéticos basados en la comparación del dominio de unión a DNA de los distintos miembros de la superfamilia Snail han permitido dividirlos en dos familias: la familia Snail y la familia Scratch. En vertebrados, la familia Snail se subdivide en 3 subfamilias: la subfamilia Snail (actualmente denominada Snail1), la subfamilia Slug (actualmente denominada Snail2) y la subfamilia Snail3 (Manzanares et al., 2001; Manzanares et al., 2004) (Figura 5A).

#### 5.1. Organización estructural y funcional de los factores de la familia Snail.

Prácticamente la totalidad de las especies de vertebrados estudiadas poseen, al menos, un gen *Snail* (SNAI1) y un gen relacionado denominado *Slug* (SNAI2) (Manzanares et al., 2001), aislado y descrito por primera vez en pollo (Nieto et al., 1994). El gen *Snail* mapea en el cromosoma 2 murino (Chr2-97.0) (Jiang et al., 1997) y en el cromosoma 20 humano (Chr 20q16.1), mientras que el gen *Snail2* se localiza en el cromosoma 16 murino (Chr16-9.4) (Jiang et al., 1998a) y en el cromosoma 8 humano (Chr 8q11) (Cohen et al., 1998). Ambos genes están constituidos por 3 exones y tienen una organización génica similar (Paznekas et al., 1999; Jiang et al., 1998a).

Las proteínas Snail están organizadas en varios dominios funcionales (Figura 5A): un extremo carboxilo terminal donde se encuentra el dominio de unión a DNA, constituido por 4-6 dedos de Zinc (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) y un extremo amino terminal de transactivación (Manzanares et al., 2001; Nieto, 2002). El primer miembro descrito de la familia Snail (dmSnail) fue identificado en estudios sobre el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*, donde se implicó en el silenciamiento de *dmcadherina-E* (Oda et al., 1998). DmSnail presenta un extremo carboxilo terminal donde se encuentra el dominio de unión a DNA, formado por 5 dedos de Zinc, y un extremo amino terminal de transactivación, que comprende el dominio Nt (Manzanares et al., 2001; Nieto, 2002) (Figura 5A) por el que interacciona con complejos de represión como Ebi/NCOR (Qi et al., 2008). La región central presenta dos secuencias consenso de



interacción con CtBP que forman los dominios CID (CtBP interaction domain) (PQDLSLK) (Figura 5A) por los cuales interacciona con dmCtBP (Hemavathy et al., 2004). El resto de los miembros de la familia Snail carecen de dominio Nt, y han sufrido modificaciones en su estructura durante la evolución, que afectan mayoritariamente a la mitad N-terminal reguladora (Manzanares et al., 2001, Nibu et al., 1998, Nieto, 2002). Las proteínas Snail1 y Snail2 de vertebrados contienen un extremo carboxilo terminal de unión a DNA, constituido por 4 ó 5 dedos de Zinc, respectivamente, y un extremo amino terminal de transactivación, que comprende el dominio SNAG (conservado en los miembros de la familia Snail de

vertebrados, en Scratch de *Drosophila*, y en la proteína Gfi) (Manzanares et al., 2001; Nieto, 2002) y difieren en la región central, rica en serinas y prolina (región SPR) (Figura 5A).

La secuencia de los dedos de zinc (ZF) tipo C2H2 sirve para clasificar la superfamilia Snail. Así, los dedos ZF3 y ZF4 tienen una secuencia consenso para todos los miembros de la superfamilia Snail, mientras que los dedos ZF2 y ZF5 presentan secuencias consenso que permiten discriminar entre las familias Snail y Scratch (Manzanares 2001). Por su parte, el dedo ZF-1, presente sólo en Snail2 y en dmSnail, parece ser no funcional (Nieto, 2002; Pavletich and Pabo, 1993). El dominio amino terminal SNAG (dominio *Snail/Gfi-1*, denominado así por su homología con una secuencia presente en el oncogén Gfi-1) (Grimes et al., 1996) está constituido por nueve aminoácidos (MPRSFLVK) (Figura 5B) y es necesario para la actividad represora de los factores Snail (Batlle et al., 2000; Hemavathy et al., 2000b; Nakayama et al., 1998; Peinado et al., 2004c).

La región central de Snail1 y Snail2 es la menos conservada entre las proteínas de ambas subfamilias. Dentro de la región SPR se encuentra una región rica en serinas (SRD) que en el caso de Snail1 comprende una secuencia de destrucción (DB) y una secuencia de exportación nuclear (NES) (Figura 5A). Por su parte, los miembros de la subfamilia Snail2 presentan, en su región central, un dominio SLUG (Sefton et al., 1998) (Figura 5A) que consiste en una secuencia de 29 aminoácidos altamente conservada (Manzanares et al., 2001) y de función desconocida (Figura 5B). Los factores Snail2 de vertebrados contiene además un dominio CID degenerado que procede evolutivamente de los dominios CID de dmSnail (Hemavathy et al., 2000a) (Figura 5B).

Por otra parte, varios estudios recientes han determinado la existencia de secuencias de importación nuclear (NLS) para los factores de la superfamilia Snail, que implican bien secuencias próximas al dominio SNAG (Ko et al., 2007) o una organización modular que implica a varios residuos básicos de los dedos de zinc (Mingot et al., 2009).

### 5.2. Mecanismos de regulación de los factores de la familia Snail.

Numerosos estudios realizados en diferentes modelos de desarrollo embrionario han puesto de manifiesto la existencia de una plétora de señales que modulan la expresión de los factores Snail en vertebrados, entre las que se encuentran las vías de TGF $\beta$ , EGF, FGF, BMP, Wnt, entre otras (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; DeCraeve et al., 2005). Algunas de estas vías de señalización se han implicado también en la inducción de la expresión de Snail1 y Snail2 en determinados sistemas celulares (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; DeCraeve et al., 2005; Peinado et al., 2007) indicando que los factores Snail pueden ser regulados en respuesta a diferentes señales del entorno. Además de la regulación de la expresión a nivel transcripcional, en los últimos años se ha puesto de manifiesto la existencia de diferentes mecanismos de regulación post-transcripcional, especialmente en el caso de Snail1. Se ha postulado que la fosforilación de Snail1 en la región SRD es necesaria para la localización nuclear (Dominguez et al., 2003). Adicionalmente, dos trabajos independientes (Yook et al., 2005; Zhou et al., 2004) identificaron en Snail1 una caja de destrucción (DB) (similar al dominio DB de  $\beta$ -catenina o IkK $\beta$ ) (Zhou et al., 2004) que contiene las serinas 96 y 100 cuya fosforilación por GSK3 $\beta$  determina su degradación por el proteasoma (Yook et al., 2005; Zhou et al., 2004). Por otra parte, la fosforilación de la serina 246 por PAK (“p21 activated kinase”) se ha propuesto que favorece la localización nuclear de Snail1 (Yang et al., 2005). Recientemente, en nuestro laboratorio se han caracterizado nuevos sitios de fosforilación *in vivo* y se han

identificado otras quinasas, como la caseína quinasa-2 (CK2) y la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA), en la regulación de Snail1 (MacPherson et al., 2009) mientras que otros autores han descrito mecanismos de defosforilación (Wu et al., 2009). Adicionalmente, se han descrito otros reguladores post-traduccionales de la estabilidad de Snail1 como: la lisil-oxidasa-like2 (LOXL2) (Peinado et al., 2005) y reguladores traduccionales como el factor YB-1 (Evdokimova et al., 2009).

En contraposición, los mecanismos de regulación post-transcripcional de Snail2 han sido poco estudiados hasta la fecha. Se ha descrito un mecanismo de estabilización de Snail2 que implica la participación de la proteína F-box Ppa (Vernon and LaBonne, 2006), así como un mecanismo de degradación por el proteosoma en situaciones de estrés celular que implica la interacción con p53 y Mdm2 (Wang et al., 2009). Sin embargo, no se han caracterizado hasta la fecha mecanismos de regulación post-transcripcional de Snail2 a nivel de fosforilación y su posible implicación funcional.

## **6. COMPLEJOS DE REPRESIÓN DE *CADHERINA-E* MEDIADOS POR PROTEÍNAS DE LA FAMILIA SNAIL**

---

La primera evidencia de la relación entre represión transcripcional y complejos co-represores en la regulación del promotor de *cadherina-E* fue la purificación del complejo co-represor CtBP unido a este promotor. Este complejo co-represor CtBP estaba formado por diferentes HDACs (histonas deacetilasas), metilasas y el represor ZEB-1 (Shi et al., 2003).

Posteriormente, nuestro grupo describió el mecanismo de represión empleado por Snail1 sobre *cadherina-E* (Peinado et al., 2004a). La represión del promotor de *cadherina-E* por Snail1 implica el reclutamiento de un complejo formado por el co-represor mSin3A, y las histonas deacetilasas 1 y 2 (HDAC1/2) mediante la interacción específica entre el dominio SNAG de Snail1 y mSin3A (Peinado et al., 2004c). La presencia de este complejo en el promotor de *cadherina-E* origina un descenso en el nivel de acetilación de las histonas H3 y H4, y la metilación de la lisina 9 de la histona H3, lo que inicia el proceso de compactación de la cromatina (Peinado et al., 2004c; Peinado and Cano, 2005). Recientemente, se han caracterizado complejos adicionales de represión reclutados por Snail1 con la participación del complejo Polycomb (Herranz et al., 2008) y las proteínas Ajuba (Hou et al., 2008; Langer et al., 2008), así como nuevas interacciones de Snail1 con proteínas Smad3/4 como mecanismos adicionales de represión en respuesta a TGF $\beta$  en células epiteliales de carcinoma de mama (Vincent et al., 2009). El mecanismo molecular responsable de la represión mediada por Snail2 todavía es desconocido. Datos previos de nuestro laboratorio han demostrado, mediante ensayos de pull-down, la interacción de Snail2 con los factores CtBP1/2 y con las HDAC1/3 (Bolos, V., 2005). Sin embargo, la relevancia funcional de estas interacciones todavía no se ha establecido.

## **7. LOS FACTORES SNAIL Y LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA**

---

### **7.1 Expresión de los factores Snail durante el desarrollo embrionario del ratón.**

El estudio del patrón de expresión de los factores Snail durante el desarrollo embrionario temprano en diferentes especies ha demostrado que desempeñan un papel clave en diferentes procesos embrionarios.

El factor Snail es necesario para la formación del mesodermo en *Drosophila* y otros invertebrados (Leptin, 1991). Snail1 y Snail2 se han implicado en las TEM asociadas a la formación del mesodermo y la delaminación de la cresta neural en embriones de ratón y pollo, respectivamente (Nieto et al., 1994; Nieto, 2002; Sefton et al., 1998). Por otro lado, estudios con dominantes negativos de Snail2 en *Xenopus* indican, asimismo, su participación en la inducción de las células de la cresta neural (Carl et al., 1999; LaBonne, 2000).

Estudios con ratones mutantes de Snail1 y Snail2, han mostrado que Snail2 no es esencial en el desarrollo del mesodermo y la cresta neural, mientras que Snail1 desempeña un papel esencial en estos procesos induciendo la TEM. Así, los embriones homocigotos nulos para Snail2 son viables y no presentan defectos aparentes en el desarrollo de la cresta neural (Jiang et al., 1998b), mientras que los embriones homocigotos nulos para Snail1 son letales embrionarios y presentan defectos en la TEM que se produce durante la gastrulación (Carver et al., 2001). Estos datos están de acuerdo con los patrones de expresión de Snail1 y Snail2 en embriones de ratón, donde Snail1 se expresa asociado a los procesos TEM, mientras que Snail2 se expresa en el mesodermo y en regiones migratorias, pero no estrictamente asociado a los procesos de TEM (Cano et al., 2000; Sefton et al., 1998). No obstante, es también importante mencionar que los factores Snail no son esenciales en la especificación del mesodermo en vertebrados sino que se asocian a los cambios de forma, adhesión y movimiento celular (revisado en Acloque et al., 2009; Thiery et al., 2009).

El estudio comparativo de Snail1 y Snail2 en embriones de pollo y ratón demuestra que se ha producido una inversión en los patrones de expresión de ambos genes en los sitios de TEM durante el desarrollo embrionario de ambas especies (Sefton et al., 1998). Así, en el embrión de pollo, Snail2 se expresa en la línea primitiva y en las células premigratorias de la cresta neural (áreas de TEM), mientras que Snail1 está ausente en estos tejidos y se expresa en las células migratorias de la cresta neural (Sefton et al., 1998). Es interesante señalar que en otros vertebrados, como *Xenopus*, aunque Snail1 y Snail2 se expresen en las células premigratorias de la cresta, Snail1 es el primer miembro de la familia que se transcribe (Aybar et al., 2003; Linker et al., 2000).

Actualmente, se sabe que ambos factores pueden ser funcionalmente equivalentes induciendo TEM cuando se expresan ectópicamente en las especies y contextos de desarrollo apropiados (del Barrio and Nieto, 2002; Nieto, 2002). Además, es preciso mencionar que Snail1 y Snail2 se han visto implicados en las TEM asociadas a la formación del corazón y al cierre del paladar, entre otros procesos morfogénéticos (Martinez-Alvarez et al., 2004; Nieto, 2002; Romano and Runyan, 2000; Sefton et al., 1998; Timmerman et al., 2004).

### 7.2 Expresión de Snail1 y Snail2 en tejidos adultos de ratón

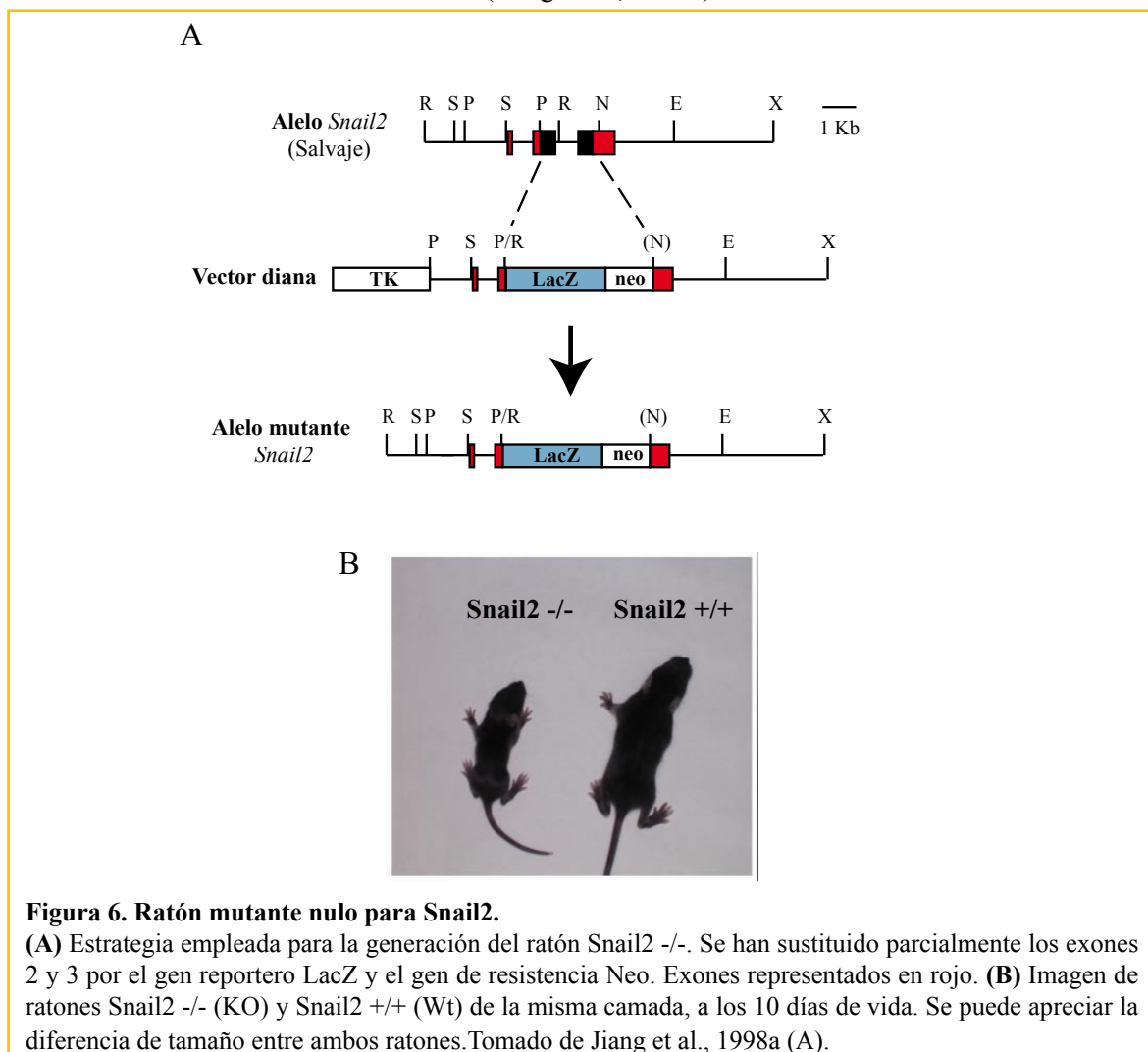
Snail1 se expresa en algunos tejidos del ratón adulto, como pulmón y corazón, y a bajos niveles en el cerebro, hígado, y músculo esquelético (Paznekas et al., 1999). Snail2, en cambio, se expresa en una gran cantidad de tejidos, presentando una expresión alta en epitelios estratificados o pseudoestratificados como la epidermis, mucosa oral, esófago y estómago. Cabe destacar la expresión de Snail2 en las células basales de estos tejidos epiteliales, lo que parece sugerir que podría estar implicado en los procesos de renovación de estos tejidos (Parent et al., 2004; Savagner et al., 2005). Adicionalmente, se han detectado niveles variables de expresión de Snail2 en fibroblastos, células del músculo liso y en los tejidos



mesenquimáticos (cartílago, glomérulos renales, pulmón, ovario y útero) (Hemavathy et al., 2000a; Inukai et al., 1999; Parent et al., 2004).

## 8. CARACTERÍSTICAS DEL RATÓN MUTANTE NULO DE *SNAIL2*

La generación del ratón mutante nulo de *Snail2* ( $Snail2^{tm2Grid}$ ; *Snail2*  $-/-$ ) ha permitido asociar *Snail2* con un gran número de procesos biológicos. En 1998, Gridley y col. generaron este ratón mutante mediante el reemplazamiento, por recombinación homóloga, de la región codificante de los dedos de zinc de *Snail2* (parte de los exones 2 y 3) por el gen reportero *LacZ* y el cassette de resistencia a Neomicina (Jiang et al., 1998b) (Figura 6A). La expresión del transgén produce la enzima  $\beta$ -galactosidasa funcional fusionada a los primeros 120 aminoácidos de *Snail2*. El ratón *Snail2*  $-/-$  es viable, aunque presenta ciertas alteraciones. Así, los ratones neonatos *Snail2*  $-/-$  presentan un 70% menos de peso comparados con sus hermanos de camada *Snail2*  $+/+$  (wild type) y *Snail2*  $+/-$  (heterocigotos), y no llegan a alcanzar el tamaño de sus hermanos en la edad adulta (Figura 6B). También se ha descrito la aparición de un mechón blanco en la frente en algunos ratones (Jiang et al., 1998b), parches de despigmentación en el vientre, la cola y las patas, debido probablemente a la deficiencia de *Snail2* durante la migración de las células de la cresta neural que dan lugar a los melanoblastos (Tribulo et al., 2004). Adicionalmente, los ratones *Snail2*  $-/-$  presentan anemia macrocítica e infertilidad (Jiang et al., 1998a).



### 8.1. Regulación de la hematopoyesis por Snail2.

Otro de los rasgos fenotípicos observados en los ratones Snail2  $-/-$  afecta al proceso de formación de las células hematopoyéticas. La cascada de señalización SCF/c-kit es esencial en la hematopoyesis, la melanogénesis, y la gametogénesis para la especificación y la migración de las células progenitoras c-kit<sup>+</sup>. Esta función también es determinante durante el desarrollo embrionario, en los procesos de TEM inducidos por los factores de la familia Snail. Se ha demostrado *in vivo* que la activación de c-kit por SCF (Stem Cell factor) induce la expresión de Snail2 (Perez-Losada et al., 2002).

El análisis de la hematopoyesis en los ratones Snail2  $-/-$  reveló que la deficiencia de Snail2 bloquea el desarrollo de las células progenitoras de la línea eritroide y de células T, pero no afecta el desarrollo de la línea de células B. Sin embargo, otros linajes hematopoyéticos c-kit<sup>+</sup>, como los mastocitos y los melanoblastos, no muestran fenotipo en los ratones Snail2  $-/-$ , sugiriendo que el contexto celular es importante para interpretar el papel de Snail2 en la cascada SCF/c-kit. Además, otros estudios revelan que Snail2 regula la supervivencia de los progenitores hematopoyéticos y los pro-linfocitos B tras un daño genotóxico (Inoue et al., 2002; Perez-Losada et al., 2003; Wu et al., 2005).

Sorprendentemente, Snail2 también se ha visto implicado en la adipogénesis: los ratones Snail2  $-/-$  presentan mucha menos acumulación de grasa blanca que sus hermanos Snail2  $+/+$  y éstos mucha menos que los ratones que sobreexpresan Snail2 (Perez-Mancera et al., 2007).

### 8.2. Snail2 regula la homeostasis epitelial.

Los ratones Snail2  $-/-$  también se han utilizado para estudiar el papel de Snail2 en la homeostasis epitelial. Ensayos con radiación ultravioleta (UVR) a dosis similares a las solares, demuestran que Snail2 induce una respuesta aguda en los queratinocitos (Kurrey et al., 2009), además de regular positivamente la proliferación de los queratinocitos y el reclutamiento de neutrófilos en respuesta a la radiación (Newkirk et al., 2008a; Newkirk et al., 2008b). En estudios de explantes de piel de ratones Snail2  $-/-$  se observó un descenso en la capacidad proliferativa y migratoria de la epidermis, mientras que la sobreexpresión de Snail2 en queratinocitos en cultivo aumentó su capacidad de re-epitelializar (Arnoux et al., 2008; Hudson et al., 2009; Savagner et al., 2005).

Todos estos datos sugieren que Snail2 está implicado en la homeostasis de las células madre melanocíticas, hematopoyéticas y germinales (Perez-Losada et al., 2002; Inoue et al., 2002; Wu et al., 2005).

## 9. LA PIEL

---

La piel es la barrera fisiológica que comunica y protege al organismo del ambiente externo. Está constituida por hipodermis (tejido adiposo), dermis (tejido conectivo) y epidermis (epitelio estratificado) (Fuchs, 1990). La hipodermis es la capa más interna de la piel y une de manera laxa la dermis con los órganos adyacentes. Está compuesta por una capa variable de tejido adiposo, la cual ejerce de aislante evitando la pérdida de calor corporal y protegiendo el cuerpo contra traumatismos superficiales. La dermis es la capa intermedia, siendo el soporte físico de varias estructuras anatómicas como los vasos sanguíneos, vasos linfáticos, receptores sensoriales, folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas



sudoríparas (estas últimas ausentes en la piel del ratón). La dermis está compuesta principalmente por una matriz extracelular compuesta por colágenos (tipo I y III), elastina, glicosaminoglicanos y glicoproteínas filamentosas. El principal tipo celular de la dermis es el fibroblasto, célula mesenquimática con una morfología fusiforme (Alberts et al, 1996).

9.1 La epidermis

La epidermis es un epitelio renovable, estratificado y queratinizado, compuesto en su mayor parte por queratinocitos. Además, contiene melanocitos (células productoras de melanina), células de Langerhans (macrófagos intraepidérmicos con función presentadora de antígenos) y células de Merkel (receptores sensoriales).

Los queratinocitos se organizan en capas de células que representan estadios sucesivos en la diferenciación terminal de la epidermis. Se distinguen cuatro capas según su disposición y morfología: basal, espinosa, granular y cornificada (Figura 7) (Alberts et al 1996). Mediante el proceso de homeostasis se produce la renovación de las distintas capas de la epidermis. Así, las células de la capa basal mantienen la capacidad proliferativa y periódicamente ejecutan el programa de diferenciación terminal. La transición de la capa basal a la capa suprabasal es el paso principal del programa de diferenciación terminal. Cuando las células de la capa basal entran en la capa espinosa, dejan de expresar las citoqueratinas 5 y 14 (CK5 y CK14) para expresar las citoqueratinas CK1 y CK10 (Fuchs and Green, 1980). Posteriormente, migran a la capa granular, dónde expresan proteínas estructurales, características de la diferenciación terminal, como profilagrina y loricrina, y el depósito de gránulos de queratohialina. Al mismo tiempo, se reprime completamente la síntesis de DNA, que culmina con la pérdida de sus núcleos y la expresión de marcadores como la involucrina. Finalmente se produce la muerte del queratinocito en la capa cornificada desprendiéndose de la superficie de la epidermis (descamación) cuando son empujadas por las células de

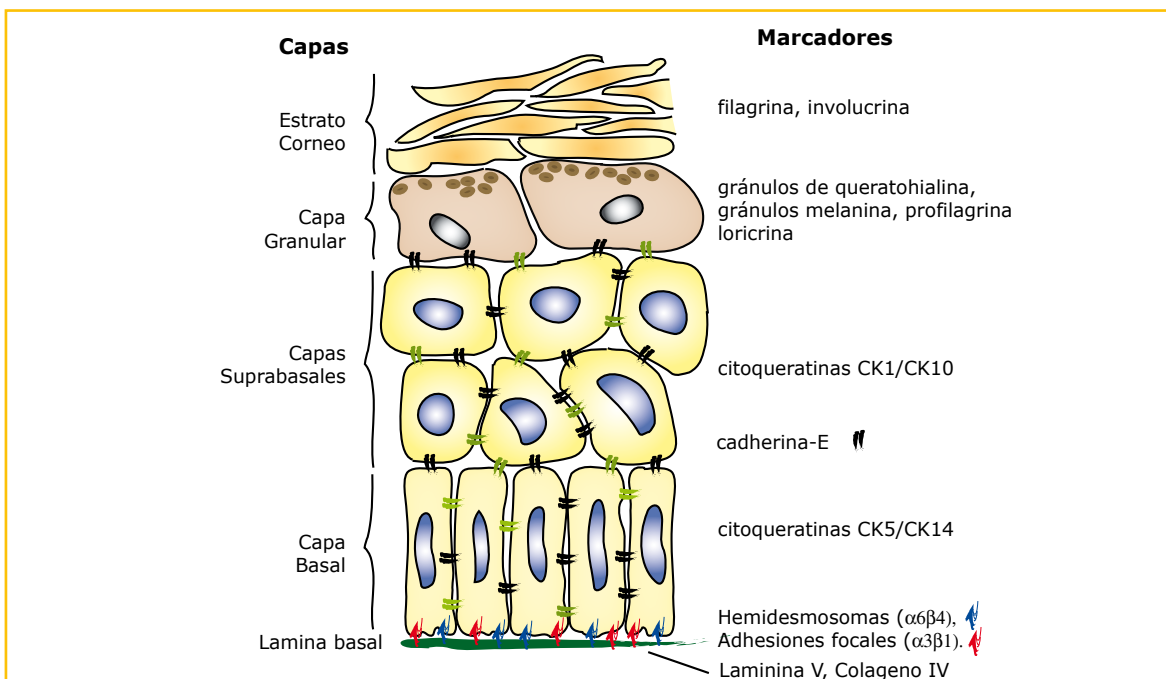


Figura 7. Representación esquemática de la estructura de la epidermis.

El esquema representa la organización de las distintas capas que componen la epidermis, así como las proteínas que se expresan mayoritariamente en cada una de las capas y sirven como marcadores específicos de cada capa. La lámina basal (en verde) se incluye en este esquema, aunque no forma parte de la epidermis, sino de la matriz extracelular, para indicar el contacto entre ésta y las células de la capa basal .

las capas inferiores (Fuchs, 1990). Se han identificado múltiples vías de señalización esenciales para la correcta estratificación y homeostasis de la piel (Blanpain et al., 2007; Blanpain and Fuchs, 2006), como las vías de Notch, MAPK, NFkB, el regulador transcripcional p63, el regulador transcripcional C/EBP, IRF6, GRHL3 y KLF4.

Otra cuestión importante durante la homeostasis es el proceso de división asimétrica que sufren algunas células de la capa basal. Una división asimétrica que sucede paralelamente a la membrana basal generan dos células progenitoras transitorias, también denominada “transient amplified cell” (TA), ó una TA y una célula hija ya comprometida para la diferenciación terminal. Las TA puede dividirse varias veces simétricamente antes de comenzar la diferenciación terminal (Braun et al., 2003; Ghazizadeh and Taichman, 2001). Sin embargo, las divisiones asimétricas perpendiculares a la lámina basal sólo generan una TA y una célula hija ya comprometidas para la diferenciación terminal, restringiendo así la presencia de células con capacidad proliferativa a la capa basal. La epidermis se puede subdividir funcionalmente en: epidermis interfolicular (EIF) y folículos pilosos (FP). En el folículo piloso (que origina el pelo) residen las células madre de la piel, concretamente en una región medio-superior concreta, denominada “*bulge*” desde donde pueden migrar a la capa basal de la epidermis interfolicular generando las células progenitoras transitorias (Blanpain and Fuchs, 2006; Blanpain and Fuchs, 2009; Watt et al., 2006). Todas estas células están encargadas de la regeneración del pelo, la cicatrización de heridas, y del mantenimiento de la homeostasis de la piel, por lo que podrían jugar un papel fundamental en la carcinogénesis (Brown and Balmain, 1995; Lavker et al., 1993; Miller et al., 1993; Watt et al., 2006).

La piel del ratón presenta ciertas ventajas como modelo experimental en el estudio de los cambios asociados con el desarrollo neoplásico (Brown and Balmain, 1995), como son:

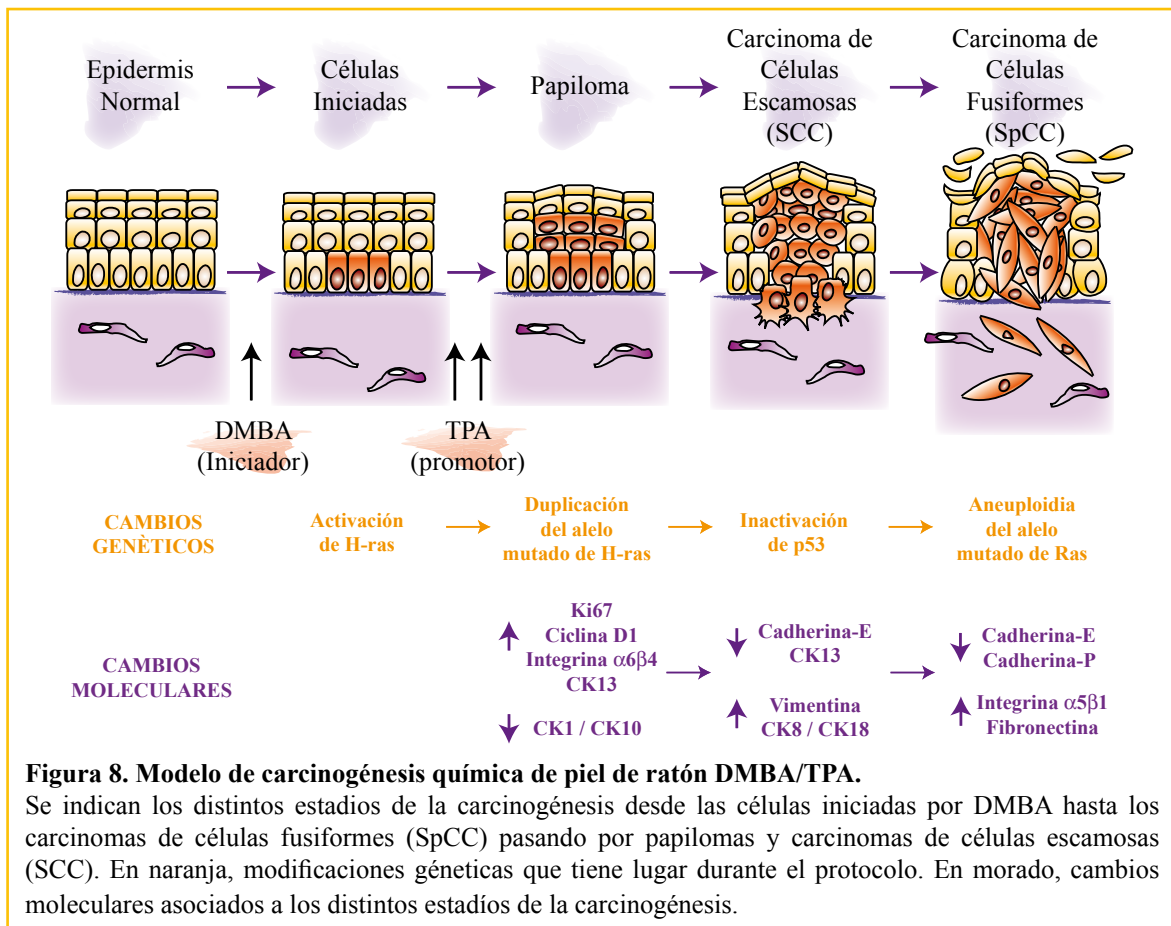
- Es un órgano fácilmente accesible y permite la aplicación localizada de carcinógenos.
- Permite la investigación de los diferentes aspectos de cada etapa de la carcinogénesis: iniciación, promoción y progresión, que pueden separarse experimentalmente.
- El desarrollo morfológico de los tumores se puede seguir fácilmente tanto microscópica como macroscópicamente.
- Permite el uso de animales modificados genéticamente.

## 10. MODELO DE CARCINOGENESIS QUÍMICA DE PIEL DE RATÓN

El modelo de carcinogénesis química de piel de ratón en dos estadios se basa en la utilización de un carcinógeno como iniciador y de un promotor tumoral generando un proceso canceroso multisequencial (Boutwell, 1974; Hennings and Yuspa, 1985; Yuspa, 1994; Yuspa et al., 1996). El protocolo consiste en la aplicación tópica de una dosis del carcinógeno químico dimetilbenzantraceno (DMBA), que actúa promoviendo la aparición en la epidermis de “células iniciadas” (células que han sufrido mutaciones en su DNA), seguida de aplicaciones repetidas del éster de forbol TPA como promotor tumoral, que induce la división descontrolada de las células de la epidermis (Figura 8). Con este protocolo, al cabo de varias semanas se generan tumores benignos (papilomas), la mayoría de los cuales regresan. Un pequeño número (5-10%) de los papilomas evolucionan a carcinomas escamosos malignos (SCC) que eventualmente progresan a carcinomas indiferenciados fusiformes (SpCC) (Ewing et al., 1988; Stenback, 1980). De esta manera pueden distinguirse tres etapas en la carcinogénesis química de piel de ratón:

iniciación, promoción y progresión maligna.

Durante el proceso de carcinogénesis química suceden cambios genéticos que generan células iniciadas y favorecen la promoción y progresión maligna (Yuspa et al., 2004). Así, la iniciación química con el carcinógeno DMBA promueve la activación del oncogén Harvey-ras (H-ras) mediante la mutación específica del codón 61 del gen H-ras (Balmain et al., 1984; Brown et al., 1985; Quintanilla et al., 1986). Durante la promoción y la progresión de papilomas a SCCs se produce la amplificación del alelo mutado de H-ras, mientras que en los últimos estadios de la progresión maligna (SpCC), se produce la amplificación alélica de H-ras, acompañada de la pérdida del alelo normal (Bianchi et al., 1990; Brown and Balmain, 1995; Quintanilla et al., 1986). Asimismo, durante la progresión de papilomas a SCC se produce la inactivación del gen supresor de tumores p53 (Burns et al., 1991; Han and Kulesz-Martin, 1992; Ruggeri et al., 1991) y de p19 Arf mediante procesos de regulación genética y epigenética (Kelly-Spratt et al., 2004) (Figura 8). Además de las alteraciones genéticas, durante el proceso de carcinogénesis tienen lugar cambios en los patrones de expresión de proteínas, habiéndose caracterizado varios marcadores que permiten clasificar las distintas lesiones generadas durante el proceso de carcinogénesis (Figura 8). Así, la epidermis hiperplásica y los papilomas incipientes expresan marcadores epiteliales y de diferenciación, como *cadherina-E* y citoqueratina CK10. Los papilomas con alto riesgo de progresión expresan otros marcadores, como TGF- $\beta$  (Fowlis et al., 1992; Glick et al., 2008), integrina  $\alpha\beta4$  (Tennenbaum et al., 1992; Tennenbaum et al., 1993), y citoqueratina CK13 (Gimenez-Conti et al., 1990; Nischt et al., 1988). La conversión de papiloma a carcinoma se asocia con cambios en los marcadores de diferenciación epitelial: disminuye la expresión de *cadherina-E* (Navarro et al., 1991) y de citoqueratinas CK1 y CK10 (Roop et al., 1988) y se incrementa la expresión de integrina  $\alpha\beta4$  (Gomez et al., 1992; Tennenbaum et al., 1996). Además, en las primeras etapas del proceso de progresión maligna se produce un aumento



en la expresión de las citoqueratinas embrionarias CK8 y CK18 (Caulin et al., 1993; Larcher et al., 1992), mientras que en los estadios finales (carcinomas indiferenciados, SpCC) se induce la expresión de vimentina y fibronectina, características de células mesenquimáticas (Caulin et al., 1993; Gomez et al., 1994), la expresión de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  (Gomez and Cano, 1995) y la pérdida de cadherina-E y P (Navarro et al., 1991) (Figura 8).

La homeostasis de la piel requiere un control muy estricto entre la proliferación y la apoptosis, que tiene lugar mediante la comunicación entre los queratinocitos y el microambiente de la piel. Este control previene la transformación neoplásica. Durante el desarrollo temprano de los tumores, sin embargo, se invalidan estos controles debido probablemente a la aparición de inflamaciones crónicas, y el cambio a un estado pro-tumoral del microambiente. Actualmente, está bien establecido que los tumores primarios están controlados por múltiples células del estroma además de las células tumorales (Tlsty and Coussens, 2006). Algunas de estas células estromales se han implicado en la promoción tumoral, como las células endoteliales, los fibroblastos, varias células derivadas de la médula ósea (BMDCs, como macrófagos, neutrófilos y mastocitos), mientras que otras pueden actuar como células supresoras (Alison et al., 2009; Mantovani et al., 2009; Phinney and Prockop, 2007; Sasaki et al., 2008).

En los últimos años han aumentado las evidencias sobre la importancia de las BMDCs en la progresión maligna. Muchas de estas células infiltrantes acuden al tumor debido a la destrucción del tejido provocado por agentes inflamatorios o como respuesta al crecimiento del propio tumor. Las células tumorales no sólo escapan del control del sistema inmune, sino que son capaces de modular cierto tipo de células inflamatorias para que actúen como células pro-tumorales (Allavena et al., 2008a; Allavena et al., 2008b; Mantovani et al., 2008; Mantovani et al., 2009).

Los macrófagos pueden considerarse las células BMDC prototípicas capaces de modificar el comportamiento de las células tumorales y han sido relacionados con angiogénesis, invasión, intravasación y metástasis en modelos animales (Condeelis and Segall, 2003; Pollard, 2004). Los macrófagos son células plásticas, y esta adaptabilidad puede ser utilizada por las células tumorales para obtener distintas funciones de los macrófagos en distintos estadios de la progresión tumoral habiéndose planteado recientemente la existencia de un cambio entre macrófagos anti-tumorales y pro-tumorales durante la progresión tumoral (Allavena et al., 2008b; Allavena et al., 2008c; Mantovani et al., 2009; Sica et al., 2008; Sica et al., 2007). Los factores que controlan el balance entre la actividad pro y anti-tumoral de los macrófagos, y cómo este equilibrio cambia durante la progresión tumoral, son desconocidos, siendo uno de los campos de intenso interés y investigación actual.

## **OBJETIVOS**

---



Como objetivos generales de esta tesis, nos planteamos caracterizar el mecanismo de acción de Snail2 en la represión transcripcional de *cadherina-E* (PARTE 1), así como el papel de Snail2 en la carcinogénesis química de piel de ratón (PARTE 2). Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización de la represión del promotor de *cadherina-E* mediada por Snail2.
  - 1.1. Caracterización funcional de los dominios de unión a DNA y reguladores de Snail2.
  - 1.2. Caracterización de los complejos co-represores reclutados por Snail2.
  - 1.3. Caracterización funcional de la fosforilación de Snail2.
  
2. Análisis de la función de Snail2 en la carcinogénesis de piel de ratón.
  - 2.1. Implicación funcional de Snail2 en la carcinogénesis química.
  - 2.2. Caracterización de las funciones intrínsecas de los queratinocitos Snail2 <sup>-/-</sup>.
  - 2.3. Influencia del microambiente tumoral en la carcinogénesis en ausencia de Snail2.





## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## 1. Construcciones de DNA

En esta tesis se han utilizado diversas construcciones generadas previamente en nuestro grupo o cedidas por distintos laboratorios, como se especifica en la Tabla I. Adicionalmente, en el contexto del presente trabajo, se han generado vectores de expresión de diferentes formas mutantes de Snail2 murino a partir del plásmido pcDNA3-mSlug-HA (Bolos et al., 2003), que porta la secuencia completa de Snail2 de ratón fusionada al epítipo HA (hemaglutinina). Los oligonucleótidos empleados en la generación de las construcciones mencionadas se recogen en la Tabla II. Los vectores de expresión de las diferentes formas mutantes de Snail2 comprenden (ver Tabla III):

1.1. Mutaciones puntuales. Se generaron los siguientes mutantes puntuales mediante la técnica de mutagénesis dirigida (Zheng et al., 2004).

→ Mutantes en la región de los dedos de zinc. Se obtuvieron mutantes en cada uno de los cinco dedos de zinc presentes en Snail2. La mutación consistió en la sustitución de la primera cisteína de cada uno de los dedos de zinc por alanina, dicha alteración impide la formación de la estructura tridimensional del dedo de zinc y por tanto el que ese dominio sea funcional.

→ Mutantes de fosforilación. Se generaron mutantes en varios residuos, susceptibles de fosforilación, presentes en Snail2. Las mutaciones consistieron en sustituir la serina indicada por alanina, cambio que impide la fosforilación de ese residuo. Adicionalmente, se sustituyó la serina correspondiente por aspártico, generando un mutante que mimetiza la carga negativa del fosfato.

→ Mutantes intermedios. Se generaron mutantes del plasmido pcDNA3-Snail2-HA que incorporan una diana de restricción para la enzima EcoRV en los nucleótidos que codifican para el aminoácido indicado (pcDNA3-EVaa).

1.2. Mutantes de delección. Los mutantes de delección  $\Delta$ SNAG2-HA y  $\Delta$ Nt-HA se obtuvieron mediante la amplificando por PCR de la región de Snail2 de interés utilizando como DNA molde el vector pcDNA3-Snail2-HA. El producto amplificado se subclonó en el vector pcDNA3-HA. Los mutantes  $\Delta$ SLUG-HA,  $\Delta$ CID-HA y  $\Delta$ 65-87-HA se generaron mediante la digestión de dos vectores intermedios (EcoRVaa1 e EcoRVaa2) (ver Tabla III y Esquema 1). En el caso del mutante  $\Delta$ 65-87-HA, los vectores intermedios pcDNA3-EV65 y pcDNA3-EV87 se digirieron con las enzimas de restricción EcoRV y XhoI según se indica en el Esquema 1. El fragmento de pb del vector pcDNA3-EV65 se ligó con el fragmento de ..... pb del vector pcDNA3-EV87 generandose un plásmido que codifica para la proteína Snail2 deleccionada en la región comprendida entre el 65 y el 87 (ver Esquema 1). Los mutantes  $\Delta$ SLUG-HA,  $\Delta$ CID-HA se generaron de la misma manera.

Una vez obtenidas las distintas construcciones se verificaron mediante secuenciación automática usando oligonucleótidos específicos del vector pcDNA3.1 (Invitrogen) (oligonucleótidos del promotor T7 y del promotor SP6, Invitrogen).

