

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

**REGULACIÓ DE LA TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA
EN CÈL·LULES TUMORALS :
« PAPER D'SNAIL I ALTRES FACTORS
TRANSCRIPCIONALS »**

Memòria presentada per :

Isabel Puig Borreil

per a optar al grau de doctor
pel departament de Ciències Experimentals i de la Salut,
Universitat Pompeu Fabra
Barcelona, 2005

Tesi doctoral realitzada en la Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular
del Institut Municipal d'Investigació Mèdica

Antonio García de Herreros,
Director de la tesi

Isabel Puig Borreil,
Doctoranda

Dipòsit legal: B.33688-2005
ISBN: 84-689-3407-0

No es pot desfer un nus, sense saber com està fet.

Aristóteles

A la meva mare, pel seu record que sempre m'acompanya
A la meva petita família per recolzar-me incondicionalment
Al Joan, per ser el millor que m'ha passat a la vida

AGRAÏMENTS

Des del primer dia que vaig arribar a aquest laboratori fins avui han passat exactament 5 anys, 6 mesos i 13 dies. Des de llavors han passat moltes coses i he conegut molta gent que d'una forma o altre han ajudat a que aquesta tesi arribés al final, i a les que voldria agrair tots els moments, totes les rialles, totes les llàgrimes i totes les converses compartides.

Gràcies a la meva petita família, a la meva àvia materna, Mami, per recolzar-me incondicionalment en aquesta travessa científica, per preocupar-se per mi i per ser com una segona mare. Et recordaré sempre com abans del 30 de setembre del 2004, plena de vida.

A la meva germana, Cris, per ser molt més que una germana, per estar al meu costat sempre que la necessito, per ajudar-me en tot moment. Sense el teu recolzament aquesta tesi no s'hagués pogut realitzar.

Gràcies al meu cunyat, Montxo, per haver fet tant per la meva família i per ser el millor cunyat del món.

Gràcies al Joan, per creure en mi, per donar-me els millors moments de la meva vida, per fer-me riure quan estic més trista, per intentar entendre'm encara que a vegades sigui difícil, per estimar-me tant, per ser com ets.

Gràcies al meu futur nebodet, Josep, perquè, tot i que encara estiguis dins de la panxa, has donat llum on hi havia foscor i esperança on hi havia dolor.

Gràcies al meu pare per deixar-me estudiar allò que més volia i seguir el camí que feia temps que havia decidit.

Gràcies als pares del Joan, el Jordi i l'Elvira, gràcies als seus germans, la Montse, el Jordi i el Francesc, gràcies a les seves respectives parelles, el Josep, la Marta i l'Anna, gràcies als seus nebots, el Josep, la Gisela i el Pol per fer-me sentir com una més de la família.

Gràcies a la gran família del meu cunyat, el Ramon i la Maria, l'Anna, l'Àngels, l'Elena, el Joan, el Josep, la Mariona i la Núria per engrandir la meva petita família i per la seva ajuda.

Gràcies a tota la gent del laboratori que han arribat a ser com una segona família. Gràcies a l'Antonio per haver-me donat l'oportunitat de fer allò que més m'agrada, per haver confiat en mi durant tot aquest temps i per ajudar-me a "créixer" com a científica. Has estat un gran "jefe" tant a nivell científic com a nivell personal, gràcies per entendre'm en els pitjors moments.

Gràcies a la Sandra, "el orgullo de Reus", per ser com ets i per haver estat una gran companya de poiata i una gran amiga. Gràcies per totes les converses que hem tingut durant tots aquests anys, gràcies per escoltar-me i per compartir amb mi les pors, les penes, les alegries i els experiments!!! Et desitjo el millor.

Gràcies a la Susana Aguilar per haver estat una altra amiga en el món de la ciència, per ensenyar-me el que és seguir endavant quan tot se't gira en contra. Gràcies per haver compartit amb mi tots els moments, els fàcils i els difícils.

Gràcies al Jose i la Susana Miravet, els "papis", pel vostre bon humor. Al Jose per tenir la paciència d'escoltar-me i per dibuixar-me un somriure i a la Susana per la seva capacitat de transmetre optimisme i alegria. Gràcies per la vostra amistat.

Gràcies al Miki per organitzar aquells esmorzars o berenars espontanis que ens ajudaven a desconnectar. Gràcies per haver-me fet riure com ningú i per haver estat un bon amic.

Gràcies a la Clara per ser la millor en canviar de tema quan un menys s'ho espera. Gràcies pels moments divertits que hem compartit.

Gràcies al Fran per ensenyar-me que la sensibilitat masculina també existeix. Gràcies per les moltes converses compartides.

Gràcies a la Bàrbara pels moments de “despiste” compartits i per alguna que altra conversa sobre l'espai, els forats negres i l'astronomia una nit de setembre a Madrid. Crec que al final et va ser útil, oi? Gràcies per la teva amistat.

Gràcies a la Cris per la teva espontaneïtat i per les innumerables vegades que m'has recomanat restaurants, obres de teatres, pel·lícules, etc. Gràcies a tu he descobert un munt de coses que no coneixia. Gràcies per compartir la calculadora, el celo i la grapadora, elements importants per elaborar la llibreta del laboratori. Gràcies per ser una amiga.

Gràcies a l'Ariadna per ensenyar-me el que és ser valenta i per les converses a cultius o al laboratori. Gràcies per conscienciejar-me sobre els problemes del món dels quals molt sovint ens oblidem.

Gràcies al David per ensenyar-me el que és l'esforç i la passió per la ciència, per ser tant intel·ligent com modest a la vegada, per tenir sempre un moment per explicar-te qualsevol dubte i unes paraules per animar-te.

Gràcies a la Montse perquè sempre té un moment per ajudar-te, perquè sempre té un moment per preocupar-se per tu, perquè l'inici de la seva tesi em recorda a la meva. Perquè sé que ho aconseguiràs.

Gràcies a la Maria per ser una més en aquest vaixell, pel seu interès pel que l'envolta.

Gràcies a la Maria José per la teva ajuda incondicional, per les teves paraules d'ànims, pels teus e-mails encoratjadors. Gràcies per aquelles tardes de pràctiques compartides i per totes les converses sinceres que hem tingut. Gràcies per entendre'm tant bé.

Gràcies a la Sandra P. per totes les ocasions de “sastreria” que hem compartit i per tenir sempre temps d'aconsejar-me i ajudar-me amb els experiments.

Gràcies a la Judit Grueso per haver estat, durant gran part de la tesi, l'alegria del laboratori. Gràcies per ser tant “salada” i pel teu humor, per haver-nos fet riure a tots a qualsevol moment del dia i per aixecar-nos la moral amb tanta facilitat. Gràcies per la teva frescura.

Gràcies al Jepi per haver estat el meu primer mentor, per ensenyar-me els secrets de la clonació i per tenir tanta paciència.

Gràcies a la Clara Francí per trobar sempre temps per aclarir-te qualsevol dubte.

Gràcies al Fausto per ser una persona excepcional, per les converses a la doble campana de cultius, per ensenyar-me tantes coses.

Gràcies a la Carme Torns pels seus consells en cultius cel·lulars, per ensenyar-me a tenir contentes les meves “nenes” i a recuperar-les de l'estrès. Gràcies per la teva companyia a cultius i per totes les converses entre centrífuga i centrífuga.

Gràcies a l'Anna Merlos, gran persona i millor científica, per haver-me ajudat amb els controls de les RT-PCR i per ser la meva ànima bessona, juntament amb la Bàrbara, en les activitats extra-laborals.

Gràcies a l'Estela, la Raquel, l'Elena Ortiz, la Natàlia, la Judit Pujal i la Sonia per tots els dinars compartits al fons del passadís, per les aventures amb el microones i pels riures terapèutics.

Gràcies a la Meritxell, la Laia, l'Ester, la Luisa, l'Elena López, la Coral, l'Ibane i la Marta Garrido pel temps que he pogut compartir amb elles al laboratori.

Gràcies al Maurici, l'Andrea, el Ramon, l'Oriol, el Manel i el Dani per la vostra valentia al estar en minoria, pel vostre sentit de l'humor.

Gràcies a tots els de l'Autònoma, la Mireia, el Julio i l'Imma per la seva ajuda científica i per algun que altre dinar compartit.

Gràcies a l'Annie, l'Anouchka, la Carme de Bolós, l'Elisabet, el Francesc, el Gabriel, el Josep Maria, el Paco, la Pilar i el Xavi per tenir sempre un moment per escoltar-te i ajudar-te, per aclarir-te qualsevol dubte, pels "bon dia" del passadís. Gràcies per ajudar-me a créixer com a científica i, en alguns casos, gràcies pel vostre esperit crític però constructiu en els seminaris.

Gràcies al Santi, l'Anna López, la Mercè Martin, L'Edu i l'Elena per ser una generació difícil de substituir.

Gràcies, molt especialment, a la Montse García per ser la secretària més eficient del món, després de la meva germana és clar, i per ajudar-me en tots els tràmits de beques i demés embolics de burocràcia. Gràcies per les converses d'ordinador a ordinador en la secretaria i per estar sempre disposada a ajudar.

Gràcies a l'Arrate per les hores passades davant del microscopi buscant els millors filaments d'actina o els millors "speckles" per captar. Gràcies per la teva experiència i els teus consells, i sobretot per la teva eterna paciència.

Gràcies a tots els meus amics de Sant Llorenç. Gràcies a la Txell, la meva estimadíssima amiga i gran companya de pis, per haver-me acompanyat durant tota la tesi, per les tardes de rialles, pels sopars preparats a la cuina, per totes les converses al sofà, per recolzar-me en tots els moments, per ser com ets, per ser una amiga. Perquè crec en tu i ser que aconseguiràs tot el que et proposis.

Gràcies a la Pili per ser una persona amb un gran cor, per tenir una qualitat humana excepcional, per escoltar sempre als demés sense esperar res a canvi, per la teva força interior (que la tens), per la teva bondat. No canviïs mai.

Gràcies a la Beti i la Meritxell per estar quan les necessitava, pel seus "sms" en els moments baixos i per les seves rialles en els moments alegres. Gràcies per totes les converses a la barra del Jardí i al cotxe pujant cap a Sant Llorenç, gràcies per les vostres paraules.

Gràcies a la Georgina per aquella conversa a temps, per intentar arreglar les coses, per no deixar perdre una amistat. Gràcies per intentar entendre'm.

Gràcies a la Montse i al Jesús per ser una parella única, pel recolzar-me quan més ho necessitava, per les converses al Jardí, per les vostre paraules, pel vostre interès. Us desitjo molta felicitat en la propera nova etapa de la vostra vida.

Gràcies al Joan de Manresa per ensenyar-me el que és la força de la vida, la valentia, el valor de l'esperança. Gràcies per haver-me donat la teva amistat, per totes les converses i rialles compartides. Gràcies per ser un model a seguir, gràcies per ser com ets.

Gràcies a la Montse Ollé, el Marc Casoné, la Judit, el Dani, el Miquel i la Claudia per totes les nits de festa, per ajudar-me a desconnectar, per la vostra amistat.

Gràcies a totes les amigues de la Facultat, les “biolocas”, per fer l'esforç de no deixar que el temps apagui la nostra amistat.

Gràcies a la Mari Carmen pel teu sentit de l'humor, per la teva capacitat organitzadora de esdeveniments “marujils”, per compartir un mateix camí. Gràcies per aguantar-me des dels primers dies de la facultat.

Gràcies a l'Àngela per estar al meu costat des del principi, per les nostres converses de “truchos”, per compartir molts moments.

Gràcies a la Miriam per ser tant “pastoril”, per la teva espontaneïtat, pel teu optimisme contagiós.

Gràcies a la Carol per les tapes de iogurt, per explicar-nos viatges increïbles que et feien volar amb la imaginació. Gràcies per la teva simpatia.

Gràcies a l'Ester per ser un símbol de germanor entre Catalunya i altres països del món. Gràcies per estar tan lluny i al mateix temps tan a prop.

Gràcies a l'Irma per la teva imaginació i la teva capacitat a l'hora de fer manualitats, Gràcies per la teva originalitat, per, de quan en quan, donar-nos un “toque” a totes quan ens despistem per quedar i organitzar. Gràcies per l'esforç diari de mantenir-nos a totes juntes.

Gràcies a la Marisa per tantes rialles, pels seus consells i per ser una més.

Gràcies a la Soraya per la seva força interior, per les converses compartides en els dinars i els “findes marujils”.

Gràcies a la Rosa per ser tan divertida, per les rialles compartides, per haver connectat tan bé.

Gràcies a tots els “truchos”, al Jorge, l'Alexis, el Juan, el Joan, el Carles i el Toni per ser tan genials i per haver congeniat tan bé entre vosaltres.

Crec que no m'he oblidat de ningú i si és així, espero que em perdoni no és res personal. Sense tots vosaltres aquesta aventura hagués estat molt difícil, de manera que aquesta tesi es tan vostra com meva. Moltes gràcies a tots per haver estat al meu costat durant tot aquest temps. Només dir-vos que, si tot va bé i passo una temporada lluny d'aquí, us enyoraré moltíssim i que el vostre record m'acompanyarà allà on vagi.

Barcelona, 15 de març del 2005.

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ	1
1.- La transició epiteli-mesènquima en embriogènesi i càncer	1
2.- Alteracions de les cèl·lules al llarg del procés de TEM	2
3.- Gens que modifiquen la seva expressió durant l'embriogènesi	4
3.1.- <i>L'E-cadherina</i>	4
3.2.- <i>La superfamília de repressors Snail</i>	5
3.3.- <i>Zeb-1 i Zeb-2</i>	8
3.4.- <i>E47</i>	9
3.5.- <i>Twist</i>	9
3.6.- <i>WT1</i>	10
4.- Vies de senyalització implicades en la TEM	12
5.- Snail i la regulació de la TEM en embriogènesi i processos tumorals	13
OBJECTIUS	15
CAPÍTOL I: Gens epitelials i mesenquimals regulats per Snail durant la transició epiteli-mesènquima (TEM)	16
ANTECEDENTS	16
RESULTATS	17
• Les cèl·lules transfectades establement amb Snail perden les seves característiques epitelials i es desdiferencien	17
• Les cèl·lules que expressen establement Snail presenten una disminució de l'expressió de gens marcadors epitelials i un augment de l'expressió de gens marcadors mesenquimals	19
• Snail té la capacitat de reprimir directament l'expressió de MUC-1 i de VDR	20
• L'expressió d'Snail i de Zeb-1 provoca una gran davallada de l'expressió de l'E-cadherina	23
• Snail indueix l'expressió de Zeb-1 en clons HT-29 M6 que expressen ectòpicament Snail en absència de tetraciclina	25
• Són necessàries concentracions majors de Zeb-1 que d'Snail per obtenir una repressió comparable a la produïda per aquest darrer factor transcripcional	26
• Els nivells d'ARNm de Zeb-2 no canvien durant la TEM	28
• L'activitat del promotor de Zeb-2 és major en aquelles línies cel·lulars que han patit una TEM	29
• La línia IEC control que presenta una baixa activitat del promotor de Zeb-2 conserva l'intró de l'ARNm <i>antisense</i> de Zeb-2 mentre que les línies IEC ILK-1 i IEC Ha-Ras el perden	32
• Els clons M6 A4, M6 <i>tet-off</i> SNA1 i SW-480 SNA, que experimenten una	35

TEM, conserven l'intró situat entre l'exó U5 i l'exó 1 del transcrit <i>sense de Zeb-2</i>	
DISCUSSIÓ	36
CAPÍTOL II: Regulació de la transcripció d'Snail	45
ANTECEDENTS	45
RESULTATS	46
• El fragment del promotor d'Snail -78/+59 és el que presenta major activitat en dues línies cel·lulars mesenquimals	46
• El promotor mínim d'Snail és sensible a senyals que augmenten els nivells d'Snail en cèl·lules epitelials	47
• La via de senyalització d'ERK és responsable de l'activació del promotor d'Snail	49
• El factor Sp1 pot unir-se al promotor mínim en les cèl·lules IEC-ILK1 i IEC-Ha-ras	51
• NFκB/p65 estimula la transcripció d'Snail a través d'una regió situada immediatament per davant del promotor mínim en SW-480	53
DISCUSSIÓ	56
CAPÍTOL III: Importància de WT1 en la co-regulació de gens regulats per Snail	60
ANTECEDENTS	60
RESULTATS	61
• WT1 estimula l'expressió de l'E-cadherina	61
• WT1 i Snail competeixen en la seva funció reguladora del promotor de l'E-cadherina	63
• Snail reprimeix l'activitat del promotor de l'E-cadherina activat per WT1 en NIH 3T3 a través de les caixes E1 i E2	65
• Snail i WT1 competeixen per unir-se al promotor de l'E-cadherina	66
• L'expressió estable de WT1 en cèl·lules que expressen exògenament Snail dona lloc a un canvi fenotípic	68
• WT1 provoca una reorganització del citoesquelet cortical d'actina	70
• WT1 afavoreix l'adhesió cel·lular	71
• WT1 no activa l'expressió de l'E-cadherina en els clons que co-expressen Snail i WT1	73
• WT1 afavoreix la unió entre l'E-cadherina i la β-catenina	74
• WT1 recupera l'expressió de la desmocolina	75
• WT1 recupera l'expressió del gen marcador epitelial MUC-1 i disminueix els nivells del gen marcador mesenquimal Fibronectina	77
DISCUSSIÓ	79

MODEL FINAL	85
CONCLUSIONS	92
MATERIALS I MÈTODES	94
BIBLIOGRAFIA	108

ABREVIATURES

APC: Adenomatous Polyposis Coli protein.