**Tabla I: vectores de expresión en eucariotas**

Construcción	Especie	Tag	Referencia
<b>Vectores de expresión en células eucariotas</b>			
pcDNA3-mSnail1-HA	Ratón	HA	Lab. Dr. A. Cano (Peinado et al., 2005)
pcDNA3-mSnail2-HA	Ratón	HA	Lab. Dr. A. Cano (Bolos et al 2003)
pcDNA3-flag-CtBP1	Ratón	Flag	Dra. K. Verscheuren, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, Zwijnaarde, Belgium
pcDNA3-HDAC1-flag	Humano	Flag	
pcDNA3-HDAC2-flag	Humano	Flag	Dr. E. Seto, Moffit Cancer Center, Tampa, USA
pcDNA3-HDAC3-flag	Humano	Flag	
pSC2-mSin3A-myc	Ratón	Myc	Dr. R. N. Eisenman, Fred Hutchinson, Cancer Research Center, Seattle, USA
pcDNA3-NCoR-flag	Ratón	Flag	Dra. Ana Aranda, Instituto de Investigaciones Biomédicas - Madrid "Alberto Sols" CSIC-UAM, España
<b>Vectores testigos</b>			
pGL2-mCadherina-E (-178/+92)	Ratón	LUC	Lab. Dr. A. Cano (Bolos et al 2003)
pGL2-hCadherina-E (-178/+92)	Humano	LUC	Dr. F. Van Roy, VIB, Universidad de Ghent, Bélgica
pCMV-βGalactosidasa	-	β-GAL	Promega

**Esquema 1. Generación del mutante de delección Snail2-ΔCID-HA mediante la digestión de vectores intermedios.** Se generaron dos vectores intermedios por mutagénesis dirigida que incorporan en su secuencia una secuencia de restricción para el enzima EcoRV (en rojo) en la posición del aminoácido indicado. En este caso, en los aminoácidos 46 (izquierda, vector morado, Snail2-EV46-HA) y 65 (derecha, vector verde, Snail2-EV65-HA). Los vectores intermedios se digirieron con los enzimas EcoRV y XhoI, y los fragmentos de interés se ligaron para generar un nuevo vector pcDNA3-HA que incorpora una secuencia del cDNA de Snail2 que carece de la región comprendida entre los aminoácidos 46 y 65 (Snail2-ΔCID-HA).

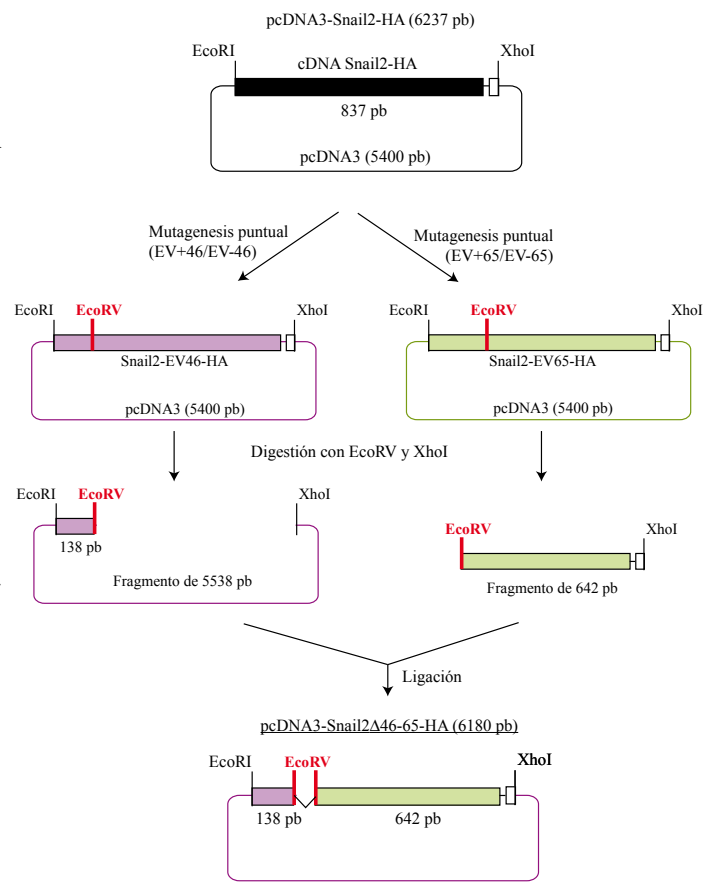


Tabla II: oligonucleótidos empleados para la generación de los distintos mutantes.

Orientación	Secuencia	Mutante
<b>1. Cebadores para mutantes en los dedos de zinc</b>		
C131A-5' C131A-3'	5'-GTTTCAGGCAAATTTATGCAATAAGACCTATTCTACTTCTCTGGGCTGGC 5'-GCATAAATTTGCCTGAAACTTCTCAGCTTCGATGGC	mutZF1
C162A-5' C162A-3'	5'-CGTTCAGCGCCAAGTATTGTGACAAGGAATATGTGAGCC 5'-GTCACAATACTTGGCGCTGAACGATTTCTAGACTGGG	mutZF2
C188A-5' C188A-3'	5'-CTTGTGTCGCCAAGATTTGTGGCAAGGCTTTCTCC 5'-GCCACAATCTTGGCGACACAAGGCAATGTGTG	mutZF3
C216A-5' C216A-3'	5'-CCTTCTCTGCCCCTCACTGCAATAGGGCTTTTGC 5'-CAGTGAGGGGCAGAGAAAGGCTTTTCCCCAGTGTG	mutZF4
C244A-5' C244A-3'	5'-CCAGGCCAAAACTGCTCCAAAACCTTCTC 5'-GAGCAGTTTTTGGCCTGGTATTTCTTACATCAGAGTGGG	mutZF5
<b>2. Cebadores para mutantes de fosforilación</b>		
Rw S4A Fw S4A	5'-CCACCATGCCGCGCCTTCTCTGGTCAAGAAACATTTCAAC 5'-CAGGAAGGCGCGGGCATGGTGGCTGCGGGC	S4A
Rw S14A Fw S14A	5'-CAACGCCGCCAAGAAGCCCAACTACAGCGAAC 5'-GGCTTCTTGGCGGCGTTGAAATGTTTCTTGACCAGG	S14A
Rw S88A Fw S88A	5'-GCGTGTAGCTCCCCGCTTCTCTGACACTTCATCCAAGG 5'-GAAGGCGGGGGAGCTACACGCCCCAAGGATGAG	S88A
Rw S4D Fw S4D	5'-GCCGCGGACTTCTGGTCAAGAAACATTTCAACGCCTCC 5'-CCAGGAAGTCGCGCGGCATGGTGGCTGCGGGC	S4D
Rw S14D Fw S14D	5'-CAACGCCGACAAGAAGCCCAACTACAGCGAACTGG 5'-GGGCTTCTTGTTCGGCGTTGAAATGTTTCTTGACCAGG	S14D
Rw S88D Fw S88D	5'-CGTGTAGATCCCCGACTTCTCTGACACTTCATCCAAGG 5'-GGAAGTCGGGGGATCTACACGCCCCAAGGATGAGGAG	S88D
<b>3. Cebadores para mutantes de delección<sup>1</sup></b>		
DSNAG2-5' DSNAG2-3'	5'-GGCGGCGAATTCATGTTCAACGCCTCCAAGAAGCCCAACTACAGC 5'-GGGCGCCTCGAGGTGTGCCACACAGCAGCCAGACTCC	ΔSNAG2
DNt2-5' DSNAG2-3'	5'-GGCGAATTCATGTTGCTGAGAAGTTTCAAGTGC 5'-GGGCGCCTCGAGGTGTGCCACACAGCAGCCAGACTCC	ΔNt2
<b>4. Cebadores para la generación de vectores intermedios<sup>2</sup></b>		
EV+46 EV-46	5'-CCAAAACCAGATATCCTCACCTCGGGAGCATAACAGCCC 5'-GGTGAGGATATCTGGTFTTTGGTATGACAGGTATAGG	EV46
EV+65 EV-65	5'-GCAGCTGATATCCACTCTCCTTTACCCAGTGGCCTTTC 5'-GGAGAGTGGATATCAGCTGCCGACGATGTCCATACAG	EV65
EV+87 EV-87	5'-GGGCGTGATATCCCCCGCCCCTTCTCTGACACTTC 5'-GCGGGGGATATCACGCCCCAAGGATGAGGAGTATC	EV87
EV+123 EV-123	5'-CCCCATGATATCGAAGCTGAGAAGTTTCAAGTGC 5'-CTTCGATATCATGGGGGTCTGAAAGCTTGGGCTG	EV123

1. Se han incorporado unas secuencias de restricción para los enzima EcoRI (en el cebador directo) y XhoI (en el cebador reverso) (subrayado), así como un codón de inicio de la transcripción (letras en verde) en el cebador directo.

2. Se ha incorporado una secuencia de restricción para el enzima EcoRV, tanto en el cebador directo como en el reverso (subrayado)

Los nucleótidos mutados con respecto a la secuencia del cDNA de Snail2 murino se indican en negrilla.

**Tabla III: Vectores de expresión en eucariotas generados para esta memoria.**

Construcción	Mutación	Cebadores	Dianas 5'/3'	Tag	Mutagenesis <sup>1</sup>
<b>Mutantes de los dedos de zinc</b>					
pcDNA3-mutZF1-HA	C131A	C131A-5'/C131A-3'	EcoRI/XhoI	HA	m.d.
pcDNA3-mutZF2-HA	C162A	C162A-5'/C162A-3'	EcoRI/XhoI	HA	m.d.
pcDNA3-mutZF3-HA	C188A	C188A-5'/C188A-3'	EcoRI/XhoI	HA	m.d.
pcDNA3-mutZF4-HA	C216A	C216A-5'/C216A-3'	EcoRI/XhoI	HA	m.d.
pcDNA3-mutZF5-HA	C244A	C244A-5'/C244A-3'	EcoRI/XhoI	HA	m.d.
<b>Mutantes de fosforilación</b>					
pcDNA3-S4A-HA	S4A	S4A-5'/S4A-3'	EcoRI/XhoI	HA	m.d.
pcDNA3-S4D-HA	S4D	S4D-5'/S4D-3'	EcoRI/XhoI	HA	m.d.
pcDNA3-S14A-HA	S14A	S14A-5'/S14A-3'	EcoRI/XhoI	HA	m.d.
pcDNA3-S14D-HA	S14D	S14D-5'/S14D-3'	EcoRI/XhoI	HA	m.d.
pcDNA3-S88A-HA	S88A	S88A-5'/S88A-3'	EcoRI/XhoI	HA	m.d.
pcDNA3-S88D-HA	S88D	S88D-5'/S88D-3'	EcoRI/XhoI	HA	m.d.
<b>Mutantes de delección</b>					
pcDNA3-ΔSNAG2-HA	Δ1-13	ΔSNAG2-5'/ΔSNAG2-3'	EcoRI/XhoI	HA	PCR
pcDNA3-ΔNt2-HA	Δ1-125	ΔNt2-5'/ΔSNAG2-3'	EcoRI/XhoI	HA	PCR
pcDNA3-ΔCID-HA	Δ46-65	v.i.&	EcoRI/XhoI	HA	-
pcDNA3-Δ65-87-HA	Δ65-87	v.i	EcoRI/XhoI	HA	-
pcDNA3-ΔSLUG-HA	Δ87-123	v.i	EcoRI/XhoI	HA	-
Vector intermedio	Mutación	Cebadores	Fragmento <sup>2</sup>	Mutante de delección <sup>3</sup>	
pcDNA3-EV46	E46 D	EV46-5'/EV46-3'	5538 pb	}	pcDNA3-ΔCID-HA
pcDNA3-EV65	P65D	EV65-5'/EV65-3'	645 pb		
pcDNA3-EV87	P87D	EV87-5'/EV87-3'	5605 pb	}	pcDNA3-Δ65-87-HA
			489 pb		
pcDNA3-EV123	A123	EV123-5'/EV123-3'	5661 pb	}	pcDNA3-ΔSLUG-HA
			369 pb		

1. Técnica utilizada para la generación del vector mutante: m.d, mutagenesis dirigida; PCR, amplificación del fragmento por PCR y subclonaje en el vector pcDNA3-HA vacío.

2. Tamaño del fragmento utilizado para la ligación tras la digestión con EcoRV de los vectores intermedios, según esquema 1.

3. Mutante de delección generado por la ligación de los fragmentos indicados (2)

&. v.i: los mutantes se generaron por digestión y ligación de dos vectores intermedios según se indica a continuación (2 y 3)

## 2. Anticuerpos

Los diferentes anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta memoria, así como las técnicas específicas en las que se han empleado se describen en las Tablas IV y V.

## 3. Cultivos celulares.

### 3.1 Cultivo de líneas celulares establecidas:

Las líneas celulares empleadas en la presente memoria fueron las siguientes:

- La línea epitelial MDCK-II (“Madin Darby Canine Kidney”), derivada de epitelio simple de riñón de perro. (Comprado de la ATCC).
- La línea epiteloide HEK293T (“Human Embryonic Kidney”) derivada de epitelio renal embrionario humano, que ha sido inmortalizada con la proteína de adenovirus E1A y transformada con el antígeno T. (Proporcionado por el Dr. Santiago Ramón y Cajal, Hospital Valle de Hebrón, Barcelona).
- La línea NMuMG (“Normal Murine Mammary Gland”) derivada de epitelio mamario glandular de ratón. (Proporcionado por la Dra. M. Angela Nieto, Instituto de Neurociencias, UMH-CSIC, Alicante).

Las distintas líneas celulares se crecieron en medio DMEM (Gibco BRL), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, BRL), 2mM de L-Glutamina (Gibco BRL), 100 µg/ml de ampicilina, 32 µg/ml de gentamicina. Adicionalmente, la línea NMuMG fue crecida en presencia de insulina a 10µg/ml (Gibco,BRL). Todos los cultivos celulares se crecieron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de saturación de CO<sub>2</sub>.

### 3.2 Cultivo de fibroblastos para su utilización como células nodriza.

La selección de un clon de células 3T3 para su uso como células nodrizas se basa en su habilidad para a) formar una monocapa a una densidad de saturación manteniendo la inhibición por contacto, y b) sobrevivir al tratamiento con mitomicina C (8 µg/ml) sin perder la adhesión con la placa. Las células nodrizas utilizadas proceden del laboratorio de la Dra. Mirna Pérez-Moreno (CNIO-Madrid).

Las células nodrizas se crecen en medio F hasta confluencia y se tratan 2h con mitomicina C (8 µg/ml) para detener su crecimiento. Posteriormente, 24h antes de sembrar los queratinocitos se tripsinizan y plaquean a densidad de saturación (5x 10<sup>5</sup> células/ P60)

### 3.3 Aislamiento de queratinocitos primarios de ratones neonatos.

Los queratinocitos primarios se aislaron de ratones neonatos. Se extirpó la piel a los ratones y tras tratarla con tripsina 0,25% a 4 °C durante 16h, se separó la dermis de la epidermis. La epidermis se disgregó mecánicamente y filtró con un filtro para células de 40 µm de diámetro (BD Falcon) para recuperar los queratinocitos de la epidermis. Los queratinocitos obtenidos se resuspendieron en medio de congelación (75% Suero Fetal Bovino descomplementado, 10% DMSO, 15% EMEM con 0,75 gr /ml Glucosa) para su crio-preservación. Los queratinocitos se aislaron de forma independiente para cada ratón, y se determinó su genotipo (según el apartado 7) a partir de una muestra de la cola obtenida previamente.

### 3.3.1 Ensayos de clonogenicidad de queratinocitos primarios.

Se sembraron  $2,5-5 \times 10^4$  queratinocitos primarios en placas MW6 (Falcon), previamente recubiertas con células nodriza NIH3T3, en medio E de crecimiento para queratinocitos con una concentración de 0,3 mM de  $\text{NaCl}_2$  (DMEM:F12 (3:1), 3,7g/L bicarbonato sódico, 0,475 g/L L-glutamina, 15% FBS quelado con CHELEX (Bio-Rad) suplementado con hidrocortisona, toxina colérica, transferrina, insulina, tironina, 0,3mM  $\text{CaCl}_2$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina, 32  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina, pH 7,2). Los queratinocitos se mantuvieron en cultivo durante 10 días hasta la formación de colonias, que se contaron y clasificaron por tamaño y morfología.

### 3.3.2. Cultivo de queratinocitos primarios.

Los queratinocitos primarios se crecieron en el medio E de crecimiento para queratinocitos descrito anteriormente con una concentración baja en calcio (0,05 mM  $\text{CaCl}_2$ ), sobre células nodriza NIH3T3.

El laboratorio de la Dra. Mirna Perez-Moreno (CNIO-Madrid) colaboró en la realización de estos experimentos.

## 4. Transfecciones transitorias.

Todas las transfecciones se realizaron con el reactivo Lipofectamina (Invitrogene) siguiendo las indicaciones del fabricante, con las siguientes consideraciones:

- Para los ensayos de actividad del promotor se sembraron  $2 \times 10^4$  células (MDCK-II) ó  $2,5 \times 10^4$  células (HEK293T) por pocillo en placas MW24 (Falcon) tal como se ha descrito recientemente (Moreno-Bueno et al., 2009). Tras 18 horas se transfectaron con 200 ng/pocillo del vector testigo que contiene el promotor de *cadherina-E* (murino o humano) fusionado al gen testigo de la luciferasa, 10 ng/pocillo del vector testigo pCMV- $\beta$ Gal utilizado como control de eficiencia de transfección y los vectores de expresión del factor de transcripción y/o HDACs y/o co-represores indicados (la concentración utilizada de tales vectores se especifica en cada figura, y oscila entre 50-300 ng/pocillo).
- Para los ensayos de co-inmunoprecipitación se sembraron  $5 \times 10^5$  células HEK293T en placas P60 (Falcon). Tras 18 h se transfectaron con 3  $\mu\text{g}$  de cada uno de los vectores indicados en cada ensayo
- Para los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se sembraron  $1 \times 10^6$  células HEK293T o NMuMG en placas P100 (Falcon), tras 18 horas se transfectaron con 15  $\mu\text{g}$  de pcDNA3-Snail2-HA, pcDNA3-mutZF2-HA o pcDNA3-mutZF5-HA.
- Para los ensayos de localización subcelular, se sembraron  $3,5 \times 10^5$  células MDCK-II en placas P60 con cristales de 12 mm de diámetro. Tras 18 horas de incubación se transfectaron con 3  $\mu\text{g}$  de los plásmidos indicados para cada ensayo.



**5. Ensayos de actividad promotora.**

Los ensayos de actividad promotora se han realizado según se ha descrito (Moreno-Bueno et al., 2009). La actividad de los promotores de *cadherina-E* murino y humano se determinó en las células MDCK-II o HEK293T transfectadas transitoriamente (según se indica en el apartado 4). 18 h después de la transfección, las células se lavaron con PBS 1x y se lisaron durante 15 min a temperatura ambiente (t.a.) con tampón de lisis pasivo (Promega). Las actividades luciferasa y β-galactosidasa de los extractos resultantes se determinaron con el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay* (Promega) utilizando un luminómetro Lumat LB9507 (Berthold Technologies). La actividad relativa luciferasa/β-galactosidasa se normalizó con respecto a la actividad detectada en las células control transfectadas con el vector vacío (pcDNA3-HA). Todos los ensayos se realizaron al menos dos veces y cada condición experimental se analizó por triplicado.

**6. Análisis de proteínas**

6.1 Inmunofluorescencia de células en cultivo.

Las células MDCK-II fueron crecidas hasta un 60% - 70% de confluencia en cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro incluidos en placas de cultivo P60 (Falcon). Tras su adhesión al sustrato se transfectaron transitoriamente según se indica en el apartado 4 24 h después las células se fijaron en formaldehído al 3.7% durante 20 min a t.a. y posteriormente se permeabilizaron con 0.05% de Triton X-100 en solución de bloqueo (2% BSA en PBS) durante 15 min a t.a. Tras dos lavados con PBS, la unión inespecífica del anticuerpo se bloqueó con solución de bloqueo, las células se incubaron dentro de una cámara húmeda durante 1 h en contacto con los anticuerpos primarios (diluidos según se indica en la Tabla IV en solución de bloqueo). Después de 2-3 lavados en PBS, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes adecuados. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti

**Tabla IV: Anticuerpo primarios y secundarios utilizados en la primera parte de la tesis**

Anticuerpo	Especie	Dilución WB/IF/IP/ChIP	Procedencia
<b>Anticuerpos primarios:</b>			
Anti-HA (mAb)	Rata	1:100/1:50/10 µg/20 µg	Roche
Anti-Flag (mAb)	Ratón	1:3000/1:1000/NA/NA	Sigma
Anti-Myc (pAb)	Conejo	1:1000/1:500/NA/NA	Sigma
<b>Anticuerpos secundarios</b>			
Anti-Rata-HRP (pAb)	Cabra	1:10000 WB	Nordic
Anti-Ratón-HRP (pAb)	Oveja	1:1000 WB	Amersham
Anti-Conejo-HRP (pAb)	Cabra	1:4000 WB	Nordic
Alexa α-Rata-488 (pAb)	Cabra	1:800 IF	Molecular probes
Alexa α-Ratón-555 (pAb)	Cabra	1:800 IF	Molecular probes
Alexa α-Conejo-555 (pAb)	Cabra	1:800 IF	Molecular probes

WB, Western blot; IF, Inmunofluorescencia; IP, Inmunoprecipitación; ChIP, inmunoprecipitación de cromatina; mAb, anticuerpo monoclonal; pAb, anticuerpo policlonal.

IgGs de rata, ratón o conejo generados en cabra y acopados a los fluorocromos Alexa-488 y Alexa-555 (Tabla IV). Posteriormente, el núcleo celular se tiñó con 4,6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes) 10 min a t.a. Finalmente, las preparaciones se montaron sobre portaobjetos usando Mowiol (Sigma-Aldrich). La tinción fluorescente se examinó usando un microscopio Zeiss Axiophot equipado con epifluorescencia acoplado a una cámara digital CCD Olympus DP70. Para el análisis mediante microscopía confocal se utilizó un microscopio confocal ultra-espectral (TCS-SP-2-AOBS-UV, Leica). El análisis y procesamiento de las imágenes capturadas se llevó a cabo utilizando los paquetes informáticos ImageJ y Adobe PhotoShop CS2.

**Tabla V: Anticuerpo primarios y secundarios utilizados en la segunda parte de la tesis**

Marcador	Clon/Especie	Procedencia	Dilución IF/IHQ	Fijación (IF)	Desenmascaramiento (IHQ) <sup>a</sup>
Anticuerpos primarios:					
Cadherina-E	ECCD-2 / rMab	M. Takeichi	1:200/1:100	Met/Ac	Citrato, 10 min OP
Ciclina D1	Dxc-6 / mMab	DAKO	NA/1:200	NA	Citrato, 10 min OP
Citoqueratina 5	- /Conejo	Covance	NA/1:200	NA	Citrato, 10 min OP
Citoqueratina 8	- / Ratón	Progen	NA/1:100	NA	Citrato, 10 min OP
Citoqueratina 10	- /Guinea pig	Progen	1:100/1:100	Met/Ac	Citrato, 10 min OP
Citoqueratina 13	AE8 / mMab	Progen	NA/1:100	NA	Citrato, 10 min OP
Citoqueratina 15	- / Guinea pig	Progen	NA/1:100	NA	Citrato, 10 min OP
IκB-P	5A5 / mMab	Cell signalling	NA/1:50	NA	EDTA, 3 min OP
Ki67	Mib-1 / mMab	DAKO	NA/1:50	NA	EDTA, 3 min OP
Loricrina	- / Conejo	Covance	1:250/1:200	Met/Ac	Citrato, 10 min OP
Involucrina	SY5/mMab	Novocastra	1:250/ NA	Met/Ac	NA
NFκB	F-6 / mMab	Santa Cruz	NA/1:350	NA	Citrato, 10 min OP
P27	57 / mMab	BD Biosciences	NA/1:1000	NA	Citrato, 10 min OP
P53	DO-1 / mMab	Santa Cruz	NA/1:50	NA	EDTA, 3 min OP
P63	4A4 / mMab	Dako	1:25	NA	Citrato, 10 min OP
Snail2	- / Conejo	Abcam	NA/1:100	NA	EDTA, 3 min OP
Snail1	H33 / mMab	Virtanen <sup>b</sup>	NA/1:50	NA	EDTA, 15 min OP
Anticuerpos secundarios:					
anti- Cobaya-HRP	- / Conejo	Progen	NA/1:200	NA	NA
anti- Rata-Biotinilado	- /Conejo	Dako	1:800/NA	NA	NA
anti- Conejo/Ratón	kit LSAB	Dako	-	NA	NA
Alexa-488		Molecular probes	1:800/NA	NA	NA
Alexa-555		Molecular probes	1:800/NA	NA	NA

IF, Inmunofluorescencia en tejido; IHQ, Inmunohistoquímica en secciones parafinadas; NA, no aplicado; OP, Olla a presión; <sup>a</sup> Citrato: tampón citrato; EDTA, tampón EDTA a 1 atmósfera en olla a presión. r: rata; m: ratón; Mab: anticuerpo monoclonal.

### 6.2. Ensayos de co-inmunoprecipitación.

Las células HEK293T se transfectaron según se indica en el apartado 4, transcurridas 36 h las células se lavaron con PBS y se lisaron en tampón de inmunoprecipitación IPH (50mM Tris-HCl, pH 8,0; 150mM NaCl; 5mM EDTA; 0,5% NP-40), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (2mM PMSF, 2 µg/ml leupeptina, 2 µg/ml aprotinina), en hielo durante 30 min. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 17.000 g para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes se pre-absorbieron con proteína A/G-sepharosa (Sigma-Aldrich) (20 µl /600-800 µg de proteína) con el fin de eliminar los residuos proteicos que puedan interactuar inespecíficamente con la proteína sepharosa. La inmunoprecipitación se realizó incubando el lisado pre-aclarado con 1 µg de anti-HA con agitación orbital a 4°C durante toda la noche. A continuación, se incubaron con 40 µl de proteína A/G- Sepharosa (Sigma-Aldrich) en agitación orbital a 4°C durante 2 horas. Tras cuatro lavados con tampón IPH, el inmunoprecipitado se centrifugó a 9.600 g durante 10 min. El inmunoprecipitado se resuspendió en tampón Laemmli 1X. Para la co-inmunoprecipitación de proteínas con un peso molecular aproximado de 35 KDa se utilizó tampón de carga no reductor (2% SDS, 0,002% azul de bromofenol, 10% glicerol, 0,125 M Tris-HCl) con 10 mM de iodoacetamida para evitar la interferencia con las cadenas ligeras de las IgGs durante el Western blot. Los inmunoprecipitados se analizaron por electroforesis, e inmunotransferencia según se indica en el apartado 6.3.

### 6.3. Electroforesis e inmunotransferencia (Western blot)

Los inmunoprecipitados se cargaron en geles de SDS-PAGE al 6%-12% de acrilamida. Los polipéptidos se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Immobilon-P (Millipore) utilizando tampón de transferencia (Metanol 20%, Tris-glicina 1x) durante 1h a 300 mA. La unión no específica del anticuerpo se bloqueó con PBS-Tween (0.01%) y 5% BSA. Las membranas se incubaron con anticuerpo primario a la dilución adecuada (ver Tabla IV) durante 1h a t.a. o toda la noche a 4°C. Tras varios lavados con abundante PBS-Tween, se incubaron con anticuerpo secundario apropiado anti-IgGs de ratón/conejo/rata conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) a la dilución adecuada (ver Tabla IV), durante 45 min. Posteriormente las membranas se lavaron con PBS-Tween y las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia, usando el kit de detección *ECL chemiluminescence detection kit* (Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos, la imagen mostrada corresponde a un experimento representativo de al menos dos realizados.

### 6.4. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina.

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizaron según se ha descrito previamente (Aparicio et al., 2004, Peinado et al., 2004c). Las proteínas se entrecruzaron al DNA incubando las placas con 10 mM dimetiladipimidato (DMA), 0,25% DMSO durante 45 min a t.a. y se fijaron con 1% formaldehído durante 15 min a t.a. A continuación, las células se lisaron en tampón de lisis SDS (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH8) y se sonicaron en inmersión (en 4 ciclos de 15 min en régimen de 30 seg a potencia máxima seguido de 30 seg apagado) con el fin de romper el DNA en fragmentos de 200-1000 pb. Los lisados sonicados se incubaron con 10 µg del anticuerpo anti-HA o con anti-IgG de rata utilizado como control negativo. La cromatina unida al anticuerpo se precipitó con proteína G-agarosa bloqueada con DNA de esperma de salmón (Promega). La fracción inmunoprecipitada se recogió y se lavó varias veces para posteriormente separar el DNA del anticuerpo mediante incubación con 200 mM NaCl a 65°C durante 18 h. El DNA inmunoprecipitado se purificó con

el kit “*PCR purification*” (Quiagen). Para la amplificación por PCR del promotor endógeno de *cadherina-E* (humano y/o murino) se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: para el promotor de *cadherina-E* murino: Fw-cdh1 5'-AGTCCTTTGTAAGTCCATG-3' y Rw-cdh1 5'-AGACGCCGAGCAAA-CACTG-3'; y para el promotor de *cadherina-E* humano: Fw-CDH1 5'-TCCTTTGTAAGTCCATGTCTCCCGT-3' y Rw-CDH1 5'-CGGGCAGGAGTCTAGC-AGAAG-3'. Para cada promotor la sensibilidad de la amplificación por PCR se evaluó en diluciones seriadas del DNA total obtenido después de la sonicación (DNA de partida o “*input fraction*”). Los productos amplificados de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con SyberSafe (Invitrogen). En cada gel se incluyó el DNA de partida y la fracciones inmunoprecipitadas con los anticuerpos anti-HA e IgG (como control negativo).

### 6.5. Ensayos de fosforilación *in vitro*.

Los ensayos de fosforilación *in vitro* se realizaron incubando 1 µg de la proteína de fusión GST-Snail2 o GST sola con 10 U de la quinasa indicada, en el tampón suministrado por el fabricante, suplementado con 100 µM ATP y 1 µCi [<sup>32</sup>P]-ATP. La reacción se incubó 30 min a 30°C y se detuvo añadiendo tampón Laemmli 2x. Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en geles 10% SDS-PAGE y transferencia a membrana de nitrocelulosa, como se indica en el apartado 6.3. La holoenzima recombinante humana caseína quinasa 2 (CK2) y la subunidad catalítica de la proteína quinasa C (PKC) humana se obtuvieron de Calbiochem y Sigma-Aldrich, respectivamente. La proteína de fusión GST-Snail2 se obtuvo como se ha descrito previamente (Bolos V., 2003). La proteína GST-ΔSLUG se obtuvo mediante PCR (ver Tabla III) y subclonaje en el vector pGEX, en fase con la proteína GST.

### 6.6. Ensayos de fosforilación *in vivo*.

Las células se crecieron en P35 y se transfectaron con pcDNA3-Snail2-HA o con pcDNA3-ΔSLUG-HA, según el apartado 4. Después de 24-36 h, las células se lavaron tres veces con DMEM libre de fosfato, suplementado con 10% FCS. A continuación, las células se incubaron en el mismo medio con 1 mCi/ml de [<sup>32</sup>P]-ortofosfato (Amersham) durante 4 h. Las células se lisaron a 4°C en tampón RIPA (0,1% SDS, 0,5% deoxicolato, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) suplementado con inhibidores de proteasas (2 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 1mM PMSF) e inhibidores de fosfatasa (1 mM ortovanadato sódico, 10 mM fluoruro sódico). El lisado se centrifugó a 14.000 g durante 15 min y el sobrenadante se incubó durante 16 h a 4°C con 1 µg de anticuerpo anti-HA y 25 µl de proteína G-Sepharosa (Amersham). Los inmunoprecipitados se recogieron y lavaron cuatro veces con tampón RIPA a 4°C. Las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron en geles 12% SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (según el apartado 6.4) antes de exponerlas toda la noche a películas X-ray para detectar las proteínas marcadas radiactivamente mediante autoradiografía..

### 6.7. Análisis de mapas de fosfopéptidos.

El mapa de fosfopéptidos se elaboró según se ha descrito previamente (Boyle et al. 1991, MacPherson et al., 2009, Van Der Geer and Hunter, 1994). Las bandas de Snail2 fosforilado se excindieron de la membrana y bloquearon durante 30 min con 0.5% polivinilpirrolidón K30 (Sigma-Aldrich), 0.6% ácido acético a 37°C. Después de varios lavados con agua destilada, las bandas se incubaron 16 h a 37°C en 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8.0 con 1 µg de tripsina de grado (Promega). La solución con los péptidos eluidos se transfirió a un tubo limpio y, tras medir la radiactividad, estos se congelaron y secaron al vacío. Posteriormente, se oxidaron con ácido per fórmico durante 1h a 4°C en oscuridad. El análisis

se realizó mediante electroforesis cromatográfica en placas de TLC de 20x20 cm (TLC plate cellulose pre-coated-without fluorescent indicator- grosor de la placa 0,1 mm, Merck), tal como se ha descrito previamente (MacPherson et al., 2009). La electroforesis se realizó con un aparato de electroforesis de alto voltaje HTLE-700 (CBS Scientific) durante 30 min a 2000V. Posteriormente, se secó la placa durante al menos 6 h antes de realizar la cromatografía. La separación de los péptidos por cromatografía se llevó a cabo durante 14-16 h en solución de ácido isobutírico (62.5% ácido isobutírico, 3% ácido acético, 2% n-butanol, 5% piridina). Después de secar durante al menos 6 h, las placas se expusieron en una pantalla phosphorimaging (Fujifilm). Los resultados se observaron utilizando una cámara Typhoon (GE Healthcare) y el programa informático Adobe PhotoShop versión 7.0.

6.8. Degradación de Edmann.

Los fosfopéptidos se eluyeron de la placa de celulosa en tampón de electroforesis pH1.9 y se liofilizaron. Las fracciones se sometieron a protocolo de degradación automática de Edman (Edman, P., 1950). Para la degradación de Edmann, los fosfopéptidos (40-500 c.p.m.) se unieron a membranas Sequelon-AA (Millipore) según las instrucciones del fabricante, y se secuenciaron en un secuenciador (Applied Biosystems Gas Phase Sequencer Model 470A). Los aminoácidos de feniltiohidantoina liberados en cada ciclo se aplicaron en distintos puntos en placas de cromatografía en capa fina. La radiactividad de cada punto se cuantificó mediante la exposición con una pantalla PhosphorImager FLA (Fuji).

**7. Genotipado de los ratones para Snail2.**

Los ratones heterocigotos de Snail2 (Snail2 +/-) fueron cedidos por el Dr. Tomas Gridley (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA). Los ratones se mantuvieron en régimen de cruces rotacional entre heterocigotos, con el fin de evitar la consanguinidad entre camadas. En todos los ensayos se han utilizado ratones Snail2 +/+, Snail2 +/- y Snail2 -/-, hermanos de camada.

Para el genotipado del alelo *Snail2* se extrajo DNA genómico de la cola de ratones de 28 días con el reactivo REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich), según las indicaciones del fabricante. Se determinó la presencia o no de los alelos Snail2, LacZ y Neo mediante PCR semicuantitativa de 1 µl de DNA extraído. Las condiciones de la PCR fueron: 35 ciclos de amplificación de 1min. a 94°C; 1 min. a 60°C; 1 min. 30 segundos a 72°C. Los oligonucleótidos utilizados se indican en la siguiente Tabla VI.

**Tabla VI. Secuencia de oligonucleótidos para el genotipado de los ratones**

<b>Alelo</b>	<b>Oligonucleótidos</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño</b>
<b>Snail2</b>	Snail2 5'	5' - AGAACGGAAGCTGTTTGGCTG-3'	≈ 450 pb
	Snail2 3'	5' - CTATTTGGTTGGTAAGCACATGAG-3'	
<b>Neo</b>	Snail2 5'	5' - AGAACGGAAGCTGTTTGGCTG-3'	≈ 1 kb
	Neo	5' - TTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTAT-3'	
<b>LacZ</b>	Snail2 5'	5' - AGAACGGAAGCTGTTTGGCTG-3'	≈ 400 pb
	LacZ	5' - TCGCCTTCTATCGCCTTCTTG-3'	

### 8. Anestesiado de ratones.

Los ratones se anestesiaron mediante la administración intraperitoneal de 100 µl de clorhidrato de queetamina (Imalgene 500, Nerial Lab. S.A) en combinación con 10 µl de clorhidrato de medetomidina (Dormitol, Pfizer S.A). Tras la manipulación, los ratones fueron despertados de la anestesia mediante inyección subcutánea de 100 µl de alipamezol, antagonista del clorhidrato de medetomidina (Antisedan, Pfizer S.A).

### 9. Carcinogénesis química de piel de ratón mediante tratamiento con DMBA/TPA

Para el estudio de la carcinogénesis química por DMBA/TPA, se indujeron tumores en la piel dorsal de ratones de 6-8 semanas de edad, afeitados el día antes del inicio del tratamiento, mediante la aplicación de una dosis única de 200 µl de DMBA (9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene; Sigma-Aldrich) de una dilución a 160 µg/ml de acetona, seguida de dos dosis semanales de 200 µl de TPA (Forbol 12-miristato 13-acetato; Sigma-Aldrich) de una dilución a 62,5 µg/ml de acetona durante 16 semanas. El número y tamaño de los tumores fué medido semanalmente. La duración total del tratamiento y la observación de los ratones se especifica en cada experimento. Na vez concluido el tratamiento se realizaron las necropsias recogiendo las muestras tisulares de interés. El procesamiento de las mismas se detalla en el apartado 13.

#### 9.1 Tratamiento con dexametasona.

Tras la inducción de lesiones mediante DMBA/TPA, los ratones Snail2 +/+, Snail2 +/- y Snail2 -/- se sometieron al tratamiento con dexametasona tras la aparición de las primeras lesiones. Para el tratamiento, se inyectaron diariamente 0,05 mg/Kg de ratón de Dexametasona (Sigma-Aldrich) vía intraperitoneal, y el tratamiento se prolongó hasta el sacrificio de los ratones. Una vez concluido el tratamiento se realizaron las necropsias recogiendo las muestras tisulares de interés. El procesamiento de las mismas se detalla en el apartado 13.

### 10. Inducción de fibrosarcomas por inyección de metilcolantreno

Para la inducción de fibrosarcomas se inyectaron subcutáneamente con 100 µg de MCA (3-metilcolantreno; Sigma-Aldrich) en 100 µl de trioleil glicerol en ambos flancos de los ratones. Tras la inyección, se valoró la aparición y tamaño de las lesiones dos veces por semana, considerando positivas aquellas lesiones que alcanzasen 5 mm y tuviesen un crecimiento progresivo. Los ratones se sacrificaron cuando las lesiones alcanzaron un diámetro  $\geq 2$  cm. Una vez concluido el tratamiento se realizaron las necropsias, recogiendo las muestras tisulares de interés. El procesamiento de las mismas se detalla en el apartado 13.

### 11. Tratamiento con TPA.

Ratones de 6 a 8 semanas de edad, afeitados el día anterior al inicio del protocolo, se trataron tópicamente con 200 µl de TPA (forbol 12-miristato 13-acetato; Sigma-Aldrich) diluido a 62,5 µg/ml en acetona. El tratamiento se llevó a cabo durante una semana, administrándose el fármaco cada 48 h hasta



un máximo de tres aplicaciones. Una vez concluido el experimento, los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron biopsias de piel que se procesaron según se indica en el apartado 13.

### 12. Ensayos de cicatrización de heridas.

Se rasuró el dorso de los ratones y tras anestesiarlos (según el apartado 8) se realizaron 2 heridas transcutáneas de 6 mm de diámetro, utilizando un punteador de biopsias (Pfiel). Se tomaron imágenes diarias de las heridas mediante el dibujo sobre papel parafilm del borde de las mismas, hasta el cierre completo de las heridas. Para determinar el área de la herida se procesaron las distintas imágenes utilizando el programa informático PhotoShop CS2. A lo largo del experimento, se sacrificaron los animales a distintos tiempos para recoger muestras de las heridas que se procesaron según se indica en el apartado 13.

### 13. Procesamiento de las muestras obtenidas en las necrópsias.

Las lesiones y vísceras de los ensayos *in vivo* se fijaron en 3,7 % de formaldehído o se congelaron con nitrógeno líquido para su posterior procesamiento, según se ha descrito previamente (Moreno-Bueno et al., 2009), siguiendo los protocolos siguientes:

#### 13.1. Generación de bloques de OCT.

Se generaron bloques de OCT (“Optimal Cutting temperature” medium, Takara) a partir de muestras congeladas. Las muestras extraídas de ratones se incluyeron y orientaron en un soporte tipo Tissue Teck (Dako), que se rellenó con OCT previamente refrigerado. Todo el proceso se realizó en frío sobre nieve carbónica para evitar la descongelación de las muestras. Una vez obtenidos los bloques se cortaron secciones de 10  $\mu\text{m}$  con un criostato (Reichert-Jung *Cryocut 1900*, Leica Int.) y se depositaron sobre portaobjetos (Dako) para su posterior análisis.

#### 13.2. Generación de bloques de Parafina.

Se generaron bloques de parafina a partir de muestras fijadas con formaldehído al 3,7% durante 24 h. Posteriormente, las muestras se deshidrataron en baños progresivos de 30 min en etanol al 25%, 50%, 75%, 80% y 100%, y finalmente se incubaron en xilol (Merck) 24 h. Para la obtención de los bloques de parafina, las muestras deshidratadas previamente se incluyeron en un baño de xilol:parafina (1:1) a 55°C durante 16 horas, a continuación se embebieron en soportes metálicos rellenos con parafina (DC Panreac) a 55°C, y el bloque se dejó enfriar hasta su solidificación. Una vez obtenidos los bloques se cortaron secciones de 5  $\mu\text{m}$  con un microtomo (Microtomo Rotatorio Tipo Minot, Leica) que se depositaron en portaobjetos (DAKO) para su posterior análisis.

#### 13.3. Micromatriz tisular (TMA).

Las matrices de tejido (TMA, “tissue microarrays”) se construyeron para poder realizar estudios inmunohistoquímicos de las muestras parafinadas obtenidas de los ensayos de carcinogénesis química de piel de ratón, siguiendo esencialmente el método establecido (Kononen, 1998). Para ello, tras la evaluación histológica de cada bloque de parafina, mediante tinción de hematoxilina-eosina (H&E), se seleccionaron al menos dos áreas representativas de cada lesión, y se extrajeron pequeños cilindros de tejido de 3 mm de

diámetro que se depositan en un nuevo bloque de parafina. El bloque resultante (*microarray*) es una matriz con un número total de 36 muestras correspondientes a 24 papilomas (6 Snail2 +/+ y 18 Snail2 -/-), 4 SCC (1 Snail2 +/+ y 3 Snail2 -/-), y un control de piel Snail2 +/+, todas ellas por duplicado. Las muestras se encuentran separadas entre sí por 0,8 mm de distancia. El TMA resultante se cortó en secciones de 5 µm depositadas en portaobjetos (Dako) para su posterior análisis inmunohistoquímico.

El laboratorio del Dr. José Palacios (Unidad de Anatomía Patológica. Hospital Virgen del Rocío. Sevilla) colaboró en la elaboración de los TMAs.

### 14. Tinción con Hematoxilina/Eosina (H&E).

Las secciones de bloques de parafina se desparafinaron con xilol y se rehidrataron con baños sucesivos de etanol al 75%, 50%, 25% y H<sub>2</sub>O. Las secciones de bloques de OCT se fijaron en acetona (Sigma-Aldrich) a -20°C durante 30 min y se lavaron con PBS. Ambos tipos de muestras se tiñeron con hematoxilina (DC Panreac) 10 min a t.a.; el exceso de tinción se eliminó con agua destilada, y a continuación se llevó a cabo una contratinción con eosina durante 1,5 a 3 min a t.a. Finalmente, las muestras se deshidrataron en baños progresivos de 10 min en etanol al 25%, 50%, 75% y xilol, y se montaron con medio DEPEX (Dako).

### 15. Inmunodetección en tejidos.

#### 15.1. Inmunohistoquímica.

Los cortes de tejido se desparafinaron con xilol (20 min), se rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 95%, 70%) y finalmente en agua destilada. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de desenmascaramiento del antígeno inducido por calor (en olla a presión a 120°C) sumergiendo los cortes en tampón Tris-EDTA (10 mM Tris Base, 1 mM EDTA pH 9.0) o en tampón citrato (10 mM citrato sódico, pH 6.5), según se indica en la Tabla V. A continuación se inactivó la peroxidasa endógena del tejido con solución de bloqueo para dicha enzima (Dako) y se incubó con el anticuerpo primario a la dilución adecuada (ver Tabla V) durante 40 min. La detección del anticuerpo primario se realizó mediante la actividad enzimática de la peroxidasa de rábano acoplada a los anticuerpos secundarios utilizando los métodos inmunohistoquímicos de tinción LSAB o EnVision (Dako Cytomation), según se ha descrito (Moreno-Buenos et al., 2009) y siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Para los controles negativos se omitieron los anticuerpos primarios.