AREB6: Atp1a1 Regulatory Element Binding factor 6.

ARN: Àcid Ribonucleic.

bHLH: basic Helix-Loop-Helix.

Caixes E: Ephrussi box-like motif.

CtBP: C-terminal Binding Protein.

EGR: Epidermal Growth factor Receptor.

EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay.

ERK : Extracellular-Regulated Kinase.

EST: Expressed Sequence Tags.

GSK-3 β : Glycogen Synthase Kinase-3 β .

HER2/*neu*: Human Epidermal growth factor Receptor 2.

I κ B: Inhibitor of nuclear factor Kappa B.

ILK: Integrin-Linked Kinase.

IP: Immunoprecipitació.

IRES: Internal Ribosome Entry Site.

KTS: Lisina Treonina Serina.

LEF- 1: Lymphoid Enhancer binding Factor 1.

LY294002: 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one hydrochloride.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase.

MEK: Mitogen activated protein kinase kinase.

MUC- 1: Mucin 1.

NF κ B: Nuclear Factor Kappa B.

PD98509: 2-amino-3-methoxyflavone.

PI3K: Phosphoinositide-3 Kinase.

PK-C α : Protein Kinase C α .

PMA: Phorbol 12myristate 13-acetate.

RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends.

RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction.

SB203580: 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridil)1H-imidazole.

SIP1 : Smad Interacting Protein 1.

Sp/XKLF: Família Sp/Krüppel-Like Factors.

TEM/EMT: Transició Epiteli-Mesènquima/Epithelial-Mesenchymal Transition.

TME/MET: Transició Mesènquima-Epiteli/Mesenchymal-Epithelial Transition.

UO126: 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene.

UTR: Untranslated Region.

WB: Western Blot.

WT1: Wilms' Tumor protein 1.

Zfh- 1/2: Zinc-finger homeodomain- 1/2.

INTRODUCCIÓ

1.- La transició epiteli-mesènquima en embriogènesi i càncer

La transició epiteli-mesènquima (TEM) es defineix com el conjunt d'esdeveniments cel·lulars i moleculars que donen lloc a la reorganització de l'epiteli i la seva conversió, reversible o irreversible, en cèl·lules de tipus mesenquimals (Thiery and Chopin, 1999). Aquest procés dona lloc a l'inici de la gastrulació, procés durant el qual les cèl·lules del mesoderm es transformen en cèl·lules mesenquimals primerenques i migren cap a l'interior del blastocel com a cèl·lules individuals. Des del punt de vista de l'evolució, aquest fenomen va ser molt important ja que va permetre l'aparició d'una tercera capa embrionària (Nieto, 2002). A més a més, el fenomen de TEM també està implicat en un altre important esdeveniment que ocorre al llarg del desenvolupament, la formació de la cresta neural. Les cèl·lules de la cresta neural perden la seva morfologia neuroepitelial per adquirir un fenotip migratori com a cèl·lules fibroblàstiques individuals. Aquesta veritable TEM va acompanyada d'un ràpid canvi en el seu estadi d'adhesió (Thiery and Chopin, 1999).

Avui en dia, existeixen fortes evidències que suggereixen que la TEM és un important esdeveniment durant la progressió de varis carcinomes, i potser una característica permanent en tumors amb aparença mixta entre carcinoma i sarcoma. El fenomen de TEM permetria a la cèl·lula tumoral adquirir característiques invasives facilitant, d'aquesta manera, l'inici d'un procés metastàtic. Com podem veure en la figura I1, aquest procés s'iniciaria en l'epiteli normal, el qual està proveït d'una membrana basal que podria començar a proliferar localment donant lloc a la formació d'un adenoma. Més tard, aquestes cèl·lules, degut a diverses alteracions genètiques, podrien patir una TEM perdent les seves característiques epitelials i transformant-se en cèl·lules d'un carcinoma invasiu. A continuació, la membrana basal podria ser degradada i les cèl·lules del carcinoma es podrien transportar, a través dels vasos limfàtics o sanguinis, a òrgans distants.

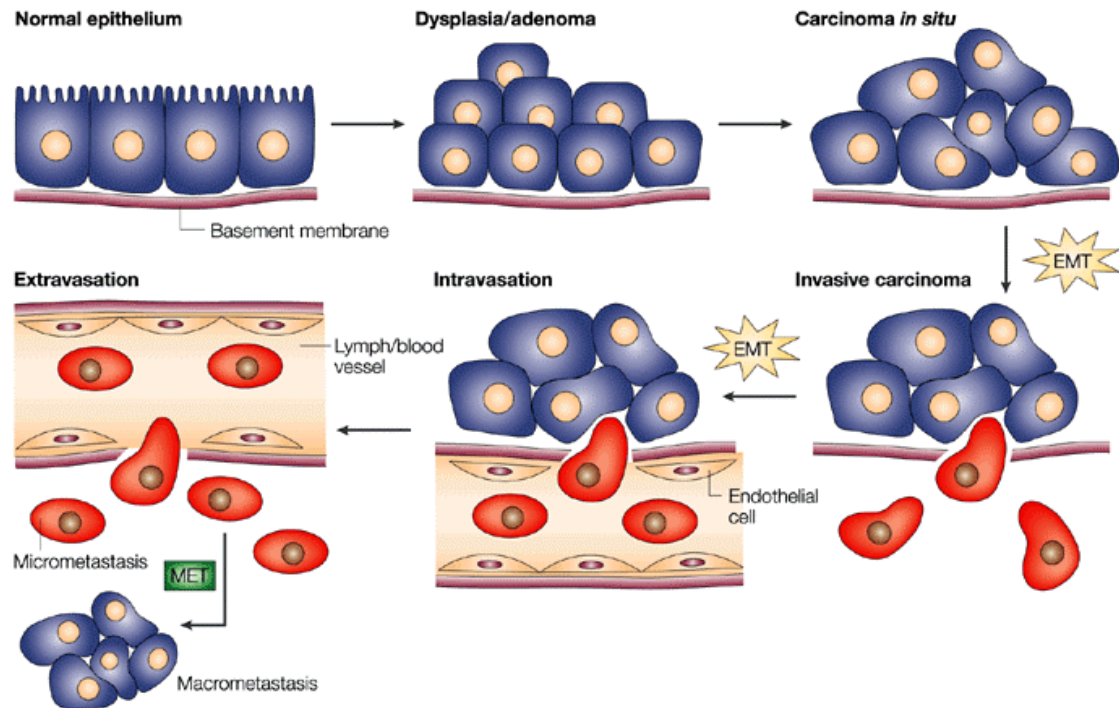


Figura 11: La TEM en l'aparició i progressió del carcinoma. Les cèl·lules tumorals perden gran quantitat de marcadors epitelials al llarg de la formació del carcinoma adoptant, així, gran diversitat de fenotips i un important potencial maligna (Thiery, 2002).

Un cop allí, les cèl·lules del carcinoma primari que hagin aconseguit arribar i extravasar-se podrien patir un procés contrari a l'inicial, fenomen anomenat transició mesènquima-epiteli (TME), donant lloc, d'aquesta manera, a un nou carcinoma secundari en l'organisme. En conclusió, podem dir que el fenomen de TEM està involucrat en un programa de desdiferenciació cel·lular donant lloc a la formació d'un carcinoma maligne (Thiery, 2002).

2.- Alteracions de les cèl·lules al llarg del procés de TEM

La pèrdua de l'adhesió cel·lular i la reorganització del citoesquelet són els principals marcadors de la TEM i són utilitzats per valorar la progressió d'aquest procés. L'habilitat de les cèl·lules per dissociar-se de l'entitat epitelial provoca la ruptura de l'adhesió intercel·lular. Als estadis inicials de la TEM, els complexos proteics d'adhesió que inclouen les unions estretes, les unions adherents, els desmosomes i les unions de tipus gap són reorganitzades i funcionalment desintegrades (Boyer *et al.*, 2000; Savagner, 2001).

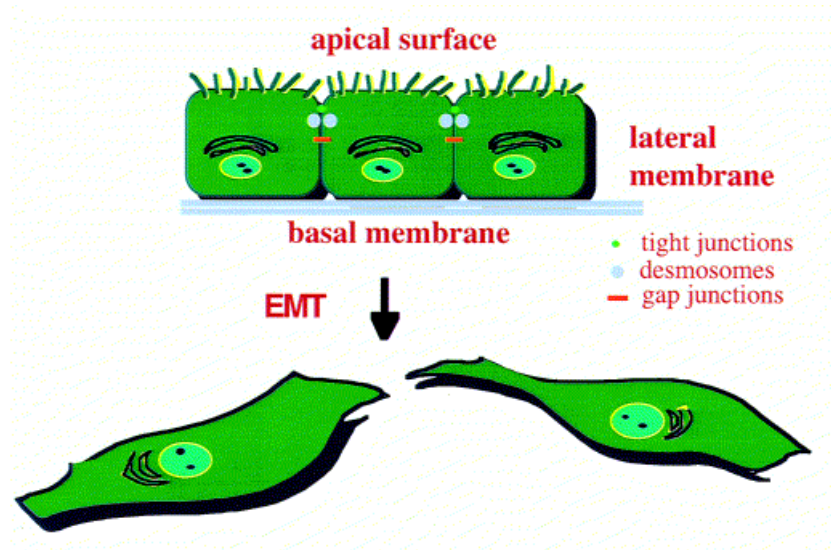


Figura 12: Canvi fenotípic cel·lular durant la TEM. Durant la TEM, la cèl·lula epitelial desorganitza els seus complexos d'adhesió, perdent així, el seu domini apical. Com a conseqüència, la cèl·lula es transforma adoptant tota una sèrie de característiques mesenquimals (Boyer *et al.*, 2000).

Com podeu veure en la figura 12, la desintegració de les unions estretes provoca la pèrdua de la polaritat epitelial destruint, així, la funció que té la capa de cèl·lules epitelials com a barrera, i la pèrdua de les estructures de tipus desmosoma trenca la continuïtat de la xarxa de filaments intermedis de les estructures epitelials, provocant l'alliberament de cèl·lules a partir d'una capa epitelial estrictament ordenada (Gotzmann *et al.*, 2004). Un cop les cèl·lules epitelials adopten un fenotip mesenquimal es caracteritzen per ser un grup de cèl·lules individualment mòbils sense polaritat baso-apical i amb la capacitat de reorganitzar-se lliurement i moure's en tres dimensions. A més a més, aquestes cèl·lules pateixen una aturada del cicle cel·lular facilitant així a la cèl·lula la plena disponibilitat del citoesquelet per tal de dirigir els canvis morfològics i portar a terme la migració cel·lular necessària durant TEM (Shook and Keller, 2003). Aquestes alteracions que caracteritzen el procés de TEM es van analitzar a nivell molecular a través de l'estudi dels processos d'histogènesi i organogènesi de ratolins *knockout*. Això va permetre identificar tota una sèrie de gens que, tan regulats de forma positiva com negativa, estaven implicats en el fenomen de TEM.

3.- Gens que modifiquen la seva expressió durant l'embriogènesi

3.1.- L'E-cadherina

L'E-cadherina és el prototipus de cadherina de tipus I. Aquests tipus de cadherines, formen ponts adhesius entre les cèl·lules a través d'interaccions homofíliques entre un o varis dominis de tipus immunoglobulines (Ig) presents en la seva regió extracel·lular i es connecten, de forma indirecta en el citoplasma, amb els microfilaments d'actina a través d'altres dues proteïnes anomenades α - i β -catenines (Kemler, 1993). La sobreexpressió d'E-cadherina en cèl·lules mesenquimals normals o transformades pot induir la formació de contactes estables cèl·lula-cèl·lula i donar lloc al desenvolupament de les unions adherents. En les cèl·lules epitelials, els contactes primerencs entre cèl·lules són mitjançats per molècules d'E-cadherina que s'agrupen formant petits complexos d'adhesió, els quals acaben establint les unions adherents i promouen la formació de desmosomes (Adams and Nelson, 1998). Al llarg de la TEM, la reorganització de les unions adherents inclou el trencament de l'estabilitat del complex seguit de la disminució o pèrdua total de la proteïna supressora de tumors E-cadherina, la qual juga un paper molt important en la integritat epitelial (Birchmeier *et al.*, 1995 ; Christofori and Semb, 1999).

L'E-cadherina és el component central de l'adhesió cel·lular i és necessària per a la formació de l'epiteli en l'embrió i per mantenir l'homeostasi epitelial en l'adult. La pèrdua de l'E-cadherina s'ha observat de manera consistent en els llocs on es produeix la TEM al llarg del desenvolupament i del càncer. Aquesta pèrdua provoca un augment de la capacitat invasiva de les cèl·lules tumorals *in vitro* i contribueix a la transició d'adenoma a carcinoma en els models animals (Thiery, 2002; Perl *et al.*, 1998).

La presència de mutacions que inactiven la funció de l'E-cadherina s'ha observat en, aproximadament, el 50% dels carcinomes lobulars de mama. A més a més, hi han individus que presenten una mutació inherent d'un al·lel de l'E-cadherina de manera que tenen un alt risc de desenvolupar un carcinoma gàstric difús. És per això, que es va catalogar l'E-cadherina com a gen supressor de tumors. El fet de que el segon al·lel de l'E-cadherina s'hagi trobat sempre intacte, ens fa pensar en l'existència d'altres

mecanismes responsables de la pèrdua de funció d'aquesta proteïna. Una teoria que s'ha vist reforçada en aquests últims anys explicaria aquest fenomen a través d'un mecanisme de repressió de l'expressió de la proteïna (Hennig *et al.*, 1996). Tot i això, existeixen també alguns casos en que l'E-cadherina s'expressa però s'obté un producte no-funcional (Rashid *et al.*, 2001). La identificació de varis repressors transcripcionals específics ens ha permès ampliar el nostre coneixement de com pot ser regulada l'expressió de l'E-cadherina. A continuació exposo els principals repressors identificats.

3.2.- La superfamília de repressors Snail

El primer membre de la família d'Snail, el propiament dit Snail, es va descriure en *D. Melanogaster*, on es va veure que era essencial per a la formació del mesoderm. A partir d'aquí, es van trobar homòlegs d'Snail in diverses espècies incloent humans, altres vertebrats, no-vertebrats cordats, insectes, nemàtodes, anèl·lids i moluscs (Nieto, 2002). Els membres de la família d'Snail codifiquen per a un factor de transcripció de tipus dits de zenc. Tots ells tenen una organització similar, es componen d'una regió carboxi-terminal altament conservada que conté de quatre a sis dits de zenc i d'una regió amino-terminal molt més divergent. Els dits corresponen al tipus C₂H₂ i funcionen com a motius d'unió a l'ADN específics de seqüència (vegeu figura I3) (Knight and Shimeld, 2001).

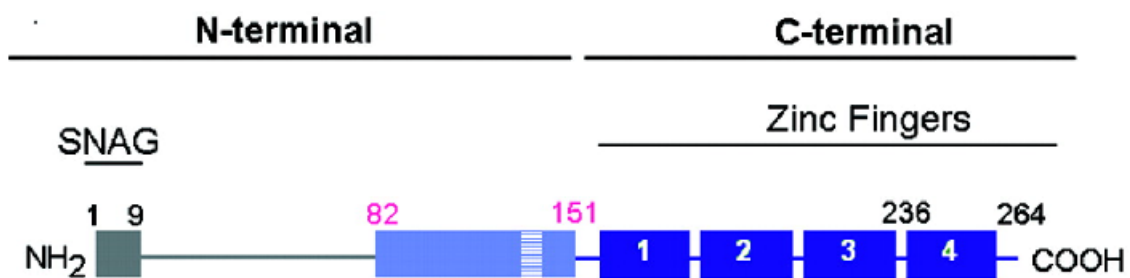


Figura I3: Diagrama de la proteïna Snail. S'han descrit dues regions diferents en aquesta proteïna: el domini C-terminal d'unió l'ADN (aa 152 a 264; color blau fosc) i el domini N-terminal regulador (aa 1 a 151; colors gris i blau clar). La part C-terminal conté quatre dits de zenc. El domini N-terminal difereix molt més entre els diferents homòlegs d'Snail. En mamífers, el domini SNAG (gris) és essencial per a la repressió. La regió més conservada de l'extrem N-terminal, excloent el domini SNAG, correspon a un subdomini situat entre els residus 82 i 151 de la seqüència d'Snail de ratolí. Aquest subdomini conté una seqüència d'export nuclear (NES) i una regió adjacent sensible a fosforilació (Domínguez *et al.*, 2003).

Gràcies a diversos experiments de transfecció, realitzats amb diferents promotors, es va demostrar que el lloc d'unió consens per als factors de la família Snail està format per un *core* de sis parells de bases, 5'-CAGGTG-3' (Mauhin *et al.*, 1993). Aquesta seqüència és idèntica a l'anomenada caixa-E que està descrita com a lloc d'unió consens dels factors de transcripció bHLH, indicant així que les proteïnes Snail podrien competir amb aquests factors per a la seva unió a la seqüència específica de l'ADN (H. Kataoka *et al.*, 2000).

Unint-se a les caixes-E, els membres de la família Snail poden actuar com a repressors transcripcionals (Hemavathy *et al.*, 2000). L'activitat repressora d'aquests factors no només depèn de la seva regió d'unió a l'ADN sinó també a un domini present en la seva regió amino-terminal anomenat SNAG (Snail/Gfi). Aquest motiu és molt important perquè el factor transcripcional pugui realitzar la seva funció repressora en les cèl·lules de mamífer (Nakayama *et al.*, 1998) i només està conservat en els vertebrats. Tot i que aquest domini està perdut en els no vertebrats, com són *Drosophila*, el nemàtode *Caenorhabditis elegans* i els ascidis, la proteïna Snail d'aquests organismes presenta un domini d'unió a CtBP que l'Snail de vertebrats no té (Nibu *et al.*, 1998).

Per tal de classificar els diferents membres de la família Snail, es van realitzar uns estudis filogenètics comparant les seqüències de les regions de dits de zinc presents en els diferents membres de la família. Gràcies a això, van subdividir els membres de la família d'Snail de vertebrats, en dues subfamílies anomenades: Snail i Slug. Curiosament, en estudis posteriors es va observar un patró d'expressió diferencial dels gens Snail i Slug segons l'espècie, és a dir, es va veure un intercanvi de patró d'expressió entre el pollastre i el ratolí. Així com en ratolins Snail s'expressava en els precursors del mesoderm i en la formació de la cresta neural, en pollastre s'intercanviava l'expressió d'Snail per la d'Slug (Sefton *et al.*, 1998). Això indicaria que, en ratolins, l'expressió d'Snail seria el principal responsable d'induir la TEM necessària per a la formació del mesoderm i la cresta neural mentre que, en pollastre, aquesta funció seria rellevada pel seu homòleg slug. En *Drosophila*, Snail s'expressa específicament en les cèl·lules mesodèrmiques durant la invaginació, just abans que pateixin la TEM. Durant aquest procés, s'ha demostrat que la regulació a la baixa de l'E-

cadherina és un procés essencial perquè les cèl·lules mesodèrmiques iniciïn la gastrulació en els embrions de ratolí (Burdsal *et al.*, 1993). Tenint en compte que el patró d'expressió d'Snail durant la gastrulació coincideix en temps i espai amb l'inici de la davallada de l'E-cadherina, i que hi havia uns estudis realitzats amb embrions de *Drosophila* mutants per Snail que fallaven alhora de gastrular i que presentaven una reducció de la regulació a la baixa de l'expressió de l'E-cadherina (Oda *et al.*, 1998), es va plantejar la teoria de que el gen de l'E-cadherina podria ser un bon candidat com a gen diana d'Snail.

Efectivament, la caracterització del promotor humà de l'E-cadherina va revelar l'existència de tres caixes-E en el fragment proximal del promotor i que a la vegada eren importants per a la repressió d'aquest gen en línies cel·lulars tumorals i en fibroblasts. Diferents assatjos amb aquest promotor van demostrar que Snail era capaç d'unir-se a aquestes caixes-E i reprimir l'expressió d'aquest gen (Batlle *et al.*, 2000). Però, s'han descrit també altres gens, apart de l'E-cadherina, que durant la TEM són regulats per Snail de forma negativa o fins i tot positiva, directe o indirectament, com són la repressió del marcador epitelial desmoplaquina i l'augment de l'expressió dels marcadors mesenquimals vimentina i fibronectina (Cano *et al.*, 2000).

Així, sembla ser que l'expressió d'Snail juga un paper molt important alhora d'induir els canvis moleculars necessaris per donar lloc a la TEM. De totes maneres, tornant als embrions mutants per Snail de *Drosophila* (abans esmentats), cal tenir en compte que en el mesoderm d'aquests embrions l'expressió de l'E-cadherina seguia sent més baixa que l'expressió d'aquesta mateixa proteïna en l'ectoderm dels mateixos embrions. Això indicaria que els nivells d'E-cadherina no es recuperaven del tot i que, per tant, hi deuen haver altres repressors de l'E-cadherina que actuarien simultàniament amb Snail durant la gastrulació. S'han identificat alguns factors transcripcionals de tipus bHLH que estan implicats en la pèrdua de l'expressió de l'E-cadherina i que també s'expressen en el mesoderm embrionari, són els anomenats Zeb-1 (δ EF1) (Grooteclaes and Frisch, 2000), Zeb-2 (o SIP1) (Comijn *et al.*, 2001), E47 (Pérez-Moreno *et al.*, 2001) i Twist (Yang *et al.*, 2004).

3.3.- Zeb-1 i Zeb-2

El gen *Zfh-1* de *D. Melanogaster* codifica per a dues proteïnes homòlogues, anomenades Zeb-1 i Zeb-2, que contenen un homeodomini flanquejat per dues regions d'unió a ADN de tipus dits de zinc altament conservades: una situada a l'extrem N-terminal i l'altre a l'extrem C-terminal. El gen *Zfh-1* s'expressa en el mesoderm d'embrions primerencs i en vàries estructures derivades del mesoderm d'embrions tardans. És necessària l'expressió d'*Snail* i de *Twist* en el mesoderm perquè s'expressi *Zfh-1*; en mutants d'*Snail*, l'expressió de *Zfh-1* està severament reduïda (Lai *et al.*, 1991).

Una de les proteïnes codificades pel gen *Zfh-1* és la proteïna Zeb-1, o també anomenada δ EF1 o AREB6, que va ser caracteritzada per primera vegada com a una proteïna amb dits de zinc amb la capacitat d'unir-se a seqüències de tipus caixa-E donant lloc a una repressió transcripcional que regula la diferenciació dels limfòcits (Geneta *et al.*, 1994). Zeb-1 s'expressa en teixits com el sistema nerviós central (SNC), el cor, el múscul esquelètic i les cèl·lules hematopoiètiques. Tot i tenir aquest ampli patró d'expressió, ratolins *Zeb-1*^{-/-} sobreviuen fins al naixement i només presenten deformitats esquelètiques i una deficiència severa de limfòcits T.

Això va suggerir que, segurament, existia algun altre gen relatiu a Zeb-1 que compensava la pèrdua d'expressió d'aquest factor de transcripció en el SNC i el múscul. Va ser llavors quan es va clonar un altre gen d'estructura i seqüència molt similars a *Zfh-1*. Aquest gen codificava per una altra proteïna anomenada Zeb-2, o SIP1 (Postigo and Dean, 2000). Aquesta proteïna s'expressa amb alts nivells en les cèl·lules pre-migratòries de la cresta neural, cèl·lules que pateixen un procés de TEM, donant lloc d'aquesta manera a l'inici de la formació del tub neural; i és en aquest precís moment en que aquestes cèl·lules presenten una pèrdua de l'expressió de l'E-cadherina (Eisaki *et al.*, 2000; Takeichi, 1988). Concordant amb tot això, es va demostrar que, de la mateixa manera que Zeb-1, Zeb-2 també té la capacitat d'unir-se a caixes-E i reclutar el co-repressor CtBP per reprimir d'aquesta manera l'expressió de l'E-cadherina (Comijn *et al.*, 2001).

3.4.- E47

Com ja he dit anteriorment, un altre factor que podria estar implicat en la repressió de l'expressió de l'E-cadherina durant el desenvolupament embrionari és la proteïna E47. Mitjançant un anàlisi d'*screening* (cribatge) amb l'assaig de *one-hybrid* (simple-híbrid) amb llevats, es va identificar un altre repressor transcripcional capaç d'interaccionar amb les caixes-E del promotor de l'E-cadherina, el factor anomenat E47. La proteïna E47, de tipus bHLH, es tradueix juntament amb una altra proteïna anomenada E12, també de tipus bHLH, a partir de dos transcrits produïts pel gen E2A i obtinguts per *splicing* (tall i empalmament) alternatiu. L'activitat transcripcional de les proteïnes resultants de la transcripció del gen E2A pot ser regulada negativament per la seva interacció amb una altra subclasse de factors de tipus bHLH anomenats Id.

Per tal de correlacionar l'expressió del factor E47 amb la pèrdua d'expressió de l'E-cadherina durant el desenvolupament, primer cal saber quin és el patró d'expressió de dita proteïna durant aquest procés. Mitjançant un anàlisi d'hibridació *in situ* sobre embrions de ratolí, es va observar que no hi havia expressió del gen E2A en els epitelis embrionaris però sí que s'expressava amb alts nivells en el mesoderm d'embrions primerencs. Per tant, la relació inversa que existeix entre l'expressió d'E2A i l'expressió de l'E-cadherina en el desenvolupament embrionari primerenc, resulta ser un argument a favor pel que fa a l'activitat repressora que tenen els productes del gen E2A en la regulació a la baixa de l'expressió de l'E-cadherina i en la generació i/o manteniment del fenotip mesenquimal. Aquesta teoria es va demostrar a través d'uns estudis realitzats sobre una línia cel·lular epitelial que expressava de forma estable i ectòpica E47. La sobreexpressió d'aquest factor transcripcional donava lloc a un fenomen de TEM, amb una disminució de l'expressió de l'E-cadherina i un augment de l'expressió i de la reorganització d'alguns marcadors mesenquimals (Pérez-Moreno *et al.*, 2001).

3.5.- Twist

Un altre possible regulador negatiu de l'expressió de l'E-cadherina és el factor transcripcional anomenat Twist. En els organismes multicel·lulars que ocupen un rang que va des de la *Drosophila* fins als vertebrats, Twist actua

com un factor transcripcional de tipus bHLH en la cascada de senyalització que inicia el desenvolupament del mesoderm durant la gastrulació (Castanon and Baylies, 2002). Per tant, es va pensar en Twist com a factor candidat inductor de la TEM.

Per demostrar això, es van fer experiments d'expressió ectòpica d'aquest regulador transcripcional en cèl·lules epitelials de ronyó de gos i en cèl·lules epitelials de mama humanes immortalitzades en cultiu, i es va veure que la sobreexpressió de Twist induïa, de forma força potent, una TEM de les dues línies cel·lulars. La transició morfològica d'aquestes cèl·lules epitelials cap a una aparença fibroblàstica anava acompanyada per un efecte d'*scattering* (dispersió), per l'adquisició de característiques migratòries, per un guany de marcadors mesenquimals cel·lulars (com són la fibronectina, la vimentina, un "estirament" dels filaments d'actina, i N-cadherina) i per una pèrdua de marcadors epitelials (E-cadherina, α - i γ -catenina). Sembla ser que Twist podria estar implicat en la regulació a la baixa de l'E-cadherina a través de les caixes-E, però encara queda per determinar si la interacció de Twist amb aquestes caixes és directa o indirecta (Yang *et al.*, 2004).

3.6.- WT1

Fins aquí hem parlat de la regulació negativa de l'expressió de l'E-cadherina durant el desenvolupament embrionari. Però, també cal donar-li importància als possibles reguladors positius de l'expressió d'aquesta proteïna d'adhesió, ja que, serà l'adequat balanç entre una regulació a l'alça i una regulació a la baixa de la transcripció d'aquesta proteïna la que determinarà el patró d'expressió correcte de l'E-cadherina durant el desenvolupament. Un factor transcripcional que s'ha vist molt important en la regulació positiva de l'E-cadherina és la proteïna *Wilms' Tumor 1* (WT1).

Durant l'embriogènesi, WT1 presenta una alta expressió al llarg del desenvolupament del ronyó, les gònades, la melsa i en la línia mesotelial dels òrgans abdominals (Pritchard-Jones *et al.*, 1990; Pelletier *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1993; Armstrong *et al.*, 1993; Buckler *et al.*, 1991). Una característica comú d'aquests teixits és la seva transició mesènquima-epiteli (TME) durant el desenvolupament embrionari augmentant, així, la possibilitat de que WT1 pugui contribuir tant a la inducció com a la resposta

de senyals de desenvolupament (Lee and Haber, 2001). L'expressió de l'E-cadherina juga un paper molt important alhora d'induir el procés de TME durant el desenvolupament normal. L'E-cadherina apareix en el mesènquima metanèfric induït, un cop la condensació per donar lloc a la formació de l'epiteli ha començat, és a dir, en el mateix moment en que comença a augmentar l'expressió de WT1 en el desenvolupament del ronyó (Vestweber *et al.*, 1985; Pritchard-Jones *et al.*, 1990). Això va fer pensar en la possibilitat de que WT1 podria estar regulant l'expressió de l'E-cadherina. Fins al moment, se sabia que el gen de WT1 codifica per un factor de transcripció de tipus dits de zinc. Aquesta proteïna pot unir-se a diferents seqüències, entre les quals trobem les seqüències riques en -GC-, les quals són típicament reconegudes pels factors EGR.

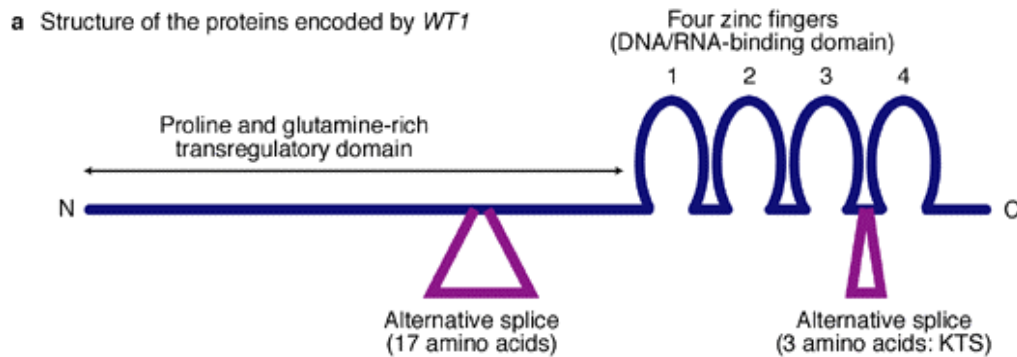


Figura 14: Estructura de la proteïna WT1. Les proteïnes codificades per WT1 tenen un domini transregulatori ric en prolines i glutamines en l'extrem amino-terminal i quatre dits de zinc en el domini d'unió a ADN/ARN en l'extrem carboxi-terminal. Té dos modificacions de l'ARN (triangles púrpura): un insert de 17 aminoàcids en el domini transregulatori i un insert de 3 aminoàcids entre el tercer i el quart dit de zinc (Brown and Malik, 2001).