La inmunohistoquímica fue evaluada al menos por dos patólogos y el nivel de expresión se estimó semicuantitativamente utilizando un sistema de puntuación compuesto, que incluía la intensidad de la tinción (ausente, reducida o débil, normal, o fuerte comparado con la de las células epiteliales de la piel normales adyacente) y la abundancia relativa de células inmunopositivas.

Los cortes de tejido en bloques de OCT se fijaron en 3,7% de paraformaldéhidro (PFA) a pH 7,4 y se trataron según el protocolo de inmunohistoquímica, a partir de la inactivación de la peroxidasa.

#### 15.2. Inmunofluorescencia

Los cortes de tejido de muestras congeladas se fijaron con 4% de PFA a pH 7.4 durante 20 min a



t.a. y posteriormente se permeabilizaron con 0.05% de Triton X-100 durante 15 min a t.a. Tras dos lavados con PBS, la unión inespecífica del anticuerpo se bloqueó con solución de bloqueo (2% BSA en PBS), se incubó dentro de una cámara húmeda durante 1 h en contacto con los anticuerpos primarios (diluidos en solución de bloqueo según se indica en la Tabla V). Después de dos o tres lavados en PBS, se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes adecuados. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: Anti IgGs de ratón o conejo generados en cabra y acopados a los fluorocromos Alexa-488 y Alexa-555 (diluidos en solución de bloqueo según se indica en la Tabla V). Posteriormente, los núcleos se tiñeron con 4,6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes) 10 min a t.a. Finalmente, las preparaciones se montaron sobre portaobjetos usando Mowiol (Sigma-Aldrich). La tinción fluorescente se examinó usando un microscopio Zeiss Axiophot equipado con epifluorescencia acoplado a una cámara digital CCD Olympus DP70. El análisis y procesamiento de las imágenes capturadas se llevó a cabo utilizando los paquetes informáticos ImageJ y Adobe PhotoShop CS2.

### **16. Detección de células apoptóticas en secciones de tejido.**

Secciones de 10  $\mu\text{m}$  obtenidas a partir de bloques de OCT se fijaron con 4% PFA a pH 7,4 durante 20 min. a t.a. Posteriormente, se lavaron con PBS durante 30 min y se permeabilizaron con 0,1% citrato sódico, 0,1% Tritón X-100 a 4°C durante 2 min. Las muestras se marcan con el Kit “*In situ cell death detection*” (Roche), según las indicaciones del fabricante. La tinción fluorescente se examinó usando un microscopio Zeiss Axiophot equipado con epifluorescencia acoplado a una cámara digital CCD Olympus DP70. El análisis y procesamiento de las imágenes capturadas se llevó a cabo utilizando los paquetes informáticos ImageJ y Adobe PhotoShop CS2. El número de células apoptóticas se determinó semicuantitativamente mediante el conteo de núcleos marcados en tres campos diferentes de la misma muestra en, al menos, cinco muestras independientes.

### **17. Aislamiento de folículos pilosos de cola de ratón.**

Tras el sacrificio del ratón por inhalación de  $\text{CO}_2$  se cortó la cola por la base. Mediante una incisión longitudinal con bisturí, a continuación se separó la piel de la cola del músculo y los huesos. La piel se lavó con PBS y se incubó en PBS, 5mM EDTA durante 4 h a 37°C. Posteriormente, se separó la dermis de la epidermis (junto con los folículos pilosos) con cuidado para no romper los folículos pilosos. Finalmente, la epidermis se fijó con 4% PFA a pH 7,4 durante 30 min.

### **18. Detección de la actividad $\beta$ -galactosidasa en tejidos.**

Las muestras de folículos pilosos, piel o lesiones tumorales congeladas en OCT se fijaron con 1% PFA pH 7,4, 0.2% glutaraldéhidido y 0,02% NP-40, durante 1h a 4°C. Tras dos lavados de 20 min con PBS/0,02% NP-40 se procedió a su incubación con solución de marcaje (5mM  $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$ , 5 mM  $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$ , 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,02% NP-40 y 1 mg/ml de X-gal (bromo-cloro-indolil-galactopiranoside) durante 24 horas a t.a. La tinción se examinó en campo claro usando un microscopio Olympus acoplado a una cámara digital CCD Olympus DP70. El análisis y procesamiento de las imágenes capturadas se llevó a cabo utilizando los paquetes informáticos ImageJ y Adobe PhotoShop CS2. El número de células

## MATERIALES Y MÉTODOS

o folículos pilosos  $\beta$ -galactosidasa positivos se determinó semicuantitativamente mediante el conteo de núcleos o folículos pilosos, respectivamente, presentes en tres campos diferentes de la misma muestra y en, al menos, tres muestras independientes.

## **RESULTADOS**





## PARTE 1. CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LOS DOMINIOS DE SNAIL2.

- Con el fin de caracterizar funcionalmente los diferentes dominios del factor de transcripción Snail2 se generó una amplia colección de mutantes puntuales y de delección (Figura 9) que abarcaban:

a) Mutaciones puntuales en cada uno de los 5 dedos de zinc (ZF1-ZF5) que destruyen la estructura terciaria de cada uno de ellos con el fin de analizar su implicación en la funcionalidad de Snail2.

b) Mutaciones de delección del dominio funcional ya descrito (SNAG), así como delecciones en el dominio SLUG y en extremo N-terminal, a fin de identificar la presencia de posibles regiones reguladoras.

c) Mutaciones puntuales en los residuos de serina 4, 14 y 88 (serina → alanina y serina → aspartico) identificadas mediante el análisis *in silico* y fosforilación *in vivo* de los potenciales sitios de fosforilación de Snail2.

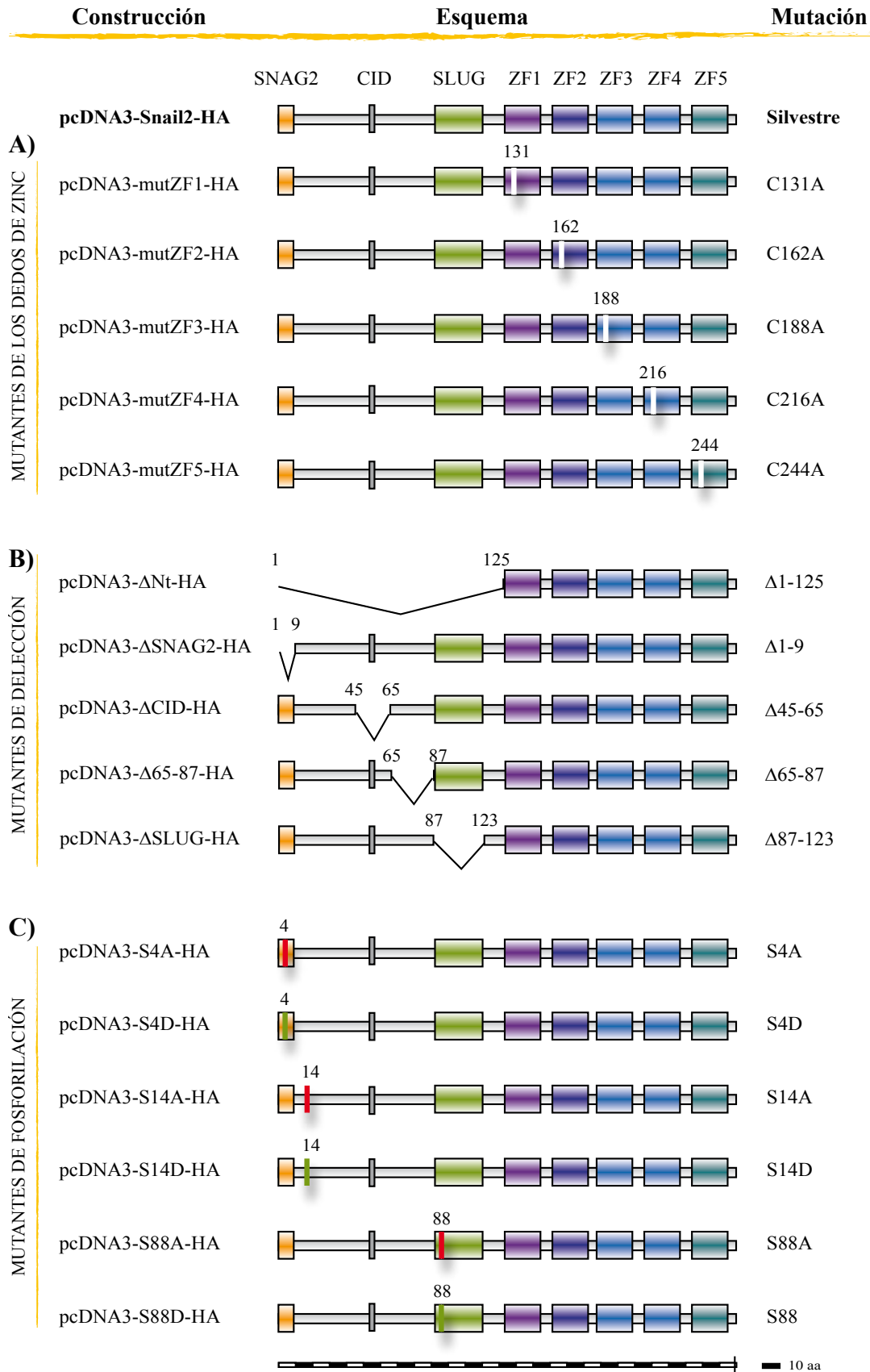
### 1.1. Caracterización funcional de los dedos de zinc de Snail2.

El dominio de unión al DNA de los factores Snail es el responsable de la unión a secuencias específicas del promotor de *cadherina-E* (cajas-E). En el caso de Snail2 el dominio de unión al DNA está localizado en el extremo C-terminal y contiene cinco dedos de zinc (ZF). La caracterización funcional de los distintos dedos de zinc de Snail2 se llevó a cabo mediante ensayos de actividad promotora sobre el promotor de *cadherina-E* murino, en células MDCK-II. De acuerdo con los resultados previos del grupo (Bolos et al 2003), Snail2-HA presenta una capacidad de represión menor que su homólogo Snail1-HA (57% vs 82%, Figura 10A) sobre el promotor de *cadherina-E* murino (Figura 10A). De los cinco mutantes en los dedos de zinc, el mutante en el quinto dedo de zinc (mutZF5-HA) presenta mayor capacidad de represión que Snail2-wt llegando a alcanzar una represión similar a la de Snail1-HA, mientras que el mutante en el segundo dedo (mutZF2-HA) pierde significativamente la capacidad de represión (20% vs. 57%,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Figura 10A), al igual que el mutante en el cuarto dedo (mutZF4-HA) (Tabla VII). Los mutantes en los restantes dedos de zinc (ZF1 y ZF3) no afectaban significativamente la represión mediada por Snail2 (Tabla VII).

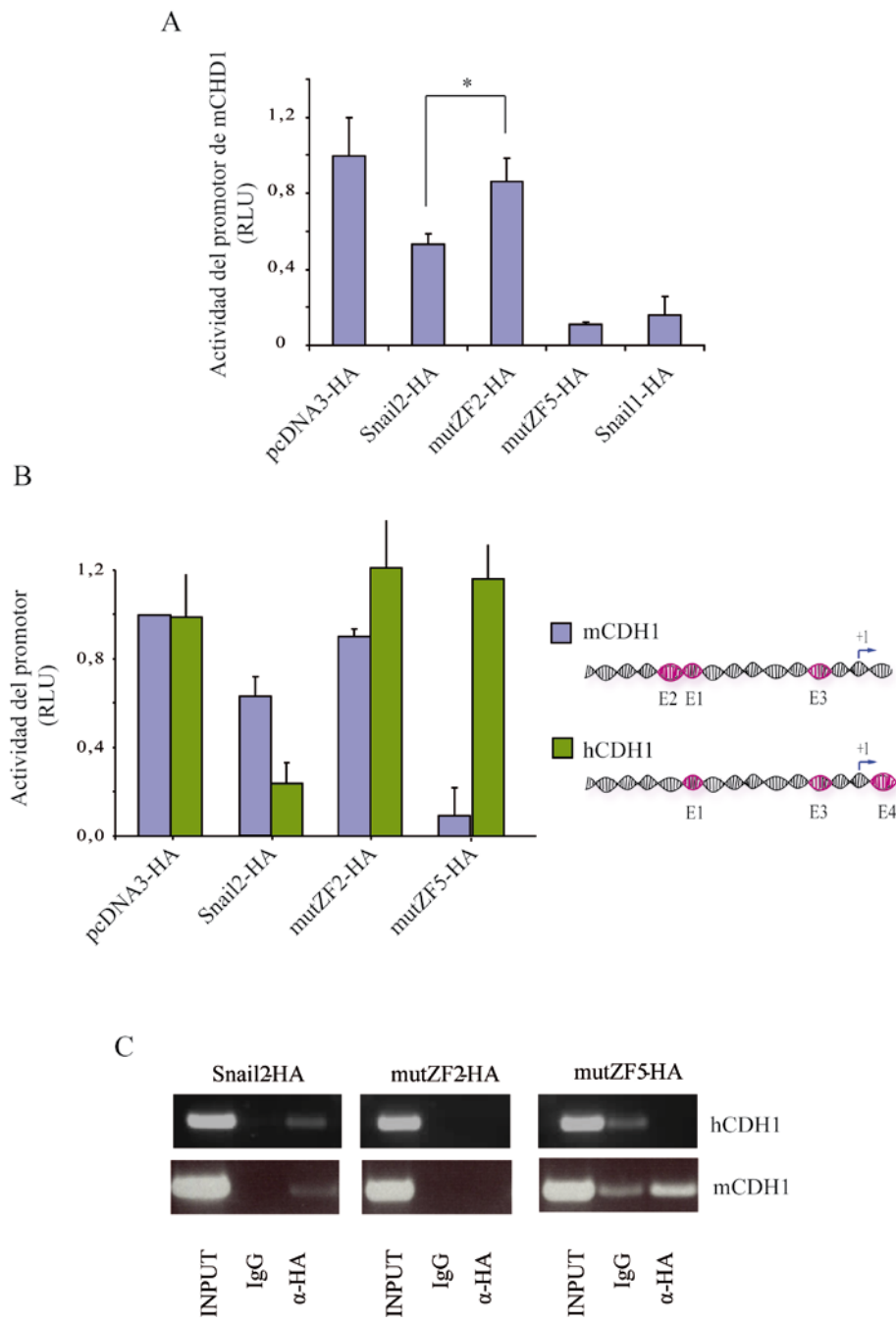
La capacidad represora de un factor de transcripción se puede ver influenciada por la localización nuclear del mismo y por este motivo analizamos la localización de los mutantes mutZF2-HA y mutZF5-HA en la línea humana HEK293T y en la línea canina MDCK-II. En ambos casos se observó una localización nuclear similar a la de Snail2-wt (datos no mostrados, resumen Tabla VII).

Los dedos de zinc son dominios de interacción con el DNA, por tanto, la capacidad de unión de un determinado factor de transcripción va a venir determinada por la arquitectura del sitio de unión en el DNA; por este motivo, decidimos analizar si la represión mediada por los mutantes en los dedos ZF2 y ZF5 se veía afectada por la estructura del promotor de *cadherina-E*. Los promotores de los genes de *cadherina-E* humano y murino presentan una distribución diferente de las cajas-E (Figura 4 y Figura 10B) por lo que decidimos analizar la actividad de los distintos mutantes sobre los promotores de ambas especies. Como cabía esperar Snail2-HA w.t. reprime ambos promotores, siendo aparentemente mayor la capacidad de represión sobre el promotor de *cadherina-E* humano (Figura 10B). El mutZF2-HA no es capaz de reprimir ninguno de los promotores pero, sorprendentemente, el mutZF5-HA pierde por completo la capacidad de represión sobre el promotor de *cadherina-E* humano (Figura 10B).

Para determinar si las alteraciones observadas en la capacidad represora de los mutantes mutZF2-



**Figura 9.- Representación esquemática de los distintos mutantes empleados en esta memoria.** Se presentan tres tipos de mutantes: **A)** mutantes de los dedos de zinc; **B)** mutantes de delección; y **C)** mutantes de fosforilación. A la derecha se indica la mutación específica incorporada en la secuencia proteica de Snail2 murino. Cada cuadradito de la escala representa 10 aminoácidos.



**Figura 10. Caracterización funcional de los dedos de Zinc ZF2 y ZF5 de Snail2.**

(A) Ensayo de actividad del promotor proximal de *cadherina-E* de ratón en células MDCK-II. Las células fueron transfectadas con 300 ng de Snail2-HA, Snail2-mutZF2-HA, Snail2-mutZF5-HA o Snail1-HA. (B) Ensayo de actividad del promotor proximal de *cadherina-E* de ratón (azul, mCDH1) y de humano (verde, hCDH1) en células MDCK-II. Las células fueron transfectadas con 300 ng de los vectores de expresión indicados. La actividad se determinó a las 24h post-transfección, y se expresa aquí como RLU (actividad Luciferasa/actividad B-Galactosidasa). Las RLU se normalizaron con respecto a la medida obtenida con el vector vacío (pcDNA3-HA). Los resultados representan la media  $\pm$  s.d. de tres experimentos independientes (\*  $p < 0,05$ ). A la derecha se muestra un esquema de la organización de las cajas-E en los promotores murino (arriba) y humano (abajo). (C) Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina en células humanas (HEK293T) y de ratón (NMuMG). Las células se transfectaron con Snail2-HA, Snail2-mutZF2-HA o Snail2-mutZF5-HA. La inmunoprecipitación se realizó con un anticuerpo anti-HA o con una IgG control. Se detectó la presencia del promotor proximal de *cadherina-E* mediante PCR con oligos específicos para la región comprendida entre las cajas E1 y E3 del promotor humano (hCDH) o el promotor murino (mCDH). Como control utilizamos como molde los extractos antes de la inmunoprecipitación (INPUT).

HA y mutZF5-HA eran causadas por alteraciones en la capacidad de interacción de estos mutantes con los promotores endógenos se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina para la región del promotor proximal endógeno de *cadherina-E* humano y murino en la línea humana HEK293T y en la línea murina NMuMG, respectivamente. Como se muestra en la Figura 10C, Snail2-HA interacciona con el promotor de *cadherina-E* tanto murino como humano (Figura 10C, panel izquierdo), mientras que el mutZF2 no es capaz de interaccionar con ninguno de los promotores (Figura 10C, panel central) y el mutZF5 sólo interacciona con el promotor murino (Figura 10C, panel derecho), aparentemente con una mayor eficacia que Snail2-wt lo cual correlaciona con la mayor capacidad de represión del mutZF5-HA observada en los experimentos de actividad promotora (Figura 10B).

En conjunto, estos resultados sugieren que el dedo ZF2 es necesario para la capacidad de represión de Snail2 independientemente de la arquitectura del promotor, mientras que el dedo ZF5 se requiere en determinados promotores, como en el promotor de *cadherina-E* murino, donde parece regular negativamente la capacidad de unión de Snail2 al promotor endógeno, reduciendo así la capacidad de represión del factor.

**Tabla VII. Análisis funcional de los mutantes en los dedos de zinc de Snail2.**

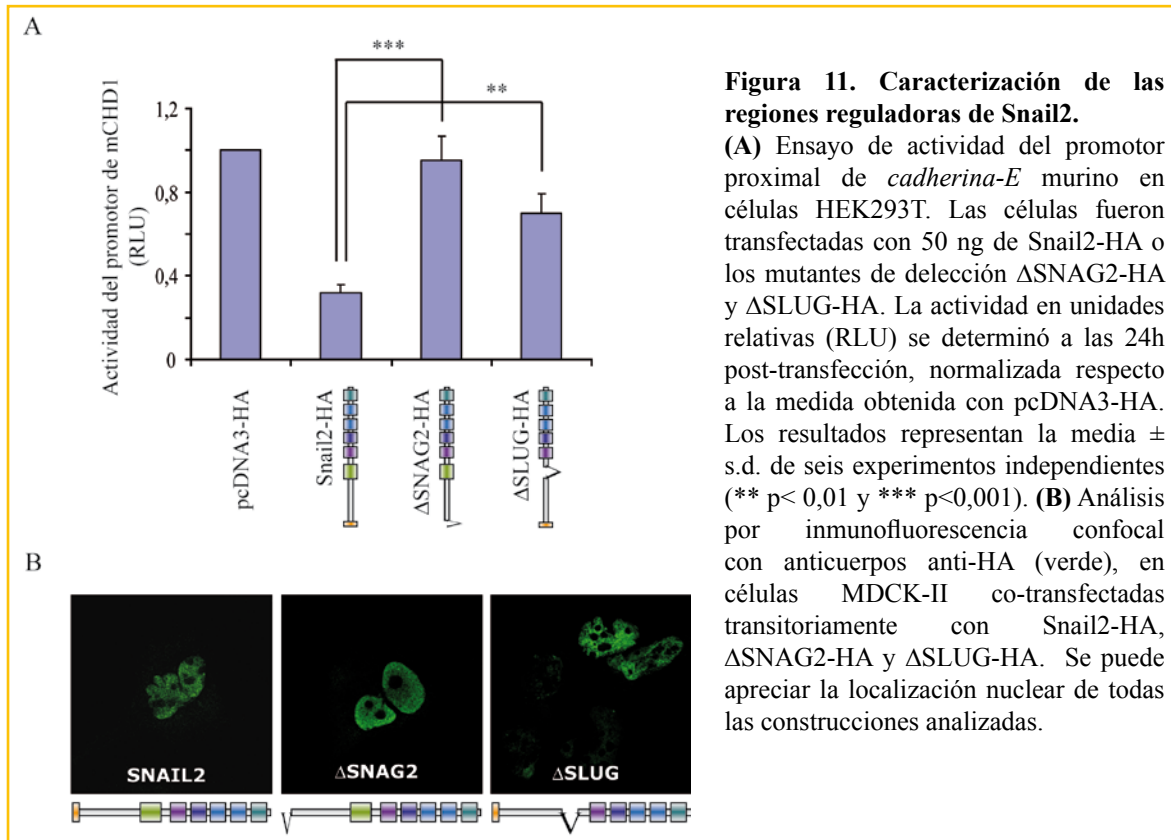
Construcción	Esquema	Actividad Represora <sup>1</sup>	Localización Nuclear <sup>2</sup>
pcDNA3-Snail2-HA		50-60%	+
pcDNA3-mutZF1-HA		57%	+
pcDNA3-mutZF2-HA		12%	+
pcDNA3-mutZF3-HA		53%	+
pcDNA3-mutZF4-HA		18%	+
pcDNA3-mutZF5-HA		82%	+

La barra blanca representa la mutación (cisteína a alanina) introducida en el dedo de zinc indicado. Actividad represora, resumen de los resultados obtenidos en ensayos de actividad del promotor proximal de *cadherina-E* murino en células MDCK-II. Las células fueron transfectadas con 300 ng de las construcciones indicadas. <sup>1</sup> La actividad represora en unidades relativas se determinó a las 24 h post-transfección, como porcentaje de represión, respecto a la medida obtenida con pcDNA3-HA que se considera como actividad represora del 0%. Los resultados representan la media  $\pm$  s.d. de al menos tres experimentos independientes. <sup>2</sup> Localización nuclear, se determinó por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-HA, en células MDCK-II transfectadas transitoriamente con la construcción indicada. +, localización nuclear positiva.

**1.2. Caracterización de las regiones reguladoras de Snail2.**

Como se ha descrito en la Introducción, los factores de transcripción de la familia Snail constan al menos de dos dominios funcionales, los denominados dominio de unión al DNA y el dominio de transactivación. El dominio de transactivación es el encargado de reclutar complejos proteicos que son los que median la acción represora o activadora del factor de transcripción. En el caso de Snail2, y por su similitud de secuencia con Snail1, se piensa que el dominio SNAG (aminoácidos 1 al 9) (a partir de aquí denominado SNAG2) podría corresponder con un dominio de transrepresión (Figura 5B, a), pero esto no ha sido demostrado. Además se desconoce si otras regiones de Snail2 podrían tener una función similar. Así, Snail2 posee una región con alta similitud al sitio de unión de CtBP (dominio CID) que se ha





**Figura 11. Caracterización de las regiones reguladoras de Snail2.**

(A) Ensayo de actividad del promotor proximal de *cadherina-E* murino en células HEK293T. Las células fueron transfectadas con 50 ng de Snail2-HA o los mutantes de delección ΔSNAG2-HA y ΔSLUG-HA. La actividad en unidades relativas (RLU) se determinó a las 24h post-transfección, normalizada respecto a la medida obtenida con pcDNA3-HA. Los resultados representan la media ± s.d. de seis experimentos independientes (\*\* p< 0,01 y \*\*\* p<0,001). (B) Análisis por inmunofluorescencia confocal con anticuerpos anti-HA (verde), en células MDCK-II co-transfectadas transitoriamente con Snail2-HA, ΔSNAG2-HA y ΔSLUG-HA. Se puede apreciar la localización nuclear de todas las construcciones analizadas.

descrito en dmSnail como necesario para reprimir la transcripción de los genes dianas (Hemavathy et al., 2000a) (Figura 5B, b); y contiene el dominio SLUG que, aunque de función desconocida, está altamente conservado en la subfamilia Snail2 (Sefton et al., 1998, Manzanares et al., 2001) (Figura 5B, c). Por este motivo decidimos llevar a cabo un análisis en detalle del papel de la región N-terminal de Snail2 en la represión del promotor de *cadherina-E*. Para llevar a cabo la caracterización de estos posibles dominios de regulación generamos versiones mutantes de Snail2 en las que se habían delecionado diferentes dominios (ΔSNAG2-HA, ΔCID-HA, Snail2Δ65-87-HA, ΔSLUG-HA y Snail2ΔNt) (Figura 9B).

Realizamos ensayos de actividad del promotor de *cadherina-E* murino, en células HEK293T. Como se puede observar en la Figura 11A la delección del dominio SNAG2 (ΔSNAG2-HA) bloquea completamente la capacidad de represión de Snail2, al igual que la delección completa del dominio N-terminal (Snail2ΔNt) (Datos no mostrados y Tabla VIII). Asimismo, la delección del dominio SLUG (ΔSLUG-HA) reduce significativamente la capacidad de represión de Snail2 (30% vs. 60%) (Figura 11A, Tabla VIII). De la misma manera el análisis del resto de mutantes puso de manifiesto la posible participación del dominio CID, ya que su delección provoca una reducción moderada de la capacidad represora de Snail2 (40% vs. 60%) (Tabla VIII). Por otra parte, la delección de la región comprendida entre los dominios CID y SLUG (Δ65-87) no afectaba significativamente la capacidad de represión (Tabla VIII). No obstante, ninguna de las mutaciones analizadas alteraba la localización nuclear de Snail2 (Figura 11B y Tabla VIII).

En conjunto, estos resultados confirman que, al igual que ocurre en Snail1, el dominio SNAG es importante para la represión mediada por Snail2 y pone en evidencia la presencia de otras regiones (SLUG y CID, principalmente) que también pueden tener un papel importante en la actividad represora de Snail2.

Tabla VIII. Análisis funcional de los mutantes de delección de la región reguladora de Snail2.

Construcción	Esquema	Actividad Represora <sup>1</sup>	Localización Nuclear
pcDNA3-Snail2-HA		50-60 %	+
pcDNA3-ΔNt-HA		0 %	n.t
pcDNA3-ΔSNAG2-HA		0-5 %	+
pcDNA3-ΔCID-HA		40 %	+
pcDNA3-Δ65-87-HA		50%	+
pcDNA3-ΔSLUG-HA		25-30%	+

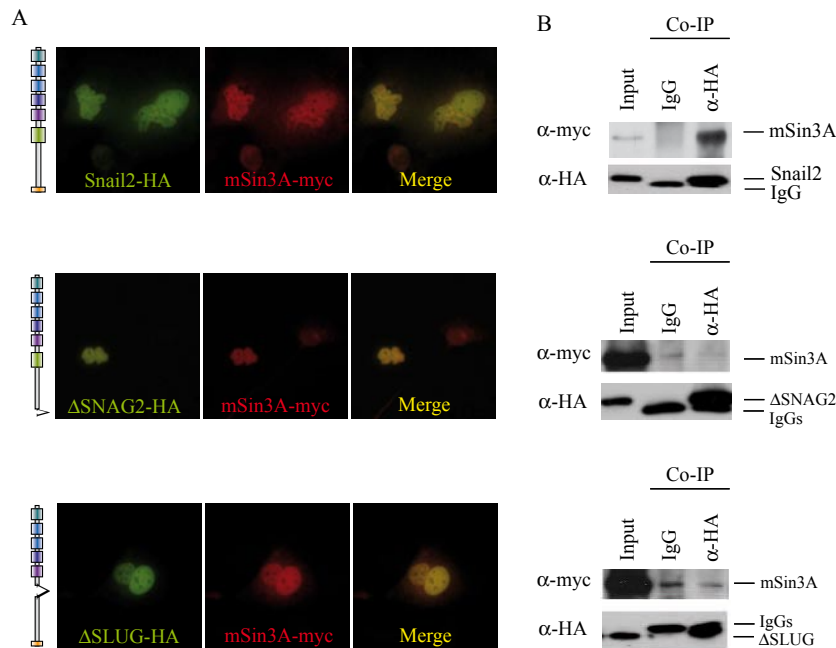
Se indican los aminoácidos eliminados en cada uno de los mutantes. Actividad represora, resumen de los resultados obtenidos en ensayos de actividad del promotor proximal de *cadherina-E* murino en células HEK293T. Las células fueron transfectadas con 50 ng de las construcciones indicadas. <sup>1</sup>La actividad represora en unidades relativas (RLU) se determinó a las 24h post-transfección, tal como se indica en la Tabla VII. Los resultados representan la media ± s.d. de al menos tres experimentos independientes. <sup>2</sup>Localización nuclear, se determinó por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-HA, en células MDCK-II transfectadas transitoriamente con la construcción indicada. +, localización nuclear positiva; n.t., no testado.

### 1.3 Caracterización de los complejos de represión reclutados por Snail2.

La mayoría de los complejos de represión reclutados por los factores Snail y ZEB para la represión del promotor de *cadherina-E* identificados hasta la fecha están compuestos por co-represores de diferentes familias e histonas deacetilasas (HDACs) y metiltransferasas (Herranz et al., 2008, Peinado and Cano, 2005, Peinado et al., 2004a, Qi et al., 2008), cuya función final, a través de complejos mecanismos, es la de impedir que la RNA polimerasa acceda al sitio de inicio de la transcripción. En el caso concreto de Snail1 se ha descrito que interacciona con los complejos de represión a través del dominio SNAG. En el caso de Snail2 se desconoce la naturaleza de los complejos co-represores reclutados y la región concreta a través de la cual son reclutados para ejercer su acción represora. Por ello decidimos caracterizar el papel de alguno de los co-represores previamente relacionados con la represión del promotor de *cadherina-E* en diferentes sistemas (CtBP1, mSin3A y NCoR) (Peinado et al., 2007, Peinado et al., 2004c, Qi et al., 2008, Shi et al., 2003) y las posibles regiones de Snail2 implicadas en el reclutamiento de dichos co-represores.

#### 1.3.1 mSin3A

Como se ha comentado en la Introducción, Snail1 recluta a través del dominio SNAG un complejo co-represor constituido por mSin3A y las HDACs 1 y 2 (Peinado et al., 2004c). Este hecho junto a la observación de que el dominio SNAG2 de Snail2 es esencial para la represión del promotor de *cadherina-E* (Tabla VIII y Figura 11A) nos llevó a analizar el papel de mSin3A y de las HDACs en la represión mediada por Snail2. La sobreexpresión transitoria de Snail2 y mSin3A, en células MDCK-II y el análisis mediante microscopía confocal nos permitió confirmar que Snail2 y mSin3A se localizan en el núcleo de estas células (Figura 12A, panel superior). A continuación llevamos a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación en células HEK293T co-transfectadas transitoriamente con Snail2-HA y mSin3A-myc. Los resultados

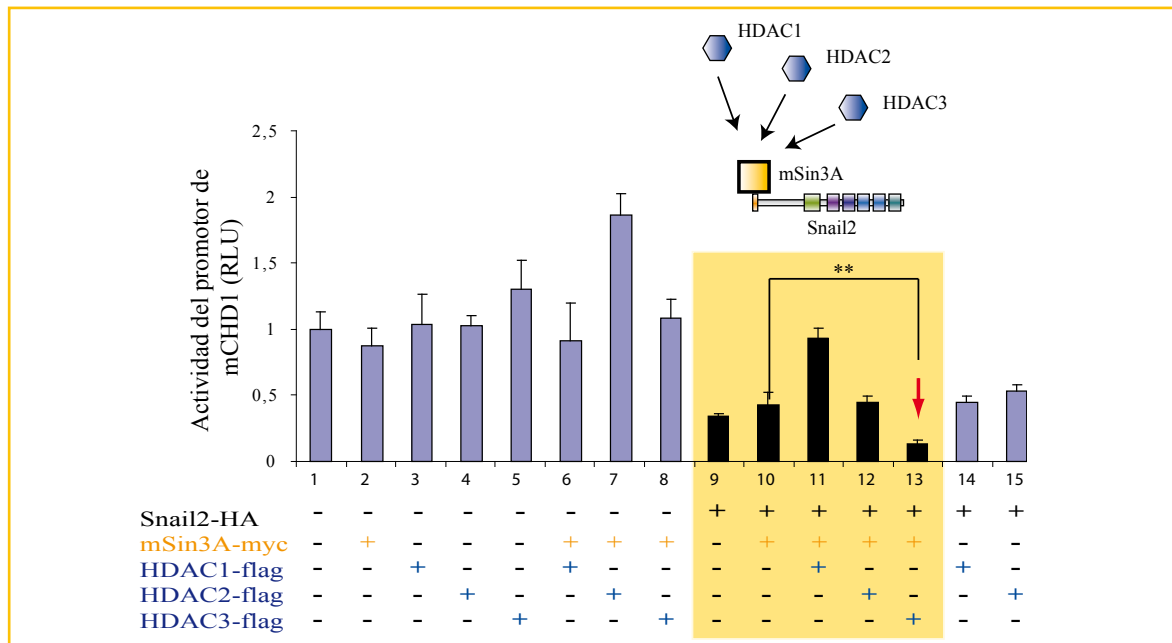
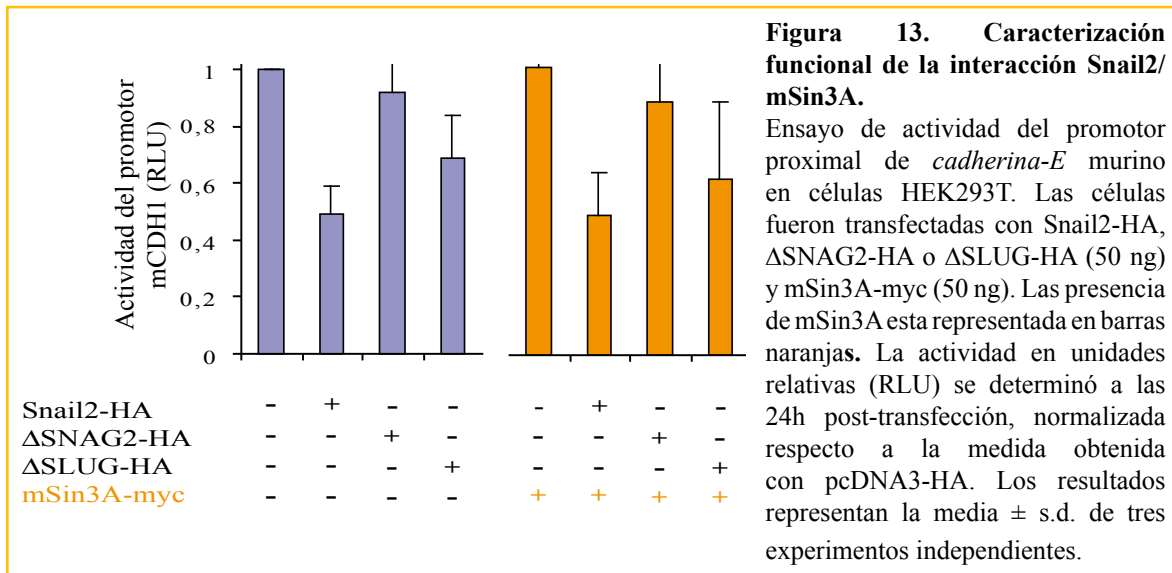


**Figura 12. Caracterización de los dominios implicados en la asociación de Snail2 con el co-represor mSin3A.**

(A) Análisis por inmunofluorescencia con anticuerpos  $\alpha$ -HA (verde) y  $\alpha$ -myc (rojo), en células MDCK-II co-transfectadas transitoriamente con mSin3A-myc y Snail2-HA (arriba),  $\Delta$ SNAG2-HA (centro) o  $\Delta$ SLUG-HA (debajo). Se puede apreciar la localización nuclear de Snail2 o los mutantes (verde) y mSin3A (rojo) en las imágenes solapadas (merge). (B) Co-inmunoprecipitación en células HEK293T co-transfectadas con mSin3A-myc y Snail2-HA (arriba),  $\Delta$ SNAG2-HA (centro) o  $\Delta$ SLUG-HA (debajo). La inmunoprecipitación se realizó con anticuerpos anti-HA o IgG control, y se analizó la proteína asociada por western con anticuerpos anti-myc (mSin3A-myc) y anti-HA (Snail2-HA), como control de la inmunoprecipitación. Se muestra la fracción control no inmunoprecipitada (Input) en cada caso.

muestran que Snail2-HA co-immunoprecipita con mSin3A-myc (Figura 12B, panel superior). A continuación procedimos a analizar la región de Snail2 responsable de la interacción con mSin3A. Para ello realizamos ensayos de co-immunoprecipitación en células co-expresando transitoriamente mSin3A-myc y Snail2-HA,  $\Delta$ SNAG2-HA o  $\Delta$ SLUG-HA. El análisis mediante microscopía confocal nos permitió confirmar que los mutantes de Snail2 y mSin3A se localizan en el núcleo (Figura 12A paneles central e inferior). Los resultados de la co-immunoprecipitación, presentados en la Figura 12B, muestran que en células que co-expresan mSin3A-myc/ $\Delta$ SNAG2-HA los niveles de mSin3A co-immunoprecipitados disminuyen drásticamente (Figura 12B, panel intermedio) en relación a los encontrados en células que co-expresan mSin3A-myc/Snail2-HA o mSin3A-myc/ $\Delta$ SLUG-HA (Figura 12B, panel inferior). Estos resultados sugieren que Snail2 y mSin3A pueden interactuar in vivo a través del dominio SNAG2.

Para determinar si la interacción observada tiene consecuencias funcionales decidimos analizar el efecto de la sobreexpresión de mSin3A sobre la represión del promotor de *cadherina-E* mediada por Snail2. Como se muestra en la Figura 13 la co-expresión de mSin3A no aumenta de la capacidad de represión de Snail2 wt ni de los mutantes de Snail2,  $\Delta$ SNAG2 y  $\Delta$ SLUG. Un posible motivo que puede explicar la falta de cooperación observada entre mSin3A y Snail2 podría ser el hecho de que algún otro elemento del complejo represor se encontrase en cantidades limitantes. Puesto que se ha descrito que mSin3A colabora en la represión del promotor de *cadherina-E* mediada por Snail1 a través del reclutamiento de HDACs (Peinado et al., 2004c), podría ocurrir que algunas de las HDACs reclutadas por mSin3A se encontrase en cantidades limitantes y, por tanto, no permitiese detectar un aumento de

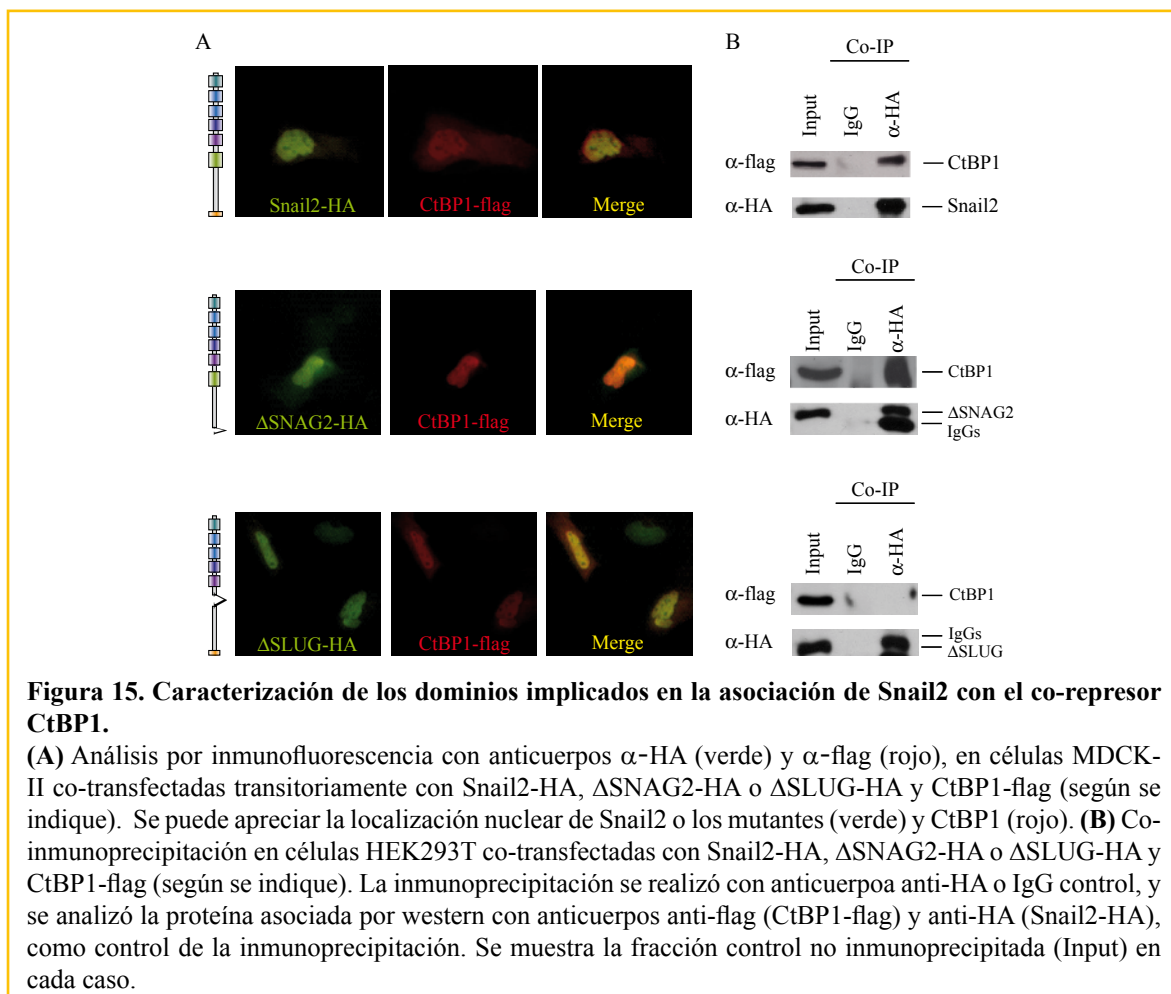


represión al co-expresar mSin3A y Snail2. Para investigar esta posibilidad decidimos analizar si la co-expresión de alguna HDAC podría incrementar la capacidad de represión del complejo Snail2/mSin3A. Para ello, realizamos ensayos de actividad del promotor de *cadherina-E* murino en células que co-expresaban Snail2, mSin3A y HDAC1, HDAC2 o HDAC3. Como se aprecia en la Figura 14 la co-expresión de HDAC3 incrementa significativamente la capacidad represora del complejo Snail2/mSin3A (Figura 14, comparar línea 10 con línea 13). Curiosamente, la co-expresión de HDAC1 parece disminuir la capacidad de represión del complejo (Figura 14, comparar línea 10 y 11).

En conjunto, estos resultados sugieren que Snail2 a través del dominio SNAG2 podría reclutar a mSin3A y HDAC3 durante el proceso de represión del promotor de *cadherina-E*.