Mitjançant un *splicing* alternatiu, el gen de WT1 pot codificar per a quatre isoformes de la proteïna segons si incorporen o no una inserció de disset aminoàcids entre la regió rica en prolines i glutamines i/o una inserció de tres aminoàcids situada entre el tercer i quart dit de zinc (vegeu figura 14). Aquesta última inserció pot modificar la capacitat d'unió de la proteïna a l'ADN de manera que la inserció del tripèptid impedeix que la proteïna s'uneixi a la seva seqüència de reconeixement. Es va analitzar la seqüència del promotor de l'E-cadherina i es va identificar una seqüència de reconeixement pel factor transcripcional WT1. Mitjançant experiments de co-transfecció i d'EMSA es va demostrar que WT1 podia unir-se a la

seqüència reguladora present en el promotor d'E-cadherina i que, a més a més, tenia la capacitat d'activar l'expressió d'aquesta proteïna d'adhesió (Hosono *et al.*, 2000).

Fins aquí hem donat molta importància a la regulació del procés de TEM per tal de que el desenvolupament embrionari transcorri de forma correcte. Durant l'embriogènesi, els principals reguladors de la TEM s'expressen sota un estricte control espacial i temporal. La desregulació en l'expressió d'algun dels factors implicats en la TEM, o fins i tot també en la TME, pot comportar greus problemes durant la morfogènesi desembocant en importants malformacions o, fins i tot, en la mort pre- o post-natal de l'organisme. Per tot això, és important conèixer els mecanismes pels quals es controla l'expressió dels diferents factors reguladors de la TEM. A continuació, exposo un breu resum de les vies de senyalització conegudes fins ara implicades en aquesta regulació.

4.- Vies de senyalització implicades en la TEM

Michael Stoker i Michael Perryman van descobrir al 1985 que el sobrenedant provenint de cultius de fibroblasts contenien una activitat anomenada *scatter* que produïa dit efecte sobre cèl·lules epitelials Mardin-Darby canine kidney (MDCK), això va obrir noves portes a l'estudi en el camp de la TEM. A principis dels anys 90, l'anomenat factor *scatter* va resultar ser el factor de creixement dels hepatòcits (HGF), lligand del receptor c-met (Thiery, 2003).

En la majoria de models de TEM cel·lulars, la conversió fenotípica requereix senyals externes. Existeixen una multitud de factors de creixement i citoquines, i fins i tot components de la matriu extracel·lular, que indueixen la TEM a través de l'activació dels seus receptors específics presents en la superfície cel·lular. Factors de creixement com el factor de creixement tumoral (TGF)- α , el factor de creixement epidèrmic (EGF) o els factors de creixement fibroblàstics (FGFs) transdueixen la seva senyal a través de l'activació de les vies dels receptors tirosina quinasa (RTKs) que transmetrant la seva senyal mitjançant l'activació de la via de Ras-MAPK (Rommel and Hafen, 1998). Es conegut també, que es requereix una cooperació entre la via de senyalització de TGF- β i de Ras per tal d'induir la desdiferenciació (Janda *et al.*, 2002). Tant TGF- β com altres estímuls estan

involucrats en la inducció de la TEM activant la quinasa ERK2, integrada en la via de senyalització de les MAPKs, i la via de senyalització PI3K/Akt (Grande *et al.*, 2002).

Com he dit anteriorment, la matriu extracel·lular pot també induir la TEM a través de la senyalització per integrines i la seva quinasa associada anomenada ILK, molècula que pot transmetre la seva senyalització a nucli a través de l'activació per fosforilació d'Akt (Tan *et al.*, 2001), un factor diana que està, també, per sota de les vies de senyalització dels RTKs (Cruet-Hennequart *et al.*, 2003; Gary *et al.*, 2003). Per això, es considera que la molècula ILK juga un important paper en el *crosstalk* entre les vies de senyalització induïdes pels RTKs i les induïdes per les integrines. Se sap que Akt és capaç de fosforilar la quinasa (IKK) responsable de fosforilar l'inhibidor de NFκB (IκB) alliberant d'aquesta manera el factor transcripcional que es translocarà a nucli per realitzar la seva funció activadora (Ozes *et al.*, 1999). El factor NFκB és un element regulador homòleg al factor transcripcional Dorsal, present en *Drosophila*. Es caracteritza per ser un activador transcripcional molt important alhora de marcar el lloc d'inici dels moviments de gastrulació i, per tant, està considerat un factor crucial en el desencadenament dels processos de TEM necessaris per a la formació del mesoderm (Ip *et al.*, 1992).

Podem concloure així, que totes aquestes vies són redundants en la cèl·lula alhora de regular la TEM entrecreuant-se entre elles de manera que la pèrdua d'una d'aquestes vies podria ser contrarestada, en part, per l'activació o sobre-activació d'alguna altra.

5.- Snail i la regulació de la TEM en embriogènesi i processos tumorals

Cada vegada més es tendeix a comparar i traçar un paral·lelisme entre el procés de TEM que es dona durant la gastrulació i el fenomen de desdiferenciació cel·lular que pateixen les cèl·lules epitelials al convertir-se en cèl·lules tumorals capaces de migrar i envair altres teixits de l'organisme. El factor transcripcional Snail té un paper essencial en la coordinació de tots els fenòmens de TEM (Nieto, 2002) i això el fa un ferm candidat com a mediador del procés d'invasió que té lloc en els carcinomes. Fins a l'actualitat, s'ha pogut establir una alta correlació entre l'expressió

d'Snail i la baixa o absent expressió d'E-cadherina en algunes línies cel·lulars derivades de tumors de cap i coll , fetge, mama i en línies cel·lulars de melanoma (Yokoyama *et al.*, 2001; Jiao *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2002; Poser *et al.*, 2001). En aquests casos Snail seria el responsable d'induir una TEM de les cèl·lules epitelials normals per acabar adoptant un fenotip invasiu i metastàtic.

El fenomen de TEM que es dona durant la gastrulació és de tal complexitat que justifica el fet que sigui un procés que hagi d'estar sotmès a una acurada regulació. Per tant, tenint en compte que Snail dirigiria tots els processos implicats en aquest procés, aquest factor transcripcional hauria de ser capaç d'integrar aquelles senyals que poden desencadenar aquest procés morfogènic de transformació (Nieto, 2002; Ip and Gridley, 2002). Per tant, tenint en compte que aquest model de funcionament en gastrulació és aplicable a la transformació tumoral, podem concloure que el coneixement de les vies de regulació de la TEM, a través de la regulació d'Snail, durant l'embriogènesi pot acabar sent una eina essencial per entendre el funcionament d'un procés tumoral.

OBJECTIUS

En conformitat amb la línia investigadora del grup, els **objectius** plantejats en aquest treball són els següents:

- (I) Examinar amb major detall els canvis induïts per l'expressió ectòpica d'Snail en cèl·lules epitelials i els diferents gens que presenten una expressió alterada.
- (II) Caracteritzar el promotor humà d'Snail i demostrar quines són les vies de senyalització inductores de la TEM implicades en activar la seva expressió.
- (III) Estudiar l'acció reguladora transcripcional positiva donada per WT1 en relació a l'activitat repressora de la proteïna Snail sobre el promotor d'E-cadherina.

tumorals mancades d'E-cadherina, era capaç d'unir-se a les tres caixes-E presents en el promotor d'E-cadherina humà i reprimir, al mateix temps, l'expressió d'aquest gen (Batlle et al., 2000). A més a més, també van demostrar que l'expressió ectòpica d'Snail en línies cel·lulars epitelials normals induïa a una pèrdua de les característiques epitelials i a l'adquisició de propietats invasives i migratòries. Aquestes cèl·lules patien un fenomen de TEM. Com ja he dit en la introducció, una de les característiques d'aquest procés és la pèrdua de diferents marcadors epitelials, a més a més de l'E-cadherina, i l'augment de l'expressió de marcadors mesenquimals. Per tant, s'esperava que Snail no només reprimís l'expressió de l'E-cadherina sinó que també ho fes amb altres gens epitelials indicant així la funció essencial d'Snail en la TEM. Va ser en aquest moment quan em vaig incorporar al grup i es va continuar el projecte d'estudiar com Snail, a més a més de reprimir l'expressió de l'E-cadherina, podia està implicat en els canvis moleculars que pateixen les cèl·lules epitelials durant la seva transformació tumoral.

RESULTATS

Les cèl·lules transfectades establement amb Snail perden les seves característiques epitelials i es desdiferencien.

Les línies cel·lulars utilitzades en aquest estudi provenen de la transfecció estable d'Snail en una línia cel·lular parental anomenada HT-29 M6, en aquest treball es presenten dos dels diferents clons obtinguts, HT-29 M6 SNA1 i HT-29 M6 SNA2 (vegeu figura RI-2a). La principal característica d'aquestes cèl·lules és la seva incapacitat per formar colònies i el seu aspecte allargat (*scattering*). Els clons HT-29 M6 transfectats amb el sistema *tet-off* poden recuperar el seu fenotip epitelial al afegir al medi de cultiu un anàleg de la tetraciclina anomenat doxiciclina, el qual evita l'expressió d'Snail (vegeu figura RI-2a; i la referència Batlle *et al.*, 2000).

Es van realitzar una sèrie de seccions laterals dels clons HT-29 M6 que mostraven com la sobreexpressió d'Snail prevenia la formació de la monocapa de tipus epitelial columnar i compacta que caracteritza les cèl·lules HT-29 M6 i reduïa l'espessor de la capa de 12-16 a 4-6 µm (vegeu figura RI-2b esquerra).

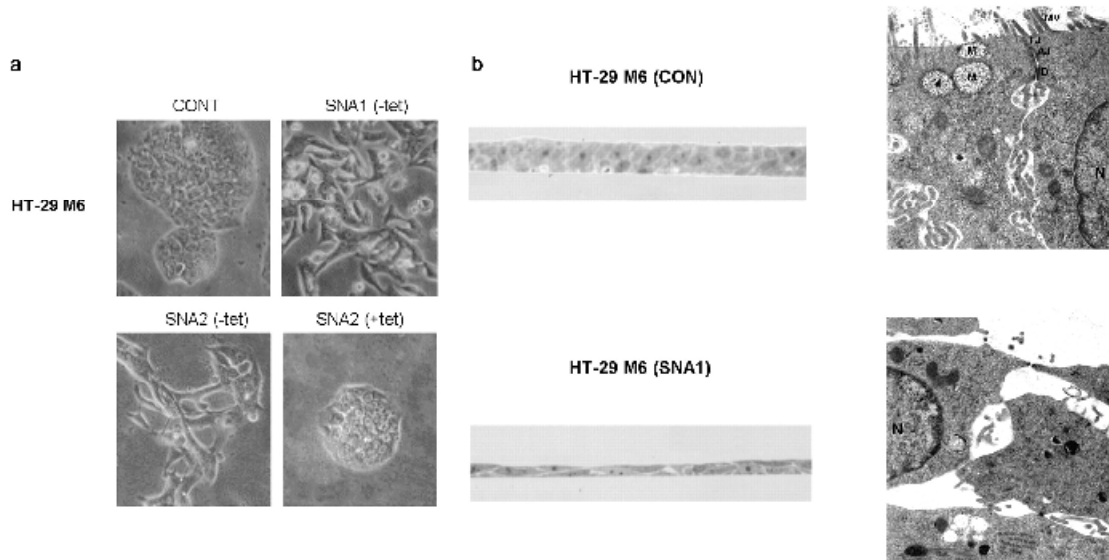


FIGURA RI-2: Morfologia dels clons HT-29 M6 transfectats amb Snail. (a) Les fotografies es van fer a 320 augments. Quan és indicat (+*tet*), els clons HT-29 M6 Snail es van créixer en presència de doxiciclina (2 µg/ml). *CONT*, control. **(b)** Els clons HT-29 M6 control i SNA1 es van créixer en confluència. Es mostren talls semifins (pannell dret) i seccions ultrafines visualitzades amb microscopi electrònic (pannell de l'esquerra). *M*, vesícules de moc; *MV*, microvellositats; *TJ*, adhesió estreta; *AJ*, adhesió adherent; *D*, desmosoma; *N*, nucli; *CON*, control.

A partir d'aquestes seccions laterals, es va poder observar, de la mateixa manera que amb els altres clons que expressen Snail, que les cèl·lules es presenten allargades i planes, amb un fenotip de tipus fibroblast amb cèl·lules disposades, ocasionalment, unes a sobre de les altres. No s'observen contactes cel·lulars en aquests tranfectants respecte als clons control HT-29 M6 que presenten unions estretes, unions adherents, i desmosomes (vegeu figura RI-2b dreta). Aquests clons control també mostren altres característiques pròpies de cèl·lules ben diferenciades com són estructures de microvilli i vesícules de moc.

De forma compatible amb una transició epiteli-mesènquima (TEM), els transfectants d'Snail també mostraven varies de les seves propietats alterades. A més a més d'una disminució de l'adhesió cel·lular, els clons que expressen Snail s'enganxaven millor al plàstic i es movien més ràpidament sobre diverses matrius com el col·lagen o la laminina (dada no mostrada). En els fibroblasts s'observava també un augment d'aquests dos paràmetres en comparació amb cèl·lules epitelials ben diferenciades de tipus HT-29 M6.

Els clons HT-29 M6 transfectats amb Snail i tractats amb doxiciclina eren indistingibles dels clons controls.

Les cèl·lules que expressen establement Snail presenten una disminució de l'expressió de gens marcadors epitelials i un augment de l'expressió de gens marcadors mesenquimals.

A partir d'aquestes observacions, es va voler determinar si aquests canvis en el fenotip cel·lular anaven acompanyats d'alteracions en l'expressió de diferents gens. Mitjançant anàlisis de RT-PCR semi-quantitativa, es va veure que els nivells d'ARN de diferents gens epitelials, a més de l'E-cadherina, estaven disminuïts en els clons HT-29 M6 transfectats amb Snail (vegeu figura RI-3) respecte els nivells del seu control.

L'expressió de MUC-1, Citoqueratina-18 (vegeu figura RI-3) i VDR (dada no mostrada), els quals contenen seqüències putatives d'unió a Snail en els seus promotors (vegeu més endavant), disminueixen en els clons transfectats amb Snail. D'altra banda, l'expressió de la Fibronectina, de LEF-1 i de Zeb-1 està augmentada en els transfectants d'Snail (vegeu figura RI-3). L'augment dels nivells de Fibronectina ja s'havia descrit en cèl·lules MDCK transfectades amb Snail (Cano *et al.*, 2000); de fet, l'augment de l'expressió d'aquesta proteïna podria ser la responsable de la millor capacitat de moviment i d'adhesió a la placa que presenten els clons Snail. Zeb-1 i LEF-1 són dos factors de transcripció relacionats íntimament amb el fenotip mesenquimal. LEF-1 és la isoforma preferencial del factor cel·lular T (TCF) en les cèl·lules mesenquimals i es troba diferencialment expressat en diversos processos neoplàstics com serien els càncers de colon (Hovanes *et al.*, 2001). D'altra banda, Zeb-1 és un factor transcripcional recentment descrit com a un factor involucrat en la repressió de l'E-cadherina (Grooteclaes and Frisch, 2000).

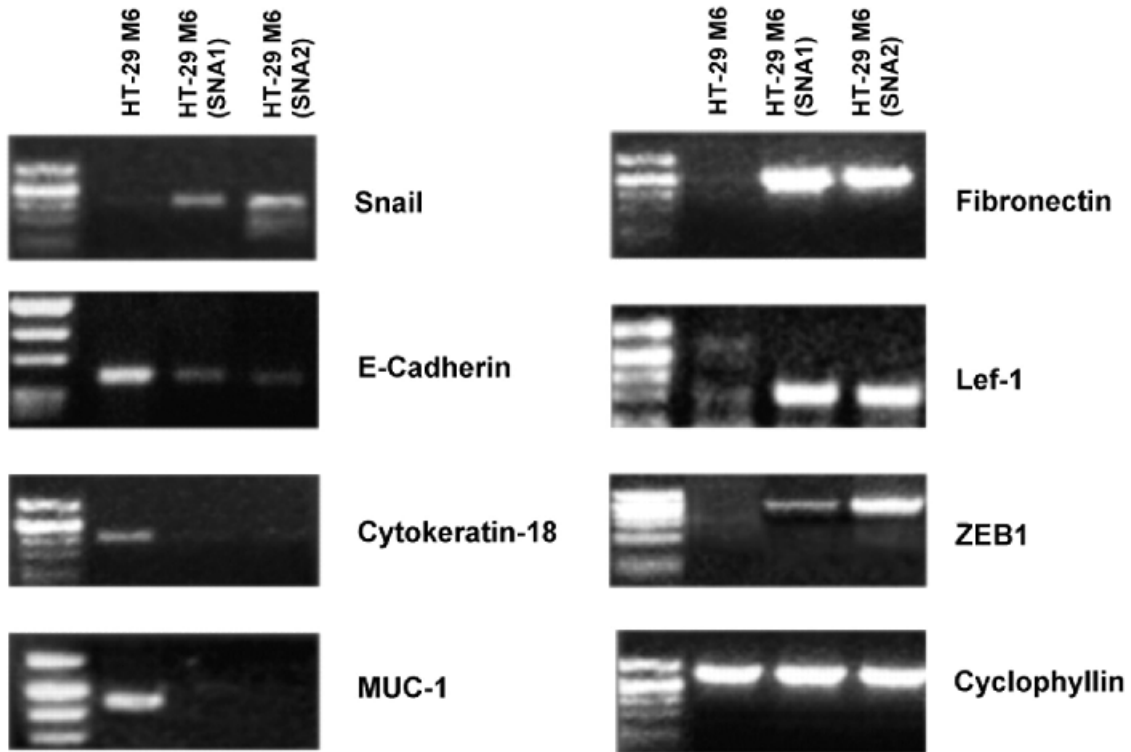


FIGURA RI-3: Els clons transfectats amb Snail presenten una disminució de l'expressió de gens epitelials i un augment de l'expressió de gens mesenquimals. L'ARN de les cèl·lules HT-29 M6 control o SNA1 o SNA2 es va obtenir mitjançant procediments estàndards. L'amplificació de l'ARN es va fer a través d'uns RT-PCR *one-step* (un sol pas) a partir de 500 ng d'ARN total, els productes obtinguts es van separar utilitzant gels d'agarosa a l'1.5-2%. Les seqüències dels oligonucleòtids utilitzats per amplificar cada un dels gens estan especificats en l'apartat de *Materials i Mètodes*, i el tamany dels fragments amplificats es corresponen amb lo esperat. La primera línia de cada requadre correspon a un marcador d'ADN de baix pes molecular (MBI, Fermentas): 908, 659-656, 403, 283, 257 i 226 pb.

Per tal d'investigar els canvis de l'expressió gènica que acompanyen aquesta transició epiteli-mesènquima, es va decidir analitzar amb major detall la modulació de tres gens representatius: dos, MUC-1 i VDR, que estan reprimits i l'altre, Zeb-1, que està activat.

Snail té la capacitat de reprimir directament l'expressió de MUC-1 i de VDR.

MUC-1 està descrit com a marcador de diversos teixits epitelials, incloent l'epiteli de colon. La seqüència del seu promotor presenta un tàndem repetit de la seqüència consens d'unió a l'ADN d'snail situat a -84 pb a partir de l'inici de transcripció (Kovarik *et al.*, 1993). A més a més, de

la mateixa manera que l'E-cadherina, aquest gen és una diana putativa directa d'Snail. Mitjançant l'anàlisi per Northern blot, es va corroborar que els nivells de l'ARN de MUC-1 eren significativament menors en els clons que expressen Snail que en els controls (vegeu figura RI-4a).

A continuació, es va voler analitzar si la disminució dels nivells de l'ARN de MUC-1 induïda per Snail era conseqüència de la repressió de l'activitat del seu promotor. Per això, un fragment gènic de 800 pb de MUC-1, que corresponia a la seqüència -756/+49 respecte l'inici de transcripció (Kovarik *et al.*, 1993), es va clonar i insertar dins del plàsmid pGL3 per davant del gen *reporter* (marcador) luciferasa. Aquest promotor ja s'havia descrit com a actiu en línies cel·lulars epitelials que expressen MUC-1 (Kovarik *et al.*, 1993). L'activitat transcripcional de MUC-1 era menor en els clons transfectants d'Snail que en els control o en les cèl·lules parentals (vegeu figura RI-4b). La repressió del promotor de MUC-1 induïda per Snail es va reproduir també al transfectar transitòriament Snail en cèl·lules parentals HT-29 M6 o en altres cèl·lules epitelials que expressen MUC-1. En tots els casos, Snail va reprimir l'activitat del promotor de manera dosi-dependent al voltant d'un 80% (vegeu figura RI-4c).

La modificació de l'element putatiu d'unió a Snail del promotor de MUC-1, mutació de 5'-cacctgtcacctg-3' a 5'-aacctataaaccta-3', va evitar la disminució de l'activitat del promotor (vegeu figura RI-4c). Anteriorment, ja s'havia descrit que, una mutació similar, inhibia la unió del factor Snail a les caixes-E del promotor de l'E-cadherina i, conseqüentment, prevenia la seva repressió (Batlle *et al.*, 2000). Per tant, la integritat de les seqüències d'unió per Snail és requerida per bloquejar la transcripció de MUC-1. De la mateixa manera que MUC-1, l'epiteli normal del colon humà expressa el receptor de la vitamina D (VDR) sent així un altre marcador epitelial. En condicions d'hiperplàsia augmenta una mica la seva expressió i està clarament reduïda en estadis avançats de carcinogènesi (Pàlmer *et al.*, 2001). Això ens va fer pensar en la possibilitat de que aquest receptor fos un gen diana per Snail. Per tal de verificar aquesta hipòtesi, es va procedir a analitzar la seqüència del promotor del VDR en busca de possibles seqüències consens d'unió per Snail.

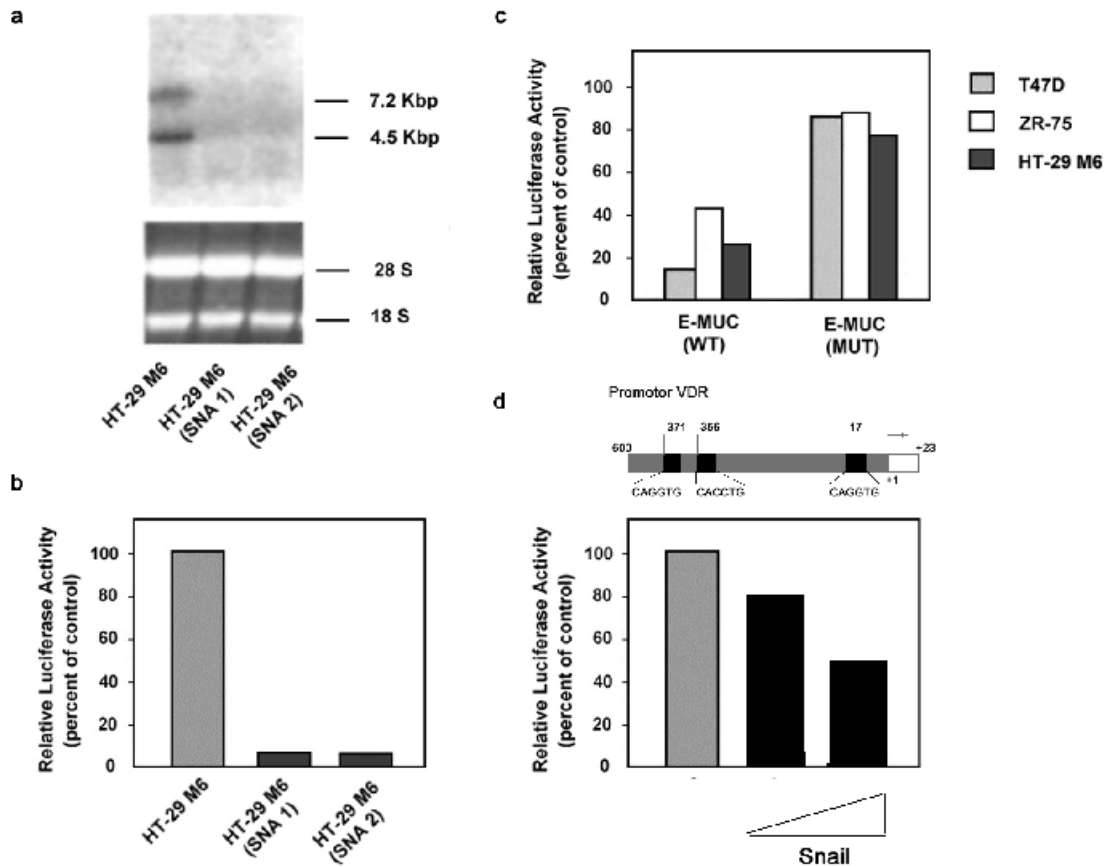


FIGURA RI-4: Snail reprimeix l'expressió de MUC-1 i VDR. (a) L'ARN obtingut a partir de les cèl·lules HT-29 M6 control o dels clons SNA1 o SNA2 es va analitzar per *Northern blot* utilitzant una sonda d'ADNc de MUC-1 marcada radioactivament. Les bandes corresponents als 18S i 28S es van tenyir amb bromur d'etidi i es van fotografia abans de fer el *blotting* i es mostren aquí com a control de càrrega. Les dues bandes detectades en aquest anàlisi corresponen als dos al·lels de MUC-1 presents en aquesta línia cel·lular (Kovarik *et al.*, 1993). **(b)** Per realitzar els assatjos d'activitat de promotor en les cèl·lules HT-29 M6 control, SNA1 i SNA2 es van utilitzar 400 ng de pGL3 buit o de pGL3-promotor de MUC-1 i 25 ng de pRTK-Luc per normalitzar l'eficiència de transfecció. **(c)** Les diferents línies cel·lulars es van transfectar amb 250-500 ng de pGL3-promotor de MUC-1 (salvatge o amb les caixes-E mutades) en presència de 25 ng de pcDNA3-Snail o pcDNA3 buit com a control, i a continuació es va determinar l'activitat de la *luciferasa*. **(d)** Es van transfectar de forma transitòria cèl·lules SW-480 amb 250 ng de pGL3 buit o pGL3-promotor de VDR i concentracions creixents de RSV buit com a control o RSV-Snail (0.1-1 ng). Tots els valors obtinguts es van normalitzar utilitzant l'activitat *luciferasa* de la *Renilla* (pRTK-Luc, 15-30 ng). Els resultats corresponen a un experiment representatiu de tres experiments independents fets, cada un, per duplicat o triplicat. *WT*, salvatge (wild type).

Efectivament, el promotor del VDR va resultar contenir tres seqüències homòlogues a les caixes-E presents en el promotor d'E-cadherina (vegeu figura RI-4d, adalt). A partir d'aquí, es va procedir a clonar un fragment

d'uns 600 pb corresponen a la seqüència del promotor del VDR, -600/+23 respecte l'inici de transcripció, i es va insertar en el mateix plàsmid que pel promotor de MUC-1. La co-transfecció transitòria del promotor del VDR amb concentracions creixents d'Snail van mostrar una inhibició dosi-dependent de l'activitat de dit promotor (vegeu figura RI-4d, abaix).

Aquests resultats demostraven que Snail podia reprimir directament l'expressió d'altres marcadors epitelials a més a més de l'E-cadherina. Les cèl·lules SW-480-ADH corresponen a una línia cel·lular d'adenocarcinoma de colon humà que expressen VDR. El tractament d'aquestes cèl·lules amb un anàleg de la vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) indueix l'expressió de l'E-cadherina (Pálmer et al., 2001). La transfecció ectòpica d'Snail-HA en la línia cel·lular SW-480-ADH dona lloc a una disminució dels nivells d'expressió de VDR i una inhibició de la inducció de l'expressió de l'E-cadherina (Pálmer et al., 2004). Aquests resultats, obtinguts posteriorment als presentats en aquest capítol, concordarien amb les observacions descrites anteriorment.

L'expressió d'Snail i de Zeb-1 provoca una gran davallada de l'expressió de l'E-cadherina.

La inducció de l'expressió de Zeb-1 va ser també investigada. Com ja s'ha mencionat anteriorment, Zeb-1 és també un repressor transcripcional capaç, de la mateixa manera que Snail, de reprimir el promotor de l'E-cadherina. Primerament, l'expressió d'aquests tres gens (Snail, Zeb-1 i E-cadherina) es va analitzar en una col·lecció de línies cel·lulars epitelials que expressaven quantitats variables d'E-cadherina. Degut a les petites quantitats d'ARN corresponents als factors de transcripció presents en les mostres d'ARN total, es va utilitzar l'anàlisi per RT-PCR per detectar els nivells d'Snail i de Zeb-1. Només les línies cel·lulars que co-expressaven Snail i Zeb-1 mostraven una disminució severa dels nivells d'expressió de l'E-cadherina (vegeu figura RI-5). En algunes línies cel·lulars, com les EpH4, es va detectar simultàniament l'expressió d'E-cadherina i d'Snail però no de Zeb-1.

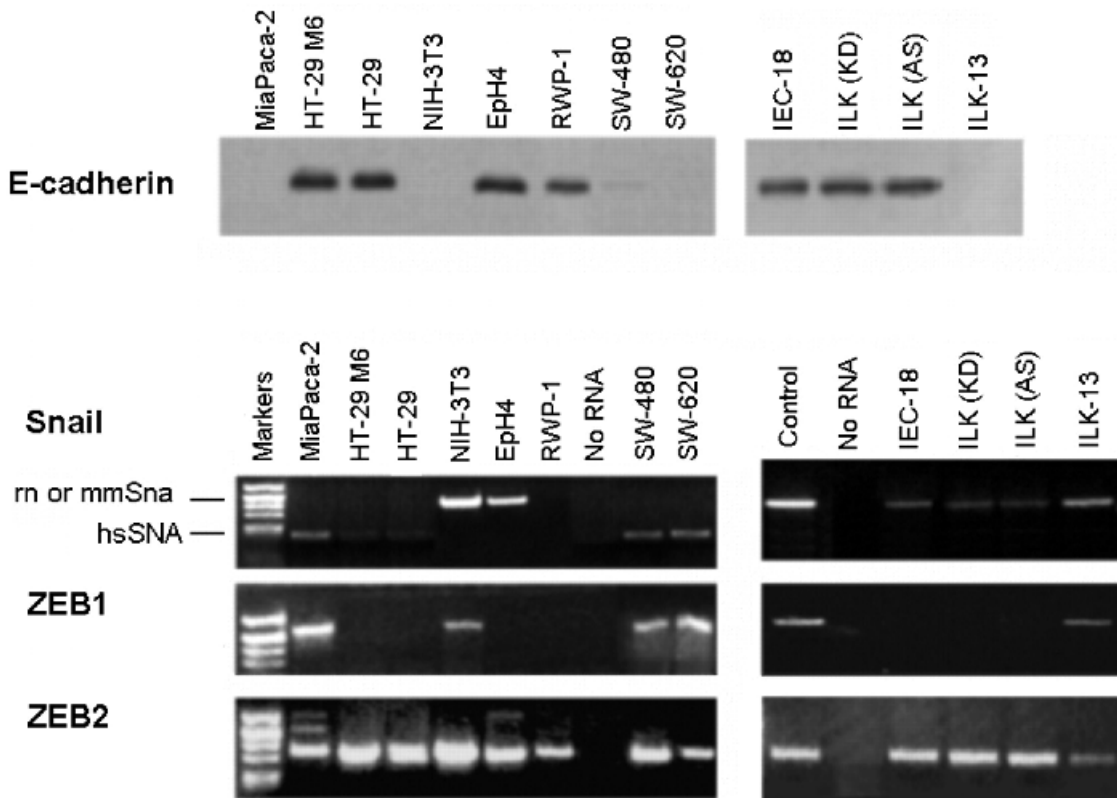


FIGURA RI-5: Expressió d'Snail i Zeb-1 en diferents línies cel·lulars epitelials.

L'expressió de l'E-cadherina es va analitzar mitjançant Western blot i a partir de mostres lisades amb SDS provenint de les línies cel·lulars indicades (pannell superior). L'expressió de l'ARN d'Snail, Zeb-1 i Zeb-2 humana, de rata o de ratolí es va analitzar mitjançant RT-PCR (pannell inferior). Els oligonucleòtids utilitzats per amplificar Zeb reconeix tant la forma humana com les formes de rata i ratolí; els oligonucleòtids utilitzats per amplificar l'Snail de ratolí (*mmSna*) també van servir per amplificar l'Snail de rata (*rn*). *IEC-18*, línia cel·lular IEC-18 control transfectades amb el vector buit; *ILK (KD)*, cèl·lules IEC-18 transfectades amb la forma *kinase-dead* de l'ILK; *ILK (AS)*, cèl·lules IEC-18 transfectades amb un ADNc *antisense* de l'ILK; *ILK-13*; cèl·lules IEC-18 transfectades amb una forma activa de l'ILK.