1.3.2 CtBP1 (C-terminal binding protein-1)

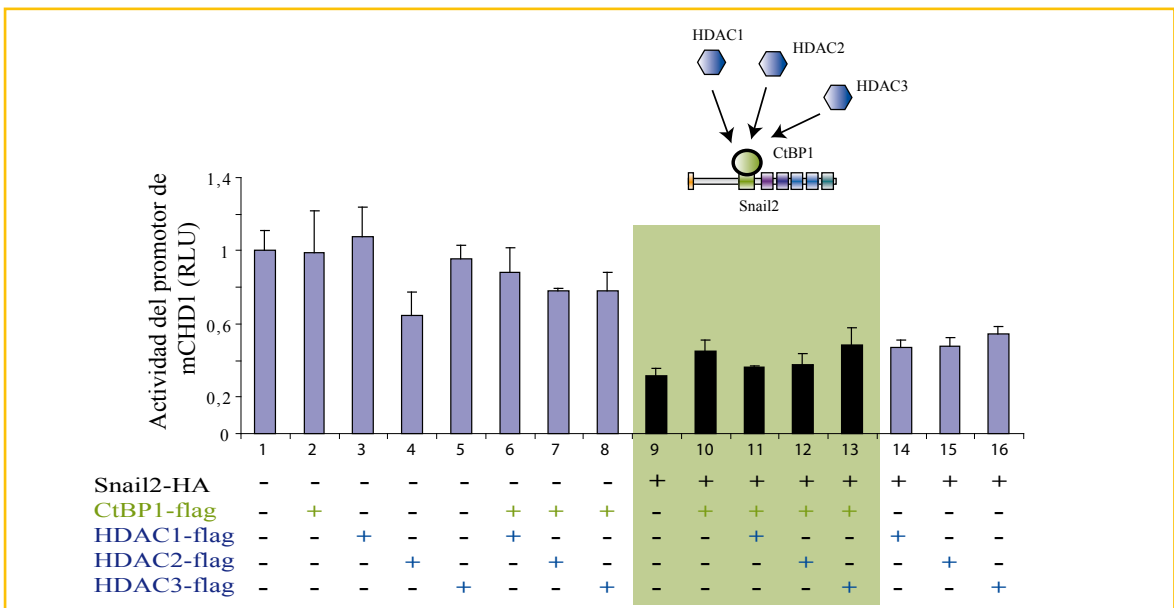
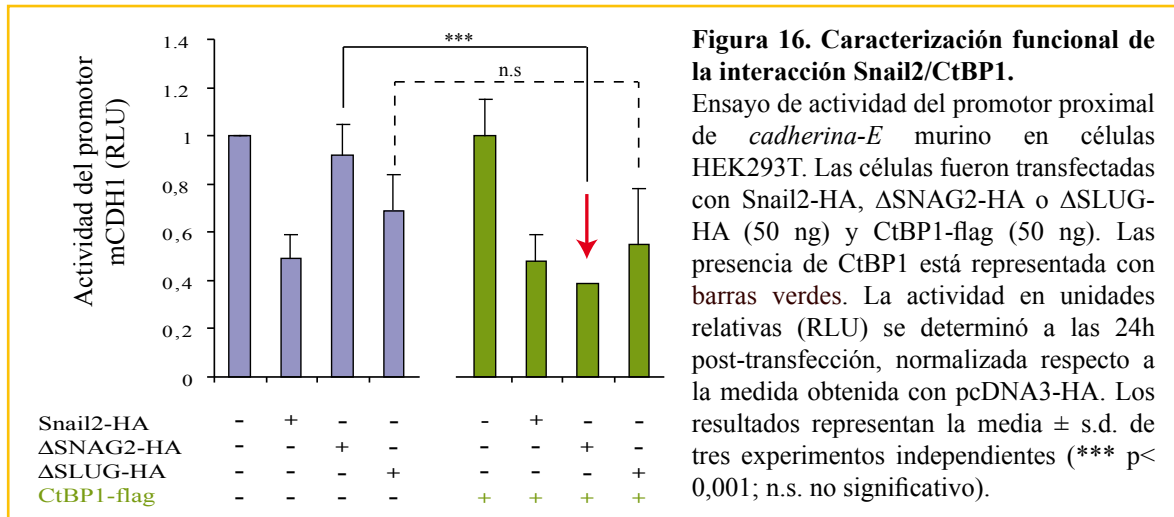
La sobreexpresión transitoria de Snail2 y CtBP1, en células MDCK-II y el análisis mediante microscopía confocal nos permitió confirmar que Snail2 y CtBP1 se localizan en el núcleo de estas células (Figura 15A). A continuación y con el objetivo de determinar si Snail2 interactúa con CtBP1, llevamos a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación en células HEK293T co-transfectadas transitoriamente con Snail2-HA y CtBP1-flag. Los resultados muestran que Snail2-HA co-immunoprecipita con CtBP1-flag (Figura 15B, panel superior). A continuación procedimos a analizar la región de Snail2 responsable de la interacción con CtBP. Para ello llevamos a cabo dos tipos de experimentos. Por una parte realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación y microscopía confocal en células co-expresando transitoriamente CtBP-flag y ya sea Snail2-HA wt,  $\Delta$ SNAG2-HA o  $\Delta$ SLUG-HA y, por otra parte llevamos a cabo ensayos del promotor de *cadherina-E* en células co-expresando esas mismas combinaciones de proteínas. El análisis mediante microscopía confocal de esas células nos permitió confirmar que los mutantes de Snail2 y CtBP se localizan en el núcleo (Figura 15A). Los ensayos de co-inmunoprecipitación claramente muestran que Snail2 y CtBP interactúan a través del dominio SLUG (Figura 15B, panel inferior), mientras que el dominio SNAG2 no participa en dicha interacción (Figura 15B, panel intermedio). En los ensayos de promotor se observa que CtBP y Snail2 no cooperan funcionalmente en la represión del promotor de *cadherina-E* (Figura 16, comparar líneas 2 y 6) pero, sorprendentemente, si se observó una clara cooperación funcional entre CtBP y el mutante  $\Delta$ SNAG2-HA (Figura 16, comparar líneas 3 y 7).



## RESULTADOS

Los estudios de actividad promotora en presencia de distintas HDACs mostraron que las HDAC1/2/3 no cooperan funcionalmente en la represión de Snail2/CtBP1 (Figura 17).

Estos resultados sugieren que Snail2 y CtBP pueden interactuar pero que la funcionalidad de la interacción es interferida por el dominio SNAG.



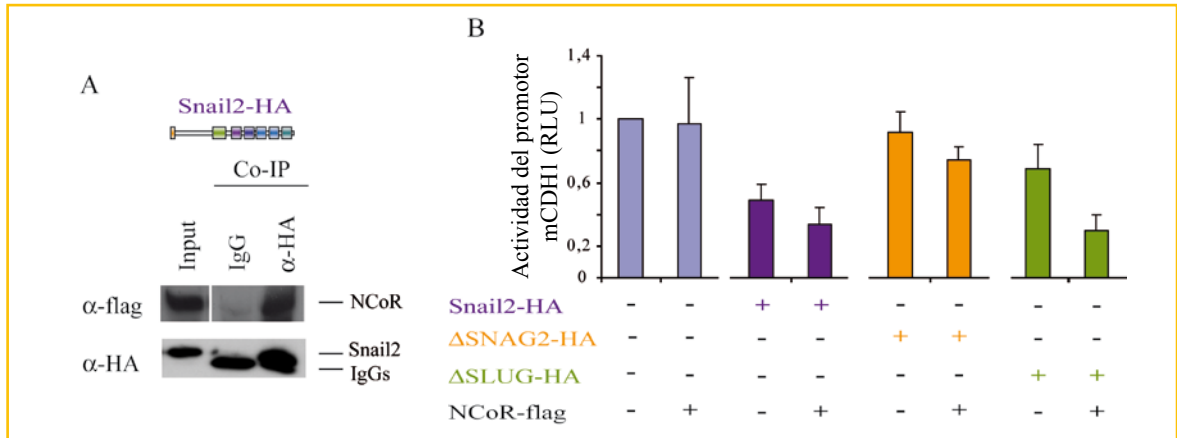


1.3.3 NCoR (Nuclear CoRepresor)

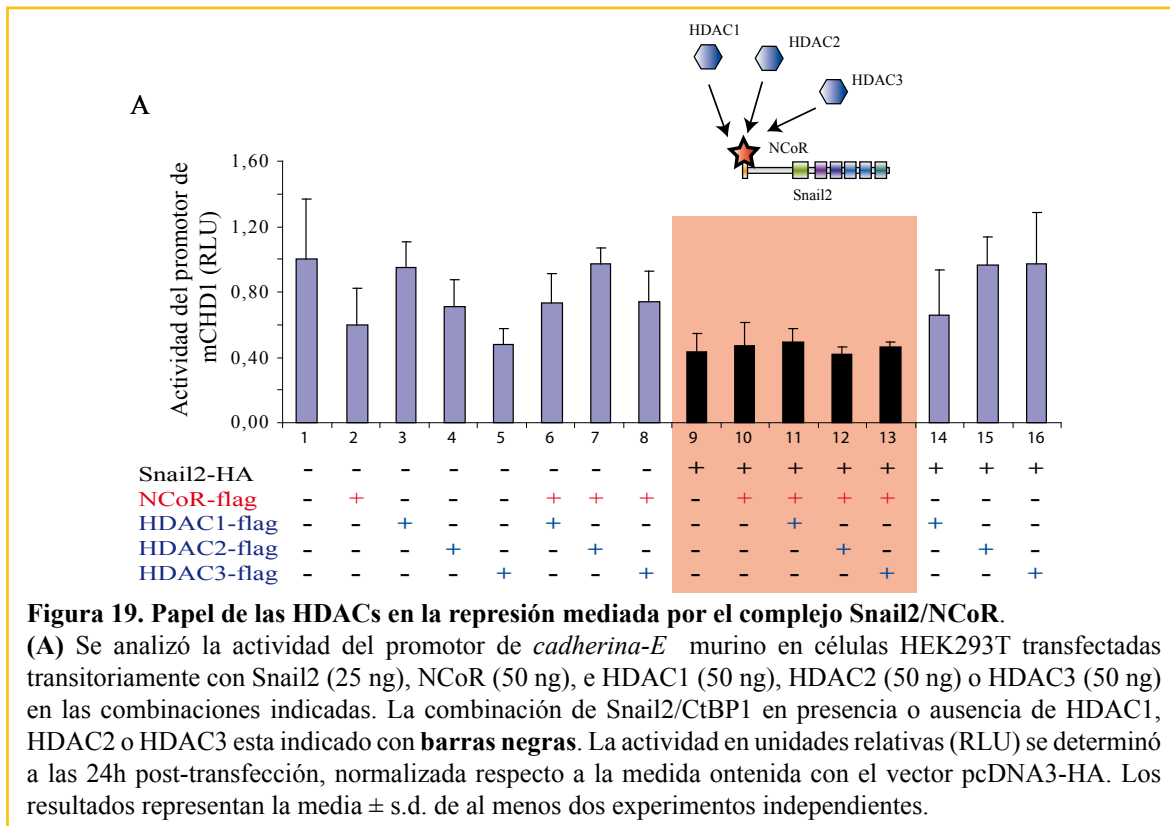
El factor Ebi de *Drosophila* se ha implicado recientemente en la represión mediada por dmSnail (Qi et al., 2008), gracias al reclutamiento del co-represor NCoR. Por este motivo decidimos analizar la implicación de NCoR en la represión mediada por Snail2. Para ello llevamos a cabo experimentos de co-immunoprecipitación en células HEK293T co-expresando transitoriamente Snail2-HA y NCoR-flag. Los resultados muestran que Snail2-HA co-immunoprecipita con NCoR-flag (Figura 18A).

Para analizar si la capacidad de interacción entre Snail2-HA y NCoR-flag tiene consecuencias funcionales llevamos a cabo ensayos de promotor en células co-expresando Snail2 y NCoR. Como se muestra en la Figura 18B la co-expresión de NCoR incrementa la capacidad de represión de Snail2 wt (Figura 18B, morado). Por su parte, el análisis de los mutantes ΔSNAG-HA y ΔSLUG-HA mostró que la eliminación del dominio SNAG2 suprime la cooperación funcional entre Snail2 y NCoR (Figura 18B, naranja). Sorprendentemente esta cooperación se mantiene cuando se delecciona el dominio SLUG (Figura 18B, verde), sugiriendo de nuevo una posible interferencia entre los dominios SNAG y SLUG durante la represión del promotor de *cadherina-E* ó que la interacción Snail2/NCoR sea independiente del dominio SLUG. A continuación, decidimos analizar el efecto de la co-expresión de HDAC1, HDAC2 o HDAC3 sobre la actividad represora del complejo Snail2/NCoR. Como se muestra en la figura 19 ninguna de las HDACs analizadas colabora en la represión mediada por el complejo Snail2/NCoR.

Estos resultados, junto con los obtenidos en el apartado anterior, sugieren que el dominio SNAG2 de Snail2 puede reclutar a dos tipos de complejos represores. Por una parte puede reclutar a mSin3A y HDAC3 y, por otra, puede reclutar al co-represor NCoR. En este último caso queda por determinar si NCoR recluta algún otro tipo de HDACs o algún enzima modificador de la cromatina.



**Figura 18. Caracterización funcional de la interacción Snail2/NCoR.**  
**(A)** Co-immunoprecipitación en células HEK293T co-transfectadas con Snail2-HA, y CtBP1-flag. La inmunoprecipitación se realizó con un anticuerpo α-HA o con una IgG control, y analizamos por western con anticuerpos α-flag y α-HA, como control de la inmunoprecipitación. **(B)** Ensayo de actividad del promotor proximal de *cadherina-E* murino en células HEK293T. Las células fueron transfectadas con 50 ng de Snail2-HA (morado), ΔSNAG2-HA (naranja) o ΔSLUG-HA (verde) y NCoR-flag (50 ng), según se indique. La actividad en unidades relativas (RLU) se determinó a las 24h post-transfección. Las RLU se normalizaron respecto a la medida obtenida con pcDNA3-HA sólo (representada en la columna 1). Los resultados representan la media ± s.d. de dos experimentos independientes.



1.3.4 Colaboración funcional entre los distintos complejos represores.

El estudio de los complejos de represión asociados a NCoR en otros sistemas ha permitido determinar que tanto CtBP1 como mSin3A pueden estar formando parte de complejos co-represores que contienen NCoR (Perissi et al., 2008), de forma que durante la represión se formarían macro-complejos que incluyesen varios co-represores con sus respectivas HDACs, asociados a un mismo represor.

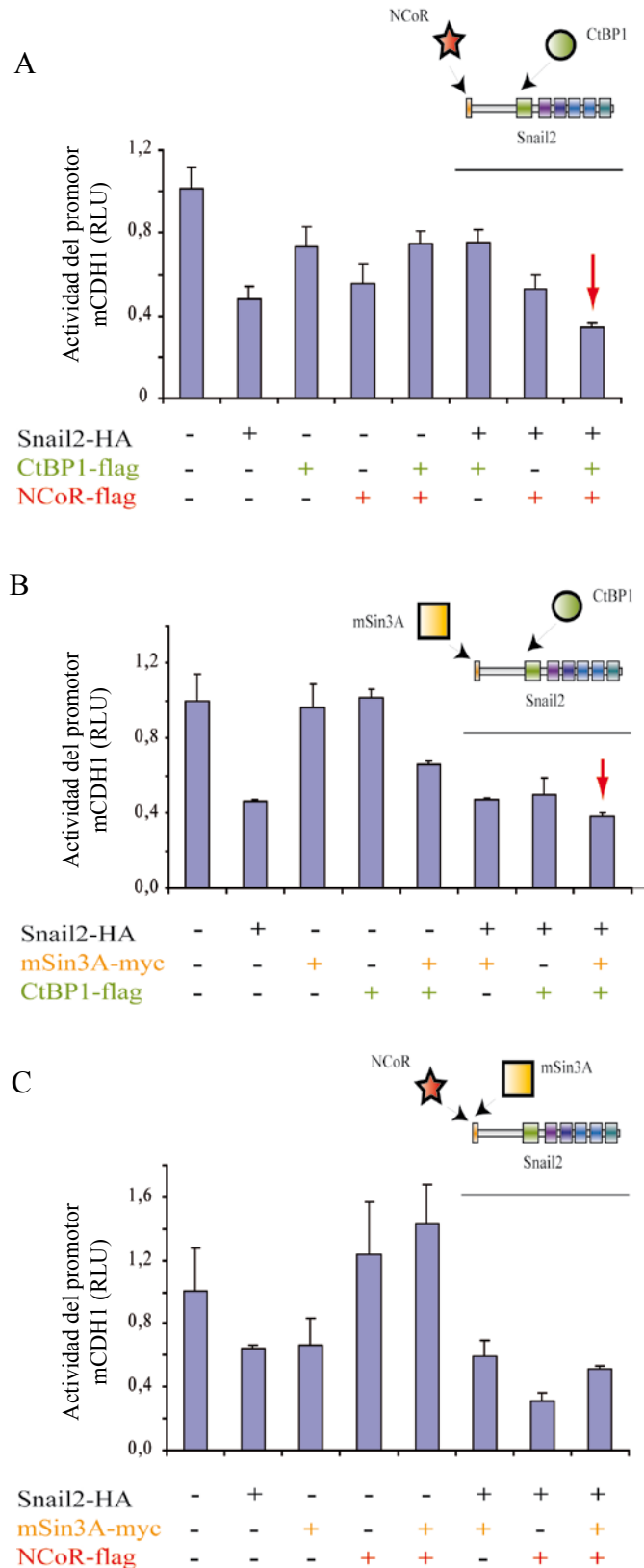
Para determinar si existe alguna relación a nivel transcripcional entre los co-represores NCoR, CtBP1 y mSin3A y el factor Snail2, procedimos a analizar la actividad del promotor de *cadherina-E* murino, en células HEK293T co-expresando Snail2 y una de las siguientes combinaciones de co-represores: NCoR/CtBP1, mSin3A/CtBP1 o NCoR/mSin3A. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 20. Como se puede apreciar, la co-expresión de NCoR/CtBP1 o mSin3A/CtBP1 incrementaba la capacidad de represión de Snail2 sugiriendo que los co-represores reclutados por Snail2 a través del dominio SNAG2 (NCoR y mSin3A) y del dominio SLUG (CtBP1) lo hacen de forma independiente y que ambos complejos cooperan entre si. Por el contrario, cuando se analizó la actividad del promotor de *cadherina-E* en células co-expresando NCoR y mSin3A no se observó cooperación entre ambos, resultado que era esperable ya que ambos co-represores interactúan con Snail2 a través del mismo dominio funcional.

1.4. Caracterización funcional de la fosforilación de Snail2.

1.4.1 Fosforilación *in vivo* de Snail2.

Estudios previos sobre Snail1 han puesto de manifiesto la importancia de distintos procesos de fosforilación en la regulación de la estabilidad, localización y actividad funcional de Snail1 (Dominguez et al., 2003, MacPherson et al., 2009, Yang et al., 2005, Yook et al., 2005, Zhou et al., 2004). Sin embargo, se desconoce la existencia de mecanismos de fosforilación de Snail2. La búsqueda *in silico* de posibles

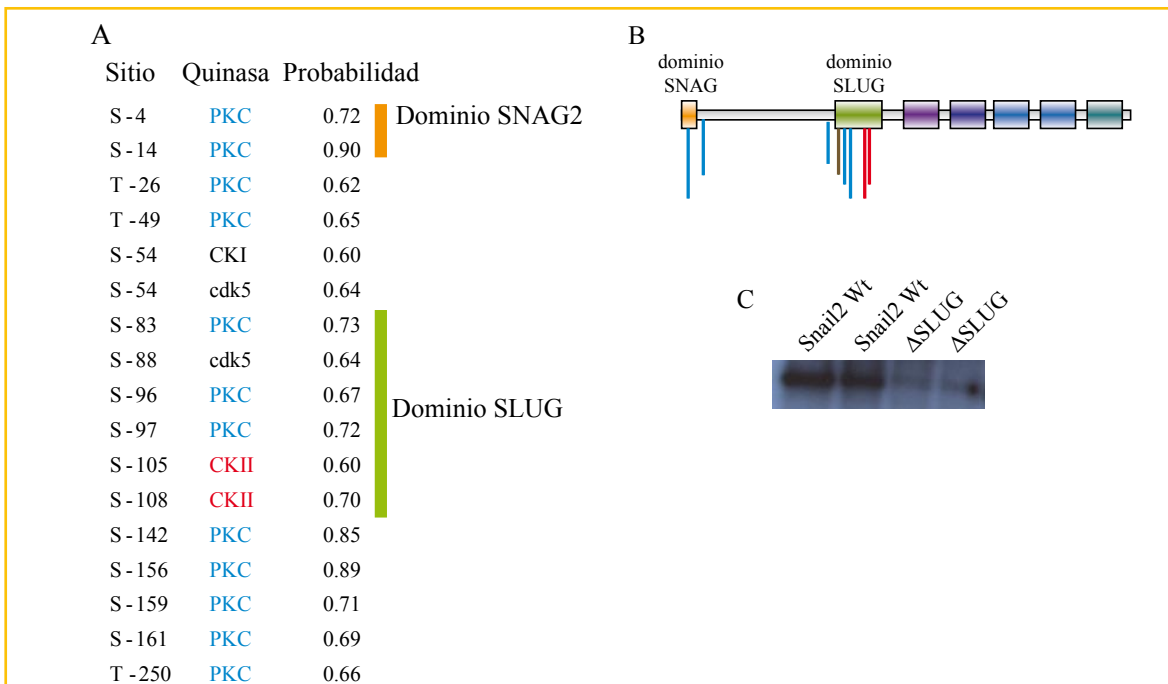




**Figura 20. Colaboración funcional entre los co-represores mSin3A, NCoR y CtBP1.**

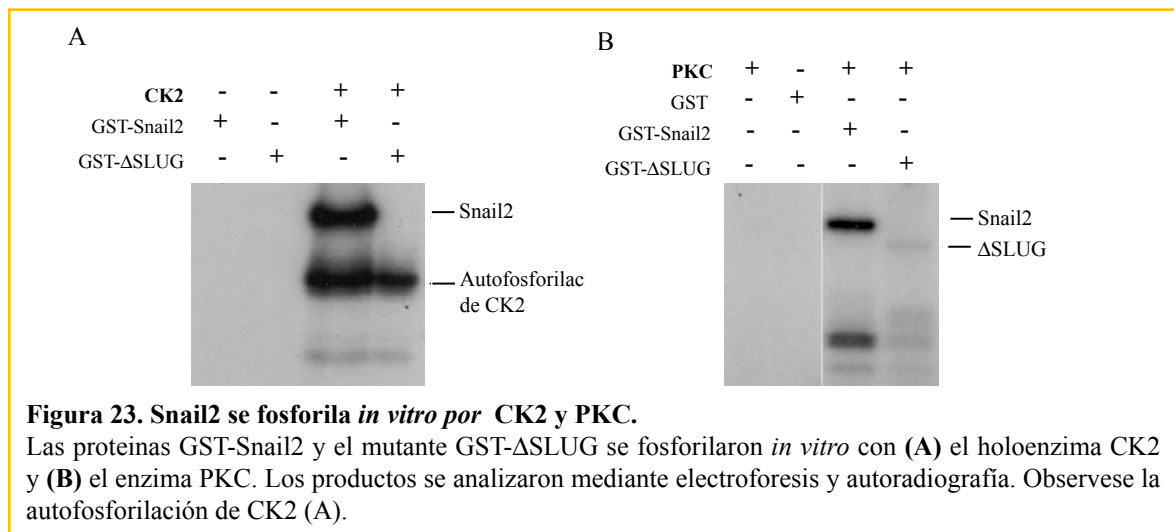
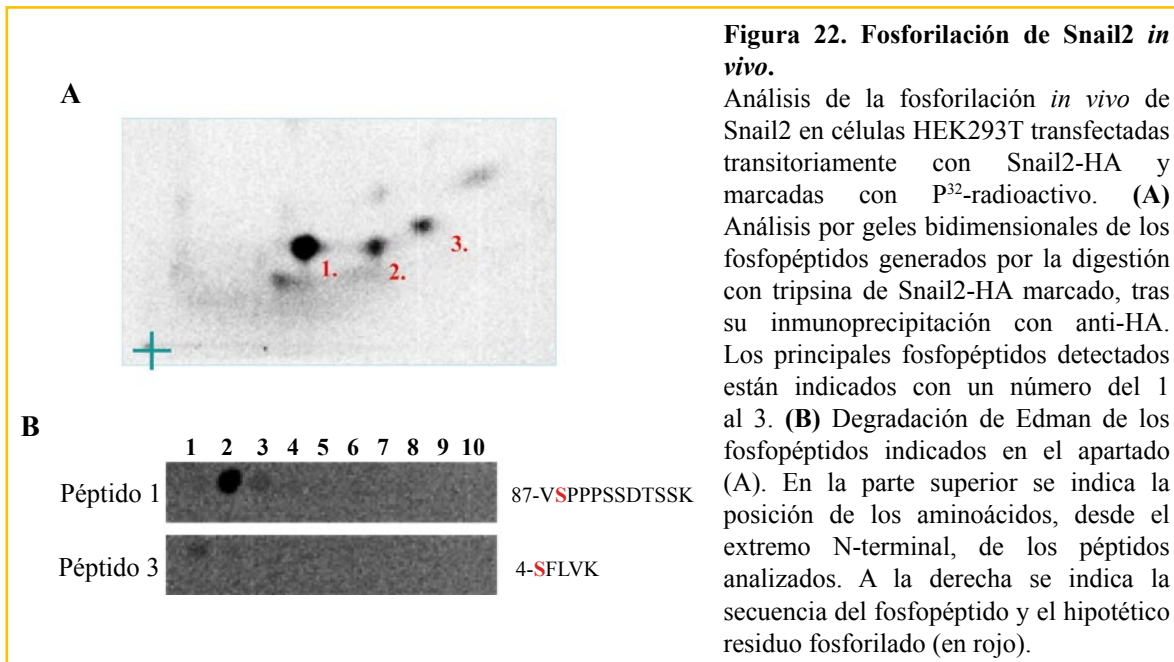
Ensayos de actividad del promotor proximal de *cadherina-E* murino en células HEK293T. Las células fueron transfectadas con Snail2-HA (25 ng) y (A) CtBP1-flag (50 ng) y NCoR-flag (50 ng). (B) CtBP1-flag (50 ng) y mSin3A-myc (50 ng). (C) mSin3A-myc (50 ng) y NCoR-flag (50 ng). La actividad en unidades relativas (RLU) se determinó a las 24h post-transfección, normalizada respecto a la medida obtenida con pcDNA3-HA sólo. Los resultados representan la media  $\pm$  s.d. de dos experimentos independientes.

sitios de fosforilación en Snail2 puso de manifiesto la existencia de múltiples secuencias consenso para la fosforilación de Snail2 por proteína quinasa C (PKC), caseína quinasa 2 (CK2) y quinasa dependiente de ciclina 5 (cdk5) (Figura 21A). Los sitios de fosforilación más probables encontrados se concentran en los dominios SNAG2, SLUG y regiones adyacentes (Figura 21A, B). Para evaluar la posible relevancia de estos sitios procedimos en primer lugar a la identificación de los residuos fosforilados *in vivo*, para lo cual tratamos de obtener un mapa de fosfopéptidos de Snail2 fosforilado *in vivo*. La forma fosforilada *in vivo* de Snail2 aparece como una banda única (Figura 21C), cuya intensidad se reduce cuando utilizamos el mutante ΔSLUG (Figura 21C). La banda de Snail2 fosforilado fue eluida del gel y digerida con tripsina, y los péptidos resultantes separados en dos dimensiones mediante electroforesis y cromatografía. El mapa resultante muestra un mínimo de 3 fosfopéptidos (Figura 21A). Cada fosfopéptido fue eluido y degradado mediante la reacción de Edman identificando los residuos marcados radiactivamente mediante autorradiografía (Figura 22B). Este análisis nos permitió determinar que el fosfopéptido 1 se encontraba fosforilado en la posición 2 y el fosfopéptido 3 en la posición 1. Del resto de fosfopéptido no se pudo extraer la cantidad necesaria para llevar a cabo este tipo de análisis. Cuando la movilidad de los péptidos y la posición de fosforilación se comparó con la movilidad teórica de todos los posibles péptidos de Snail2 producidos por la digestión con tripsina se llegó a la conclusión de que el fosfopéptido 1 correspondía al péptido 87-VSPPPSSDTSSK mientras que el fosfopéptido 3 correspondía al péptido 4-SFLVK. Por tanto, al menos, la serina 4 y la serina 88 de Snail2 se encontrarían fosforiladas *in vivo* (Figura 22B).



**Figura 21. Análisis de los sitios de fosforilación de Snail2.**

(A) Análisis *In silico* de posibles sitios de fosforilación de Snail2 (Programa online NetPhosK 1.0). Se indican los residuos serina (S) o treonina (T) fosforilables (izquierda), las quinasas más probables (centro) y la probabilidad calculada para cada residuo/quinasa (derecha). (B) Representación esquemática de la localización de los sitios de fosforilación predichos *in silico*. PKC (azul), CKII (rojo) y cdk5 (marrón). (C) Ensayo de fosforilación *in vivo* en células HEK293T transfectadas con Snail2-HA y el mutante ΔSLUG-HA marcadas con P<sup>32</sup>-radioactivo. Se muestra la autorradiografía tras la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HA de Snail2-HA y el mutante ΔSLUG-HA. El experimento se realizó por duplicado.



La serina 4 es un potencial sitio de fosforilación por PKC mientras que la serina 88 localizada en el dominio SLUG es un sitio potencial de fosforilación por cdk5. No obstante, un análisis más detallado permitió determinar que la serina 88 se encuentra en un posible sitio consenso de fosforilación para CK2. La posibilidad de que Snail2 sea un sustrato de PKC y CK2 se confirmó mediante experimentos de fosforilación *in vitro*. Para lograr este objetivo una proteína de fusión GST-Snail2 purificada de bacterias se incubó con las proteínas quinasas comerciales PKC y CK2. Como se muestra en la Figura 23, ambas quinasas eran capaces de fosforilar a Snail2. Asimismo, la fosforilación *in vitro* del mutante ΔSLUG confirmó que la fosforilación por CK2 dependía de la presencia de este dominio (Figura 23A), mientras que la fosforilación por PKC no se perdía completamente en el mutante ΔSLUG (Figura 23B), probablemente debido a la existencia de otros sitios de fosforilación para PKC fuera del dominio SLUG.

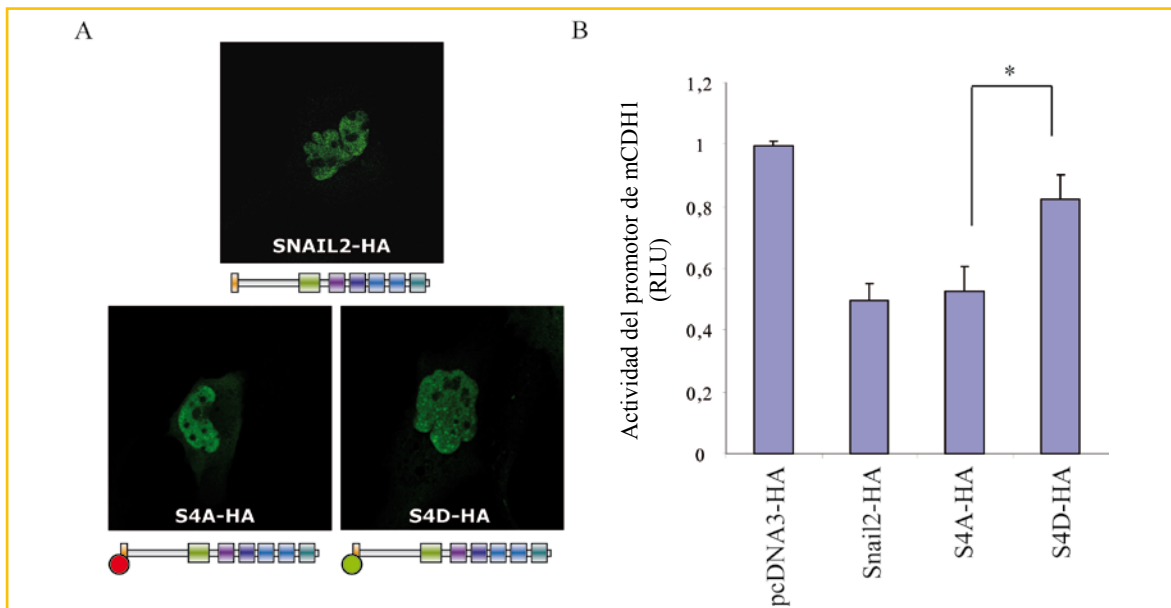
En conjunto, los estudios de fosforilación sugieren que Snail2 se fosforila *in vivo* en los dominios SNAG2 y SLUG, probablemente por las quinasas PKC y CK2, y señalan como posibles residuos fosforilados la serina 4 (del dominio SNAG2) y la serina 88 (del dominio SLUG), si bien no podemos descartar otros residuos detectados en el análisis *in silico* (Figura 21).

1.4.2 Efecto de la fosforilación en la actividad represora de Snail2.

La serina 4 de Snail2 se encuentra dentro del dominio SNAG2 y su fosforilación podría afectar a la actividad represora del factor. En el caso de la serina 14, ésta es equivalente a la serina 11 de Snail1 donde la fosforilación por PKA regula la represión mediada por el complejo Snail1/mSin3A (MacPherson et al., 2009). Por tanto, la fosforilación de las serinas 4 y 14 de Snail2 podría afectar al reclutamiento de co-represores del dominio SNAG2. Adicionalmente, la fosforilación de la serina 88 (en el dominio SLUG) también podría tener un papel en la actividad funcional de Snail2 y, por tanto, afectar a la interacción de Snail2 con CtBP1.

Para determinar el efecto de la fosforilación de Snail2 en los residuos de serina 4, 14 y 88, se realizaron ensayos de actividad de promotor de *cadherina-E* murino, en células HEK293T, en presencia de mutantes fosfomiméticos (S → D) o no fosforilables (S → A) de Snail2 en cada uno de los residuos mencionados (Tabla IX). La transfección transitoria de Snail2 y los distintos mutantes mostró que las versiones fosfomiméticas de la serina 4 y la serina 88 presentaban una capacidad represora disminuida respecto de Snail2 (Figura 24B y Tabla IX). Por el contrario, en el caso de la serina 14, es la versión no fosforilable de este residuo la que presenta una menor capacidad de represión respecto de Snail2 (Tabla IX), al igual que ocurre en el caso de Snail1 con la serina 11 (MacPherson et al., 2009).

Estos resultados sugieren que las fosforilaciones en el dominio SNAG2 y residuos adyacentes, y en el dominio SLUG pueden ser relevantes para modular la actividad represora de Snail2.



**Figura 24. Caracterización del estado de fosforilación de la Ser4 de Snail2.**

(A) Análisis por inmunofluorescencia con anticuerpos  $\alpha$ -HA (verde), en células MDCK-II co-transfectadas transitoriamente con Snail2-HA, S4A-HA y S4D-HA. Se puede apreciar la localización nuclear de las construcciones analizadas. (B) Ensayo de actividad del promotor proximal de *cadherina-E* murino en células HEK293T. Las células fueron transfectadas con Snail2-HA (50 ng), los mutantes de fosforilación S4A-HA (50 ng) y S4D-HA (50 ng). La actividad en unidades relativas (RLU) se determinó a las 24h post-transfección. Las RLU se normalizaron respecto a la medida obtenida con la construcción pcDNA3-HA (representada en la columna 1). Los resultados representan la media  $\pm$  s.d. de cuatro experimentos independientes (\*  $p < 0,05$ ).

**Tabla IX Análisis funcional de los mutantes de fosforilación de Snail2.**

Construcción	Esquema	Actividad Represora	Interacción con mSin3A
pcDNA3-Snail2-HA		50 %	+
pcDNA3-S4A-HA		48 %	+
pcDNA3-S4D-HA		18 %	-
pcDNA3-S14A-HA		27 %	-
pcDNA3-S14D-HA		57 %	+
pcDNA3-S88A-HA		55 %	n.t
pcDNA3-S88D-HA		28%	n.t

Se indica la posición del aminoácido mutado con un punto. Punto rojo, mutación Ser → Ala; Punto verde, mutación Ser → Asp. Actividad represora, resumen de los resultados obtenidos en ensayos de actividad del promotor proximal de *cadherina-E* murino en células HEK293T. Las células fueron transfectadas con 50 ng de las construcciones indicadas. La actividad represora se determinó a las 24h post-transfección, como porcentaje de represión respecto a la medida obtenida con pcDNA3-HA sólo que se considera como actividad represora del 0%. Los resultados representan la media ± s.d. de al menos tres experimentos independientes. Interacción con mSin3A, se determinó por co-inmunoprecipitación en células HEK293T co-transfectadas con mSin3A-myc y el mutante indicado. La inmunoprecipitación se realizó con anticuerpos anti-HA o con IgG control, y se analizó por western con anticuerpos anti-myc (mSin3A-myc) y anti-HA (Snail2-HA), como control de la inmunoprecipitación. n.t: no testado.

**1.4.3 Efecto de la fosforilación de la serinas 4 y la serina 14 en la interacción Snail2/mSin3A.**

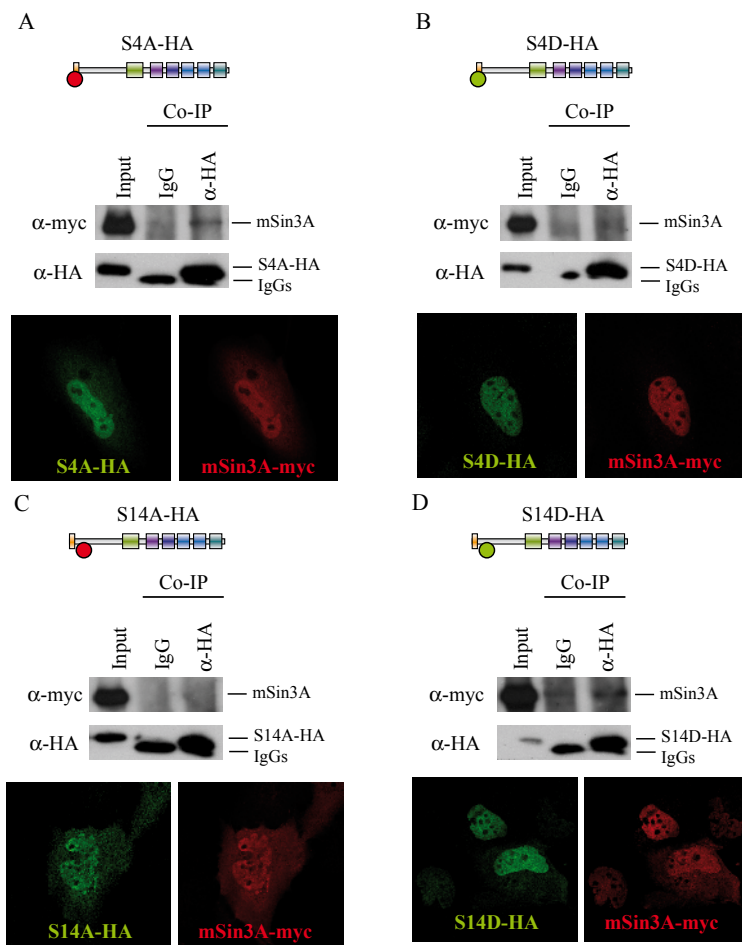
En el caso de la serina 4 es posible que su estado de fosforilación pueda modular la interacción de Snail2 con el co-represor mSin3A. Para analizar esta posibilidad se co-transfectaron células HEK293T con mSin3A-myc y Snail2-S4A o Snail2-S4D y se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación. Los resultados muestran en primer lugar que las mutaciones en la S4 no alteran su localización nuclear (Figura 24A) y, en segundo lugar, que la versión fosfomimética de la serina 4 de Snail2 (S4D) pierde la capacidad de interaccionar físicamente con mSin3A (Figura 25B, panel superior). Estos resultados sugieren que la fosforilación de la serina 4 del dominio SNAG2 de Snail2 puede estar regulando negativamente la interacción con el co-represor mSin3A y por tanto la represión mediada a través del complejo mSin3A/HDAC3.

En el caso de la serina 14, es posible que su fosforilación también regule la interacción con mSin3A. De acuerdo con esto, el análisis por inmunoprecipitación de la capacidad de interacción con mSin3A muestra que la forma fosfomimética (S14D) mantiene la interacción con mSin3A (Figura 25D, panel superior), mientras que la forma no fosforilable (S14A) pierde sustancialmente capaz de interaccionar con mSin3A (Figura 25C, panel superior).

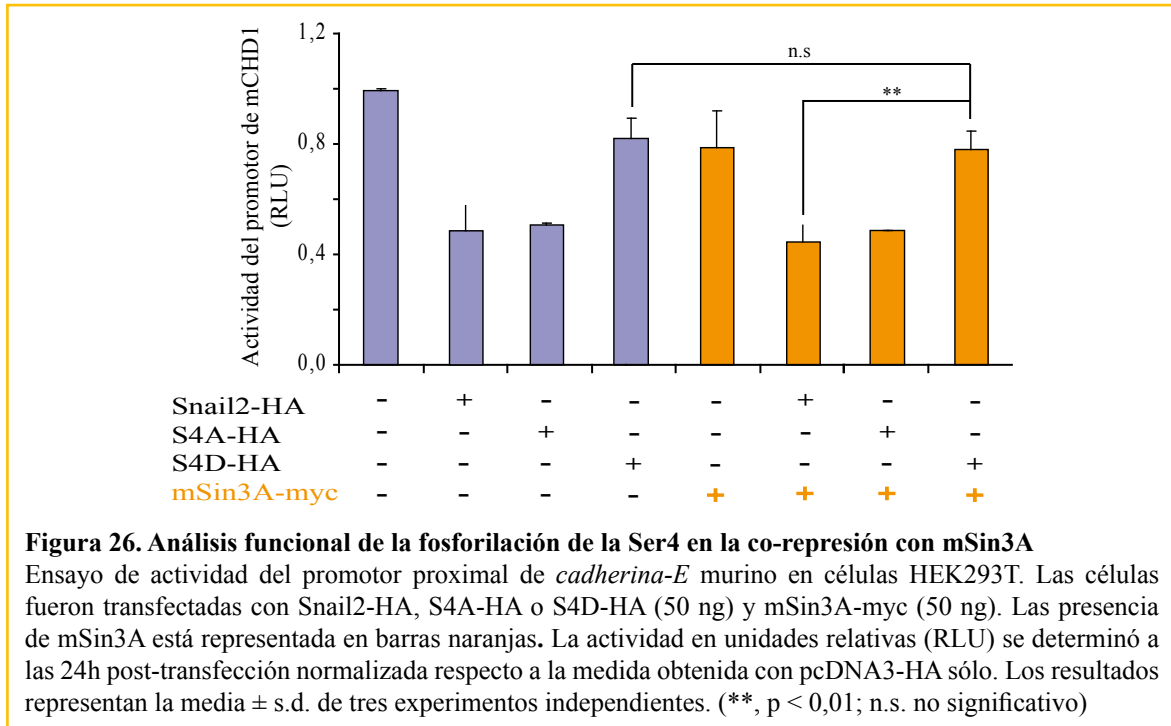
Para analizar el papel funcional de la fosforilación como regulador del complejo Snail2/mSin3A realizamos ensayos de actividad del promotor de *cadherina-E* en células co-expresando transitoriamente mSin3A-myc y Snail2-HA, S4A-HA o S4D-HA. Como se muestra en la figura 26, la forma pseudofosforilada de Snail2 en la serina 4 impide la co-represión mediada por mSin3A y la represión de Snail2 solo, mientras que la forma no fosforilada se comporta como Snail2 wt.

Asimismo, y como se indica en la Tabla IX, la fosforilación de la serina 88 en el dominio SLUG disminuye la capacidad de represión de Snail2, si bien queda por determinar si la fosforilación de este residuo afecta a la capacidad de interacción de Snail2 con el co-represor CtBP1 a través del dominio SLUG.

En conjunto, estos resultados, junto con los obtenidos en el apartado anterior, sugieren que el estado de fosforilación de la serina 4 y la serina 14 tiene un papel modulador de la represión mediada por Snail2 sobre el promotor de *cadherina-E*, de manera que en su estado fosforilado regula positiva y negativamente, respectivamente, el reclutamiento del co-represor mSin3A. Asimismo, la fosforilación de la serina 88 regula negativamente la capacidad de represión Snail2, aunque queda por caracterizar el mecanismo molecular específico.



**Figura 25. Efecto de la fosforilación de las Ser4 y Ser14 en la interacción entre Snail2/mSin3A.** (A y B) **Panel superior**, co-inmunoprecipitación en células HEK293T co-transfectadas con mSin3A-myc y los mutantes de fosforilación S4A-HA (A) y S4D-HA (B). La inmunoprecipitación se realizó con anticuerpos anti-HA o con IgG control, y se analizó la proteína asociada por western con anticuerpos anti-myc y anti-HA, como control de la inmunoprecipitación. **Panel inferior**, análisis por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-HA (verde) y anti-myc (rojo), en células MDCK-II co-transfectadas transitoriamente con mSin3A y S4A-HA (A) o S4D-HA (B). Se puede apreciar la localización nuclear de los mutantes (verde) y mSin3A (rojo). (C y D) **Panel superior**, co-inmunoprecipitación en células HEK293T co-transfectadas con mSin3A-myc y los mutantes de fosforilación S14A-HA (C) y S14D-HA (D). análisis por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-HA (verde) y anti-myc (rojo), en células MDCK-II co-transfectadas transitoriamente con mSin3A y S14A-HA (C) o S14D-HA (D). Se puede apreciar la localización nuclear de los mutantes (verde) y mSin3A (rojo). En todas las inmunoprecipitaciones se incluye la fracción no inmunoprecipitada (input) como control positivo.





**PARTE 2: FUNCIÓN DE SNAIL2 EN LA CARCINOGENESIS DE PIEL DE RATÓN**

Para estudiar la implicación de Snail2 en el proceso de carcinogénesis utilizamos como modelo animal el ratón homocigoto nulo de Snail2 (Snail2  $-/-$ ) generado en el laboratorio de Thomas Gridley (Jiang et al., 1998b) y cedido amablemente.

**2.1. Carcinogénesis química de piel de ratón: efecto de la delección de Snail2.****2.1.1 Caracterización general del proceso.**

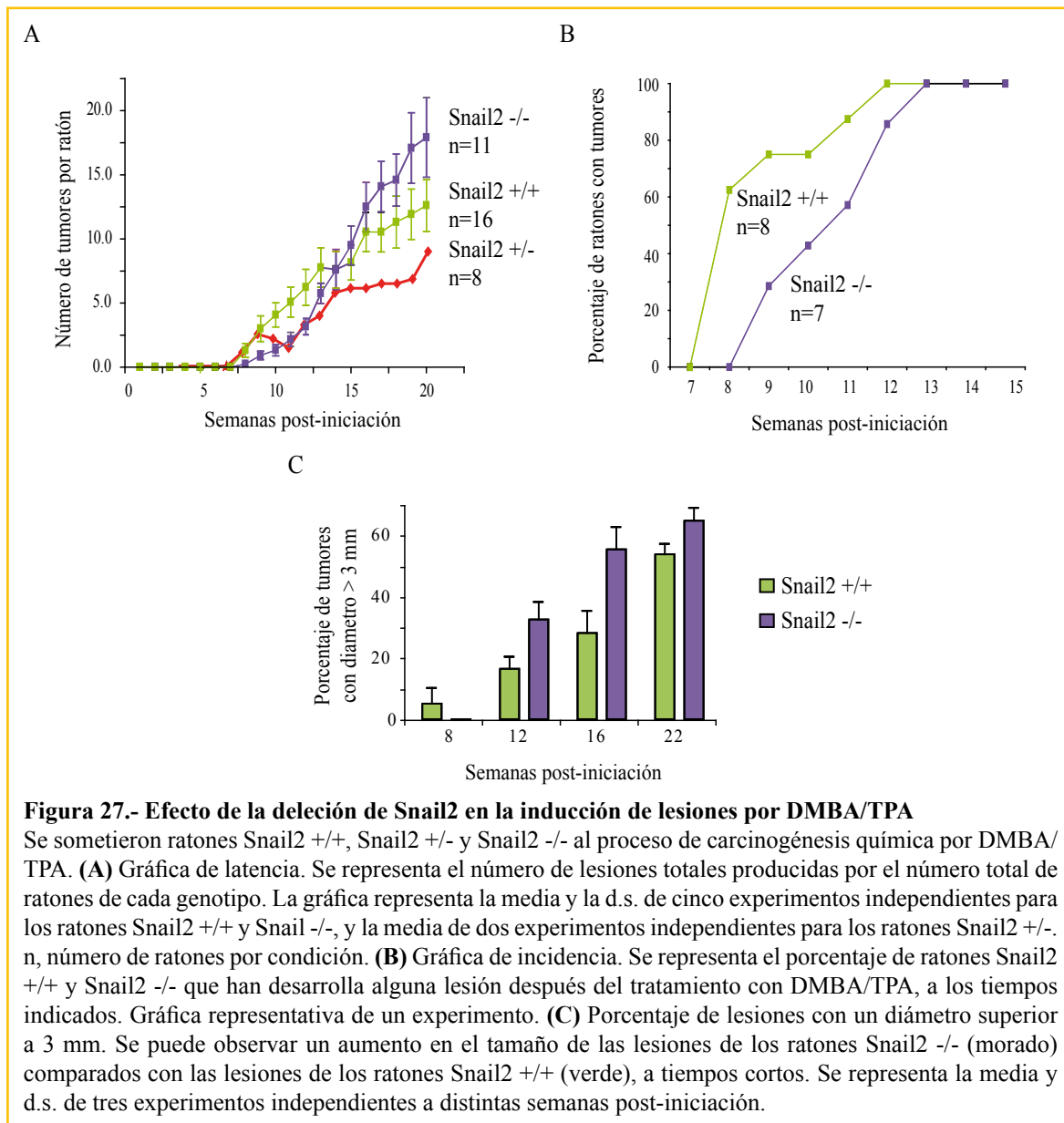
La implicación funcional de Snail2 en el proceso de carcinogénesis se estudió mediante ensayos de carcinogénesis química por DMBA/TPA en ratones silvestres para Snail2 (Snail2  $+/+$ ), heterocigotos para Snail2 (Snail2  $+/-$ ) y homocigotos nulos para Snail2 (Snail2  $-/-$ ). Este tipo de ensayos permiten obtener datos como la latencia, la incidencia, el número de lesiones y su tamaño, entre otros, relacionados con el grado de sensibilidad a la carcinogénesis y relacionarlos con la ausencia/presencia de Snail2, en este caso. Como se muestra en la Figura 27, la respuesta al tratamiento con DMBA/TPA fue similar entre los ratones Snail2  $+/+$  y Snail2  $+/-$  en cuanto a la latencia, detectándose la aparición de las primeras lesiones a partir de las 7 semanas de inicio del tratamiento, mientras que los ratones Snail2  $-/-$  presentaron un aumento de la latencia, apareciendo las primeras lesiones a partir de las 8 semanas (Figura 27A). Sorprendentemente, superada la fase de latencia, el número de lesiones presentes en los ratones Snail2  $-/-$  aumenta significativamente, presentando al final del ensayo 18 lesiones por ratón frente a las 10 lesiones por ratón producidas en los ratones Snail2  $+/+$  y 8 lesiones por ratón producidas en los ratones Snail2  $+/-$  (Figura 27A). Sin embargo, la incidencia fue del 100% para los tres genotipos, Snail2  $+/+$ , Snail2  $+/-$  y Snail2  $-/-$  (Figura 27B y datos no mostrados). Asimismo, el porcentaje de lesiones superiores a 3 mm fue mayor en los ratones Snail2  $-/-$  comparados con los Snail2  $+/+$  a tiempos cortos e intermedios, llegando a duplicar el número de lesiones superiores a 3 mm a las 16 semanas de tratamiento (54,30% vs 27,55%) (Figura 27C), si bien estas diferencias tienden a minimizarse a tiempos más largos (como a las 22 semanas) (Figura 27C)

El análisis histológico de las lesiones (Figura 28) mostró que el tratamiento había producido, tanto en los ratones Snail2 wild type (Snail2  $+/+$ ) como en los ratones nulos para Snail2 (Snail2  $-/-$ ) lesiones benignas, papilomas e hiperplasias. Sorprendentemente, un 31% de las lesiones de los ratones Snail2  $-/-$  eran carcinomas de células escamosas (SCC), mientras que los ratones control solo desarrollaron un 7% de SCC (Figura 28A). El incremento en el porcentaje de SCC observado en los ratones Snail2  $-/-$  parece ocurrir fundamentalmente a expensas de la disminución de las lesiones de papilomas (63% en ratones Snail2  $-/-$  frente 81% en ratones Snail2  $+/+$ ), si bien no puede descartarse la aparición de carcinomas directamente a partir de hiperplasias. El análisis histopatológico no detectó diferencias aparentes entre los papilomas generados por los ratones Snail2  $+/+$  y Snail2  $-/-$  (Figura 28B).

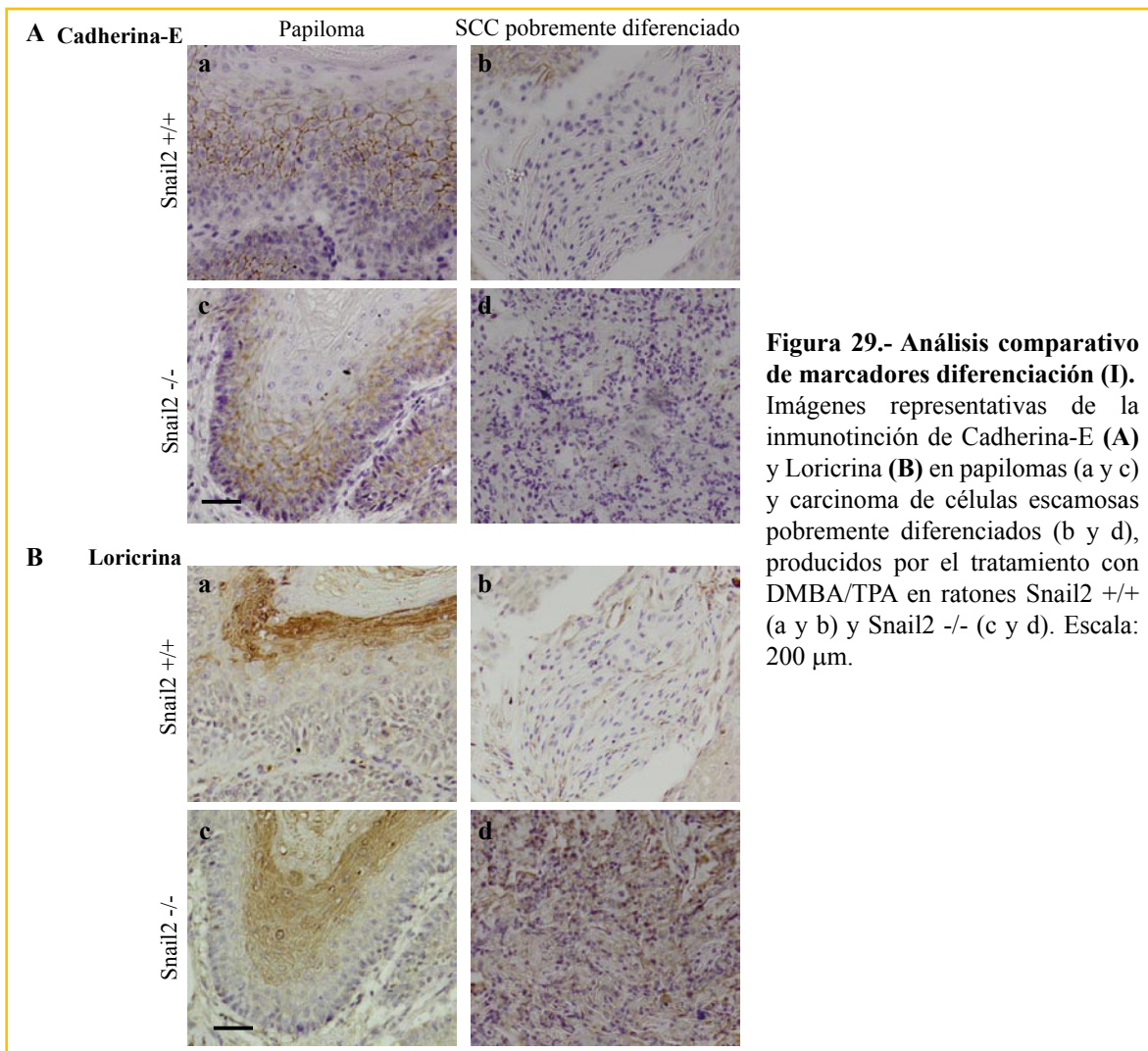
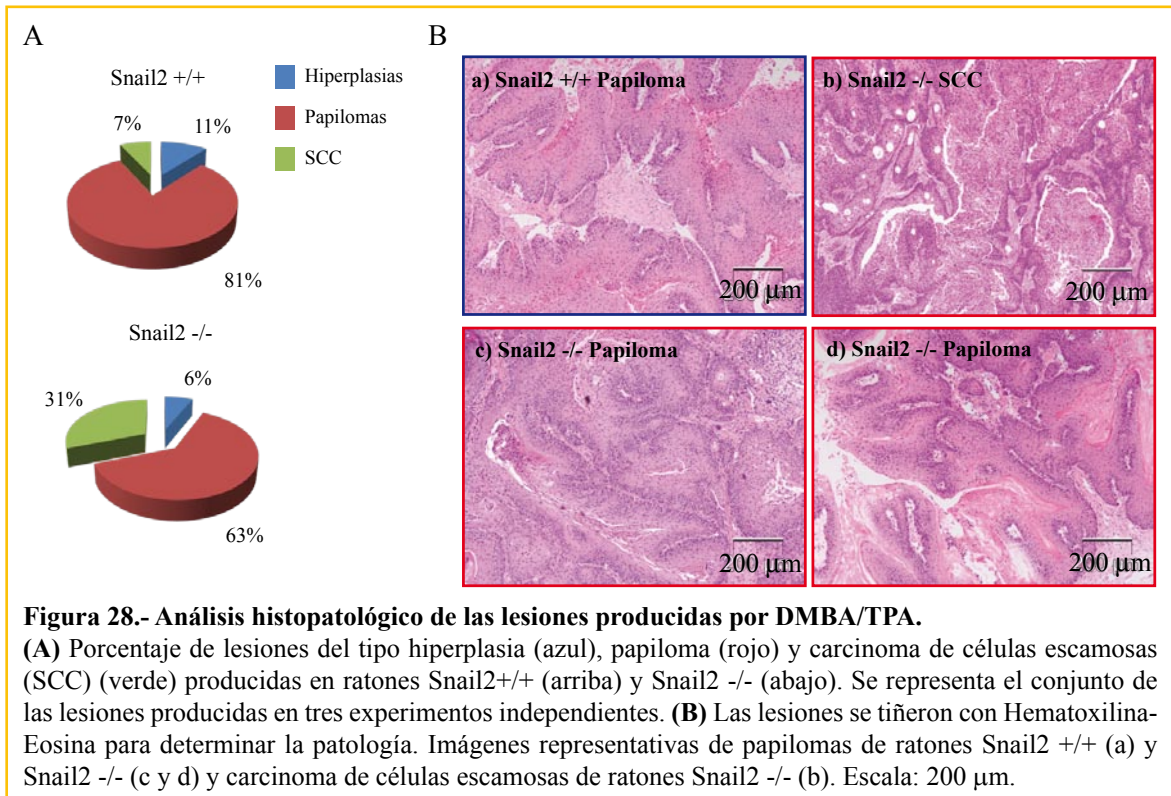
**2.1.2 Análisis inmunohistoquímico de marcadores de diferenciación y proliferación.**

Con objeto de analizar en mayor profundidad las características de las lesiones producidas en ratones Snail2  $+/+$  y Snail2  $-/-$  se estudió la expresión de un número significativo de marcadores mediante el análisis de perfiles de expresión de proteínas en las lesiones. Para ello, se elaboró un TMA (Tissue Microarray) constituido por un total de 24 papilomas, 4 SCC de ambos genotipos y piel control. Debido al papel descrito para Snail2 como represor transcripcional de *cadherina-E* analizamos inicialmente su





expresión en las lesiones generadas en los ratones Snail2 +/+ y Snail2 -/-. No se detectaron diferencias significativas en el patrón de expresión de cadherina-E en las lesiones de ambos genotipos, presentando una localización de membrana en las células de las capas basal y suprabasales en papilomas (Figura 29A, a y c), la disminución en SCC bien diferenciados (datos no mostrados) y una ausencia de expresión en los SCC pobremente diferenciados (Figura 29A, b y d). A continuación se realizó el análisis comparativo de la expresión de 1) marcadores de diferenciación (loricrina, CK10, CK13 y CK8), 2) marcadores proliferación (Ki67 y ciclina D1), y 3) marcadores de muerte celular (TUNEL y p63) en las lesiones derivadas de ratones Snail2 +/+ frente a las lesiones derivadas de ratones Snail2 -/-. El marcador de diferenciación terminal loricrina se expresa de forma restringida en las capas cornificadas de las lesiones Snail2 +/+, como cabría esperar (Figura 29B, a), mientras que lo hace de forma difusa y a lo largo de un mayor número de capas suprabasales en las lesiones Snail2 -/- (Figura 29B, c). La expresión de loricrina se pierde en las lesiones avanzadas, SCC pobremente diferenciados, de ambos genotipos (Figura 29B, b, d). Durante el desarrollo de las lesiones se produce un cambio en el tipo de citoqueratinas expresadas por los queratinocitos, así los papilomas que progresan intercambian inicialmente la CK10 por la CK13 (marcador de papilomas de grado medio) (Gimenez-Conti et al., 1990, Nischt et al., 1988) y en estados



más avanzados la CK13 por la CK8 (marcador de progresión de papiloma a SCC) (Caulin et al., 1993, Larcher et al., 1992, Casanova et al., 2004). El análisis de CK10, CK13 y CK8 (Figura 30) mostró un patrón de expresión de CK10 en las capas suprabasales de las lesiones de ratones Snail2 +/+ acorde con lo descrito previamente en papilomas benignos (Roop et al., 1988) y la pérdida progresiva con la progresión tumoral (Figura 30A, a-c). Significativamente, las lesiones de los ratones Snail2 -/- apenas expresan CK10, incluso en los estadios más benignos (Figura 30A, d) y se pierde por completo en papilomas avanzados (Figura 30A, e). De acuerdo con esto, el análisis de la expresión de CK13 mostró muy altos niveles de expresión en todas las lesiones derivadas de ratones Snail2 -/- (Figura 30B, d-f), incluidos papilomas iniciales, mientras que las lesiones de ratones Snail2 +/+ presentaban distintos grados de expresión de CK13 (Figura 30B, a-c). Por otra parte, la expresión de CK8 se detectó en papilomas avanzados y SCCs de ratones Snail2 -/-, mientras que solo se observó en SCCs de lesiones de ratones Snail2 +/+ (Figura 30C, y resultados no mostrados).

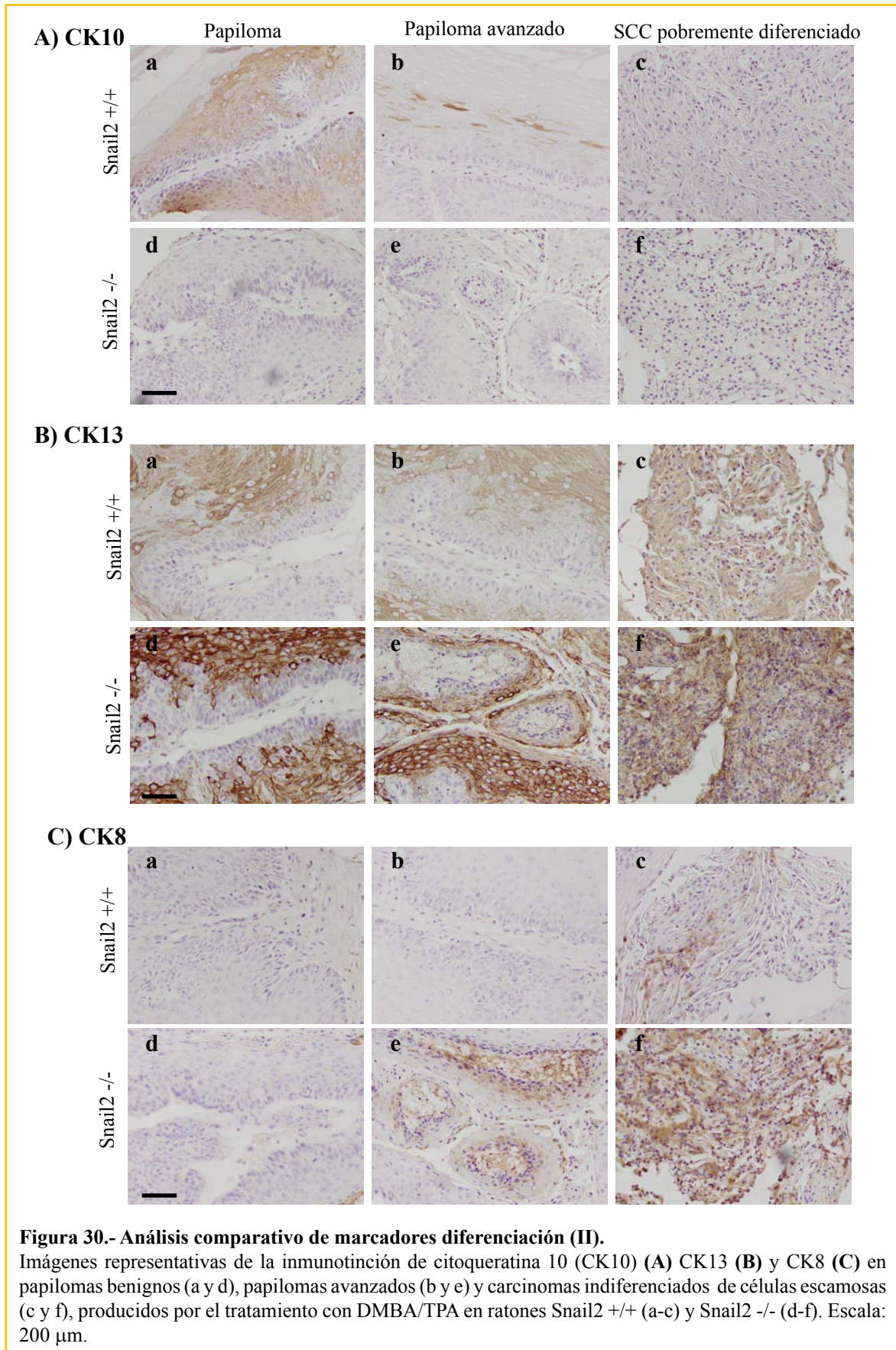
En conjunto, estos resultados indican que los papilomas derivados de ratones Snail2 -/- presentan un menor grado de diferenciación y una mayor tendencia a la progresión maligna que los derivados de ratones Snail2 +/+.

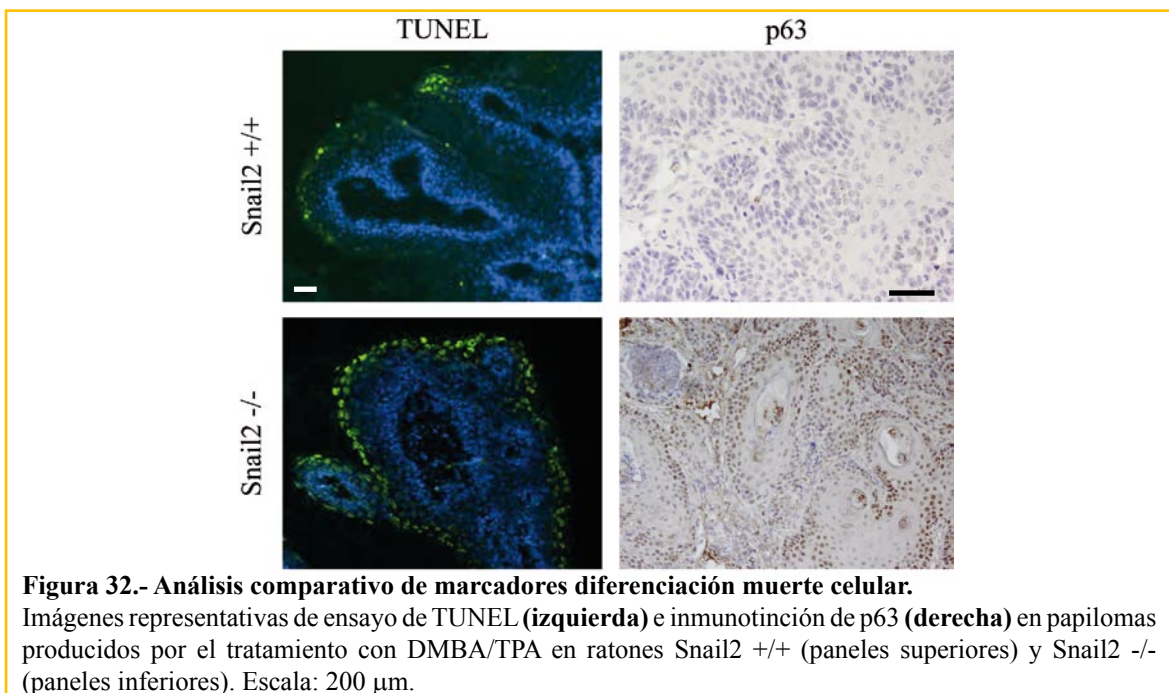
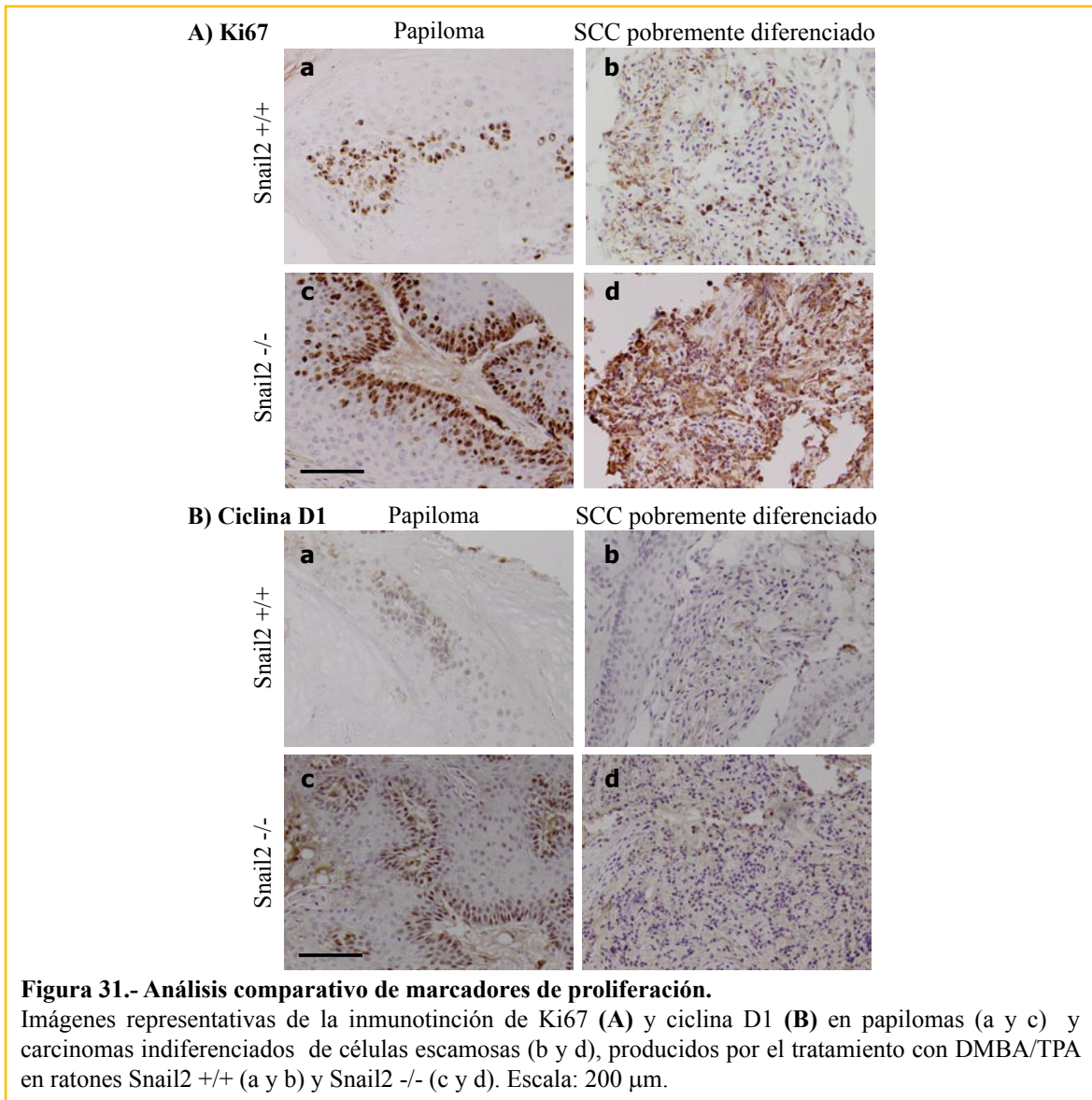
El análisis de los marcadores de proliferación Ki67 y ciclina D1 mostró un aumento significativo de células Ki67 positivas en las lesiones (papilomas y SCC) derivadas de ratones Snail2 -/- con respecto a las lesiones de ratones Snail2 +/+ (12,68%  $\pm$  4,31 frente a 5,39%  $\pm$  1,34 del área de los papilomas Ki67 positiva, respectivamente) (Figura 31A). Como cabría esperar, la expresión de Ki67 en las lesiones Snail2 +/+ se limita a las células proliferativas de la capa basal (Figura 31A, a). Sin embargo, las células Ki67 positivas de las lesiones Snail2 -/- se extienden además por las capas suprabasales (Figura 31A, c). El marcaje para ciclina D1 mostró un menor número de células ciclina D1 positivas en las lesiones Snail2 +/+ que de células Ki67 positivas (Figura 31B, a), mientras que el marcaje para ciclina D1 en los ratones Snail2 -/- es comparable al de Ki67, al menos en los papilomas (Figura 31B, c). En conjunto, estos resultados indican un mayor estado proliferativo de las lesiones derivadas de ratones Snail2 -/- comparadas con las lesiones derivadas de ratones Snail2 +/+.

Debido a que el tamaño de las lesiones se debe a la relación entre la capacidad proliferativa de los queratinocitos y el número de células que mueren por apoptosis, decidimos analizar el grado de apoptosis en las lesiones mediante ensayos de TUNEL e inmunotinción para p63. Como se muestra en la Figura 32, el número de células apoptóticas detectadas por TUNEL en las lesiones Snail2 -/- es significativamente mayor que en las lesiones Snail2 +/+ (Figura 32, panel izquierda). Estos datos están de acuerdo con la tinción para p63 donde se puede ver un aumento significativo en el número de núcleos p63 positivos en las lesiones Snail2 -/-, comparado con las lesiones Snail2 +/+ donde los niveles de p63 son casi indetectables (Figura 32, panel derecha). El aumento de la capacidad apoptótica de las lesiones Snail2 -/- está de acuerdo con el papel asignado a Snail2 en la supervivencia celular tras un daño genotóxico (Inoue et al., 2002, Kajita et al., 2004, Perez-Losada et al., 2003, Wu et al., 2005, )

Estos resultados, junto con anteriores, sugieren que la ausencia de Snail2 favorece la aparición de lesiones y su malignización, debido probablemente al aumento en la capacidad proliferativa de las células del tumor que no se ve compensado por los procesos de apoptosis, y alteraciones en la diferenciación terminal de los queratinocitos.





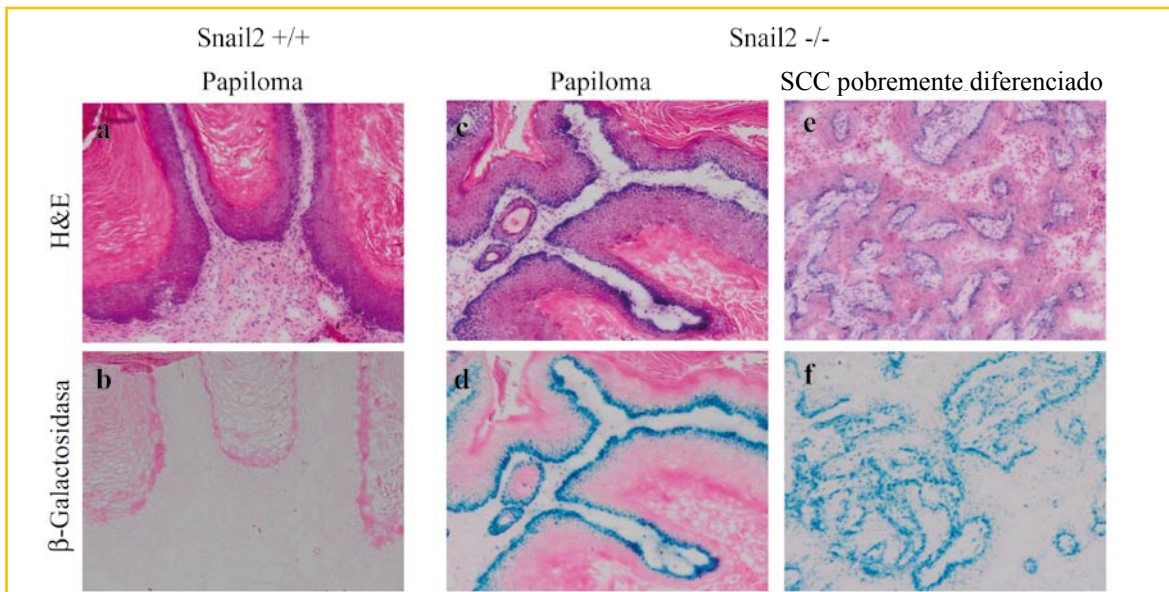




**2.1.3 Análisis indirecto de la expresión de Snail2 en lesiones tumorales.**

Como se ha indicado en la Introducción, el ratón Snail2 *-/-* lleva el gen de  $\beta$ -galactosidasa insertado entre los exones 2 y 3 del gen endógeno, quedando por tanto su expresión bajo la regulación del promotor endógeno de *Snail2* (Jiang et al., 1998b). Utilizamos la expresión del gen de la  $\beta$ -galactosidasa para determinar las células que deberían estar expresando Snail2 en las lesiones de los ratones Snail2 *-/-*. El marcaje con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) de las lesiones mostró que la expresión de  $\beta$ -galactosidasa se restringe mayoritariamente a células de la capa basal de los papilomas y carcinomas (Figura 33), aunque el número de células positivas es muy elevado, extendiéndose adicionalmente a algunas células aisladas de las capas suprabasales (Figura 33 d, f).

Estos resultados indican la expresión restringida de Snail2 en distintos tipos de lesiones a las células proliferativas.



**Figura 33.- Análisis indirecto de la expresión de Snail2 en lesiones tumorales.** Imágenes representativas del marcaje de  $\beta$ -galactosidasa (a-f) contrateñido con Hematoxilina-Eosina (a-e) en papilomas (a-d) y carcinomas de células escamosas (e y f) producidos por el tratamiento con DMBA/TPA en ratones Snail2 +/+ (a y b) y Snail2 -/- (c-f). Escala: 200  $\mu$ m.

**2.2. Caracterización de las funciones intrínsecas de los queratinocitos Snail2 -/- e influencia del entorno tumoral.**

Los resultados anteriores indican que la deficiencia de Snail2 está induciendo un aumento en el número de lesiones producidas por el tratamiento con DMBA/TPA además de favorecer su malignización. Estos resultados sorprenden frente al papel propuesto para Snail2 como inductor de TEM (Bolos et al., 2003), y su valor pronóstico propuesto en ciertos tipos de tumores humanos (revisado en Peinado et al., 2007). Como se describe en la Introducción, el proceso de carcinogénesis no depende solo de los queratinocitos de la epidermis, sino que consiste en un sistema complejo de interacciones entre la dermis y la epidermis, y entre las células del tumor y el microambiente tumoral que pueden favorecer ó impedir la aparición de lesiones y su progresión.

Para dilucidar el papel de Snail2 en la inducción y progresión maligna, decidimos analizar el efecto de la delección de Snail2 en las funciones intrínsecas de los queratinocitos y la respuesta de éstos al entorno tumoral.

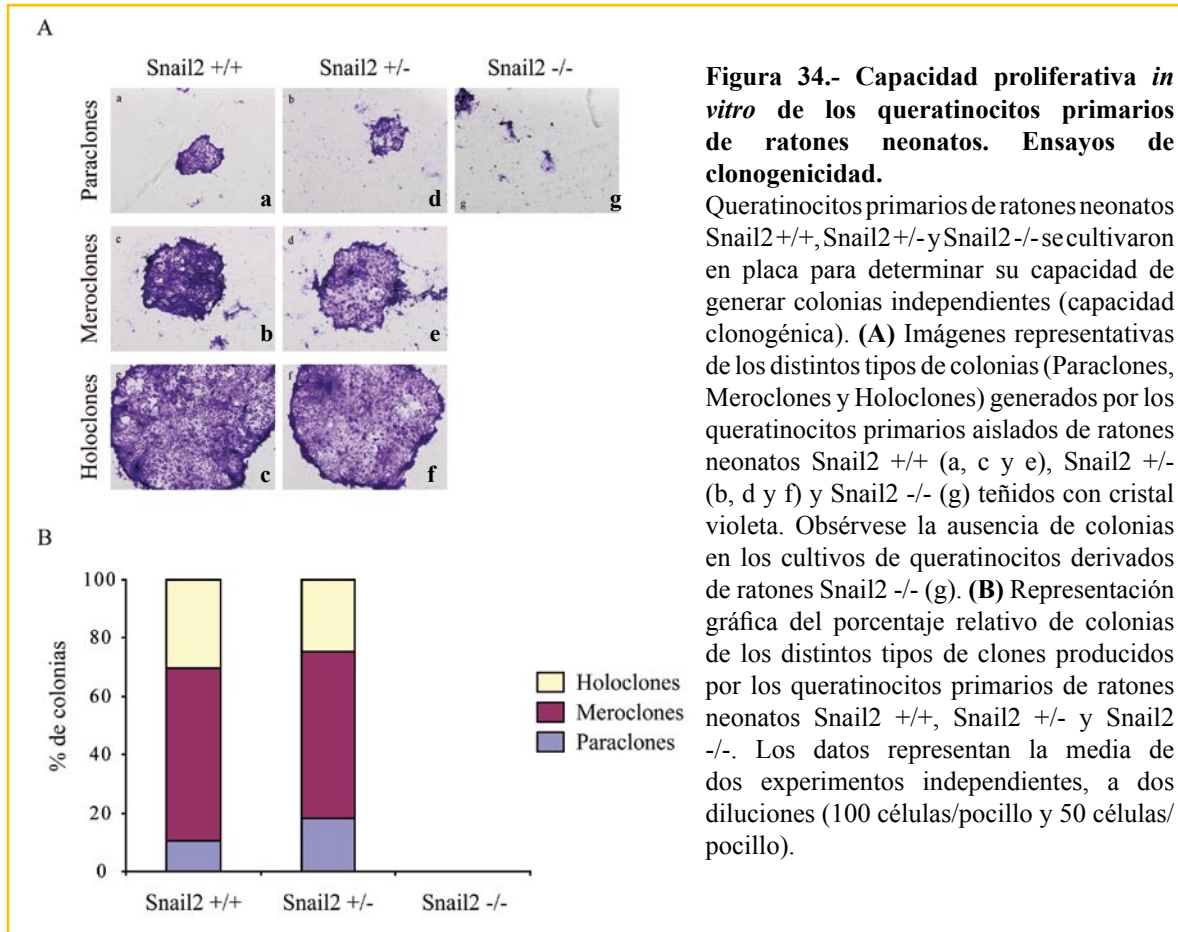
**2.2.1 Proliferación *in vitro*.**

Como mostramos anteriormente, la ausencia de Snail2 induce un aumento en la proliferación de las células de los tumores. Para caracterizar si esta capacidad es intrínseca de los queratinocitos Snail2 <sup>-/-</sup> decidimos estudiar la capacidad proliferativa de éstos mediante ensayos de clonogenicidad con queratinocitos primarios aislados de ratones neonatos (2-3 días p.n.) Snail2 <sup>+/+</sup>, Snail2 <sup>+/-</sup> y Snail2 <sup>-/-</sup>. En estos ensayos los queratinocitos primarios crecen en placa formando tres tipos de colonias (Barrandon and Green, 1987), diferenciables por su tamaño, morfología, capacidad proliferativa y grado de diferenciación (ver Tabla X). Como se muestra en la Figura 34, tanto los queratinocitos Snail2 <sup>+/+</sup> como los queratinocitos Snail2 <sup>+/-</sup> son capaces de formar los tres tipos de colonias en proporciones similares (Figura 34). Sin embargo, los queratinocitos deficientes en Snail2 no son capaces de formar ningún tipo de colonias. Además, obtuvimos cultivos primarios de queratinocitos Snail2<sup>+/+</sup> y Snail2 <sup>+/-</sup>, pero no fue posible obtener estos cultivos a partir de los queratinocitos Snail2 <sup>-/-</sup> (datos no mostrados).

Estos datos demuestran que Snail2 es esencial para la supervivencia y proliferación de los queratinocitos, y sugieren un papel importante del entorno en la supervivencia de los queratinocitos Snail2 <sup>-/-</sup> *in vivo*.

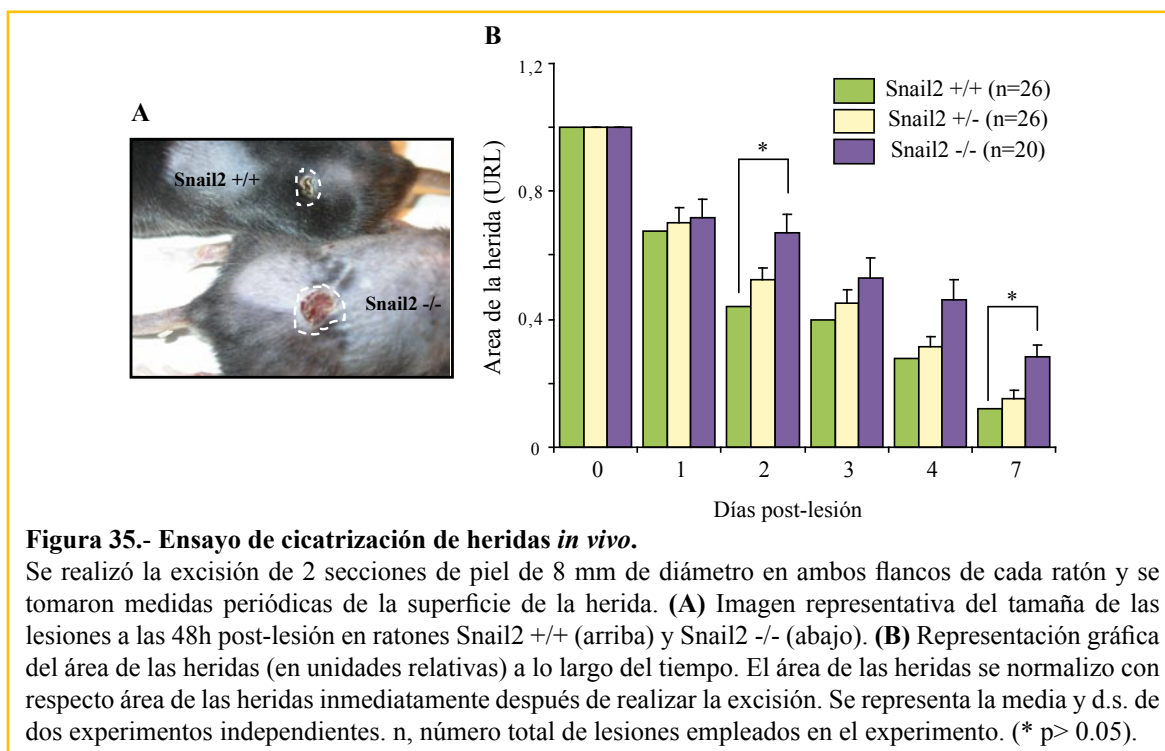
**Tabla X. Ensayos de clonogenicidad: tipos de clones**

	Holoclones	Meroclones	Paraclones
<b>Capacidad proliferativa</b>	+++	++	-
<b>Estado de diferenciación</b>	-	++	+++



**2.2.2 Cicatrización de heridas.**

Utilizamos los ensayos de cicatrización de heridas como modelo para estudiar inicialmente el efecto del entorno sobre la capacidad proliferativa y mótil de los queratinocitos. Como se muestra en la Figura 35, el proceso de cicatrización de heridas es más lento en los ratones Snail2 -/- que en los ratones Snail2 +/+ y Snail2 +/- . Así, dos días después de realizarse las lesiones, los ratones control ya habían cerrado el 56% del área de la lesión, mientras que los ratones Snail2 -/- solo habían cerrado el 33% de la herida (n=26 y n=20, respectivamente, p<0.05), y estas diferencias se seguían manteniendo tras una semana (Figura 35B). Los resultados obtenidos están de acuerdo con estudios previos del laboratorio del Dr. Savagner sobre la reparación de heridas *in vitro* que indican que los queratinocitos Snail2 -/- tienen menor capacidad migratoria que los queratinocitos de ratones Snail2 +/+ (Savagner et al., 2005).