També es va voler analitzar si l'expressió d'Snail estava induïda en condicions en les quals les cèl·lules patien una TEM. Per això, es va utilitzar com a model una línia cel·lular epitelial d'íleon de rata anomenada IEC-18 que patia un fenomen de TEM al ser transfectada amb una forma activa de la quinasa lligada a integrines (ILK) (Hannigan *et al.*, 1996). Quan la forma activa de l'ILK era expressada, les cèl·lules IEC-18 adquirien un fenotip fibroblastoide que es correlacionava amb una disminució de l'expressió de l'E-cadherina. Encara que es van detectar certs nivells d'expressió d'Snail en les cèl·lules IEC-18 parentals, la sobreexpressió de l'ILK induïa un augment considerable dels nivells d'ARN corresponents al repressor transcripcional.

Es va trobar que la forma activa d'ILK també induïa l'expressió de Zeb-1 (vegeu figura RI-5). Per tant, sembla ser que Zeb-1 seria capaç d'induir, concomitantment amb Snail, l'adquisició d'un fenotip fibroblastoide per part de les cèl·lules IEC-18.

Snail indueix l'expressió de Zeb-1 en clons HT-29 M6 que expressen ectòpicament Snail en absència de tetraciclina.

La implicació d'Snail en l'activació de Zeb-1 es va evidenciar gràcies a les dades obtingudes amb els transfectants d'Snail. Com ja s'ha mencionat anteriorment (vegeu figura RI-3), els clons HT-29 M6 presenten nivells augmentats de l'ARN de Zeb-1. Gràcies a aquests clons, que es caracteritzen per poder regular l'expressió d'Snail segons l'addició o no d'un anàleg de la tetraciclina anomenat Doxiciclina, es va poder realitzar un estudi més detallat de les observacions anteriors. Només es va detectar transcripció de Zeb-1 després de que es permetés l'expressió d'Snail al treure la doxiciclina del medi (vegeu figura RI-6).

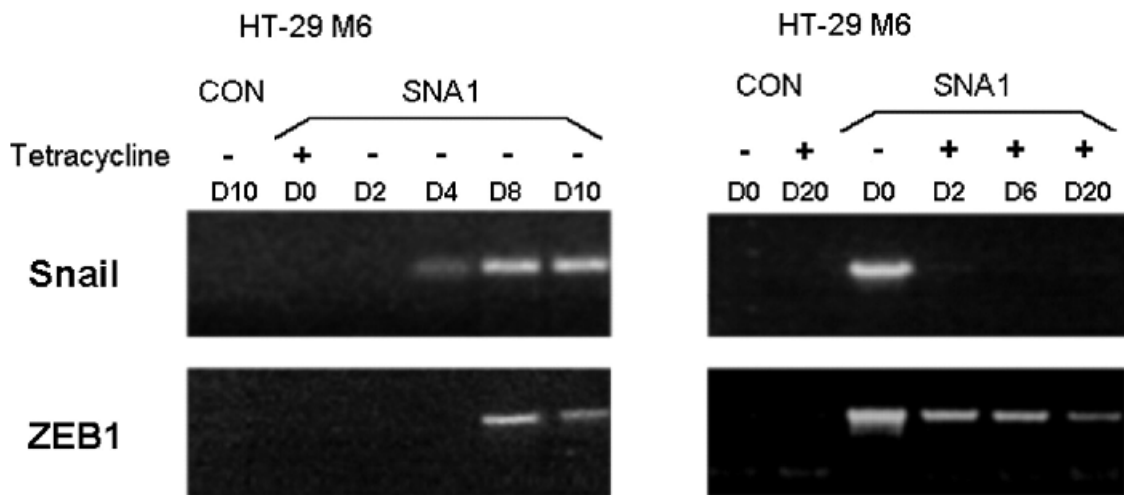


FIGURA RI-6: Snail promou l'expressió de Zeb-1 en els transfectants Snail regulats per tetraciclina. *Pannell esquerra*, mostra l'expressió de Zeb-1 després de la inducció de l'expressió d'Snail. El clon HT-29 M6 SNA1 es va cultivar en DMEM més FCS al 10% en presència de doxiciclina (2 µg/ml) durant 30 dies. La inducció d'Snail es va fer retirant la doxiciclina del medi de cultiu durant els dies indicats (D). Les cèl·lules control es van créixer en absència de doxiciclina. *Pannell dret*, mostra l'expressió de Zeb-1 després de la repressió de l'expressió d'Snail. Les cèl·lules HT-29 M6 SNA1 es van créixer en absència de doxiciclina; l'expressió d'Snail es va reprimir afegint doxiciclina al medi de cultiu durant els dies indicats. Els nivells d'ARN d'Snail i de Zeb-1 es van analitzar per RT-PCR. D0 correspon al dia en que es va afegir la doxiciclina (*pannell dret*) o es va treure (*pannell esquerra*). CON, control.

L'expressió d'Snail es va detectar 4 dies després de treure la doxiciclina, mentre que no es va detectar l'expressió de Zeb-1 fins passats 8 dies sense doxiciclina. Per tant, sembla ser que l'expressió d'Snail és suficient per donar lloc a l'expressió de Zeb-1. D'altra banda, quan s'apaga l'expressió d'Snail per l'addició al medi de doxiciclina, els nivells d'ARN de Zeb-1 no desapareixen immediatament, com fan els d'Snail, sinó que ho fan de forma gradual. L'estabilitat de l'ARN de Zeb-1 en absència d'Snail suggereix que Zeb-1 podria, possiblement, prolongar la repressió de gens epitelials iniciada per Snail.

Són necessàries concentracions majors de Zeb-1 que d'Snail per obtenir una repressió comparable a la produïda per aquest darrer factor transcripcional.

Es va analitzar l'activitat repressora de Zeb-1 sobre l'activitat transcripcional del promotor d'E-cadherina en diverses línies cel·lulars epitelials utilitzant un promotor d'E-cadherina proximal (-178 a +92) clonat davant del gen *reporter* (marcador) de la luciferasa. La seqüència d'aquest promotor conté 3 caixes 5'-CACCTG-5' on Snail i Zeb-1 poden unir-se. Zeb-1 reprimeix l'activitat del promotor de forma dosi-dependent amb una inhibició màxima del 60-80% en les línies cel·lulars testades, entre les quals tenim RWP1 (vegeu figura RI-7a), MCF-7 (vegeu figura RI-7b), HT-29 M6 i MDCK (dades no mostrades).

Els graus de repressió obtinguts per Zeb-1 i per Snail eren comparables; tot i així, encara que ambdós factors s'expressen sota el control del mateix promotor, Zeb-1 requereix una dosi de 10 a 20 vegades més que la d'Snail per tal d'obtenir la repressió màxima en les quatre línies cel·lulars utilitzades. Aquest efecte sobre el promotor d'E-cadherina anava acompanyat per canvis en l'expressió de la mateixa proteïna (dada no mostrada). D'aquesta manera podem dir que Zeb-1 també té el potencial necessari per reprimir la transcripció de l'E-cadherina, tot i que d'una forma menys efectiva que Snail. D'altra banda, Zeb-2 reprimeix més pobrament el promotor amb una repressió màxima del 40 % en les cèl·lules MCF-7 (vegeu figura RI-7b).

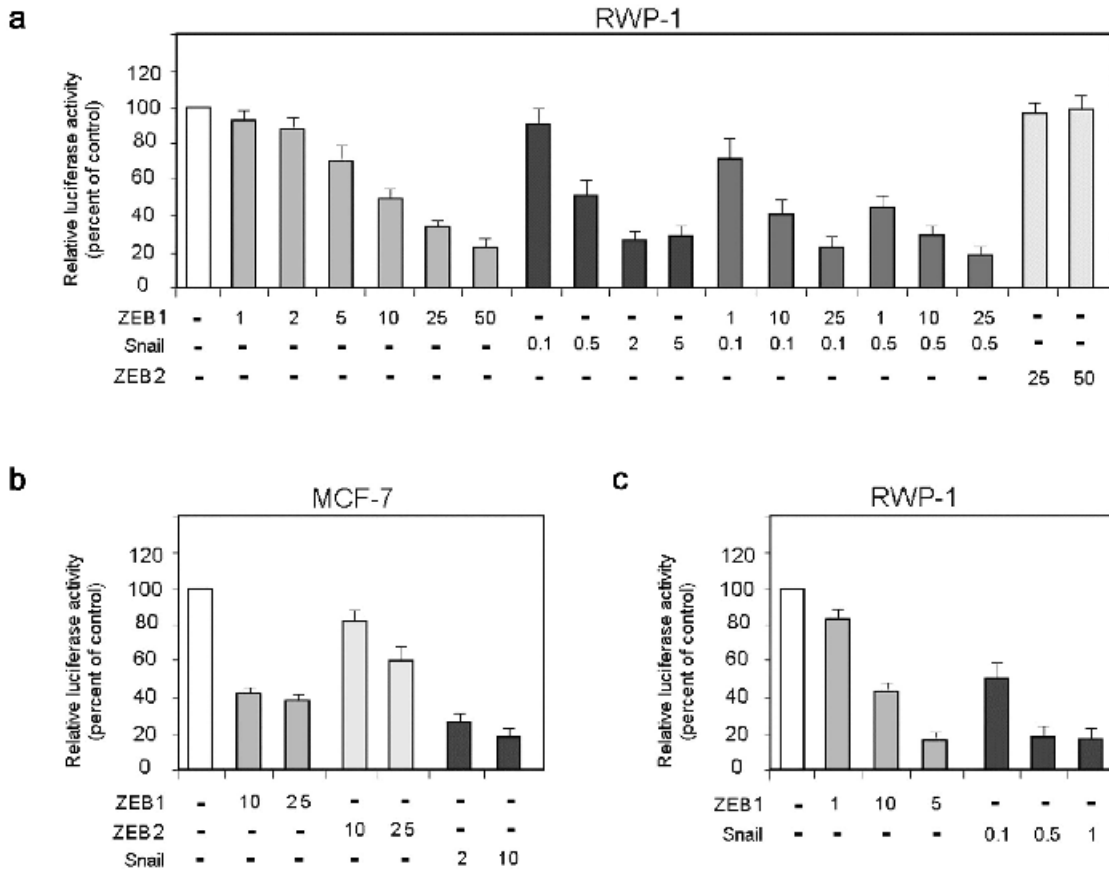


FIGURA RI-7: Activitat repressora epitelial de Zeb-1 i Snail. Les cèl·lules es van co-transfectar amb 250 ng de pGL3-promotor d'E-cadherina (**a i b**) o pGL3-promotor de MUC-1 (**c**), 5 ng de pRLSV-Luc, i les quantitats indicades d'Snail, Zeb-1 o Zeb-2 clonats en pcDNA3. En tots els experiments l'activitat de la *luciferasa* es va llegir 48 h després de la transfecció i es van normalitzar els seus valors amb els de la *luciferasa Renilla*. Els resultats una desviació \pm el rang de tres a quatre experiments independents realitzats per triplicat.

No es van observar efectes sinèrgics de l'acció repressora de Zeb-1 i d'Snail sobre l'activitat del promotor d'E-cadherina en experiments de repressió simultàniament; però sí que es va observar un efecte additiu de la repressió d'ambdós factors sobre el promotor (vegeu figura RI-7a).

També, es va voler testar si Zeb-1 tenia la capacitat de reprimir alguna altra diana d'Snail, com per exemple, MUC-1. Es van realitzar assatjos d'activitat de promotor sobre el promotor de MUC-1 (descriu anteriorment) i es va veure que, de forma semblant a Snail, Zeb-1 reprimia l'activitat del promotor (Figura RI-7c). De forma similar als resultats obtinguts amb el promotor d'E-cadherina, Zeb-1 és unes 10 vegades menys potent que Snail a l'hora de reprimir el promotor de MUC-1.

Els nivells d'ARNm de Zeb-2 no canvien durant la TEM.

Com ja s'ha comentat en la introducció, l'homòleg de Zeb-1, la proteïna Zeb-2, també havia estat descrita com a un factor repressor de l'expressió de l'E-cadherina (Comijn *et al.*, 2001). Tot i així, aquest factor sembla no respondre a l'activació d'Snail en cap dels experiments realitzats, i la seva expressió no es correlaciona amb la d'Snail en les diferents línies cel·lulars testades (vegeu figura RI-5), donat que no s'apreciaven canvis significatius en els nivells d'expressió del factor en qüestió.

A més a més de les línies cel·lulars descrites anteriorment, també es van analitzar els nivells de Zeb-2 d'unes altres línies epitelials que havien estat forçades a adoptar un fenotip mesenquimal mitjançant la transfecció estable de diferents gens. Utilitzant la línia cel·lular parental corresponent a les IEC-18, es va obtenir, apart de l'anterior línia IEC ILK-1 ja descrita (Novak *et al.*, 1998), la línia cel·lular IEC-Ha-Ras, la qual havia estat transfectada amb una forma activa de l'oncogen Ha-Ras. A través de la mateixa tècnica, també es va obtenir un clon de la línia HT-29 M6 que expressava constitutivament l'isoforma activa de la PK-C α (+) (Batlle *et al.*, 1998), la línia resultant es va anomenar M6 A4. Tots tres sistemes cel·lulars, IEC-ILK-1, IEC-Ha-Ras i HT-29 M6 A4 patien un procés de TEM i presentaven, respecte a les seves cèl·lules control, una disminució de l'expressió de l'E-cadherina i un augment dels nivells d'ARNm corresponents al gen marcador mesenquimal fibronectina (vegeu figura RI-8a). A continuació es van analitzar els nivells d'ARNm d'Snail, Zeb-1 i Zeb-2. Mitjançant l'anàlisi de RT-PCR semi-quantitativa, es van poder detectar alts nivells d'expressió del factor transcripcional Snail així com de Zeb-1 en els tres sistemes cel·lulars utilitzats (vegeu figura RI-8b). De la mateixa manera que amb les línies anteriorment analitzades, els nivells d'ARNm de Zeb-2 no variaven significativament. Tampoc s'apreciaven diferències d'expressió pel que fa als trànscrips d'Slug.

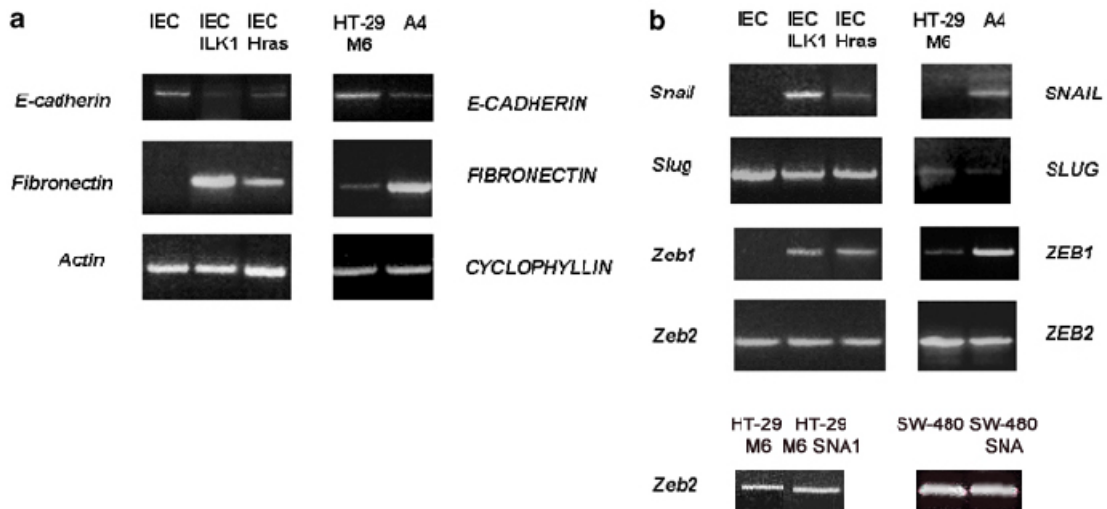


FIGURA RI-8: L'expressió d'Ha-Ras i ILK-1 en cèl·lules IEC-18 i de PK-C α en cèl·lules HT-29 M6 augmenten els nivells d'ARNm d'Snail sense variar l'expressió de Zeb-2. L'ARN es va aïllar de les línies cel·lulars indicades i els nivells de fibronectina, E-cadherina **(a)** i dels repressors de l'Ecadherina **(b)** es van determinar per RT-PCR semi-quantitativa, com s'ha descrit en *Materials i Mètodes*. Es va utilitzar l'amplificació de la ciclofilina i l'actina com a controls interns de les cèl·lules humanes i de rata respectivament.

Una altra línia cel·lular de la qual es van analitzar els nivells d'ARNm de Zeb-2 va ser la línia derivada de la línia cel·lular epitelial SW-480, la SW-480 SNA, descrita anteriorment. Aquest sistema també presentava nivells d'expressió de Zeb-2 comparables als de la seva línia parental SW-480; no responent tampoc a l'expressió d'Snail (vegeu figura RI-8b).

L'activitat del promotor de Zeb-2 és major en aquelles línies cel·lulars que han patit una TEM.

Per tal de corroborar aquests resultats, es va voler analitzar l'activitat del promotor de Zeb-2 en les diferents línies cel·lulars descrites. Comparant la regió 5' de la seqüència de l'ARNm de Zeb-2 trobat en el *GenBank* (Núm. d'accés NM014795) amb la seqüència complerta d'un clon corresponent a una part de la seqüència genòmica del cromosoma 2 humà (GenBank núm. d'accés AC009951.10 i NT005058) es va observar que els primers nucleòtids transcrits de Zeb-2 corresponien a una regió del genoma situada a uns 2500 pb de l'inici de traducció. A partir d'aquí es va decidir aïllar i clonar en el vector pGL3 tota la regió de la seqüència genòmica humana que anava des d'uns 900 pb per davant de l'inici de transcripció fins a l'inici

de traducció, en total es van amplificar prop de 4 Kb d'ADN. A continuació, es va testar l'activitat d'aquest promotor en aquelles línies cel·lulars que havien estat analitzades pels nivells d'ARNm de Zeb-2.

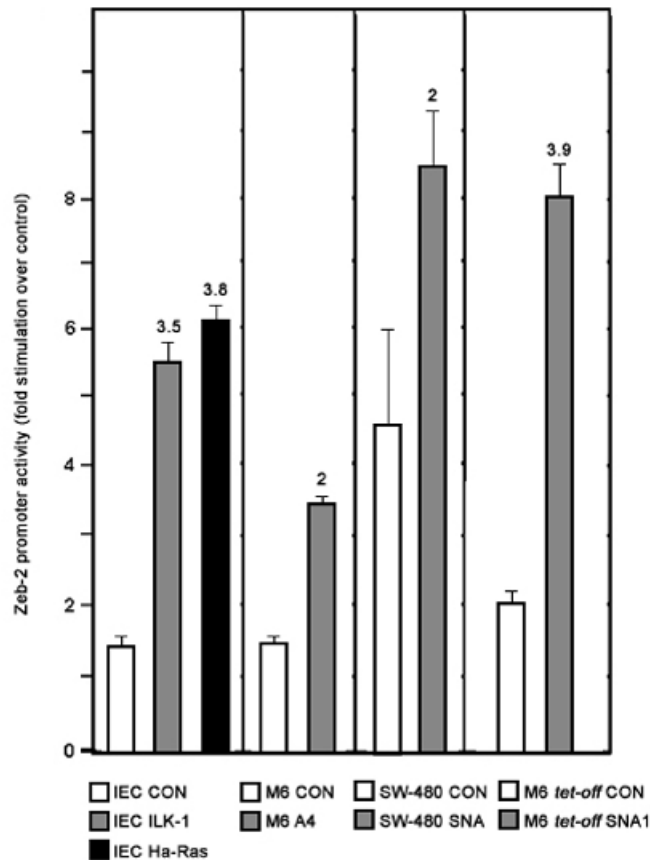


Figura RI-9: Activitat del promotor de Zeb-2 en diferents línies cel·lulars. L'activitat del promotor de Zeb-2 es va analitzar en les línies cel·lulars indicades. L'activitat del promotor es va referir als valors obtinguts pel vector pGL3 buit en cadascuna de les línies. Els números indicats sobre cada barra corresponen a l'estimulació observada del promotor respecte el seu control; és a dir, IEC ILK-1 i IEC Ha-Ras *versus* IEC CON, M6 A4 *versus* M6 CON, SW-480 SNA *versus* SW-480 CON, o M6 *tet-off* SNA1 *versus* M6 *tet-off* CON. Els resultats corresponen a la mitjana \pm s.d. de tres experiments realitzats per duplicat.

Sorprenentment, l'activitat del promotor de Zeb-2 era major en aquelles cèl·lules que havien patit una TEM, de l'ordre de 2 a 4 vegades per sobre de les seves respectives línies parentals epitelials (vegeu figura RI-9). La línia SW-480 control presentava una major activitat del promotor de Zeb-2 que les cèl·lules control HT-29 M6 i IEC-18, això podria explicar-se perquè, com ja s'ha dit anteriorment, aquesta línia cel·lular prové d'un adenocarcinoma de colon i expressa uns baixos nivells basals d'Snail de manera que, tot i

ser epitelials, tenen un fenotip més estirat i no formen colònies tan compactes com les HT-29 M6 i les IEC-18. Es podria considerar que aquesta línia cel·lular té un fenotip intermedi entre epitelial i mesenquimal.

La presència d'un intró tan llarg, que dona lloc a una separació d'uns 2500 pb entre l'inici de transcripció i l'inici de traducció de Zeb-2, ens va suggerir que, possiblement, aquesta regió podria tenir alguna funció important en la regulació de l'expressió de Zeb-2. Nelles *et al.* han caracteritzat aquest complex promotor. Els autors, a partir de diferents teixits i línies cel·lulars de ratolí i utilitzant les tècniques de RT-PCR i 5' RACE, van obtenir una sèrie de diferents transcrits madurs de Zeb-2 resultants de les diferents formes d'*splicing* obtingudes a partir del processament del pre-ARNm. L'anàlisi dels extrems 5' d'aquests transcrits van revelar l'existència de 9 exons no-traduïts en la regió 5' UTR del pre-ARNm de Zeb-2 i van constatar que la majoria de transcrits s'iniciaven just per davant de l'exó U5 (vegeu figura RI-10). A la vista d'aquests resultats, Nelles *et al.*, van concloure que, segurament, hi devia haver un promotor molt actiu en les cèl·lules C2C12 situat just per davant de l'exó U5.

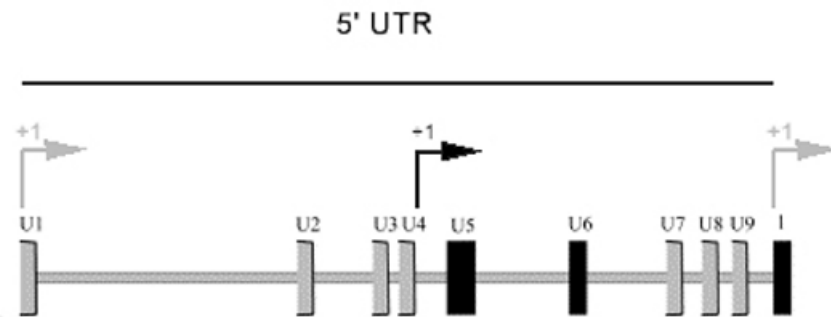


FIGURA RI-10: Estructura de la regió 5' UTR del pre-ARNm de Zeb-2 i les seves diferents formes d'*splicing*. Estructura d'introns i exons de la regió per davant del primer exó traduït del gen de Zeb-2. Les caixes negres representen exons amb llocs d'acceptació i donació d'*splicing* definits, les caixes grises representen els exons en els quals no s'ha trobat lloc d'acceptació d'*splicing*. Les fletxes amb un +1 representen els 3 possibles promotors de Zeb-2, en gris tenim els dos promotors amb poca activitat i en negre tenim el promotor més actiu (figura modificada, Nelles *et al.*, 2003).

A partir d'aquí, Nelles *et al.*, van aïllar i clonar el promotor situat a l'exó U5 i van analitzar la seva activitat en cèl·lules provenint d'una línia cel·lular humana de carcinoma epitelial de mama. Va resultar que el promotor situat en l'exó U5 presentava una activitat d'entre 6 i 7 vegades per sobre del

control (Nelles *et al.*, 2003). La comparació de la regió de l'ADN que havíem clonat en pGL3 amb les dades obtingudes per Nelles *et al.*, va revelar que la seqüència del promotor de Zeb-2 clonada incloïa el promotor més actiu, situat per davant de l'exó U5 de manera que s'obtenia un pre-ARNm que podia processar-se segons calgués en cada línia cel·lular utilitzada (vegeu figura RI-11).

Donats els resultats obtinguts fins al moment, en els quals s'aprecia una incongruència entre l'anàlisi dels nivells de l'ARNm de Zeb-2 i les diferents activitats del promotor en les diverses línies cel·lulars testades, es va pensar en una possible regulació de l'expressió de Zeb-2 a nivell post-traduccional.

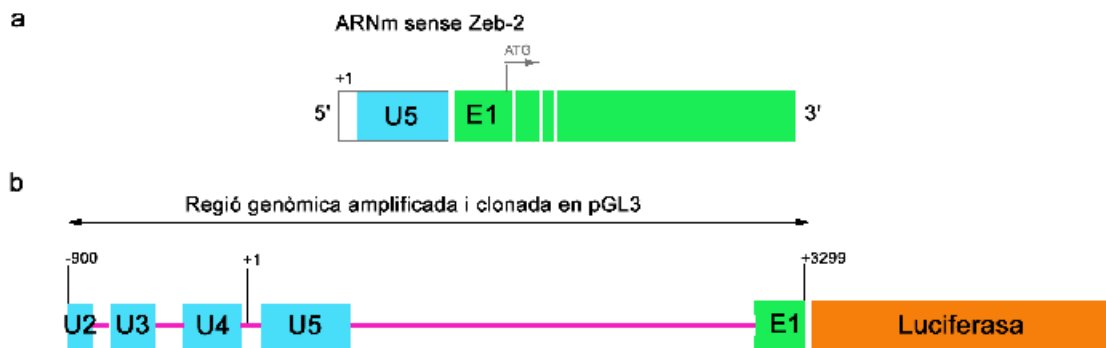


Figura RI-11: Esquema del promotor de Zeb-2 clonat en el laboratori. (a) Esquema de l'ARNm sense de Zeb-2. Inclou l'exó no-traduint U5 que no es perd en el processament de l'ARNm de Zeb-2. Tenim marcat l'inici de transcripció (+1) i l'inici de traducció (ATG). **(b)** Regió genòmica amplificada i clonada en el plàsmid pGL3 just per davant del gen de la Luciferasa. En rosa situem els diferents introns presents en aquesta seqüència. Com es pot observar, entre l'exó U5 i l'exó 1 hi ha un intró d'uns 2500 pb que provoca una important separació entre l'inici de transcripció i l'inici de traducció.

La línia IEC control que presenta una baixa activitat del promotor de Zeb-2 conserva l'intró de l'ARNm *antisense* de Zeb-2 mentre que les línies IEC ILK-1 i IEC Ha-Ras el perden.

En el mateix treball realitzat per Nelles *et al.* abans esmentat, es fa referència a l'existència d'una sèrie de seqüències EST, tant de ratolí com d'humà, que es corresponen clarament amb uns transcrits *antisense* derivats de la regió 5' UTR de Zeb-2. Totes les seqüències dels EST es situen aproximadament a 2 Kb per davant de l'exó 1 del gen de Zeb-1 i pateixen també processament per *splicing* (vegeu figura RI-12).



Figura RI-12: Estructura de l'ARNm *antisense* de Zeb-2. Esquema del transcrit *antisense* de Zeb-2 de ratolí i localització dels exons *antisense* trobats en el clon 832523 (fletxes grises) respecte a la seqüència 5' UTR del gen de Zeb-2. Requadrat en blau mostra la regió altament conservada entre ratolins i humans (figura modificada, Nelles *et al.*, 2003).

Comparant les dues seqüències dels transcrits *antisense* de ratolí i humà s'observa l'existència d'una regió, d'aproximadament uns 230 nucleòtids, altament conservada entre aquestes dues espècies i que dins d'aquesta regió hi ha un lloc d'*splicing* també conservat (vegeu figura RI-12, regió blava). Es va voler analitzar la presència d'aquests transcrits *antisense* en les diferents línies cel·lulars. Mitjançant la tècnica de RT-PCR i utilitzant uns oligonucleòtids que s'anellaven a la regió més conservada de l'ARNm *antisense* a costat i costat de l'*splicing* conservat en ambdues espècies, es va veure que la majoria de línies cel·lulars analitzades presenten un transcrit d'uns 266 nucleòtids excepte les línies cel·lulars IEC-ILK1 i IEC-Ha-Ras que tenen una disminució dels nivells dels transcrit de 266 nucleòtids i un augment d'expressió d'un transcrit de 166 nucleòtids també present en la seva línia cel·lular parental (vegeu figura RI-13a).

La seqüenciació d'aquests dos transcrits *antisense*, el de 266 i el de 166 nucleòtids, va revelar la presència d'un intró de 100 pb en el transcrit més llarg (el de 266 pb) i que justament corresponia a l'intró situat en l'*splicing* conservat entre les dues espècies. Al comparar la seqüència del transcrit *antisense*, incloent la seqüència de l'intró, amb la seqüència 5' de l'ARNm *sense* de Zeb-2 es va observar que, aproximadament, els primers 400 pb del transcrit *sense* de Zeb-2 es complementaven amb 400 pb del transcrit de Zeb-2 *antisense* quan aquest conservava l'intró (vegeu figura RI-13b).

La pèrdua d'aquest intró en el transcrit *antisense* de Zeb-2 fa que es perdin 100 pb de complementarietat amb el transcrit *sense* d'aquesta proteïna. A més, aquest intró està sempre present en el transcrit *sense* de

Zeb-2 ja que se situa quasi totalment dins de l'exó U5 que, com ja s'ha dit anteriorment, es manté en el transcrit *sense* corresponent al factor de transcripció. Per tal de descartar la possible amplificació d'ADN genòmic a l'hora de veure la presència de l'intró en els transcrits corresponents a l'*antisense* de Zeb-2, es van amplificar les diferents mostres d'ARN amb el mateix kit d'amplificació però inactivant la *transcriptasa reverse*. Aquests controls van mostrar que, efectivament, l'amplificació de l'intró prové de l'ARNm *antisense* de Zeb-2 i no de la possible contaminació d'ADN genòmic (dades no mostrades).

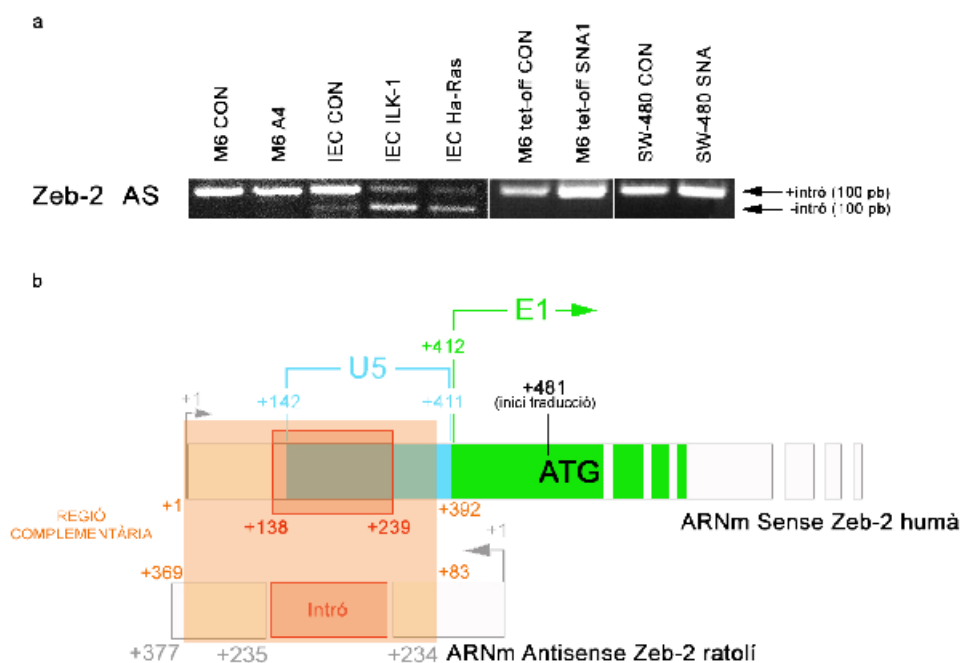


Figura RI-13: Nivells d'expressió de l'ARNm *antisense* de Zeb-2 en diferents línies cel·lulars. (a) L'expressió de l'ARNm *antisense* de Zeb-2 es va analitzar per RT-PCR utilitzant uns oligonucleòtids que anellen a banda i banda de l'intró altament conservat entre les diferents espècies, d'aquesta manera es pot identificar la presència o absència de dit intró. Per descartar la possible amplificació d'ADN genòmic present per contaminació es va fer la mateixa RT-PCR però havent inactivat prèviament la *transcriptasa reverse* durant 10 minuts a 95°C. **(b)** Esquema de la regió 5' de l'ARNm sense de Zeb-2 madur on es pot veure l'inici de la transcripció (+1), la regió corresponent a l'exó U5 (quadre blau) que no serà traduït, part de l'exó 1 (quadre verd) on es mostra l'inici de la traducció, la regió corresponent a l'intró de l'ARNm *antisense* (quadre vermell) que no es perd en l'ARNm sense de Zeb-2 ja que forma part de quasi tot l'exó U5, i finalment, es mostra la regió complementària de l'ARNm sense de Zeb-2 amb l'ARNm *antisense* (quadre groc).