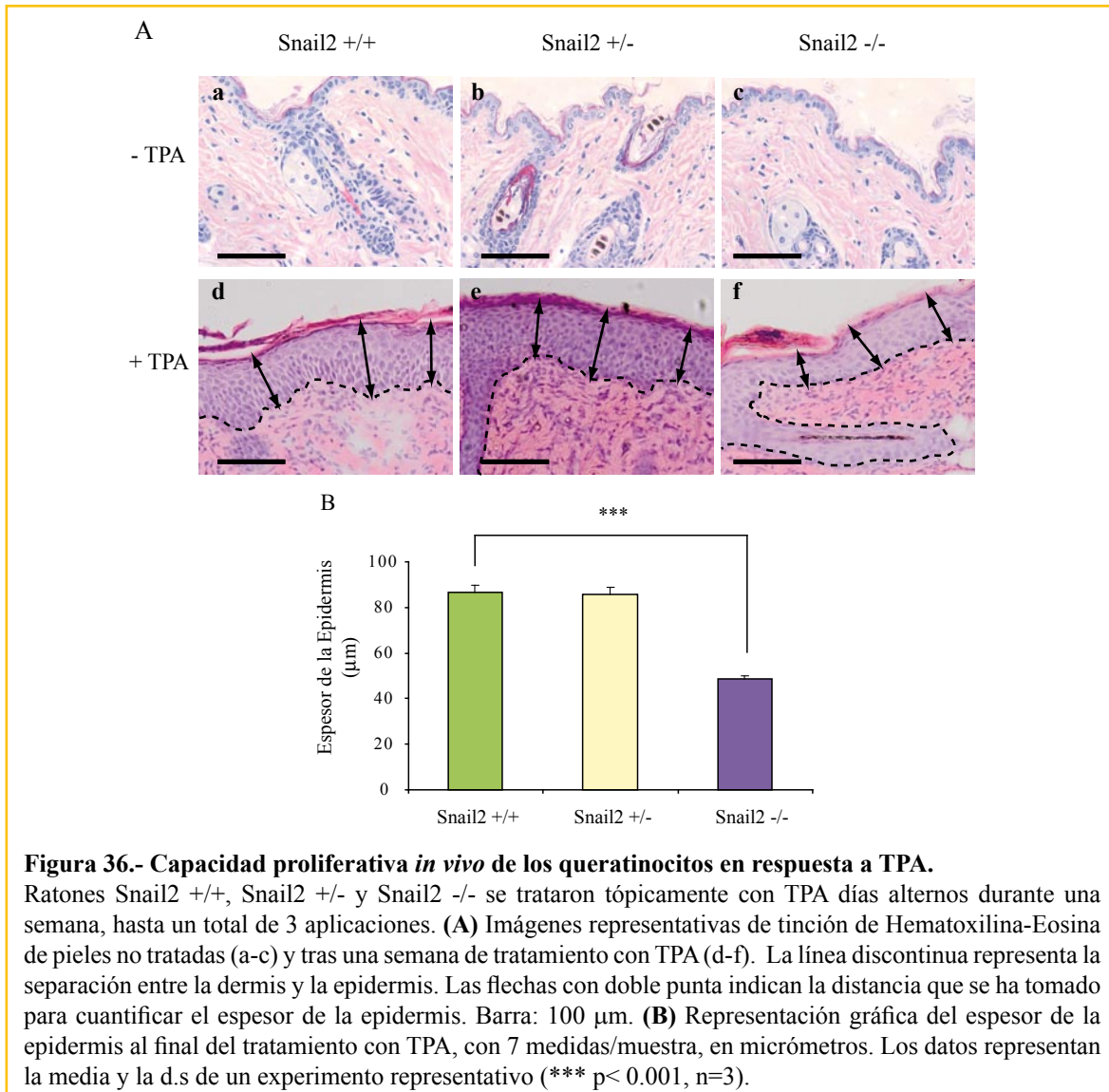


**2.2.3 Capacidad proliferativa in vivo en respuesta a TPA.**

Otro tipo de aproximación experimental para estudiar la capacidad proliferativa de los queratinocitos *in vivo* consiste en el tratamiento tópico de la piel del dorso de los ratones con TPA, provocando la hiperproliferación de la epidermis. Para analizar la respuesta proliferativa en estas condiciones *in vivo* tratamos ratones Snail2 +/+, Snail2 +/- y Snail2 -/- con TPA durante una semana. Al final del tratamiento se recogieron las pieles de ratones y se tiñeron secciones de 10 µm con hematoxilina-eoxina (Figura 36A) para determinar el grosor de la epidermis tras el tratamiento con TPA, mediante el programa informático Cella (Leica) (Figura 36B). Las pieles no tratadas no presentaban diferencias significativas en cuanto al grosor de la epidermis entre los tres genotipos (Figura 36A, a-c). Sin embargo, el tratamiento con TPA induce un mayor engrosamiento de la epidermis en los ratones Snail2 +/+ y Snail2 +/- comparado con los ratones Snail2 -/- (Figura 36A, d-f). Mientras que la piel de los ratones Snail2 +/+ (n=34) presentaba un espesor de 86,59 ± 3,28 µm (similar a la piel de los ratones Snail2 +/-), la piel de los ratones Snail2 -/- sólo tenía un espesor de 48,51 ± 1,45 µm (n=34, p< 0,001) (Figura 36B).

Estos resultados sugieren que la ausencia de Snail2 dificulta la capacidad de proliferación y/o aumenta la capacidad de diferenciación de los queratinocitos en respuesta a TPA.



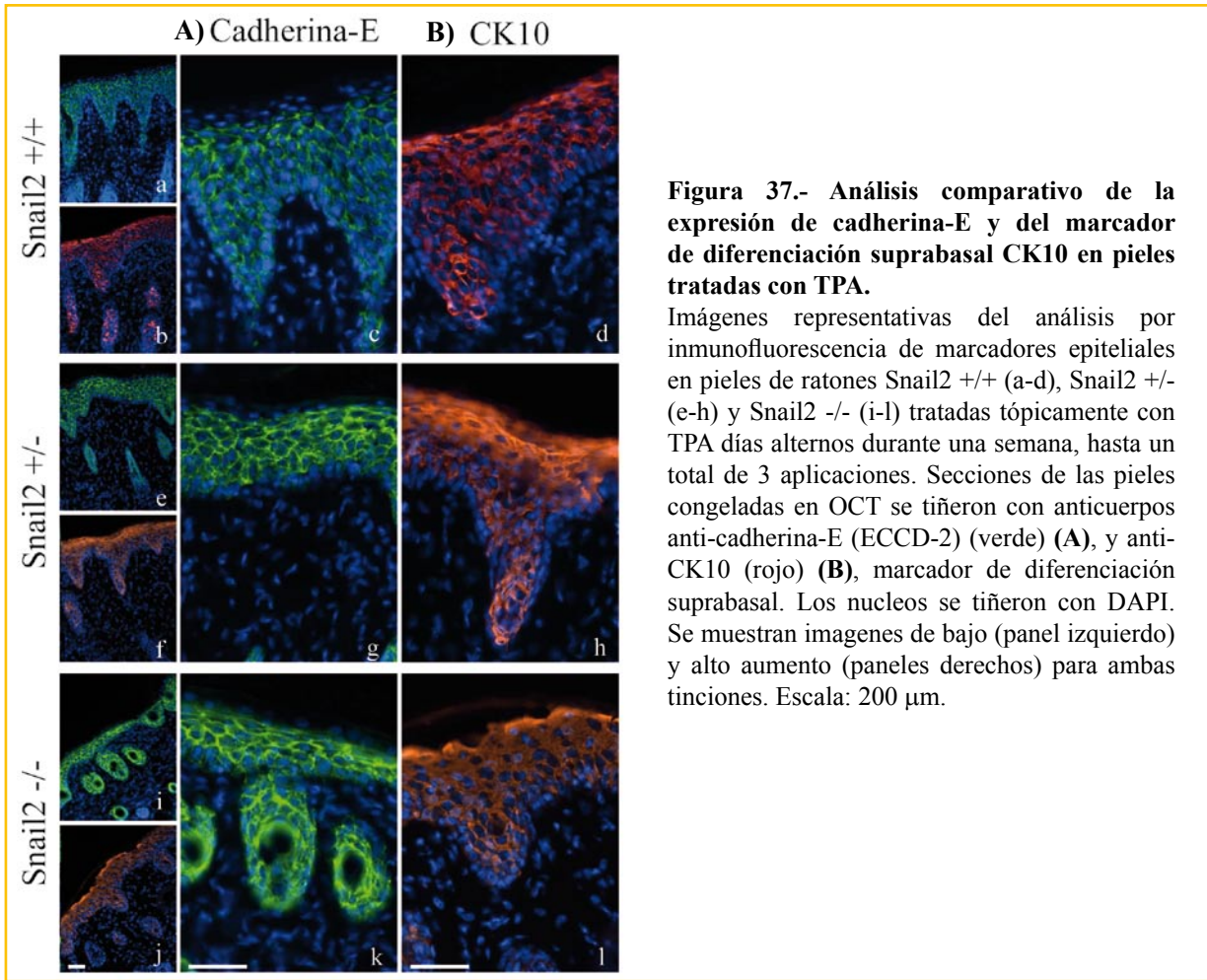


**Figura 36.- Capacidad proliferativa *in vivo* de los queratinocitos en respuesta a TPA.**

Ratones Snail2 +/+, Snail2 +/- y Snail2 -/- se trataron tópicamente con TPA días alternos durante una semana, hasta un total de 3 aplicaciones. **(A)** Imágenes representativas de tinción de Hematoxilina-Eosina de pieles no tratadas (a-c) y tras una semana de tratamiento con TPA (d-f). La línea discontinua representa la separación entre la dermis y la epidermis. Las flechas con doble punta indican la distancia que se ha tomado para cuantificar el espesor de la epidermis. Barra: 100 µm. **(B)** Representación gráfica del espesor de la epidermis al final del tratamiento con TPA, con 7 medidas/muestra, en micrómetros. Los datos representan la media y la d.s de un experimento representativo (\*\*\*) p < 0.001, n=3).

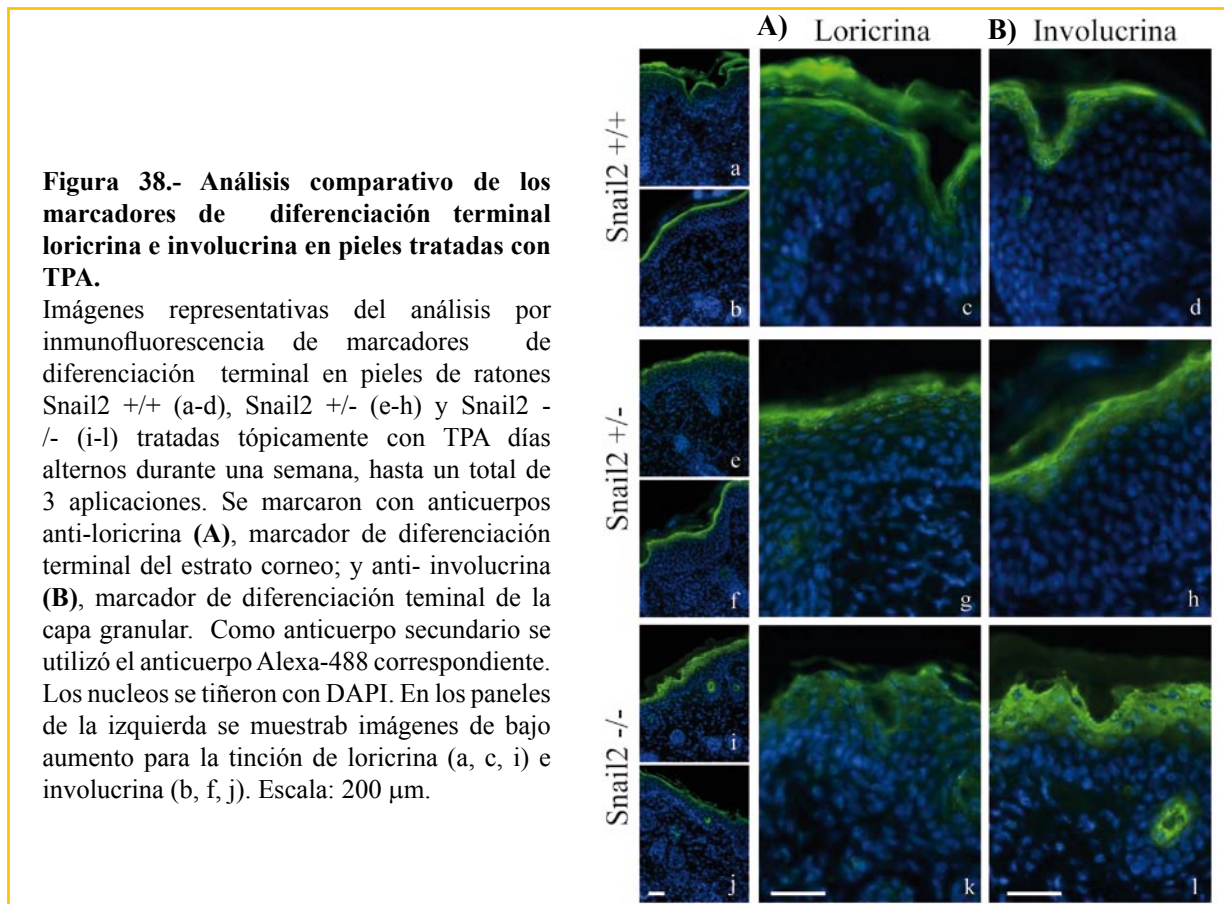
Quisimos estudiar entonces el proceso de diferenciación epitelial en pieles tratadas con TPA, para lo cual marcamos las pieles tratadas con anticuerpos específicos para CK10, involucrina y loricrina, como marcadores de diferenciación epidérmica suprabasal y terminal, respectivamente. Asimismo, analizamos la expresión de cadherina-E como control de la estructura de la epidermis. Como se muestra en la Figura 37, no se apreciaron diferencias significativas en la expresión de cadherina-E (Figura 37, comparar c, g y k) y CK10 (Figura 37, comparar d, h, l) entre las pieles tratadas con TPA de ratones Snail2 +/+, Snail2 +/- y Snail2 -/-. Sin embargo, el patrón de expresión de loricrina e involucrina se encuentra alterado en las pieles de los ratones Snail2 -/- tratados con TPA que presentan un mayor número de capas marcadas para loricrina e involucrina y con un patrón de expresión difuso (Figura 38) que las pieles de los ratones Snail2 +/+ y Snail2 +/- tratados con TPA (Figura 38 e, g y d, h, respectivamente).

Estos resultados sugieren un defecto en la diferenciación terminal de la epidermis en ausencia de Snail2.



**Figura 37.- Análisis comparativo de la expresión de cadherina-E y del marcador de diferenciación suprabasal CK10 en pieles tratadas con TPA.**

Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia de marcadores epiteliales en pieles de ratones Snail2 +/+ (a-d), Snail2 +/- (e-h) y Snail2 -/- (i-l) tratadas tópicamente con TPA días alternos durante una semana, hasta un total de 3 aplicaciones. Secciones de las pieles congeladas en OCT se tiñeron con anticuerpos anti-cadherina-E (ECCD-2) (verde) (A), y anti-CK10 (rojo) (B), marcador de diferenciación suprabasal. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se muestran imágenes de bajo (panel izquierdo) y alto aumento (paneles derechos) para ambas tinciones. Escala: 200  $\mu$ m.



**Figura 38.- Análisis comparativo de los marcadores de diferenciación terminal loricrina e involucrina en pieles tratadas con TPA.**

Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia de marcadores de diferenciación terminal en pieles de ratones Snail2 +/+ (a-d), Snail2 +/- (e-h) y Snail2 -/- (i-l) tratadas tópicamente con TPA días alternos durante una semana, hasta un total de 3 aplicaciones. Se marcaron con anticuerpos anti-loricrina (A), marcador de diferenciación terminal del estrato corneo; y anti- involucrina (B), marcador de diferenciación teminal de la capa granular. Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo Alexa-488 correspondiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. En los paneles de la izquierda se muestrab imágenes de bajo aumento para la tinción de loricrina (a, c, i) e involucrina (b, f, j). Escala: 200  $\mu$ m.

## 2.2.4 Análisis indirecto de la expresión de Snail2 en la piel de los ratones tratados con TPA.

### Expresión de $\beta$ -galactosidasa.

Estudios recientes de análisis de perfiles de expresión génica en pieles de ratones Snail2 +/+ y Snail2 -/- han puesto de manifiesto el papel de Snail2 en la regulación de la homeostasis de la piel (Newkirk, 2008b). Con el fin de profundizar en este aspecto decidimos estudiar el patrón de expresión de Snail2 en las pieles y los folículos pilosos de ratones Snail2 +/- y Snail2 -/-, así como el efecto del tratamiento con TPA. Para abordar este objetivo, y de forma similar a lo realizado en las lesiones tumorales, analizamos la expresión de  $\beta$ -galactosidasa en los folículos pilosos (FP) y las pieles de ratones Snail2 +/- y Snail2 -/- tratados y no tratados con TPA.

Como se muestra en la Figura 39, la tinción con X-gal de FPs de la cola de ratones Snail2 +/- y Snail2 -/- es discontinua, expresándose  $\beta$ -galactosidasa en franjas bien delimitadas (Figura 39B). Sorprendentemente, el número de FPs con actividad  $\beta$ -galactosidasa es significativamente mayor en la cola de ratones Snail2 -/- que en los ratones Snail2 +/- (Figura 39 B y C). Sin embargo, cuando estudiamos el patrón de expresión de  $\beta$ -galactosidasa dentro del FPs no observamos diferencias significativas en la distribución de la expresión a lo largo del FP entre ambos genotipos (Figura 39 E). El análisis de secciones de 10  $\mu$ m de pieles del dorso de ratones Snail2 +/+, Snail2 +/- y Snail2 -/- de dos a tres meses de edad mostró un patrón de expresión discontinuo, como ocurría en la cola (Figura 39 A b, c). Además, la mayoría de los queratinocitos de la capa basal de los ratones Snail2 -/- expresaban  $\beta$ -galactosidasa, mientras que en los ratones Snail2 +/- la expresión de  $\beta$ -galactosidasa presentaba un patrón más discontinuo y una intensidad menor (Figura 39A b, c y 39D).

Mediante la tinción con X-gal de cortes seriados de las pieles tratadas con TPA se reconstruyó la estructura de los FPs en las pieles tratadas con TPA y se determinó la expresión de  $\beta$ -galactosidasa en los FPs. Como se muestra en la Figura 39F, la expresión de  $\beta$ -galactosidasa tiene lugar a lo largo de todo el FPs, al igual que sucede en los FPs de la cola (Figura 39E), independientemente de presencia o no de Snail2. Sorprendentemente, las mayores diferencias en la expresión de  $\beta$ -galactosidasa tras el tratamiento con TPA se detectaron en la epidermis interfolicular (EIF) donde el tratamiento con TPA produce aparentemente una tinción más homogénea y de mayor intensidad en la piel de los ratones Snail2 -/- comparada con la de los ratones Snail2 +/- (Figura 39A e, f y Figura 39D).

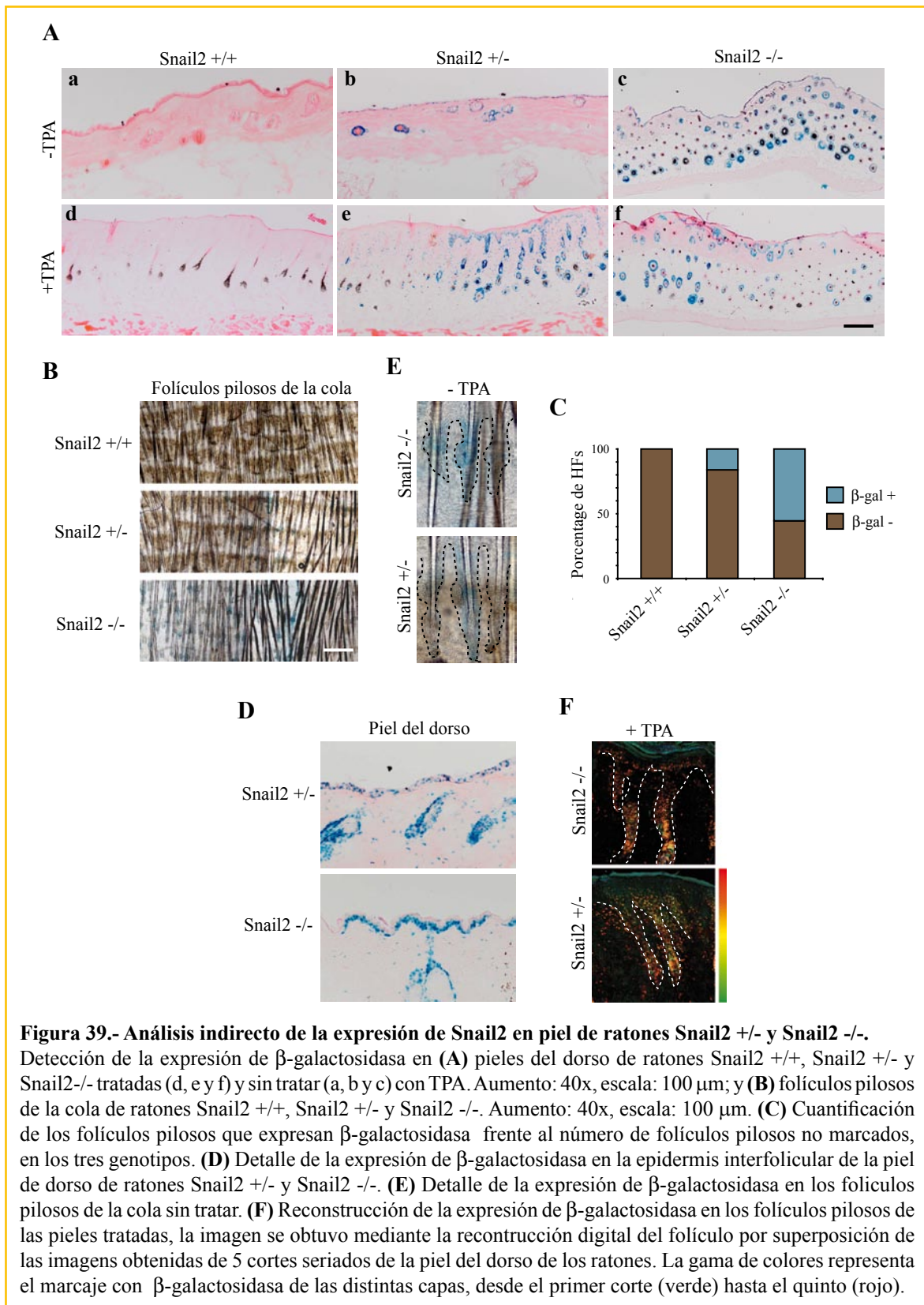
Estos análisis indican que el promotor de *Snail2* se expresa principalmente en algunas células de la capa basal y a lo largo del folículo piloso. Sorprendentemente, la ausencia de Snail2 aumenta los niveles de expresión del su promotor endógeno, sugiriendo un papel autorregulador negativo de Snail2, si bien quedaría por caracterizar el mecanismo por el cual tiene lugar esta autorregulación.

## 2.3. Inflamación, Snail2 y carcinogénesis química.

En conjunto, los resultados de la caracterización de los queratinocitos Snail2 -/- indican que los queratinocitos *per se* y la respuesta inicial de la epidermis a las heridas o al tratamiento con TPA no podían ser responsables de la mayor incidencia y progresión de las lesiones inducidas por DMBA/TPA en los ratones Snail2 -/-, ya que los queratinocitos aislados no son capaces de formar colonias, y presentan serias dificultades para crecer en cultivo, incluso acompañados de células nodriza. Además, en condiciones *in vivo* tienen deficiencias en la capacidad proliferativa y/o migratoria en respuesta a diferentes estímulos (TPA, cicatrización), lo cual es esencial en un proceso neoplásico como es la carcinogénesis química.

Como se indica en la Introducción, el protocolo de carcinogénesis química induce mutaciones en





las células de la capa basal (células iniciadas) y además promueve el reclutamiento de células del sistema inflamatorio cuya función inicial sería controlar el crecimiento descontrolado de estas células iniciadas (Allavena et al., 2008b, Allavena et al., 2008c, Mantovani et al., 2008, Sica et al., 2008). Debido a que Snail2 ha sido relacionado con la homeostasis de los progenitores hematopoyéticos y se han caracterizado alteraciones en la respuesta de este sistema en los ratones Snail2 -/- (Inoue et al., 2002, Perez-Losada et al., 2003, Wu et al., 2005), decidimos analizar el estado inflamatorio de los ratones Snail 2 -/- tras el protocolo de carcinogénesis química. El estudio histopatológico de los órganos internos de ratones Snail2 +/+ y Snail2 -/- sometidos al protocolo de carcinogénesis química con DMBA/TPA desveló que los ratones deficientes en Snail2 -/- presentaban un mayor número de alteraciones relacionadas con el sistema inmunológico en los órganos internos comparados con los ratones control Snail2 +/+ (Tabla XI). Así, se observaron alteraciones importantes en el hígado, el bazo, los ganglios inguinales y los pulmones. El análisis histopatológico de los órganos internos de ratones Snail2 +/+ y Snail2 -/- no tratados descartó que las lesiones pudieran deberse al envejecimiento del ratón. Así, las alteraciones observadas en bazo y testículos (Tabla XI) son las correspondientes al fondo genético, de acuerdo con la literatura (Jiang et al., 1998b).

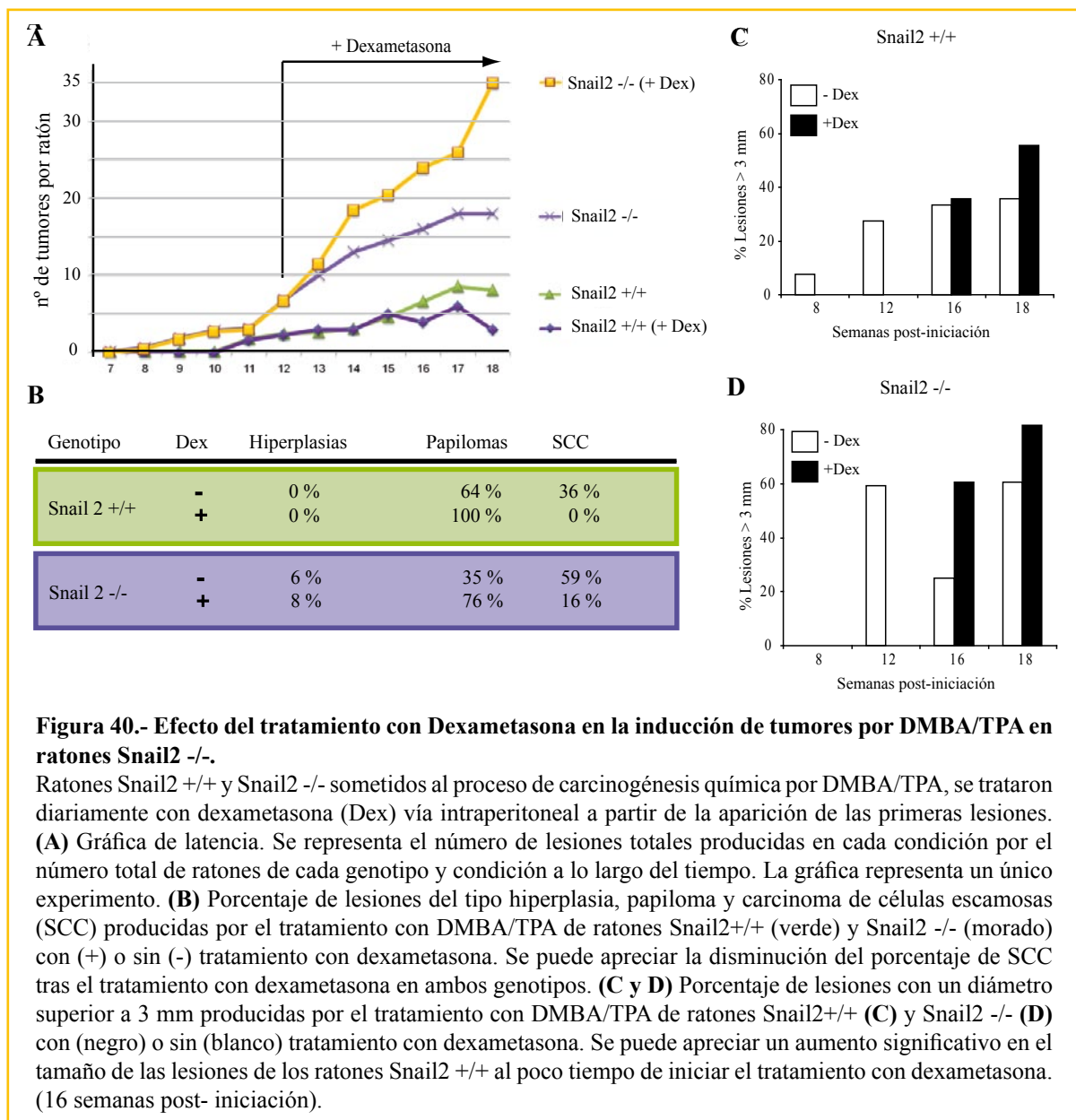
Significativamente, el análisis histopatológico detallado de las lesiones tumorales producidas por el tratamiento con DMBA/TPA manifestó que las lesiones de los ratones Snail2 -/- presentaban procesos purulentos y infiltraciones de linfocitos, neutrófilos y macrófagos, que no ocurrían en las lesiones de los ratones Snail2 +/+ (Figura 41 a, b). Estos datos indican que los ratones Snail2 -/-, tras el tratamiento con DMBA/TPA, presentan una respuesta inflamatoria anómala que podría estar favoreciendo la aparición y progresión de las lesiones en los ratones Snail2 -/-. Para confirmar esta hipótesis tratamos los ratones con un anti-inflamatorio esteroideo, como la dexametasona descrito previamente en la literatura como un protector frente al desarrollo de lesiones inducidas por DMBA/TPA (Perez-Moreno et al., 2006, Perez-Moreno et al., 2008). Iniciamos el protocolo de carcinogénesis química por DMBA/TPA y cuando el 100% de los

**Tabla XI.- Análisis histopatológico de los órganos de los ratones tratados con DMBA/TPA.**

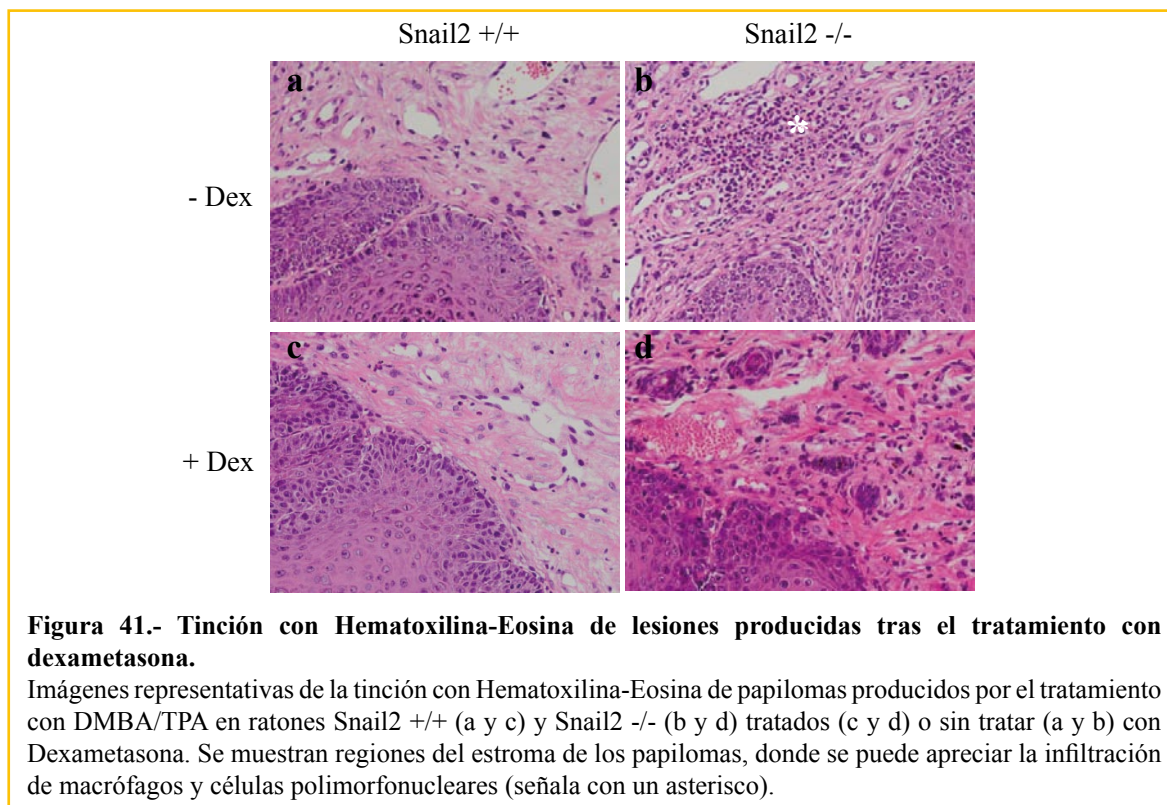
Órgano	Lesión	Snail2 -/-	Snail2 +/+
Intestino Grueso	Necrosis apical de vellosidades en el duodeno	+	-
Hígado	Severa inflamación perivascular	++	-
	Infiltración linfocitaria en sinusoides	+	-
	Infiltración mixta difusa por todo el organo	+++	-
Bazo	Depleción linfoide	++	-
	Hiperplasia celular de la pulpa roja	++	-
	Necrosis con perdida de estructura	+	-
	Predominio de células mieloides y macrófagos	+	-
	Congestión	++	-
Ganglios	Depleción linfoide	+	-
	Histiocitosis/plasmocitosis de los senos linfaticos	++	-
Pulmón	Infiltración de neutrófilos PMN	++	-
Lesiones presentes en ratones no tratados (7 meses)			
Hígado	Degeneración vacuolar hepática	-	++
Bazo	Depleción mieloide	++	-
Testículos	Degeneración severa de la línea germinal en tubulos seminiferos	+	-

PMN: polimorfonucleares

ratones presentaban lesiones se inició el tratamiento con dexametasona, por inyección intraperitoneal, que se mantuvo hasta el final del experimento. Como se muestra en la figura 40, sorprendentemente, y contrariamente a lo esperado, la administración de dexametasona en los ratones Snail2  $-/-$  duplicó el número de lesiones al final del experimento, mientras que en los ratones Snail2  $+/+$  disminuyó ligeramente el número de lesiones (Figura 40A), como cabía esperar. El análisis histopatológico de las lesiones desveló que el tratamiento con dexametasona había disminuido significativamente la aparición de SCC en los ratones Snail2  $+/+$  y Snail2  $-/-$  (Figura 40B). No obstante, el tratamiento con dexametasona provocó un aumento del tamaño de las lesiones en los ratones Snail2  $-/-$  (Figura 40 D) mientras que no afectó al tamaño de las lesiones en los ratones Snail2  $+/+$ , excepto a tiempos largos (Figura 40C). La tinción con hematoxilina-eosina de las lesiones producidas tras el tratamiento con dexametasona confirmó un descenso en el número de macrófagos infiltrantes presente en las lesiones Snail2  $+/+$  tras el tratamiento (Figura 41, comparar a y c), pero esa disminución era menos significativa en las lesiones de los ratones Snail2  $-/-$ , donde se mantenía un gran número de células infiltrantes tras el tratamiento con dexametasona (Figura 41, comparar b y d).



Estos resultados sugieren diferencias importantes en el proceso inflamatorio asociado al tratamiento con DMBA/TPA entre los ratones Snail2  $+/+$  y Snail2  $-/-$ . Así, la administración de dexametasona estaría bloqueando la progresión maligna y la aparición de nuevas lesiones en los ratones control, mientras que en los ratones Snail2  $-/-$  bloquearía la progresión tumoral pero favorecería la aparición de nuevas lesiones. Queda por realizar un análisis más exhaustivo de los procesos inflamatorios anti y pro-tumorales inducidos por la ausencia de Snail2 en este modelo.



**Figura 41.- Tinción con Hematoxilina-Eosina de lesiones producidas tras el tratamiento con dexametasona.**

Imágenes representativas de la tinción con Hematoxilina-Eosina de papilomas producidos por el tratamiento con DMBA/TPA en ratones Snail2  $+/+$  (a y c) y Snail2  $-/-$  (b y d) tratados (c y d) o sin tratar (a y b) con Dexametasona. Se muestran regiones del estroma de los papilomas, donde se puede apreciar la infiltración de macrófagos y células polimorfonucleares (señala con un asterisco).

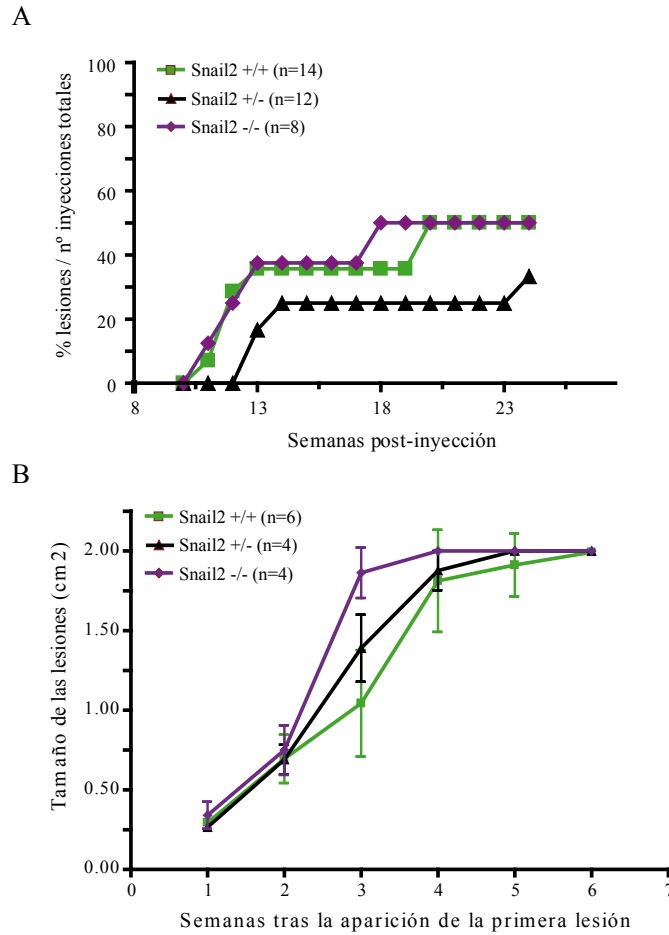
**2.4. Efecto de la delección de Snail2 en la carcinogénesis por metilcolantreno.**

Finalmente, para analizar si los efectos observados en la carcinogénesis inducida por DMBA/TPA, en la ausencia de Snail2, son extensibles a otros protocolos de carcinogénesis, realizamos un ensayo de carcinogénesis inducida por metilcolantreno (MCA) que promueve la aparición de fibrosarcomas (Reddy and Fialkow, 1979).

Como se observa en la figura 42A, la latencia y carga tumoral (% de tumores inducidos) inducida por MCA fue similar en los ratones Snail2  $+/+$  y Snail2  $-/-$ . Curiosamente, los ratones heterocigotos Snail2  $+/-$  desarrollaron lesiones con mayor latencia y menor carga tumoral (Figura 42A). No obstante, las lesiones inducidas por MCA en los ratones Snail2  $-/-$  proliferan aparentemente más rápidamente que las inducidas en ratones Snail2  $+/+$ , a juzgar por la evolución del tamaño de las lesiones tras su aparición, en comparación con las lesiones inducidas en los ratones Snail2  $+/+$  y Snail2  $+/-$  (Figura 42B).

Estos resultados sugieren que la ausencia de Snail2, aumenta la capacidad proliferativa de las lesiones inducidas por MCA, al igual que ocurre con las lesiones inducidas por DMBA/TPA.

El análisis histopatológico de las lesiones inducidas por MCA mostró la aparición de fibrosarcomas en el 100% de los casos, independientemente del genotipo de los ratones analizados.



**Figura 42.- Efecto de la delección de Snail2 en la inducción de fibrosarcomas por MCA**

Se inyectaron ambos flancos de ratones Snail2 +/+, Snail2 +/- y Snail2 -/- con MCA por vía subcutánea. **(A)** Gráfica de carga tumoral. Se representa el número de lesiones totales producidas en cada genotipo por el número total de inyecciones para cada genotipo. (n, número de flancos inyectados). **(B)** Gráfica de la progresión del tamaño de las lesiones a lo largo del experimento. Se representa el tamaño de las lesiones en cm<sup>2</sup> durante las semanas después de su aparición, hasta que alcanzan los 2 cm de diámetro (4 cm<sup>2</sup>) tras lo cual se sacrifica al animal. Se puede apreciar que en los ratones Snail2 -/- el tamaño de las lesiones aumenta a un ritmo mucho mayor que en los ratones Snail2 +/+ y Snail2 +/- (n, número de ratones que generaron lesiones durante el experimento).



## **DISCUSIÓN**

---



## 1. CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LOS DOMINIOS DE SNAIL2 EN LA REPRESIÓN DEL PROMOTOR DE *CADHERINA-E*

En los últimos años se han caracterizado varios factores de transcripción, que habían sido implicados previamente en la pérdida de expresión de cadherina-E durante el desarrollo embrionario, y que actúan como represores transcripcionales de Cadherina-E (Nieto, 2002, Peinado et al., 2004a, Peinado et al., 2007, Thiery, 2002, Thiery et al., 2009). Entre estos factores se encuentran los factores de dedos de zinc Snail1 y Snail2 (Batlle et al., 2000, Bolos et al., 2003, Cano et al., 2000, Hajra et al., 2002). La expresión estable de estos factores en células MDCK-II de lugar a la pérdida de cadherina-E y a una TEM (Bolos et al., 2003, Cano et al., 2000). El análisis de los perfiles de expresión génica de células MDCK-II expresando de forma estable Snail1 o Snail2 permitió identificar una batería de genes que eran regulados de forma común o específica por cada uno de estos factores (Moreno-Bueno et al., 2006). Por otra parte, estudios sobre el comportamiento tumorigénico, invasivo y angiogénico han permitido determinar la existencia de diferencias significativas entre los factores Snail y bHLH (Peinado et al., 2004b, Bolos et al., 2003, Moreno-Bueno et al., 2006, Sobrado et al., 2009). Estos resultados sugieren que estos factores pueden tener un papel general y otro específico (no redundante) durante la TEM. En apoyo de esta hipótesis es el hecho de que distintos inductores de TEM, y en concreto los factores Snail son esenciales durante el desarrollo embrionario de ratón y la progresión tumoral (Carver et al., 2001). Snail2 es dispensable en el embrión pero es necesario en el adulto para la homeostasis de determinados linajes celulares (Jiang et al., 1998a, Perez-Losada et al., 2003). Durante el desarrollo embrionario el papel diferencial de Snail1 y Snail2 queda también explicado por su diferente patrón de expresión (Nieto et al., 1994, Sefton et al., 1998) aunque este hecho no explica las diferencias observadas entre células estables para Snail1 o Snail2. Los mecanismos moleculares responsables de la regulación diferencial llevada a cabo por ambos factores son todavía desconocidos. La diferente afinidad de estos factores por las cajas-E del promotor de *cadherina-E* (Bolos et al., 2003) causadas probablemente por las diferencias estructurales existentes entre ambos factores puede estar en la base del papel específico que juega cada uno de ellos.

Otra razón posible de las diferencias observadas podría deberse a divergencias en la capacidad de reclutamiento de complejos de represión. Un aspecto clave es la caracterización de los dominios funcionales implicados en la unión de Snail1 y Snail2 a los promotores diana así como los complejos de represión reclutados por Snail1 y Snail2 para llevar a cabo su acción represora. Trabajos previos del laboratorio se han centrado en la caracterización funcional y en la identificación de los complejos reclutados por Snail1 (Peinado et al., 2004c, Peinado and Cano, 2005). En esta tesis se han llevado a cabo dichos estudios con el factor Snail2.

### 1.1. Regulación de la expresión de *cadherina-E* a través de los dedos de zinc 2 y 5 de Snail2.

Snail1 y Snail2 se diferencian en el número de dedos de zinc que conforman su dominio de unión al DNA, conteniendo 4 y 5 dedos de zinc respectivamente (Figura 5). Los resultados obtenidos en esta tesis mediante el análisis de mutantes no funcionales de los dedos de zinc, muestran que el dedo ZF1 de Snail2 no es funcional, como ya se había sugerido previamente (Grimes et al., 1996, Hemavathy et al., 2000a, Pavletich and Pavo, 1993). Igualmente el dedo ZF3 parece no ser necesario para la actividad represora de Snail2, al menos en las condiciones ensayadas en esta tesis (Tabla VII). Respecto a los

restantes dedos de zinc, los resultados sugieren que los dedos ZF2 y ZF4 son esenciales para la actividad represora de Snail2, mientras que la eliminación funcional del dedo ZF5 parece aumentar la capacidad represora de Snail2 en determinados contextos estructurales (Tabla VII y Figura 10). Los ensayos de promotores de *cadherina-E* murino y humano desvelaron que el dedo ZF5 de Snail2 participa en la represión del promotor de *cadherina-E* de forma dependiente de la distribución de las cajas-E y, por tanto, de la arquitectura del promotor (Figura 10B). Estos resultados se confirmaron mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en células HEK293T humanas y NMuMG murinas (Figura 10C). El hecho de que en determinados contextos la mutación del dedo ZF5 de lugar a una capacidad de represión similar a la de Snail1 (como sobre el promotor murino de *cadherina-E*) podría indicar que el dedo ZF5 puede actuar como un selector del promotor promoviendo la unión a promotores cuyas cajas-E presenten una distribución similar a la del promotor murino. Estudios iniciales sobre el promotor de *claudina-1* (Martínez-Estrada et al., 2005) parecen apoyar esta hipótesis. En el caso de de Snail1, la delección o la mutación no funcional de cualquiera de los dedos de zinc bloquea la importación de Snail1 al núcleo (Nieto, 2002, Mingot et al., 2009). Sin embargo, en nuestros estudios no observamos cambios en la localización nuclear con los mutantes no funcionales de los ZFs de Snail2 (Tabla VII). Estas diferencias pueden deberse al hecho de que todos los mutantes analizados conservan la estructura intacta de 4 de sus 5 ZFs lo que permitiría conservar los aminoácidos básicos necesarios para conformar la secuencia de localización nuclear (NLS) descrita por Mingot y col. como la secuencia mínima de reconocimiento de algunas importinas (Mingot et al., 2009).

## **1.2. Mecanismos de represión de Snail2 sobre el promotor de *cadherina-E*: implicación funcional de los dominios SNAG2 y SLUG.**

Los resultados del análisis funcional de los mutantes de delección de la región N-terminal de transrepresión de Snail2 sugieren que, al igual que ocurre con Snail1, el dominio SNAG es un dominio esencial para la represión mediada por Snail2; además, nuestros resultados sugieren la existencia de al menos otra región de Snail2 (el dominio SLUG) con una función importante para su actividad represora (Figura 11 y Tabla VIII).

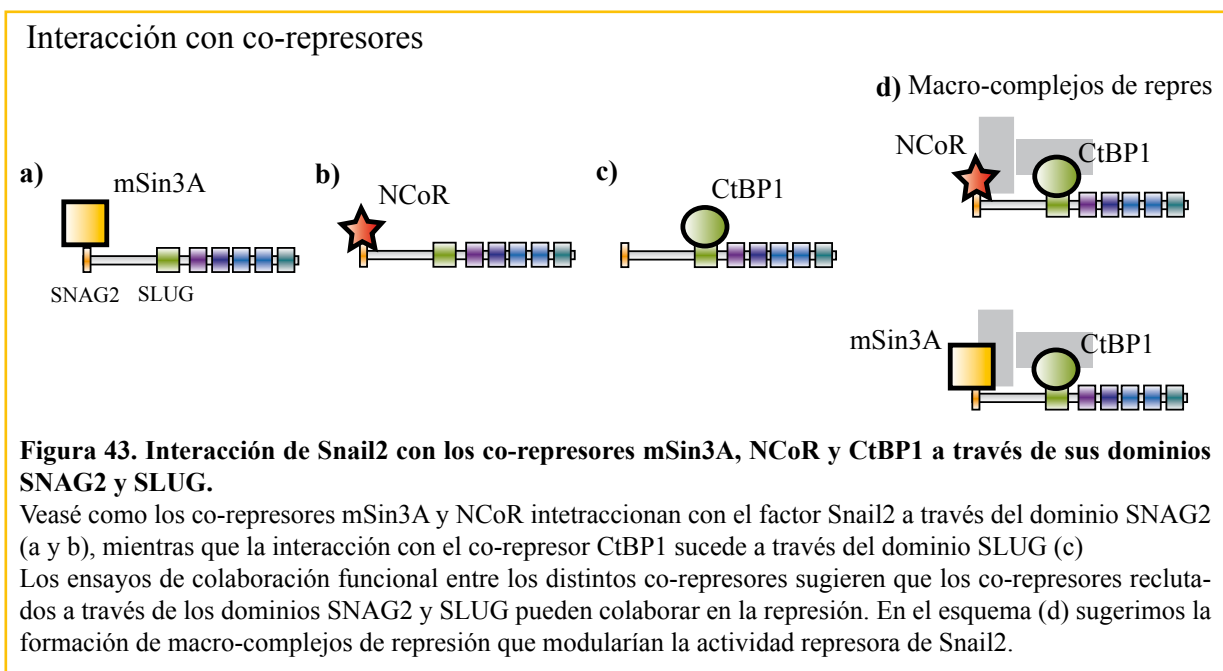
El mecanismo de represión de la expresión de *cadherina-E* por distintos miembros de la familia Snail implica a diferentes complejos represores. Así, Snail1, a través de su dominio SNAG1, recluta al co-represor mSin3A y a las HDAC1 y 2 (Peinado et al., 2004c) y eventualmente al complejo Polycomb (Herranz et al., 2008). De la misma manera, Snail2 interacciona con mSin3A a través del dominio SNAG2 (Figura 12). No obstante, los estudios funcionales llevados a cabo indican que el complejo Snail2/mSin3A requiere la presencia de la HDAC3 para la co-represión (Figura 14), en lugar de las HDAC1/2 como en el caso de Snail1 (Peinado et al., 2004c). Esta diferencia entre los complejos reclutados por ambos factores, Snail1 y Snail2, puede deberse a diferencias en la afinidad por las distintas HDACs o a la participación de algún otro co-represor que esté mediando la interacción con las HDACs. Adicionalmente, nuestros estudios han puesto de manifiesto la capacidad de Snail2 de interaccionar con otros dos co-represores: el co-represor NCoR y el co-represor CtBP1. NCoR interacciona con Snail2 a través del dominio SNAG2 (Figura 18) mientras que CtBP1 lo hace a través del dominio SLUG (Figura 15). Queda por determinar si NCoR puede interaccionar también con Snail1, si bien es poco probable la interacción Snail1/CtBP1 debido a la ausencia de dominio CID en Snail1 (Manzanares et al., 2001, Nieto, 2002)

Los estudios de co-inmunoprecipitación de CtBP1-flag con los mutantes de delección  $\Delta$ SLUG-HA

y  $\Delta$ CID-HA mostraron que el mutante  $\Delta$ SNAG2-HA tenía mayor capacidad de interacción con CtBP1 que Snail2 wt. Estos resultados concuerdan con el aumento en la actividad del complejo Snail2/CtBP1 cuando utilizamos este mismo mutante (Figura 16). La interacción Snail2/CtBP1 está de acuerdo con datos previos en *dmSnail* (Hemavathy et al., 2004), aunque contrastan con datos previos de otros autores que sugieren que Snail2 no interacciona con CtBP1 (Bailey et al., 2007). Estas diferencias pueden explicarse por las diferencias en los sistemas experimentales utilizados en ambos estudios. Nuestros resultados sugerían, de hecho, la existencia de mecanismos de interferencia/cooperación entre los complejos represores reclutados a través del dominio SNAG2 y SLUG, y por ello procedimos a analizar la posible relación funcional entre los distintos complejos represores.

### 1.2.1 Colaboración funcional entre los distintos complejos represores.

Se han descrito muchos casos, tanto en vertebrados como en invertebrados, en los que el co-represor NCoR forma parte de macrocomplejos que incluyen, entre otros componentes, el co-represor CtBP1 (Perissi et al., 2008, Qi et al., 2008, Heinzel et al., 1997, Alland et al., 1997, Huang et al., 2000, Nagy et al., 1997). Aunque no se ha podido demostrar la existencia de macrocomplejos que incluyan NCoR y mSin3A, sí se han descrito complejos de NCoR dependientes de mSin3A (Huang et al., 2000). Como demuestran los ensayos de promotor, la co-expresión de NCoR/CtBP1 o mSin3A/CtBP1 incrementa la capacidad de represión de Snail2, sugiriendo que los co-represores que se asocian a Snail2 a través del dominio SNAG (NCoR y mSin3A) o del dominio SLUG (CtBP1) pueden colaborar en la represión del promotor de *cadherina-E* (Figura 20A y B). Estos datos corroboran los estudios previos en *Drosophila melanogaster* donde NCoR actúa en combinación con CtBP1 favoreciendo la actividad represora de *dmSnail* durante el desarrollo temprano (Qi et al 2008). Por el contrario, los ensayos funcionales de co-expresión de NCoR y mSin3A no mostraron una cooperación entre ambos co-represores, y si en cambio una ligera disminución de la capacidad de represión del complejo Snail2/NCoR en presencia de mSin3A (Figura 20C). Estos datos sugieren la existencia de una competición entre ambos co-represores en su interacción con el dominio SNAG2.



### 1.3. Caracterización funcional de la fosforilación de Snail2.

Se han llevado a cabo numerosos estudios para caracterizar las modificaciones post-traduccionales que controlan la función celular de Snail1. Así, los estudios iniciales demostraron que la región rica en Serinas (SRD) de Snail1 era importante para la localización subcelular de este factor. En efecto, la mutación de todas las serinas del SRD a residuos no fosforilables provoca la localización citoplasmática de Snail1 y, en consecuencia, un descenso en su capacidad de represión (Dominguez et al., 2003). Adicionalmente, dos trabajos independientes (Yook et al., 2005, Zhou et al., 2004) identificaron una caja de destrucción (DB) en el SRD, homóloga a la presente en  $\beta$ -catenina, importante para la regulación post-traducciona de Snail1 (Zhou et al., 2004). Esta DB contiene las serinas 96 y 100, que están conservadas evolutivamente en los miembros de la subfamilia Snail y en dmSnail y son dianas de GSK3 $\beta$  (Zhou et al., 2004; Yook et al., 2005). Asimismo, se identificaron otras dos serinas (serina 104 y serina 107) del SRD, como dianas adicionales de GSK3 $\beta$  (Yook et al., 2005). Así, se han planteado dos modelos ligeramente diferentes; uno de ellos propone que GSK3 $\beta$  fosforila Snail1 en una serie de serinas próximas a la DB (serinas 107/111/115/119) provocando su exportación nuclear y una vez en el citoplasma vuelve a ser fosforilado por GSK3 $\beta$  en el DB (serinas 96/100) promoviendo su ubiquitinación y degradación por el proteosoma (Zhou et al., 2004). El otro modelo, propuesto por Yook y col., propone que las serinas 104 y 105 son fosforiladas por otras quinasas, actuando como eventos que priman la fosforilación de las serinas 96 y 100 por GSK3 $\beta$  en el dominio DB (Yook et al., 2005). De hecho, estudios recientes de nuestro grupo de fosforilación *in vivo* de Snail1 favorecen el último modelo (MacPherson et al., 2009). La fosforilación de otras serinas de Snail1 tiene en cambio el efecto contrario: la serina 246 fosforilada por PAK favorece la localización nuclear (Yang et al., 2005). Adicionalmente, se han descrito otros reguladores post-traduccionales de la estabilidad de Snail1: la lisil-oxidasa LOXL2 (Peinado et al., 2005), y reguladores traduccionales como el factor YB-1 (Evdokimova et al., 2009). Recientemente en nuestro laboratorio se han caracterizado nuevos sitios de fosforilación *in vivo* que implican a las proteínas quinasas CK2 y PKA como potenciales reguladores de la actividad de Snail1 (MacPherson et al., 2009).

Sin embargo, al inicio de esta tesis los estudios sobre las modificaciones post-traduccionales que puedan regular la actividad de Snail2 eran prácticamente inexistentes, habiéndose descrito únicamente su regulación por una proteína F-box, PpA (Vernon and LaBonne, 2006). Por ello, decidimos analizar los residuos de Snail2 que se encuentran fosforilados *in vivo* y estudiar su posible papel funcional. Nuestros estudios mostraron que Snail2 se encontraba fosforilado *in vivo*, al menos en el dominio SNAG2 (serina 4) y en el dominio SLUG (serina 88), aunque no se descartan otros sitios adicionales.

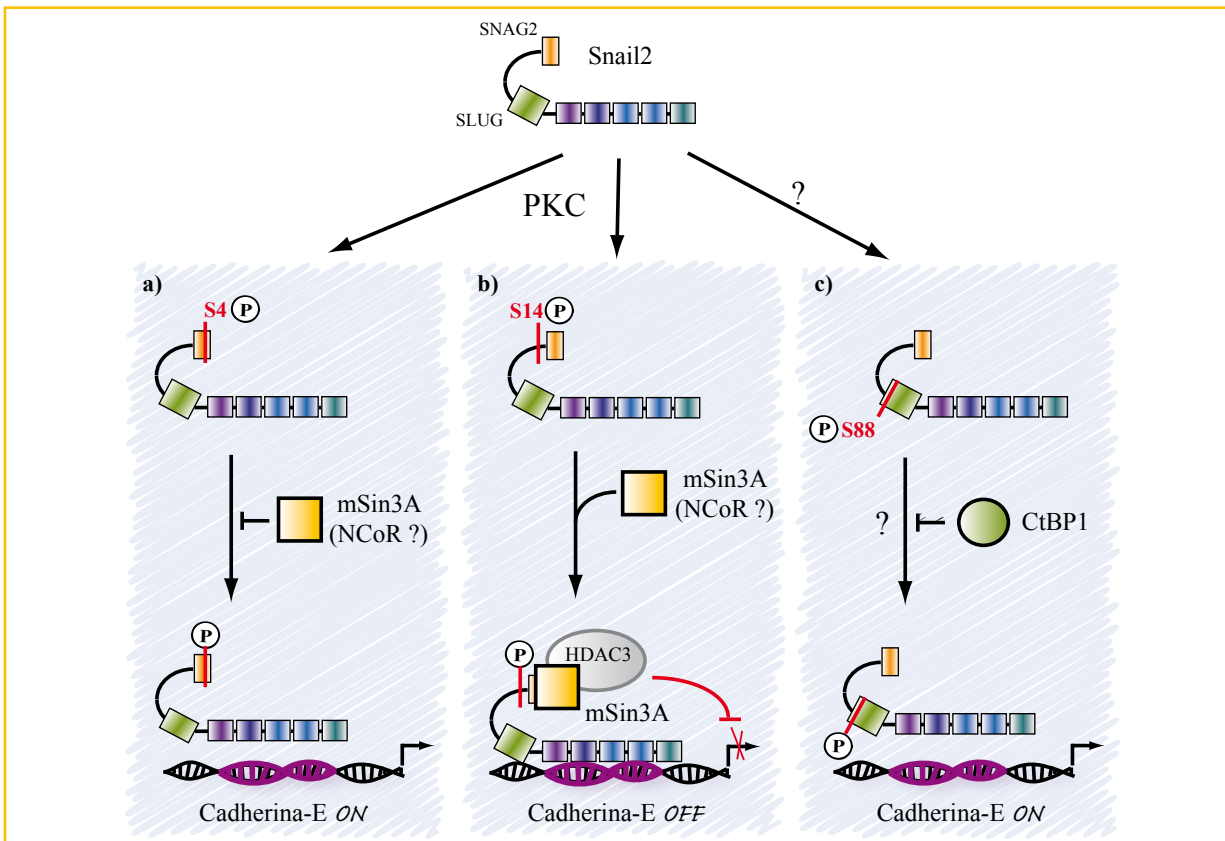
#### 1.3.1. Efecto de la fosforilación de la serina 4 y la serina 14 en la interacción Snail2/mSin3A.

Dado que, como se ha descrito anteriormente, los dominios SNAG2 y SLUG de Snail2 están implicados en el reclutamiento de co-represores, decidimos analizar el papel de la fosforilación en el reclutamiento de dichos co-represores. Para ello analizamos por co-inmunoprecipitación y ensayos de promotor la interacción y cooperación entre el co-represor mSin3A y los mutantes no fosforilables (serina a alanina) o fosfomiméticos (serina a aspártico) de las serina 4 y 14 de Snail2, esta última localizada en el entorno próximo al dominio SNAG2. Los resultados obtenidos indican que la fosforilación de la serina 4 bloquea la interacción y la colaboración de Snail2 con mSin3A (Figura 25 y 26), mientras la fosforilación de la serina 14 (correspondiente a la serina 11 de Snail1) favorece la interacción con mSin3A (Figura 25).

Falta determinar si la interacción con NCoR se ve afectada en este mismo sentido. Es interesante resaltar el hecho de que la fosforilación de la serina 14 de Snail2 y su homóloga la serina 11 en Snail1 parecen tener un mismo papel como promotor de la interacción con mSin3A (Figura 25; Macpherson et al., 2009). No obstante, parece que ambas serinas son fosforiladas en respuesta a diferentes vías de señalización, ya que en el caso de Snail1 la serina 11 es fosforilada por PKA, mientras que la serina 14 de Snail2 es fosforilada probablemente por PKC (Figura 23). Esta divergencia en la regulación post-traduccional de ambas proteínas también puede dar cuenta del papel diferencial de Snail1 y Snail2.

Respecto a la serina 88, aunque no hemos llevado a cabo un análisis detallado, nuestro estudio sugiere que su fosforilación tiene un efecto negativo sobre la capacidad de represión de Snail2, probablemente como consecuencia de una alteración en la interacción con CtBP1. Este hecho representa otro nivel de regulación de Snail2 que necesita ser investigado en el futuro. Curiosamente, Snail1 posee una serina (serina 86) en una posición equivalente y que es fosforilada *in vivo* (MacPherson et al., 2009), aunque no se ha descrito ningún papel regulador para esta fosforilación ni identificado la quinasa responsable. Sería muy interesante determinar si Snail1 puede reclutar a co-represores en el entorno de la serina 86 y si esta interacción se ve alterada por el estado de fosforilación de la serina 86.

No se puede descartar que la fosforilación de la serina 88 de Snail2, o la equivalente serina 86 de Snail1 module la interacción con co-represores reclutados por el dominio SNAG de ambos factores mediante cambios en la conformación estructural de los mismos. Estos aspectos quedan pendientes de dilucidar en estudios posteriores.



**Figura 44. Implicación funcional de la fosforilación de Snail2.**

Vease como la fosforilación de la serina 4 (a) impide la interacción Snail2/mSin3A, y por tanto la represión transcripcional, mientras que la fosforilación de la serina 14 (b) favorece esta misma interacción. La fosforilación de la serina 4 y la serina 14 también podrían afectar a la interacción con NCoR, ya que está sucediendo también a través del dominio SNAG2. En el esquema (c) sugerimos que de la fosforilación de la serina 88 afecta negativamente a la capacidad de represión de Snail2, alterando la interacción Snail2/CtBP1.



**2. FUNCIÓN DE SNAIL2 EN LA CARCINOGENÉISIS DE PIEL DE RATÓN****2.1 Efecto de la ausencia de Snail2 en la carcinogénesis química de piel de ratón**

Durante los últimos años se han detectado en diversos tumores y líneas celulares derivadas la expresión de varios represores transcripcionales de cadherina-E, asociada a progresión tumoral (Peinado et al., 2004a, Peinado et al., 2007). En carcinomas de mama, la expresión de Snail1 se asocia con la represión de *cadherina-E* y la metástasis linfática y a distancia (Cheng et al., 2001, Come et al., 2006, Blanco et al., 2002), mientras que en otros estudios se asocia con recurrencia y mal pronóstico (Elloul et al., 2006, Moody et al., 2005). De forma similar, la expresión de Snail2 se ha asociado con baja respuesta clínica en carcinomas de mama y ovario (Elloul et al., 2006, Martin et al., 2005), aunque la expresión de Snail2 se ha relacionado con fenotipos diferenciados en carcinomas de mama (Come et al., 2006). Además de en carcinomas de mama y ovario, la expresión de Snail2 también se ha detectado en otros tipos de tumores, asociado a parámetros clínicos, como en carcinomas de colon (Shioiri et al., 2006), carcinomas de células escamosas (Uchikado et al., 2005) y adenocarcinomas de pulmón (Shih et al., 2005) (revisado en Covaleta et al., 2007, Alves et al., 2009).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos estudiar el papel de Snail2 en la carcinogénesis química de piel de ratón. Para ello realizamos ensayos de carcinogénesis inducida por DMBA/TPA en ratones mutantes nulos para Snail2 (Snail2  $-/-$ ). Sorprendentemente, los ratones Snail2  $-/-$  desarrollaron un mayor número de lesiones de mayor tamaño y con una mayor incidencia de lesiones malignas, comparado con sus hermanos de camada Snail2  $+/-$  y Snail2  $+/+$  (Figuras 27 y 28). El estudio de las lesiones producidas por el tratamiento con DMBA/TPA mostró un aumento en la expresión de Ki67 y ciclina D1 en las lesiones generadas en ausencia de Snail2, sugiriendo una mayor capacidad proliferativa de los queratinocitos en los tumores derivados de ratones Snail2  $-/-$  (Figura 31). Asimismo, el análisis de los marcadores de diferenciación epitelial loricrina y citoqueratinas CK10, CK13 y CK8 indicó que la ausencia de Snail2 provoca alteraciones en la diferenciación epidérmica terminal y promueve la expresión de citoqueratinas implicadas en la malignización de las lesiones (CK13 y CK8) (Figuras 29 y 30). En los primeros estadios de la carcinogénesis el entorno tumoral genera señales de apoptosis para las células tumorales en un intento por evitar el crecimiento descontrolado de estas células (Joyce and Pollard, 2009). El análisis de la apoptosis en las lesiones tumorales generadas en los ratones de diferentes genotipos de Snail2 indicó que la ausencia de Snail2 incrementa la tasa de apoptosis intratumoral, como se muestra en los ensayos de TUNEL y el marcaje de p63 (Figura 32). Estos resultados están de acuerdo con el papel anti-apoptótico descrito previamente para Snail2 *in vivo* e *in vitro* en respuesta a daño genotóxico (Kajita et al., 2004, Kurrey et al., 2009, Perez-Losada et al., 2003, Perez-Losada et al., 2002, Vitali et al., 2008, Wang et al., 2005, Zhang and Klymkowsky, 2009).

Sorprendentemente, estos datos muestran que la ausencia de Snail2 favorece la aparición de lesiones y su malignización, contrariamente a lo esperado en relación con el papel de Snail2 como represor de *cadherina-E* e inductor de TEM (Bolos et al., 2003, Hajra et al., 2002, Moreno-Bueno et al., 2006) y su valor pronóstico propuesto en ciertos tipos de tumores humanos (revisado en Peinado et al., 2007). Este efecto podría deberse al aumento en la capacidad proliferativa de las células del tumor que no se ve compensado por los procesos de apoptosis, y/o a alteraciones en la diferenciación terminal de los queratinocitos, y por tanto, en la homeostasis epidérmica.



## 2.2 Caracterización de los queratinocitos Snail2 *-/-*. Efecto del microambiente.

Las células tumorales no responden a los controles de crecimiento fisiológicos y tienen crecimiento autónomo (Hanahan and Weinberg, 2000). A pesar de esto, el tumor no es una lesión autónoma y depende, en mayor o menor medida, de la interacción con el microambiente para su desarrollo (Joyce and Pollard, 2009).

Como se describe en la Introducción, el proceso de carcinogénesis no depende solo de los queratinocitos de la epidermis, sino que consiste en un sistema complejo de interacciones entre las células del tumor y las células del estroma que pueden favorecer o impedir la aparición de lesiones y su progresión (Yuspa et al., 1994, Gupta and Massague, 2006). Por ello, decidimos analizar las características intrínsecas de los queratinocitos de los ratones Snail2 *-/-*, así como el efecto del entorno. Los resultados obtenidos en los ensayos de clonogenicidad y cultivos con queratinocitos primarios indican que Snail2 es esencial para la supervivencia y proliferación de los queratinocitos *in vitro*, de acuerdo con el papel de Snail2 en otros sistemas celulares donde su expresión es esencial para la supervivencia de las células (Kurrey et al., 2009, Leroy and Mostov, 2007, Newkirk et al., 2008a, Wu et al., 2005, Zhang and Klymkowsky, 2009). Los ensayos de cicatrización de heridas e inducción de proliferación con TPA *in vivo* aportan datos en este sentido. La ausencia de Snail2 dificulta la reepitelialización, como se aprecia en los ensayos de cicatrización de heridas (Figura 35). Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos por otros grupos *in vitro* e *in vivo* (Arnoux et al., 2005, Savagner et al., 2005, Hudson et al., 2009). Según este último trabajo, la ausencia de Snail2 aumenta la expresión de la citoqueratina CK8 y mantiene la expresión de cadherina-E y citoqueratina CK10 durante la reepitelialización (Hudson et al., 2009). La CK8 es una citoqueratina embrionaria que se expresa en epitelios simples pero no en la epidermis intacta ni en los bordes de las heridas (Casanova et al., 2004, Larcher et al., 1992). La expresión de CK8 en la piel puede indicar alteraciones en la diferenciación de los queratinocitos. Aunque en esta memoria no se ha analizado la expresión de CK8 u otros marcadores durante la cicatrización, los resultados de las lesiones tumorales apoyarían ese modelo. Al igual que sucede en la reepitelialización la inducción de hiperplasia por tratamiento con TPA de la piel de ratones Snail2 *-/-* presenta alteraciones en el patrón de expresión de marcadores de diferenciación terminal como loricrina e involucrina, mientras que no se altera la expresión de marcadores tempranos de diferenciación como la citoqueratina CK10 (Figuras 37 y 38) En conjunto, estos resultados sugieren un papel para Snail2 en el control de la homeostasis de la epidermis.

## 2.3 Alteraciones en la activación del promotor de Snail2 en la capa basal de la epidermis.

La epidermis así como los apéndices de la piel se renuevan en el adulto por un proceso denominado homeostasis. Las células madre (CM) de la epidermis tienen un papel crucial en la homeostasis ya que mediante división asimétrica generan células hijas que activan el programa de diferenciación terminal (Blanpain and Fuchs, 2006, Blanpain and Fuchs, 2009, Fuchs, 2009, Watt et al., 2006). Como se describió en la Introducción, las células de la capa basal ejecutan periódicamente el programa de diferenciación terminal para renovar las capas superiores de la epidermis. Durante la homeostasis normal, las células progenitoras (TA) de la capa basal aumentan el número de divisiones asimétricas perpendiculares a la lámina basal para reponer las células de las capas superiores. Experimentos de marcaje de linajes celulares en la epidermis han documentado la existencia de unidades proliferativas discretas en la EIF que crecen como columnas independientes desde la capa basal hasta el estrato córneo (Kolodka et al., 1998, Mackenzie,

1997, Ro and Rannala, 2005). Los diferentes compartimentos de la epidermis, EIF, FPs y glándulas sebáceas, se mantienen en el adulto por las CM o las TA que residen en diferentes compartimentos. Las CM del FP residen en el *bulge*, y a pesar de estar relativamente quiescentes se dividen con cada ciclo del pelo para mantener su homeostasis (Jaks et al., 2008, Levy et al., 2005, Tumber et al., 2004). En respuesta a lesiones las CM del folículo activan rápidamente su movilización y su programa de diferenciación, pero esto no sucede en la epidermis normal (Ito et al., 2005, Levy et al., 2007).

Recientemente se ha relacionado a Snail2 con la homeostasis epidérmica normal y lesionada (Hudson et al., 2009, Kusewitz et al., 2009, Newkirk et al., 2008a, Newkirk et al., 2008b, Savagner et al., 2005), así como con la regulación de la homeostasis de las células progenitoras hematopoyéticas (Inoue et al., 2002, Perez-Losada et al., 2002). Estos datos indican que Snail2 podría estar regulando de alguna manera las TA de la epidermis, por lo que decidimos analizar el patrón de expresión de Snail2 en la piel de ratones Snail2 +/- y Snail2 -/- mediante el marcaje de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, ya que el alelo mutado porta el gen de la beta-galactosidasa (Figura 6A), como medida indirecta de la expresión del promotor endógeno del gen de *Snail2*. Los resultados obtenidos mostraron que el promotor de *Snail2* está activo en los FP y la EIF adyacente de los ratones Snail2 +/- y Snail2 -/-. Aunque el número de FPs marcados es mayor en los ratones Snail2 -/- que en los ratones Snail2 +/- (Figura 39), no se aprecian diferencias en el patrón de expresión de  $\beta$ -galactosidasa entre los FPs de ratones Snail2 -/- y Snail2 +/- . Sorprendentemente, la EIF de los ratones Snail2 -/- mostró un mayor número de células marcadas en la capa basal comparado con la EIF de los ratones Snail2 +/- (Figura 39), así como células marcadas dispersas por la capa suprabasal.

Estos datos sugieren que Snail2 ejerce un papel autorregulador negativo sobre su propio promotor en la EIF, por lo que la ausencia de Snail2 en los ratones Snail2 -/- aumenta la actividad del promotor de *Snail2*, estos datos contrastan con lo observado durante el desarrollo embrionario de pollo donde se han propuesto una autoregulación positiva de Snail2 (Sakai et al., 2006). De acuerdo con esta hipótesis, Snail2 regularía la localización de las células que expresan Snail2 restringiendo su expresión a la capa basal de la epidermis interfolicular. Otra hipótesis alternativa, aunque no excluyente, es que Snail2 regula negativamente la movilización y/o localización de las células madre desde el FP, tal como sugieren experimentos preliminares de retención de marcaje con BrdU (LRC). No obstante son necesarios estudios adicionales para confirmar o descartar estas hipótesis.

### 2.4 Inflamación, Snail2 y la carcinogénesis química.

En conjunto, los resultados obtenidos en la segunda parte de esta tesis junto con estudios previos (Kusewitz et al., 2009, Newkirk et al., 2008b, Savagner et al., 2005) sugieren que Snail2 tiene un papel importante en la regulación de genes implicados en la homeostasis epitelial, manteniendo la integridad de la epidermis, así como en procesos fisiológicos dinámicos como la cicatrización de heridas. Sin embargo, no explican los resultados obtenidos con el tratamiento con DMBA/TPA, ya que los queratinocitos Snail2 -/- no tienen capacidad de autorrenovación *in vitro* y lo tienen disminuido *in vivo*, lo cual es esencial en un proceso neoplásico como es la carcinogénesis. Con estos datos, lo que cabría esperar es que los ratones Snail2 +/+ fuesen más susceptibles al protocolo de carcinogénesis química que los ratones Snail2 -/-, si la respuesta fuese autónoma de los queratinocitos, contrariamente a los resultados obtenidos.

Un estudio reciente sobre perfiles de expresión génica de piel de ratones adultos Snail2 -/- implica a Snail2 en el desarrollo y diferenciación de los queratinocitos, así como en proliferación, apoptosis, adhesión, motilidad, angiogénesis y respuesta a estímulos del entorno (Newkirk et al., 2008b). Así, según

este estudio, la epidermis de los ratones Snail2  $-/-$  expresan tres veces menos receptores de citoquinas proinflamatorias IL-20 e IL-22, y un menor número de linfocitos  $T\gamma\delta$ , cuyo papel es importante en la inmunidad innata de la piel, por su actividad anti-tumoral (Girardi, 2006, Girardi et al., 2006).

El análisis del estado inflamatorio de los ratones y las lesiones producidas por el DMBA/TPA mostró un mayor número de infiltraciones de macrófagos y células polimorfonucleares, así como procesos purulentos en las lesiones producidas por el tratamiento con DMBA/TPA en los ratones Snail2  $-/-$  comparados con las lesiones generadas en los ratones Snail2  $+/+$ . Asimismo, los órganos de los ratones Snail2  $-/-$  también presentaban alteraciones relacionadas con el sistema inmunitario e inflamatorio, independientes del envejecimiento (Tabla XI). La administración del anti-inflamatorio dexametasona tras la detección de lesiones iniciales producidas por el tratamiento con DMBA/TPA bloqueó la progresión maligna en ratones Snail2  $+/+$  y Snail2  $-/-$ , como cabría esperar. Sorprendentemente, y contrariamente a lo esperado, el número de lesiones y su tamaño aumentó de forma significativa en los ratones Snail2  $-/-$  tratados con dexametasona frente a los ratones Snail2  $-/-$  no tratados (Figura 40). Estos resultados sugieren que el tratamiento con dexametasona en los ratones Snail2  $-/-$  está bloqueando la respuesta inflamatoria anti-tumoral y favoreciendo la respuesta pro-tumoral, probablemente debido a alteraciones en el propio sistema inflamatorio de los ratones Snail2  $-/-$ , junto con alteraciones en la respuesta anti-apoptótica producida en ausencia de Snail2. Para abordar esta hipótesis serían necesarios otros tipos de ensayos *in vivo*, como el trasplante de médula ósea entre ratones Snail2  $+/+$  y Snail2  $-/-$  y la inducción de carcinomas por DMBA/TPA.

Las alteraciones en la respuesta carcinogénica observada en los ratones Snail2  $-/-$  se extienden a otros protocolos de carcinogénesis, como tras el tratamiento con MCA, donde también se observa una mayor tasa proliferativa de las lesiones generadas en los ratones Snail2  $-/-$ , en comparación con los ratones Snail2  $+/+$  (Figura 42). Es de destacar, no obstante, que bajo el protocolo de MCA los ratones Snail2  $+/-$  exhiben un fenotipo tumoral menos agresivo (mayor latencia y menor carga tumoral) que los ratones Snail2  $+/+$  y Snail2  $-/-$ , sugiriendo efectos adicionales dependientes de la dosis de Snail2 que quedan por investigar.

En conjunto, los resultados derivados de los estudios de carcinogénesis por DMBA/TPA sugieren que la mayor latencia de las lesiones generadas en los ratones Snail2  $-/-$  puede deberse a las alteraciones intrínsecas de los queratinocitos promovidas por la ausencia de Snail2, como baja capacidad proliferativa y alteraciones en el programa de diferenciación terminal, si bien no podemos descartar la participación del sistema inmune en esta fase. Sin embargo, la respuesta exacerbada que se origina tras el periodo de latencia en los ratones Snail2  $-/-$  con un significativo incremento en el número y tamaño de las lesiones y aumento de su malignización debe ser originada por factores extrínsecos a los queratinocitos, que deben producir una respuesta anómala al entorno tumoral, como puede ser la provocada por procesos de inflamación crónica en el microambiente tumoral con efectos pro-tumorales. Si bien quedan todavía muchos aspectos por dilucidar sobre el papel de Snail2 en el proceso de carcinogénesis, los resultados obtenidos en esta parte de la memoria avalan un papel importante de Snail2 en el control de la respuesta al microambiente tumoral.



## **CONCLUSIONES**





## 1. CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LOS DOMINIOS DE SNAIL2 EN LA REPRESIÓN DEL PROMOTOR DE *CADHERINA-E*

1. Los dedos de zinc 1 y 3 son dispensables para la actividad represora de Snail2, mientras que los dedos de zinc 2 y 4 son esenciales para la represión del promotor de *cadherina-E*. La funcionalidad del quinto dedo de zinc de Snail2 es dependiente de la arquitectura del promotor.
2. Los dominios SNAG2 y SLUG son necesarios para la represión mediada por Snail2. El dominio SNAG2 puede reclutar dos tipos de complejos de represión, el formado por el co-represor mSin3A y la HDAC3 y el formado por el co-represor NCoR, que cooperan en la represión del promotor de *cadherina-E* murino. Por su parte, el dominio SLUG interacciona con el co-represor CtBP1.
3. Los co-represores reclutados por Snail2 a través del dominio SNAG2 (mSin3A y NCoR) y del dominio SLUG (CtBP1) cooperan entre sí para reprimir el promotor de *cadherina-E*.
4. La proteína Snail2 se fosforila *in vivo* en los dominios SNAG2 (serina 4 y serina 14) y SLUG (serina 88). Estas fosforilaciones pueden estar mediadas por las proteínas quinasas PKC y CK2, respectivamente.
5. La fosforilación de la serina 4 o la serina 14 regulan positiva o negativamente, respectivamente, el reclutamiento del co-represor mSin3A y la actividad represora de Snail2. Por su parte, la fosforilación de la serina 88 regula negativamente la capacidad de represión de Snail2.

## 2. FUNCIÓN DE SNAIL2 EN LA CARCINOGENESIS DE PIEL DE RATÓN

1. Snail2 favorece la aparición de lesiones y su malignización durante el proceso de carcinogénesis química inducida por el tratamiento con DMBA/TPA. Este hecho es debido a un aumento de la capacidad proliferativa de las células tumorales y a alteraciones en el programa de diferenciación terminal de los queratinocitos.
2. Snail2 es esencial para la proliferación de los queratinocitos *in vitro*. Es, asimismo, necesario para la respuesta hiperplásica de la epidermis en respuesta a TPA *in vivo*, así como para la migración de los queratinocitos durante la cicatrización de heridas.
3. El promotor endógeno de *Snail2* se expresa mayoritariamente en las células de la capa basal de la epidermis y en diferentes capas del folículo piloso, estando sometido a un proceso de autoregulado negativamente.
4. La ausencia de Snail2 produce alteraciones en la respuesta inflamatoria durante la carcinogénesis química por DMBA/TPA. Lo que puede estar asociado a la mayor capacidad de progresión de las lesiones tumorales.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- ACLOQUE, H., ADAMS, M. S., FISHWICK, K., BRONNER-FRASER, M. & NIETO, M. A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*, 119, 1438-1449.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., & WATSON, J.D. (1996) Molecular biology of the cell. *Ed. Omega, S.A., Barcelona*.
- ALISON, M. R., LIM, S. & HOUGHTON, J. M. (2009) Bone marrow-derived cells and epithelial tumours: more than just an inflammatory relationship. *Curr Opin Oncol*, 21, 77-82.
- ALLAND, L., MUHLE, R., HOU, H., JR., POTES, J., CHIN, L., SCHREIBER-AGUS, N. & DEPINHO, R. A. (1997) Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature*, 387, 49-55.
- ALLAVENA, P., GARLANDA, C., BORRELLO, M. G., SICA, A. & MANTOVANI, A. (2008a) Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 18, 3-10.
- ALLAVENA, P., SICA, A., SOLINAS, G., PORTA, C. & MANTOVANI, A. (2008b) The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol*, 66, 1-9.
- ALLAVENA, P., SICA, A., GARLANDA, C. & MANTOVANI, A. (2008c) The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev*, 222, 155-161.
- APARICIO, O., GEISBERG, J. V. & STRUHL, K. (2004) Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 17, Unit 17.7.
- AYBAR, M. J., NIETO, M. A. & MAYOR, R. (2003) Snail precedes Slug in the genetic cascade required for the specification and migration of the *Xenopus* neural crest. *Development*, 130, 483-494.
- BAILEY, C. K., MISRA, S., MITTAL, M. K. & CHAUDHURI, G. (2007) Human SLUG does not directly bind to CtBP1. *Biochem Biophys Res Commun*, 353, 661-664.
- BALMAIN, A., RAMSDEN, M., BOWDEN, G. T. & SMITH, J. (1984) Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature*, 307, 658-660.
- BARRALLO-GIMENO, A. & NIETO, M. A. (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, 132, 3151-3161.
- BARRANDON, Y. & GREEN, H. (1987) Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 2302-2306.
- BATLLE, E., SANCHO, E., FRANCI, C., DOMINGUEZ, D., MONFAR, M., BAULIDA, J. & GARCIA DE HERREROS, A. (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*, 2, 84-89.
- BEHRENS, J., LOWRICK, O., KLEIN-HITPASS, L. & BIRCHMEIER, W. (1991) The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 11495-11499.
- BEHRENS, J., MAREEL, M. M., VAN ROY, F. M. & BIRCHMEIER, W. (1989) Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol*, 108, 2435-2447.
- BERX, G., CLETON-JANSEN, A. M., NOLLET, F., DE LEEUW, W. J., VAN DE VIJVER, M., CORNELISSE, C. & VAN ROY, F. (1995) E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J*, 14, 6107-6115.

- BIANCHI, A. B., ALDAZ, C. M. & CONTI, C. J. (1990) Nonrandom duplication of the chromosome bearing a mutated Ha-ras-1 allele in mouse skin tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6902-6906.
- BIRCHMEIER, W. & BEHRENS, J. (1994) Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*, 1198, 11-26.
- BLANCO, M. J., MORENO-BUENO, G., SARRIO, D., LOCASCIO, A., CANO, A., PALACIOS, J. & NIETO, M. A. (2002) Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*, 21, 3241-3246.
- BLANPAIN, C. & FUCHS, E. (2006) Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 339-373.
- BLANPAIN, C. & FUCHS, E. (2009) Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 207-217.
- BLANPAIN, C., HORSLEY, V. & FUCHS, E. (2007) Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell*, 128, 445-458.
- BOLOS, V., PEINADO, H., PEREZ-MORENO, M. A., FRAGA, M. F., ESTELLER, M. & CANO, A. (2003) The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci*, 116, 499-511.
- BOLOS, V. (2005) Caracterización del factor Slug como represor transcripcional de *cadherina-E* en la progresión tumoral. Comparación con Snail. Tesis doctoral. UAM.
- BOUTWELL, R. K. (1974) The function and mechanism of promoters of carcinogenesis. *CRC Crit Rev Toxicol*, 2, 419-443.
- BOYLE, W. J., VAN DER GEER, P. & HUNTER, T. (1991) Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods Enzymol*, 201, 110-149.
- BROWN, K. & BALMAIN, A. (1995) Transgenic mice and squamous multistage skin carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, 14, 113-124.
- BROWN, K., QUINTANILLA, M., RAMSDEN, M., KERR, I. B., YOUNG, S. & BALMAIN, A. (1986) v-ras genes from Harvey and BALB murine sarcoma viruses can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cell*, 46, 447-456.
- BUKHOLM, I. K., NESLAND, J. M. & BORRESEN-DALE, A. L. (2000) Re-expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin, but not of gamma-catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients. *J Pathol*, 190, 15-19.
- BURNS, P. A., KEMP, C. J., GANNON, J. V., LANE, D. P., BREMNER, R. & BALMAIN, A. (1991) Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene*, 6, 2363-2369.
- BUXTON, R., COWIN, P., FRANKE, W., GARROD, D., GREEN, K., KING, I., KOCH PJ, MAGEE, A., REES, D. & STANLEY, J. (1993) Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J Cell Biol.*, 121, 481-483.
- CANO, A., GAMALLO, C., KEMP, C. J., BENITO, N., PALACIOS, J., QUINTANILLA, M. & BALMAIN, A. (1996) Expression pattern of the cell adhesion molecules. E-cadherin, P-cadherin and alpha 6 beta 4 integrin is altered in pre-malignant skin tumors of p53-deficient mice. *Int J Cancer*, 65, 254-262.
- CANO, A., PEREZ-MORENO, M. A., RODRIGO, I., LOCASCIO, A., BLANCO, M. J., DEL BARRIO,

- M. G., PORTILLO, F. & NIETO, M. A. (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*, 2, 76-83.
- CANO, A. & PORTILLO, F. An emerging role for class I bHLH E2-2 proteins in EMT regulation and tumour progression. *Cell Adh Migr*, 4, 1-5.
- CARL, T., DUFTON, C., HANKEN, J. & KLYMKOWSKY, M. (1999) Inhibition of neural crest migration in *Xenopus* using antisense slug RNA. *Dev Biol*, 213, 101-115.
- CARVER, E. A., JIANG, R., LAN, Y., ORAM, K. F. & GRIDLEY, T. (2001) The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol*, 21, 8184-8188.
- CASANOVA, M. L., BRAVO, A., MARTINEZ-PALACIO, J., FERNANDEZ-ACENERO, M. J., VILLANUEVA, C., LARCHER, F., CONTI, C. J. & JORCANO, J. L. (2004) Epidermal abnormalities and increased malignancy of skin tumors in human epidermal keratin 8-expressing transgenic mice. *FASEB J*, 18, 1556-1558.
- CAULIN, C., BAULUZ, C., GANDARILLAS, A., CANO, A. & QUINTANILLA, M. (1993) Changes in keratin expression during malignant progression of transformed mouse epidermal keratinocytes. *Exp Cell Res*, 204, 11-21.
- CAULIN, C., LOPEZ-BARCONS, L., GONZALES-GARRIGUES, M., NAVARRO, P., LOZANO, E., RODRIGO, I., GAMALLO, C., CANO, A., FABRA, A. & QUINTANILLA, M. (1996) Suppression of the metastatic phenotype of a mouse skin carcinoma cell line independent of E-cadherin expression and correlated with reduced Ha-ras oncogene products. *Mol Carcinog*, 15, 104-114.
- COBALEDA, C., PEREZ-CARO, M., VICENTE-DUENAS, C. & SANCHEZ-GARCIA, I. (2007) Function of the zinc-finger transcription factor SNAI2 in cancer and development. *Annu Rev Genet*, 41, 41-61.
- COHEN, M., YIN, M., PAZNEKAS, W., SCHERTZER, M., WOOD, S. & JABS, E. (1998) Human SLUG gene organization, expression, and chromosome map location on 8q. *Genomics*, 51, 468-471.
- COME, C., MAGNINO, F., BIBEAU, F., DE SANTA BARBARA, P., BECKER, K. F., THEILLET, C. & SAVAGNER, P. (2006) Snail and Slug play distinct roles during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res*, 12, 5395-5402.
- COMIJJN, J., BERX, G., VERMASSEN, P., VERSCHUEREN, K., VAN GRUNSVEN, L., BRUYNEEL, E., MAREEL, M., HUYLEBROECK, D. & VAN ROY, F. (2001) The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell*, 7, 1267-78.
- CONDEELIS, J. & SEGALL, J. E. (2003) Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer*, 3, 921-930.
- COX, B., HADJANTONAKIS, A., COLLINS, J. & MAGEE, A. (2000) Cloning and expression throughout mouse development of *mfat1*, a homologue of the *Drosophila* tumour suppressor gene *fat*. *Dev Dyn*, 217, 233-240.
- CHAMBERS, A. F., GROOM, A. C. & MACDONALD, I. C. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2, 563-572.
- CHENG, C. W., WU, P. E., YU, J. C., HUANG, C. S., YUE, C. T., WU, C. W. & SHEN, C. Y. (2001) Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene*, 20, 3814-3823.
- CHRISTOFORI, G. A. & SEMB, H. (1999) The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a

- tumour- suppressor gene. *Trends Biochem Sci*, 24, 73-76.
- DAY, M. L., ZHAO, X., VALLOROSI, C. J., PUTZI, M., POWELL, C. T., LIN, C. & DAY, K. C. (1999) E-cadherin mediates aggregation-dependent survival of prostate and mammary epithelial cells through the retinoblastoma cell cycle control pathway. *J Biol Chem*, 274, 9656-9664.
- DEL BARRIO, M. G. & NIETO, M. A. (2002) Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development*, 129, 1583-1593.
- DOMINGUEZ, D., MONTSERRAT-SENTIS, B., VIRGOS-SOLER, A., GUAITA, S., GRUESO, J., PORTA, M., PUIG, I., BAULIDA, J., FRANCI, C. & GARCIA DE HERREROS, A. (2003) Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol Cell Biol*, 23, 5078-5089.
- EDMAN, P. (1949) A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch Biochem*, 22, 475.
- EGER, A., AIGNER, K., SONDEREGGER, S., DAMPIER, B., OEHLER, S., SCHREIBER, M., BERX, G., CANO, A., BEUG, H. & FOISNER, R. (2005) DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*, 24, 2375-2385.
- EISTETTER, H. R., ADOLPH, S., RINGWALD, M., SIMON-CHAZOTTES, D., SCHUH, R., GUENET, J. L. & KEMLER, R. (1988) Chromosomal mapping of the structural gene coding for the mouse cell adhesion molecule uvomorulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 3489-3493.
- ELLOUL, S., SILINS, I., TROPE, C. G., BENSUSHAN, A., DAVIDSON, B. & REICH, R. (2006) Expression of E-cadherin transcriptional regulators in ovarian carcinoma. *Virchows Arch*, 449, 520-528.
- EVDOKIMOVA, V., TOGNON, C., NG, T., RUZANOV, P., MELNYK, N., FINK, D., SOROKIN, A., OVCHINNIKOV, L. P., DAVICIONI, E., TRICHE, T. J. & SORENSEN, P. H. (2009) Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell*, 15, 402-415.
- EWING, M. W., CONTI, C. J., KRUSZEWSKI, F. H., SLAGA, T. J. & DIGIOVANNI, J. (1988) Tumor progression in Sencar mouse skin as a function of initiator dose and promoter dose, duration, and type. *Cancer Res*, 48, 7048-7054.
- FARALDO, M. L., RODRIGO, I., BEHRENS, J., BIRCHMEIER, W. & CANO, A. (1997) Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog*, 20, 33-47.
- FIDLER, I. J. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3, 453-458.
- FOWLIS, D. J., FLANDERS, K. C., DUFFIE, E., BALMAIN, A. & AKHURST, R. J. (1992) Discordant transforming growth factor beta 1 RNA and protein localization during chemical carcinogenesis of the skin. *Cell Growth Differ*, 3, 81-91.
- FRANK, M. A. & KEMLER, R. (2002) Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 557-562.
- FRIXEN, U. H., BEHRENS, J., SACHS, M., EBERLE, G., VOSS, B., WARDA, A., LOCHNER, D. & BIRCHMEIER, W. (1991) E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*, 113, 173-185.
- FUCHS, E. (1990) Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol*, 111, 2807-2814.
- FUCHS, E. (2009) Finding one's niche in the skin. *Cell Stem Cell*, 4, 499-502.
- FUCHS, E. & GREEN, H. (1980) Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of

- the keratinocyte. *Cell*, 19, 1033-1042.
- FUKATA, M. & KAIBUCHI, K. (2001) Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 887-897.
- FUSE, N., HIROSE, S. & HAYASHI, S. (1994) Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by *escargot*. *Genes Dev*, 8, 2270-2281.
- GALLIN, W. J., EDELMAN, G. M. & CUNNINGHAM, B. A. (1983) Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 80, 1038-1042.
- GAMALLO, C., PALACIOS, J., SUAREZ, A., PIZARRO, A., NAVARRO, P., QUINTANILLA, M. & CANO, A. (1993) Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol*, 142, 987-993.
- GERSHENGORN, M. C., HARDIKAR, A. A., WEI, C., GERAS-RAAKA, E., MARCUS-SAMUELS, B. & RAAKA, B. M. (2004) Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science*, 306, 2261-2264.
- GHAZIZADEH, S. & TAICHMAN, L. B. (2001) Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J*, 20, 1215-1222.
- GILBERT, S. F. (2003) The morphogenesis of evolutionary developmental biology. *Int J Dev Biol*, 47, 467-477.
- GIMENEZ-CONTI, I., ALDAZ, C. M., BIANCHI, A. B., ROOP, D. R., SLAGA, T. J. & CONTI, C. J. (1990) Early expression of type I K13 keratin in the progression of mouse skin papillomas. *Carcinogenesis*, 11, 1995-1999.
- GIRARDI, M. (2006) Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *J Invest Dermatol*, 126, 25-31.
- GIRARDI, M., LEWIS, J. M., FILLER, R. B., HAYDAY, A. C. & TIGELAAR, R. E. (2006) Environmentally responsive and reversible regulation of epidermal barrier function by gammadelta T cells. *J Invest Dermatol*, 126, 808-814.
- GIROLDI, L. A., BRINGUIER, P. P., DE WEIJERT, M., JANSEN, C., VAN BOKHOVEN, A. & SCHALKEN, J. A. (1997) Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 241, 453-458.
- GLICK, A. B., PEREZ-LORENZO, R. & MOHAMMED, J. (2008) Context-dependent regulation of cutaneous immunological responses by TGFbeta1 and its role in skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 29, 9-14.
- GOMEZ, M. & CANO, A. (1995) Expression of beta 1 integrin receptors in transformed mouse epidermal keratinocytes: upregulation of alpha 5 beta 1 in spindle carcinoma cells. *Mol Carcinog*, 12, 153-165.
- GOMEZ, M., NAVARRO, P. & CANO, A. (1994) Cell adhesion and tumor progression in mouse skin carcinogenesis: increased synthesis and organization of fibronectin is associated with the undifferentiated spindle phenotype. *Invasion Metastasis*, 14, 17-26.
- GOMEZ, M., NAVARRO, P., QUINTANILLA, M. & CANO, A. (1992) Expression of alpha 6 beta 4 integrin increases during malignant conversion of mouse epidermal keratinocytes: association of beta 4 subunit to the cyokeratin fraction. *Exp Cell Res*, 201, 250-261.
- GRADY, W. M., WILLIS, J., GUILDFORD, P. J., DUNBIER, A. K., TORO, T. T., LYNCH, H., WIESNER, G., FERGUSON, K., ENG, C. & PARK, J. G. (2000) Methylation of the CDH1 promoter as the



- second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat. Genet.*, 26, 16-17.
- GRAFF, J. R., GABRIELSON, E., FUJII, H., BAYLIN, S. B. & HERMAN, J. G. (2000) Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J. Biol. Chem.*, 275, 2727-2732.
- GREGO-BESSA, J., DIEZ, J., TIMMERMAN, L. & DE LA POMPA, J. L. (2004) Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw. *Cell Cycle*, 3, 718-721.
- GRIMES, H. L., CHAN, T. O., ZWEIDLER-MCKAY, P. A., TONG, B. & TSICHLIS, P. N. (1996) The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol*, 16, 6263-6272.
- GROOTECLAES, M. L. A. & FRISCH, S. M. (2000) Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene*, 19, 3823-3828.
- GUILFORD, P., HOPKINS, J., HARRAWAY, J., MCLEOD, M., MCLEOD, N., HARAWIRA, P., TAITE, H., SCOULAR, R., MILLER, A. & REEVE, A. E. (1998) E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*, 392, 402-405.
- GUMBINER, B. & YAMADA, K. (1995) Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.*, 7, 615-618.
- GUPTA, G. P. & MASSAGUE, J. (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127, 679-95.
- HAJRA, K. M., CHEN, D. Y. & FEARON, E. R. (2002) The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res*, 62, 1613-1618.
- HAN, K. A. & KULESZ-MARTIN, M. F. (1992) Altered expression of wild-type p53 tumor suppressor gene during murine epithelial cell transformation. *Cancer Res*, 52, 749-753.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HARTWELL, K. A., MUIR, B., REINHARDT, F., CARPENTER, A. E., SGROI, D. C. & WEINBERG, R. A. (2006) The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 18969-18974.
- HEINZEL, T., LAVINSKY, R. M., MULLEN, T. M., SODERSTROM, M., LAHERTY, C. D., TORCHIA, J., YANG, W. M., BRARD, G., NGO, S. D., DAVIE, J. R., SETO, E., EISENMAN, R. N., ROSE, D. W., GLASS, C. K. & ROSENFELD, M. G. (1997) A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*, 387, 43-48.
- HEMAVATHY, K., ASHRAF, S. I. & IP, Y. T. (2000a) Snail/Slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene*, 257, 1-12.
- HEMAVATHY, K., GURU, S. C., HARRIS, J., CHEN, J. D. & IP, Y. T. (2000b) Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription. *Mol Cell Biol*, 20, 5087-5095.
- HEMAVATHY, K., HU, X., ASHRAF, S. I., SMALL, S. J. & IP, Y. T. (2004) The repressor function of snail is required for Drosophila gastrulation and is not replaceable by Escargot or Worniu. *Dev Biol*, 269, 411-420.
- HENNIG, G., LOWRICK, O., BIRCHMEIER, W. & BEHRENS, J. (1996) Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J Biol Chem*, 271, 595-602.
- HENNINGS, H. & YUSPA, S. H. (1985) Two-stage tumor promotion in mouse skin: an alternative interpretation. *J Natl Cancer Inst*, 74, 735-740.
- HERRANZ, N., PASINI, D., DIAZ, V. M., FRANCI, C., GUTIERREZ, A., DAVE, N., ESCRIVA, M., HERNANDEZ-MUNOZ, I., DI CROCE, L., HELIN, K., GARCIA DE HERREROS, A.

- & PEIRO, S. (2008) Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail transcription factor. *Mol Cell Biol*, 28, 4772-81.
- HOU, Z., PENG, H., AYYANATHAN, K., YAN, K. P., LANGER, E. M., LONGMORE, G. D. & RAUSCHER, F. J., 3RD (2008) The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, 28, 3198-207.
- HUANG, E. Y., ZHANG, J., MISKA, E. A., GUENTHER, M. G., KOUZARIDES, T. & LAZAR, M. A. (2000) Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway. *Genes Dev*, 14, 45-54.
- HUDSON, L. G., NEWKIRK, K. M., CHANDLER, H. L., CHOI, C., FOSSEY, S. L., PARENT, A. E. & KUSEWITT, D. F. (2009) Cutaneous wound reepithelialization is compromised in mice lacking functional Slug (Snai2). *J Dermatol Sci*, 56, 19-26.
- INOUE, A., SEIDEL, M., WU, W., KAMIZONO, S., FERRANDO, A., BRONSON, R., IWASAKI, H., AKASHI, K., MORIMOTO, A., HITZLER, J., PESTINA, T., JACKSON, C., TANAKA, R., CHONG, M., MCKINNON, P., INUKAI, T., GROSVELD, G. & LOOK, A. (2002) Slug, a highly conserved zinc finger transcriptional repressor, protects hematopoietic progenitor cells from radiation-induced apoptosis in vivo. *Cancer Cell*, 2, 279-288.
- INUKAI, T., INOUE, A., KUROSAWA, H., GOI, K., SHINJYO, T., OZAWA, K., MAO, M., INABA, T. & LOOK, A. (1999) SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Mol Cell*, 4, 343-352.
- ITO, M., LIU, Y., YANG, Z., NGUYEN, J., LIANG, F., MORRIS, R. J. & COTSARELIS, G. (2005) Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med*, 11, 1351-1354.
- JAKS, V., BARKER, N., KASPER, M., VAN ES, J. H., SNIPPERT, H. J., CLEVERS, H. & TOFTGARD, R. (2008) Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat Genet*, 40, 1291-1299.
- JIANG, R., COPELAND, N., GILBERT, D., JENKINS, N. & GRIDLEY, T. (1997) Genomic organization and chromosome localization of the mouse snail (snail) gene. *Mamm Genome*, 9, 686-688.
- JIANG, R., LAN, Y., NORTON, C., SUNDBERG, J. & GRIDLEY, T. (1998b) The Slug gene is not essential for mesoderm or neural crest development in mice. *Dev Biol.*, 198, 277-285.
- JIANG, R., NORTON, C., COPELAND, N., GILBERT, D., JENKINS, N. & GRIDLEY, T. (1998a) Genomic organization, expression and chromosomal localization of the mouse Slug (Slugh) gene. *Biochim Biophys Acta*, 1443, 251-254.
- JOYCE, J. A. & POLLARD, J. W. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, 9, 239-252.
- KAJITA, M., MCCLINIC, K. N. & WADE, P. A. (2004) Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol*, 24, 7559-7566.
- KANDIKONDA, S., ODA, D., NIEDERMAN, R. & SORKIN, B. C. (1996) Cadherin-mediated adhesion is required for normal growth regulation of human gingival epithelial cells. *Cell Adhes Commun*, 4, 13-24.
- KANG, G. H., LEE, S., KIM, W. H., RHYU, M. G. & RHO, J. Y. (2002) Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma demonstrates frequent aberrant methylation of multiple genes and constitutes CpG island methylator phenotype-positive gastric carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 160, 787-794.
- KELLY-SPRATT, K. S., GURLEY, K. E., YASUI, Y. & KEMP, C. J. (2004) p19Arf suppresses growth,

- progression, and metastasis of Hras-driven carcinomas through p53-dependent and -independent pathways. *PLoS Biol*, 2, E242.
- KEMLER, R. (1992) Classical cadherins. *Semin Cell Biol*, 3, 149-155.
- KO, H., KIM, H. S., KIM, N. H., LEE, S. H., KIM, K. H., HONG, S. H. & YOON, J. I. (2007) Nuclear localization signals of the E-cadherin transcriptional repressor Snail. *Cells Tissues Organs*, 185, 66-72.
- KOCH, P. A. & FRANKE, W. (1994) Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol.*, 6, 682-687.
- KOLODKA, T. M., GARLICK, J. A. & TAICHMAN, L. B. (1998) Evidence for keratinocyte stem cells in vitro: long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 4356-4361.
- KONONEN, J., BUBENDORF, L., KALLIONIEMI, A., BARLUND, M., SCHRAML, P., LEIGHTON, S., TORHORST, J., MIHATSCH, M. J., SAUTER, G. & KALLIONIEMI, O. P. (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4, 844-847.
- KOSMAN, D., IP, Y. T., LEVINE, M. & ARORA, K. (1991) Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the Drosophila embryo. *Science*, 254, 118-122.
- KURREY, N. K., JALGAONKAR, S. P., JOGLEKAR, A. V., GHANATE, A. D., CHASKAR, P. D., DOIPHODE, R. Y. & BAPAT, S. A. (2009) Snail and Slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells*, 27, 2059-2068.
- KUSEWITT, D. F., CHOI, C., NEWKIRK, K. M., LEROY, P., LI, Y., CHAVEZ, M. G. & HUDSON, L. G. (2009) Slug/Snai2 is a downstream mediator of epidermal growth factor receptor-stimulated reepithelialization. *J Invest Dermatol*, 129, 491-495.
- LABONNE, C. A. B.-F., M (2000) Snail-related transcriptional repressors are required in Xenopus for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev Biol*, 22, 195-205.
- LANGER, E. M., FENG, Y., ZHAOYUAN, H., RAUSCHER, F. J., 3RD, KROLL, K. L. & LONGMORE, G. D. (2008) Ajuba LIM proteins are snail/sluc corepressors required for neural crest development in Xenopus. *Dev Cell*, 14, 424-436.
- LARCHER, F., BAULUZ, C., DIAZ-GUERRA, M., QUINTANILLA, M., CONTI, C. J., BALLESTIN, C. & JORCANO, J. L. (1992) Aberrant expression of the simple epithelial type II keratin 8 by mouse skin carcinomas but not papillomas. *Mol Carcinog*, 6, 112-121.
- LARUE, L., ANTOS, C., BUTZ, S., HUBER, O., DELMAS, V., DOMINIS, M. & KEMLER, R. (1996) A role for cadherins in tissue formation. *Development*, 122, 3185-3194.
- LARUE, L., OHSUGI, M., HIRCHENHAIN, J. & KEMLER, R. (1994) E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8263-8267.
- LAVKER, R. M., MILLER, S., WILSON, C., COTSARELIS, G., WEI, Z. G., YANG, J. S. & SUN, T. T. (1993) Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation. *J Invest Dermatol*, 101, 16S-26S.
- LEPTIN, M. (1991) Twist and snail as positive and negative regulators during Drosophila mesoderm development. *Genes Dev*, 5, 1568-1576.
- LEROY, P. & MOSTOV, K. E. (2007) Slug is required for cell survival during partial epithelial-mesenchymal transition of HGF-induced tubulogenesis. *Mol Biol Cell*, 18, 1943-1952.
- LEVY, V., LINDON, C., HARFE, B. D. & MORGAN, B. A. (2005) Distinct stem cell populations

- regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Dev Cell*, 9, 855-861.
- LEVY, V., LINDON, C., ZHENG, Y., HARFE, B. D. & MORGAN, B. A. (2007) Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J*, 21, 1358-1366.
- LINKER, C., BRONNER-FRASER, M. & MAYOR, R. (2000) Relationship between gene expression domains of Xsnail, Xslug, and Xtwist and cell movement in the prospective neural crest of *Xenopus*. *Dev Biol.*, 224, 215-225.
- MACKENZIE, I. C. (1997) Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure. *J Invest Dermatol*, 109, 377-383.
- MACPHERSON, M. R., MOLINA, P., SOUCHELNYTSKYI, S., WERNSTEDT, C., MARTIN-PEREZ, J., PORTILLO, F. & CANO, A. (2009) Phosphorylation of Serine 11 and Serine 92 as New Positive Regulators of Human Snail1 Function: Potential Involvement of Casein Kinase-2 (CK2) and cAMP-activated Kinase (PKA). *Mol Biol Cell*. (In Press)
- MAHONEY, P., WEBER, U., ONOFRECHUK, P., BIESSMANN, H., BRYANT, P. & GOODMAN, C. (1991) The fat tumor suppressor gene in *Drosophila* encodes a novel member of the cadherin gene superfamily. *Cell*, 67, 853-868.
- MANI, S. A., YANG, J., BROOKS, M., SCHWANINGER, G., ZHOU, A., MIURA, N., KUTOK, J. L., HARTWELL, K., RICHARDSON, A. L. & WEINBERG, R. A. (2007) Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 10069-10074.
- MANSOURI, A., SPURR, N., GOODFELLOW, P. N. & KEMLER, R. (1988) Characterization and chromosomal localization of the gene encoding the human cell adhesion molecule uvomorulin. *Differentiation*, 38, 67-71.
- MANTOVANI, A., ROMERO, P., PALUCKA, A. K. & MARINCOLA, F. M. (2008) Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet*, 371, 771-783.
- MANTOVANI, A., SICA, A., ALLAVENA, P., GARLANDA, C. & LOCATI, M. (2009) Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum Immunol*, 70, 325-330.
- MANZANARES, M., BLANCO, M. J. & NIETO, M. A. (2004) Snail3 orthologues in vertebrates: divergent members of the Snail zinc-finger gene family. *Dev Genes Evol*, 214, 47-53.
- MANZANARES, M., LOCASCIO, A. & NIETO, M. A. (2001) The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends Genet*, 17, 178-181.
- MARTIN, T. A., GOYAL, A., WATKINS, G. & JIANG, W. G. (2005) Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 12, 488-496.
- MARTINEZ-ALVAREZ, C., BLANCO, M., PEREZ, R., RABADAN, M., APARICIO, M., RESEL, E., MARTINEZ, T. & NIETO, M. (2004) Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates. *Dev Biol*, 262, 207-218.
- MARTINEZ-ESTRADA, O. M., CULLERES, A., SORIANO, F. X., PEINADO, H., BOLOS, V., MARTINEZ, F. O., REINA, M., CANO, A., FABRE, M. & VILARO, S. (2006) The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J*, 394, 449-457.
- MAUHIN, V., LUTZ, Y., DENNEFELD, C. & ALBERGA, A. (1993) Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res*, 21, 3951-3957.

- MILLER, S. J., WEI, Z. G., WILSON, C., DZUBOW, L., SUN, T. T. & LAVKER, R. M. (1993) Mouse skin is particularly susceptible to tumor initiation during early anagen of the hair cycle: possible involvement of hair follicle stem cells. *J Invest Dermatol*, 101, 591-594.
- MINGOT, J. M., VEGA, S., MAESTRO, B., SANZ, J. M. & NIETO, M. A. (2009) Characterization of Snail nuclear import pathways as representatives of C2H2 zinc finger transcription factors. *J Cell Sci*, 122, 1452-1460.
- MOODY, S. E., PEREZ, D., PAN, T. C., SARKISIAN, C. J., PORTOCARRERO, C. P., STERNER, C. J., NOTORFRANCESCO, K. L., CARDIFF, R. D. & CHODOSH, L. A. (2005) The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell*, 8, 197-209.
- MORENO-BUENO, G., CUBILLO, E., SARRIO, D., PEINADO, H., RODRIGUEZ-PINILLA, S. M., VILLA, S., BOLOS, V., JORDA, M., FABRA, A., PORTILLO, F., PALACIOS, J. & CANO, A. (2006) Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 66, 9543-9556.
- MORENO-BUENO, G., PEINADO, H., MOLINA, P., OLMEDA, D., CUBILLO, E., SANTOS, V., PALACIOS, J., PORTILLO, F. & CANO, A. (2009) The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc*, 4, 1591-1613.
- MORENO-BUENO, G., PORTILLO, F. & CANO, A. (2008) Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene*, 27, 6958-6969.
- MUNRO, S. B. & AND BLASCHUK, O. W. (1986) The structure function and regulation of cadherins. *In cell adhesion and invasion in cancer metastasis (Brodt, P, ed.)*, pp. 17-34. (Ciudad edición).
- NAGY, L., KAO, H. Y., CHAKRAVARTI, D., LIN, R. J., HASSIG, C. A., AYER, D. E., SCHREIBER, S. L. & EVANS, R. M. (1997) Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell*, 89, 373-380.
- NAKAYAMA, H., SCOTT, I. C. & CROSS, J. C. (1998) The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev Biol*, 199, 150-63.
- NAVARRO, P., GOMEZ, M., PIZARRO, A., GAMALLO, C., QUINTANILLA, M. & CANO, A. (1991) A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J Cell Biol*, 115, 517-533.
- NEWKIRK, K. M., DUNCAN, F. J., BRANNICK, E. M., CHANDLER, H. L., PARENT, A. E. & KUSEWITT, D. F. (2008a) The acute cutaneous inflammatory response is attenuated in Slug-knockout mice. *Lab Invest*, 88, 831-841.
- NEWKIRK, K. M., MACKENZIE, D. A., BAKALETZ, A. P., HUDSON, L. G. & KUSEWITT, D. F. (2008b) Microarray analysis demonstrates a role for Slug in epidermal homeostasis. *J Invest Dermatol*, 128, 361-369.
- NIBU, Y., ZHANG, H., BAJOR, E., BAROLO, S., SMALL, S. & LEVINE, M. (1998) dCtBP mediates transcriptional repression by Knirps, Kruppel and Snail in the Drosophila embryo. *EMBO J*, 17, 7009-7020.
- NIEMAN, M. T., PRUDOFF, R. S., JOHNSON, K. R. & WHEELOCK, M. J. (1999) N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J. Cell. Biol.*, 174, 631-644.
- NIETO, M. A. (2002) The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 155-166.



- NIETO, M. A., BENNETT, M. F., SARGENT, M. G. & WILKINSON, D. G. (1992) Cloning and developmental expression of *Sna*, a murine homologue of the *Drosophila* snail gene. *Development*, 116, 227-237.
- NIETO, M. A., SARGENT, M. G., WILKINSON, D. G. & COOKE, J. (1994) Control of cell behavior during vertebrate development by *Slug*, a zinc finger gene. *Science*, 264, 835-839.
- NIEWIADOMSKA, P., GODT, D. & TEPASS, U. (1999) DE-Cadherin is required for intercellular motility during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol*, 144, 533-547.
- NISCHT, R., ROOP, D. R., MEHREL, T., YUSPA, S. H., RENTROP, M., WINTER, H. & SCHWEIZER, J. (1988) Aberrant expression during two-stage mouse skin carcinogenesis of a type I 47-kDa keratin, K13, normally associated with terminal differentiation of internal stratified epithelia. *Mol Carcinog*, 1, 96-108.
- NOLLET, F., KOOLS, P. & VAN ROY, F. (2000) Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*, 299, 551-572.
- ODA, H., TSUKITA, S. & TAKEICHI, M. (1998) Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev Biol*, 203, 435-450.
- PALACIOS, J., BENITO, N., BERRAQUERO, R., PIZARRO, A., CANO, A. & GAMALLO, C. (1995) Differential spatiotemporal expression of E- and P-cadherin during mouse tooth development. *Int J Dev Biol*, 39, 663-666.
- PARENT, A., CHOI, C., CAUDY, K., GRIDLEY, T. & DF., K. (2004) The developmental transcription factor *slug* is widely expressed in tissues of adult mice. *J Histochem Cytochem*, 52, 959-65.
- PAVLETICH, N. P. & PABO, C. O. (1993) Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science*, 261, 1701-1707.
- PAZNEKAS, W. A., OKAJIMA, K., SCHERTZER, M., WOOD, S. & JABS, E. W. (1999) Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (*SNAI1*) and a related processed pseudogene (*SNAI1P*). *Genomics*, 62, 42-49.
- PEINADO, H. & CANO, A. (2005) Epigenetic regulation of the E-cadherin cell-cell adhesion molecule. "DNA methylation, epigenetics and metastasis" (Ed. M.Esteller). Springer, The Netherlands, pp. 157-190.
- PEINADO, H., PORTILLO, F. & CANO, A. (2004a) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol*, 48, 365-375.
- PEINADO, H., MARIN, F., CUBILLO, E., STARK, H. J., FUSENIG, N., NIETO, M. A. & CANO, A. (2004b) Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci*, 117, 2827-2839.
- PEINADO, H., BALLESTAR, E., ESTELLER, M. & CANO, A. (2004c) Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol*, 24, 306-319.
- PEINADO, H., DEL CARMEN IGLESIAS-DE LA CRUZ, M., OLMEDA, D., CSISZAR, K., FONG, K. S., VEGA, S., NIETO, M. A., CANO, A. & PORTILLO, F. (2005) A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J*, 24, 3446-3458.
- PEINADO, H., OLMEDA, D. & CANO, A. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 7, 415-428.
- PEREZ-LOSADA, J., SANCHEZ-MARTIN, M., PEREZ-CARO, M., PEREZ-MANCERA, P. A. &

- SANCHEZ-GARCIA, I. (2003) The radioresistance biological function of the SCF/kit signaling pathway is mediated by the zinc-finger transcription factor Slug. *Oncogene*, 22, 4205-4211.
- PEREZ-LOSADA, J., SANCHEZ-MARTIN, M., RODRIGUEZ-GARCIA, A., SANCHEZ, M. L., ORFAO, A., FLORES, T. & SANCHEZ-GARCIA, I. (2002) Zinc-finger transcription factor Slug contributes to the function of the stem cell factor c-kit signaling pathway. *Blood*, 100, 1274-1286.
- PEREZ-MANCERA, P. A., BERMEJO-RODRIGUEZ, C., GONZALEZ-HERRERO, I., HERRANZ, M., FLORES, T., JIMENEZ, R. & SANCHEZ-GARCIA, I. (2007) Adipose tissue mass is modulated by SLUG (SNAI2). *Hum Mol Genet*, 16, 2972-2986.
- PEREZ-MORENO, M., DAVIS, M. A., WONG, E., PASOLLI, H. A., REYNOLDS, A. B. & FUCHS, E. (2006) p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin. *Cell*, 124, 631-644.
- PEREZ-MORENO, M., SONG, W., PASOLLI, H. A., WILLIAMS, S. E. & FUCHS, E. (2008) Loss of p120 catenin and links to mitotic alterations, inflammation, and skin cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 15399-15404.
- PEREZ-MORENO, M. A., LOCASCIO, A., RODRIGO, I., DHONDT, G., PORTILLO, F., NIETO, M. A. & CANO, A. (2001) A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem*, 276, 27424-27431.
- PERISSI, V., SCAFOGLIO, C., ZHANG, J., OHGI, K. A., ROSE, D. W., GLASS, C. K. & ROSENFELD, M. G. (2008) TBL1 and TBLR1 phosphorylation on regulated gene promoters overcomes dual CtBP and NCoR/SMRT transcriptional repression checkpoints. *Mol Cell*, 29, 755-766.
- PERL, A. K., WILGENBUS, P., DAHL, U., SEMB, H. & CHRISTOFORI, G. (1998) A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, 392, 190-193.
- PHINNEY, D. G. & PROCKOP, D. J. (2007) Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*, 25, 2896-2902.
- POLYAK, K. & WEINBERG, R. A. (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*, 9, 265-273.
- POLLARD, J. W. (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 4, 71-78.
- QI, D., BERGMAN, M., AIHARA, H., NIBU, Y. & MANNERVIK, M. (2008) Drosophila Ebi mediates Snail-dependent transcriptional repression through HDAC3-induced histone deacetylation. *EMBOJ*, 27, 898-909.
- QUINTANILLA, M., BROWN, K., RAMSDEN, M. & BALMAIN, A. (1986) Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature*, 322, 78-80.
- REDDY, A. L. & FIALKOW, P. J. (1979) Multicellular origin of fibrosarcomas in mice induced by the chemical carcinogen 3-methylcholanthrene. *J Exp Med*, 150, 878-887.
- RIETHMACHER, D., BRINKMANN, V. & BIRCHMEIER, C. (1995) A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 855-859.
- RO, S. & RANNALA, B. (2005) Evidence from the stop-EGFP mouse supports a niche-sharing model of epidermal proliferative units. *Exp Dermatol*, 14, 838-843.
- RODRIGO, I., CATO, A. C. & CANO, A. (1999) Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp Cell Res*, 248, 358-



371.

- ROMANO, L. A. & RUNYAN, R. B. (2000) Slug is an essential target of TGFbeta2 signaling in the developing chicken heart. *Dev Biol*, 223, 91-102.
- ROOP, D. R., KRIEG, T. M., MEHREL, T., CHENG, C. K. & YUSPA, S. H. (1988) Transcriptional control of high molecular weight keratin gene expression in multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res*, 48, 3245-3252.
- ROSIVATZ, E., BECKER, I., SPECHT, K., FRICKE, E., LUBER, B., BUSCH, R., HOFER, H. & BECKER, K. F. (2002) Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol*, 161, 1881-1891.
- RUGGERI, B., CAAMANO, J., GOODROW, T., DIRADO, M., BIANCHI, A., TRONO, D., CONTI, C. J. & KLEIN-SZANTO, A. J. (1991) Alterations of the p53 tumor suppressor gene during mouse skin tumor progression. *Cancer Res*, 51, 6615-6621.
- SAKAI, D., SUZUKI, T., OSUMI, N. & WAKAMATSU, Y. (2006) Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development. *Development*, 133, 1323-1333.
- SANO, K., TANIHARA, H., HEIMARK, R., OBATA, S., DAVIDSON, M., ST JOHN, T., TAKETANI, S. & SUZUKI, S. (1993) Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J*, 12, 2249-2256.
- SARRIO, D., MORENO-BUENO, G., HARDISSON, D., SANCHEZ-ESTEVEZ, C., GUO, M., HERMAN, J. G., GAMALLO, C., ESTELLER, M. & PALACIOS, J. (2003) Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *Int J Cancer*, 106, 208-215.
- SASAKI, M., ABE, R., FUJITA, Y., ANDO, S., INOKUMA, D. & SHIMIZU, H. (2008) Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*, 180, 2581-2587.
- SAVAGNER, P., KUSEWITT, D. F., CARVER, E. A., MAGNINO, F., CHOI, C., GRIDLEY, T. & HUDSON, L. G. (2005) Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol*, 202, 858-866.
- SCHUH, R., VESTWEBER, D., RIEDE, I., RINGWALD, M., ROSENBERG, U. B., JACKLE, H. & KEMLER, R. (1986) Molecular cloning of the mouse cell adhesion molecule uvomorulin: cDNA contains a B1 related sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 1364-1368.
- SEFTON, M., SANCHEZ, S. & NIETO, M. A. (1998) Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development*, 125, 3111-3121.
- SHI, Y., SAWADA, J., SUI, G., AFFAR EL, B., WHETSTINE, J. R., LAN, F., OGAWA, H., LUKE, M. P. & NAKATANI, Y. (2003) Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature*, 422, 735-738.
- SHIH, J. Y., TSAI, M. F., CHANG, T. H., CHANG, Y. L., YUAN, A., YU, C. J., LIN, S. B., LIOU, G. Y., LEE, M. L., CHEN, J. J., HONG, T. M., YANG, S. C., SU, J. L., LEE, Y. C. & YANG, P. C. (2005) Transcription repressor Slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 11, 8070-8.
- SHIOIRI, M., SHIDA, T., KODA, K., ODA, K., SEIKE, K., NISHIMURA, M., TAKANO, S. & MIYAZAKI, M. (2006) Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer*, 94, 1816-1822.

- SHOOK, D. & KELLER, R. (2003) Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev*, 120, 1351-1383.
- SICA, A., LARGHI, P., MANCINO, A., RUBINO, L., PORTA, C., TOTARO, M. G., RIMOLDI, M., BISWAS, S. K., ALLAVENA, P. & MANTOVANI, A. (2008) Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol*, 18, 349-355.
- SICA, A., RUBINO, L., MANCINO, A., LARGHI, P., PORTA, C., RIMOLDI, M., SOLINAS, G., LOCATI, M., ALLAVENA, P. & MANTOVANI, A. (2007) Targeting tumour-associated macrophages. *Expert Opin Ther Targets*, 11, 1219-1229.
- SOBRADO, V. R., MORENO-BUENO, G., CUBILLO, E., HOLT, L. J., NIETO, M. A., PORTILLO, F. & CANO, A. (2009) The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT. *J Cell Sci*, 122, 1014-1024.
- SORKIN, B. C., HEMPERLY, J. J., EDELMAN, G. M. & CUNNINGHAM, B. A. (1988) Structure of the gene for the liver cell adhesion molecule, L-CAM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 7617-21.
- STENBACK, F. (1980) Skin carcinogenesis as a model system: observations on species, strain and tissue sensitivity to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene with or without promotion from croton oil. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 46, 89-97.
- STRATHDEE, S. (2002) Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol.*, 12, 373-379.
- TAKAHASHI, K. & SUZUKI, K. (1996) Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Exp Cell Res*, 226, 214-22.
- TAKEICHI, M. (1988) The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 102, 639-655.
- TAKEICHI, M. (1990) Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 237-252.
- TAKEICHI, M. (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251, 1451-1455.
- TAKEICHI, M. (1993) Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol*, 5, 806-811.
- TAKEICHI, M. (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 7, 619-627.
- TAMURA, G. (2002) Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in gastric cancer. *Histol. Histopathol.*, 17, 323-329.
- TANIHARA, H., SANO, K., HEIMARK, R. L., ST JOHN, T. & SUZUKI, S. (1994) Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin. *Cell Adhes Commun*, 2, 15-26.
- TENNENBAUM, T., WEINER, A. K., BELANGER, A. J., GLICK, A. B., HENNINGS, H. & YUSPA, S. H. (1993) The suprabasal expression of alpha 6 beta 4 integrin is associated with a high risk for malignant progression in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res*, 53, 4803-4810.
- TENNENBAUM, T., YUSPA, S. H., GROVER, A., CASTRONOVO, V., SOBEL, M. E., YAMADA, Y. & DE LUCA, L. M. (1992) Extracellular matrix receptors and mouse skin carcinogenesis: altered expression linked to appearance of early markers of tumor progression. *Cancer Res*, 52, 2966-2976.
- THIERY, J. P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2, 442-454.

- THIERY, J. P., ACLOQUE, H., HUANG, R. Y. & NIETO, M. A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-890.
- THIERY, J. P. & SLEEMAN, J. P. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 131-142.
- TIMMERMAN, L. A., GREGO-BESSA, J., RAYA, A., BERTRAN, E., PEREZ-POMARES, J. M., DIEZ, J., ARANDA, S., PALOMO, S., MCCORMICK, F., IZPISUA-BELMONTE, J. C. & DE LA POMPA, J. L. (2004) Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev*, 18, 99-115.
- TLSTY, T. D. & COUSSENS, L. M. (2006) Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol*, 1, 119-150.
- TOMITA, K., VAN BOKHOVEN, A., VAN LEENDERS, G. J., RUIJTER, E. T., JANSEN, C., BUSSEMAKERS, M. J. & SCHALKEN, J. A. (2000) Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res.*, 60, 3650-3654.
- TRIBULO, C., AYBAR, M. J., SANCHEZ, S. S. & MAYOR, R. (2004) A balance between the anti-apoptotic activity of Slug and the apoptotic activity of msx1 is required for the proper development of the neural crest. *Dev Biol*, 275, 325-342.
- TUMBAR, T., GUASCH, G., GRECO, V., BLANPAIN, C., LOWRY, W. E., RENDL, M. & FUCHS, E. (2004) Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science*, 303, 359-363.
- TWIGG, S. & WILKIE, A. (1999) Characterisation of the human Snail gene (SNAI1) and exclusion as a major disease gene in craniosynostosis. *Hum Genet.*, 105, 320-326.
- UCHIKADO, Y., NATSUGOE, S., OKUMURA, H., SETOYAMA, T., MATSUMOTO, M., ISHIGAMI, S. & AIKOU, T. (2005) Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 11, 1174-1180.
- USUI, T., SHIMA, Y., SHIMADA, Y., HIRANO, S., BURGESS, R., SCHWARZ, T., TAKEICHI, M. & UEMURA, T. (1999) Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell*, 98, 585-595.
- VAN DER GEER, P., HUNTER, T. (1994). Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by electrophoresis and chromatography on thinlayer cellulose plates. *Electrophoresis*, 15, 544-554.
- VANDEWALLE, C., VAN ROY, F. & BERX, G. (2009) The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol Life Sci*, 66, 773-787.
- VERNON, A. E. & LABONNE, C. (2006) Slug stability is dynamically regulated during neural crest development by the F-box protein Ppa. *Development*, 133, 3359-3370.
- VINCENT, T., NEVE, E. P., JOHNSON, J. R., KUKALEV, A., ROJO, F., ALBANELL, J., PIETRAS, K., VIRTANEN, I., PHILIPSON, L., LEOPOLD, P. L., CRYSTAL, R. G., DE HERREROS, A. G., MOUSTAKAS, A., PETTERSSON, R. F. & FUXE, J. (2009) A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*, 11, 943-950.
- VITALI, R., MANCINI, C., CESI, V., TANNO, B., MANCUSO, M., BOSSI, G., ZHANG, Y., MARTINEZ, R. V., CALABRETTA, B., DOMINICI, C. & RASCHELLA, G. (2008) Slug (SNAI2) down-regulation by RNA interference facilitates apoptosis and inhibits invasive growth in neuroblastoma preclinical models. *Clin Cancer Res*, 14, 4622-4630.
- VLEMINCKX, K., VAKAET, L., JR., MAREEL, M., FIERS, W. & VAN ROY, F. (1991) Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor

- role. *Cell*, 66, 107-119.
- WANG, S. P., WANG, W. L., CHANG, Y. L., WU, C. T., CHAO, Y. C., KAO, S. H., YUAN, A., LIN, C. W., YANG, S. C., CHAN, W. K., LI, K. C., HONG, T. M. & YANG, P. C. (2009) p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat Cell Biol*, 11, 694-704.
- WATT, F. M., LO CELSO, C. & SILVA-VARGAS, V. (2006) Epidermal stem cells: an update. *Curr Opin Genet Dev*, 16, 518-524.
- WU, W. S., HEINRICHS, S., XU, D., GARRISON, S. P., ZAMBETTI, G. P., ADAMS, J. M. & LOOK, A. T. (2005) Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell*, 123, 641-653.
- WU, Y., EVERS, B. M. & ZHOU, B. P. (2009) Small C-terminal domain phosphatase enhances snail activity through dephosphorylation. *J Biol Chem*, 284, 640-648.
- YANG, J., MANI, S. A., DONAHER, J. L., RAMASWAMY, S., ITZYKSON, R. A., COME, C., SAVAGNER, P., GITELMAN, I., RICHARDSON, A. & WEINBERG, R. A. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117, 927-939.
- YANG, J. & WEINBERG, R. A. (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, 14, 818-829.
- YANG, Z., RAYALA, S., NGUYEN, D., VADLAMUDI, R. K., CHEN, S. & KUMAR, R. (2005) Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. *Cancer Res*, 65, 3179-3184.
- YAP, A., BRIEHER, W. & GUMBINER, B. (1997) Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 13, 119-146.
- YAP, A., NIESSEN, C. & GUMBINER, B. (1998) The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol.*, 141, 779-789.
- YAP, A. S. A. & KOVACS, E. M. (2003) Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J Cell Biol*, 160, 11-16.
- YOOK, J. I., LI, X. Y., OTA, I., FEARON, E. R. & WEISS, S. J. (2005) Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem*, 280, 11740-11748.
- YUSPA, S. H. (1994) The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis--thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res*, 54, 1178-1189.
- YUSPA, S. H., DLUGOSZ, A. A., CHENG, C. K., DENNING, M. F., TENNENBAUM, T., GLICK, A. B. & WEINBERG, W. C. (1994) Role of oncogenes and tumor suppressor genes in multistage carcinogenesis. *J Invest Dermatol*, 103, 90S-95S.
- YUSPA, S. H., DLUGOSZ, A. A., DENNING, M. F. & GLICK, A. B. (1996) Multistage carcinogenesis in the skin. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 1, 147-150.
- ZHANG, C. & KLYMKOWSKY, M. W. (2009) Unexpected functional redundancy between Twist and Slug (Snail2) and their feedback regulation of NF-kappaB via Nodal and Cerberus. *Dev Biol*, 331, 340-349.
- ZHENG, L., BAUMANN, U. & REYMOND, J. L. (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res*, 32, e115.

ZHOU, B. P., DENG, J., XIA, W., XU, J., LI, Y. M., GUNDUZ, M. & HUNG, M. C. (2004) Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*, 6, 931-940.



## **ANEXO I**

---

**Publicaciones relacionadas con la Tesis**