Els clons M6 A4, M6 *tet-off* SNA1 i SW-480 SNA, que experimenten una TEM, conserven l'intró situat entre l'exó U5 i l'exó 1 del transcrit *sense* de Zeb-2.

Es va voler estudiar la presència o absència de la regió situada entre l'exó U5 i l'exó 1 del transcrit *sense* de Zeb-2. Per això es van utilitzar uns oligonucleòtids que anellen dins de la seqüència present entre l'exó U5 i l'exó 1 i dins de l'exó 1, just per davant de l'ATG (vegeu figura RI-14a). Utilitzant aquests oligonucleòtids i fent un anàlisi per RT-PCR de les línies anteriorment presentades, es va observar que les línies HT-29 M6 A4, HT-29 M6 SNA1 i SW-480 SNA conserven aquest llarg intró respecte les seves línies cel·lulars control (vegeu figura RI-14b). Això suggeriria que les línies cel·lulars que pateixen una TEM conservarien aquest intró en el transcrit *sense* de Zeb-2 provocant l'allunyament de la regió de complementarietat de l'inici de traducció.

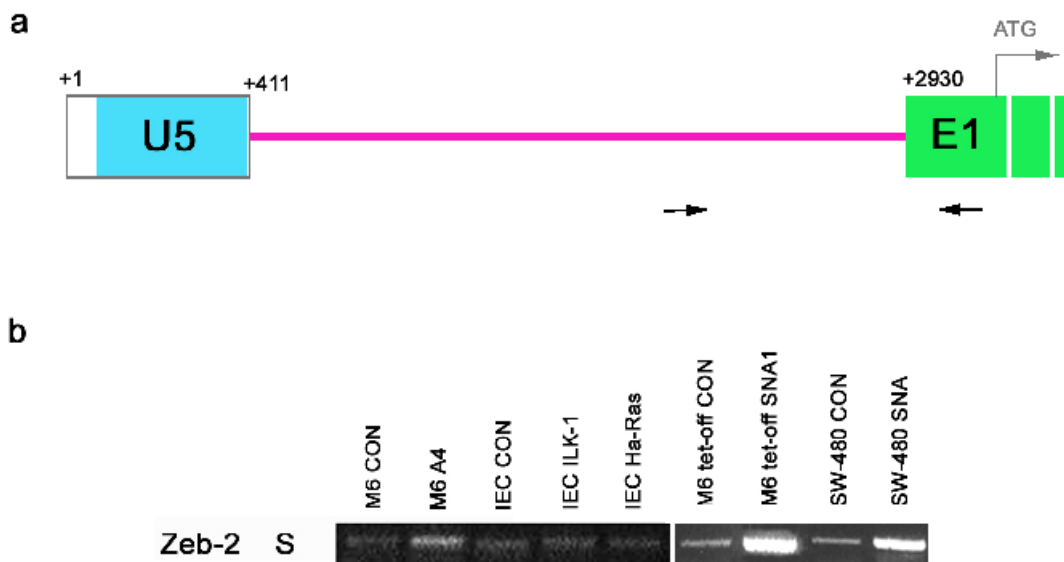


Figura RI-14: Anàlisi de la presència o absència de la regió situada entre l'exó U5 i l'exó1 del transcrit *sense* de Zeb-2. (a) Esquema de l'extrem 5' del transcrit de Zeb-2 amb l'intró inclòs (rosa). Les petites fletxes indiquen els llocs d'anellament dels oligonucleòtids utilitzats per amplificar l'intró. **(b)** A partir de l'ARNm total de les diferents línies indicades i utilitzant un oligonucleòtid *antisense* que anella per davant de l'ATG i un altre oligonucleòtid *sense* que anella dins de la regió situada entre l'exó U5 i l'exó 1 (tots dos descrits en *Materials i Mètodes*) es va amplificar un fragment d'uns 600 pb en aquelles línies que conserven la regió d'anellament amb l'oligonucleòtid *sense* indicant la presència d'aquesta regió.

DISCUSSIÓ

Sota certes circumstàncies, les cèl·lules epitelials poden patir canvis en el seu fenotip i convertir-se en cèl·lules mesenquimals. Com ja s'ha dit en la introducció, aquest procés de TEM s'ha observat en diverses fases del desenvolupament embrionari i, també, s'ha arribat a comparar amb els processos d'invasió de cèl·lules tumorals i de metàstasi. Com ja s'ha dit, la transcripció de l'E-cadherina està regulada a la baixa durant aquests processos (Vleminckx et al., 1991; Perl et al., 1998). Tot i així, la TEM també té a veure amb la disminució d'altres molècules específiques de teixit o altres marcadors epitelials diferents a l'E-cadherina i amb l'augment de molècules associades amb el fenotip mesenquimal (Hay, 1995). Com ja s'ha comentat anteriorment, està descrit que el repressor transcripcional Snail pot bloquejar l'expressió de l'E-cadherina per la seva unió específica a les caixes-E presents en el seu promotor, però el mecanisme pel qual altres molècules són regulades en la TEM ha estat poc estudiada. Estudis genètics fets en *Drosophila* han revelat que dos factors transcripcionals, Snail i Twist, regulen l'expressió de gens epitelials i mesenquimals, tot i que diversos gens mesenquimals també poden ser regulats per altres factors transcripcionals com són Dorsal o Tailless (Casal and Leptin, 1996). Diversos estudis de desenvolupament així com diversos resultats obtinguts de la transfecció de cèl·lules epitelials van indicar que Snail té la capacitat d'induir una complerta TEM quan es transfectat en cèl·lules epitelials en cultiu. Es va aprofitar aquesta avantatjosa capacitat d'Snail per estudiar els mecanismes de repressió de gens epitelials i d'activació de gen mesenquimals.

Altres gens epitelials diferents a l'E-cadherina, com són MUC-1, VDR i la citoqueratina-18, també presenten caixes-E en els seus respectius promotors. Els resultats exposats anteriorment mostren que el nivells d'ARNm d'aquests gens, MUC-1 i citoqueratina-18, disminueixen després de la transfecció d'Snail (vegeu figura RI-3) i que la repressió de MUC-1 requereix que les caixes-E estiguin intactes (vegeu figura RI-4). A més a més, sembla ser que tant MUC-1 com VDR tenen un mecanisme de regulació comú al de l'E-cadherina i que involucra Snail. Tot i així, altres factors transcripcionals amb afinitat per aquestes mateixes seqüències

podrien també participar en la regulació negativa de la transcripció de MUC-1, VDR i de l'E-cadherina.

Entre el gens regulats positivament per Snail tenim el repressor transcripcional Zeb-1 que també té la capacitat d'unir-se a les caixes-E com Snail. Com ja s'ha dit en la introducció, Zeb-1 i Zeb-2 són homòlegs a *Zfh-1* de *Drosophila* el qual s'activa per sota d'Snail en el desenvolupament embrionari. Snail es requereix per a l'expressió de *Zfh-1* en el mesoderm primerenc; en mutants d'Snail, l'expressió de *Zfh-1* està severament reduïda (Lai *et al.*, 1991). Els resultats obtinguts en aquest treball a partir de clons estables i induïbles per Snail, revelen clarament que Snail augmenta els nivells d'ARN de Zeb-1 (vegeu figures RI-5 i RI-6) durant la TEM. Encara que el promotor de Zeb-1 conté caixes-E, no es creu que Snail activi directament el promotor de Zeb-1 ja que (i) el temps que es requereix per augmentar l'activitat del promotor de Zeb-1 és major (entre 3 i 6 dies) que el necessari per reprimir els promotors de MUC-1, VDR O E-cadherina (dades observades per Sandra Guaita) i (ii) l'expressió de Zeb-1 es va detectar 4 dies després de que s'induís l'expressió d'Snail en els clons induïbles (vegeu figura RI-6).

Zeb-1, de la mateixa manera que Snail, bloqueja la transcripció de l'E-cadherina i de MUC-1 quan es transfecta en cèl·lules epitelials. A més a més, cèl·lules de línies tumorals amb una severa reducció de l'E-cadherina expressen ambdós factors, Snail i Zeb-1 (vegeu figura RI-5), i Snail i Zeb-1 presenten una activitat repressora additiva (vegeu figura RI-7). A més de la regulació positiva de Zeb-1 en els clons induïbles d'Snail, quan s'apaga l'expressió d'Snail, l'expressió de Zeb-1 necessita al voltant de 20 dies per retornar gradualment als seus nivells basals (vegeu figura RI-6). Aquesta observació indica que, en circumstàncies en que l'expressió d'Snail és transitòria, Zeb-1 prolongaria la repressió dels gens epitelials primerament bloquejats per Snail. En consonància amb aquesta hipòtesi cal indicar que, en embrions de *Drosophila*, l'expressió de *Zfh-1* persisteix després de la regulació a la baixa d'Snail (Leptin, 1991; Gray and Levine, 1996). Tot i així, mentre que els ratolins mutants KO per Snail no són viables degut a una gastrulació defectiva (Carver *et al.*, 2001), Zeb-1 és dispensable per dur a terme aquest procés. Animals KO per Zeb-1 poden acabar el seu desenvolupament, tot i que presenten severes deficiències en la producció

de cèl·lules T en el timus i diversos defectes esquelètics (Takagi *et al.*, 1998). Per tant, Snail, però no Zeb-1, és necessari per a la regulació a la baixa de l'E-cadherina requerit per donar lloc a una correcta gastrulació.

L'anàlisi de línies cel·lulars tumorals amb diferents característiques epitelials o mesenquimals com són les cèl·lules intestinals IEC-18 que expressen la quinasa activa ILK mostren una alta correlació inversa entre l'expressió de Zeb-1 i de l'E-cadherina. Aquesta correlació és millor que la presentada entre Snail i l'E-cadherina detectada en algunes línies cel·lulars que expressaven ambdues proteïnes. Tot i així, dades recents del nostre laboratori indiquen que la presència d'Snail no sempre es correlaciona amb la seva activitat en algunes línies cel·lulars, les quals expressen concomitantment E-cadherina, ja que tenen la proteïna Snail fora del nucli (Dominguez *et al.*, 2003). Aquest resultat, juntament amb l'obtingut amb els ratolins KO, suggereix que Snail és un element clau a l'hora de controlar la transcripció de l'E-cadherina i de portar a terme la TEM i, a més a més, d'induir l'expressió de Zeb-1 en diverses línies cel·lulars epitelials. Tot i així, en alguns tumors, l'expressió de Zeb-1 podria no ser induïda per l'activació d'Snail o bé, per mutacions en el seu promotor, o per l'activació d'alguns dels seus factors transcripcionals activadors i, d'aquesta manera, Zeb-1 podria mediar la repressió de l'E-cadherina.

Totes les línies cel·lulars testades van mostrar expressió de Zeb-2 independentment de l'expressió d'Snail i d'E-cadherina (vegeu figura RI-5 i RI-8). Aquesta expressió de Zeb-2 no es va veure modificada ni en les cèl·lules induïdes a partir d'una TEM com són les IEC IL-K1, IEC Ha-Ras o M6 A4 ni en les cèl·lules transfectades amb Snail com són les M6 SNA1 o les SW-480 SNA. Tot i així, l'estudi de l'activitat del promotor de Zeb-2 en les línies cel·lulars prèviament analitzades per RT-PCR, va revelar que les línies cel·lulars que han sofert una TEM presenten una activitat del promotor major que l'activitat obtinguda en les seves respectives cèl·lules epitelials parentals (vegeu figura RI-10). Per realitzar l'anàlisi de l'expressió de Zeb-2 per RT-PCR, es van utilitzar uns oligonucleòtids que anellaven dins de la regió codificant de Zeb-2. L'incongruència observada entre els nivells d'ARNm i l'activitat del promotor, que no és més que el reflex de la quantitat de proteïna *Luciferasa* expressada a partir del promotor analitzat, es podria explicar a través d'una possible regulació post-transcripcional de

Zeb-2. Alguns autors han descrit l'existència d'una sèrie d'ARNm *antisense* naturals presents en els procariotes que formarien part de la maquinària general del control de l'expressió gènica (Lacatena and Cesarini, 1981; Csiszar *et al.*, 1987; Simons and Kleckner, 1988; Wagner and Simons, 1994). En tots els exemples de procariotes estudiats, els transcrits *antisense* donaven lloc a la disminució de l'expressió dels seus corresponents transcrits *sense*. Tot i així, no existeixen evidències experimentals que descartin la seva possible implicació en un mecanisme de regulació positiva de l'expressió.

La descripció que es va fer l'any 1981 en la qual es demostrava que les dues cadenes d'ADN mitocondrial podien ser transcrites, tant en ratolins com en humans, juntament amb la descripció d'una sèrie de transcrits *sense* i *antisense* que podien complementar-se, en *Drosophila*, van donar lloc a l'estudi d'un gran número d'ARN *antisense* endògens. Es van arribar a descriure un gran número de transcrits *antisense* en varis organismes: virus, insectes, amfibis, ocells i mamífers (rates, ratolins, vaques i humans). A més a més, aquests ARNm estan molt conservats entre les diferents espècies. Aquests transcrits *antisense* també poden tenir la capacitat de codificar proteïnes, i poden jugar un paper molt important en la regulació de l'expressió dels seus transcrits *sense* respectius, gràcies a la seva complementarietat. Els transcrits *antisense* poden hibridar-se amb el transcrit *sense* i modificar, d'aquesta manera, la seva expressió (Vanhée-Brossollet and Vaquero, 1998). Els diferents mecanismes implicats en la funció reguladora d'aquests transcrits *antisense* inclouen la degradació de l'ARNm *sense* diana, la regulació de l'splicing del pre-ARNm o el control de la traducció dels ARNm *sense* complementaris (Lehner *et al.*, 2002).

Com ja he comentat anteriorment, Nelles *et al.* van descriure l'existència d'un ARNm *antisense* de Zeb-2. Aquest transcrit *antisense* de Zeb-2 pot processar-se i madurar donat que presenta varis llocs d'*splicing* (vegeu figura RI-12). Un dels llocs d'*splicing* està altament conservat entre les diferents espècies i regula la presència o absència d'un intró d'aproximadament 100 nucleòtids. Resulta que el manteniment d'aquest intró en el transcrit *antisense* de Zeb-2 dona lloc a una regió de complementarietat d'uns 400 pb amb la regió 5' del transcrit *sense* de Zeb-2 madur, just per davant de l'inici de traducció (vegeu figura RI-13b). Això

suggeriria que possiblement l'ARNm *antisense* de Zeb-2 amb l'intró conservat podria formar un dúplex amb l'ARNm *sense* i, d'aquesta manera, impedir l'entrada del complex ribosòmic per l'extrem 5' de l'ARNm, la qual cosa donaria lloc al bloqueig de la traducció de l'ARNm *sense*. Pel que fa a les cèl·lules IEC ILK-1 i IEC Ha-Ras, els resultats obtinguts recolzarien aquesta hipòtesi ja que l'ARNm *antisense* de Zeb-2 perd, en major part, l'intró i augmenten els nivells d'ARNm *antisense* sense intró respecte els nivells de les IEC parentals (vegeu figura RI-13a), coincidint d'aquesta manera amb l'augment de l'activitat del promotor de Zeb-2 en les dues línies que han patit el procés de TEM que no és més que el reflex de la quantitat de proteïna traduïda.

En canvi, les línies cel·lulars M6 A4, M6 *tet-off* SNA1 i SW-480 SNA mantenen l'intró de l'ARNm *antisense* igualment que les seves respectives línies parentals (vegeu figura RI-13a). Per tant, sembla ser que els resultats obtinguts en aquestes línies no s'explicarien a través de la hipòtesi plantejada. L'organització dels gens *Zfhx1a* (que codifica per Zeb-1) i *Zfhx1b* (que codifica per Zeb-2) divergeixen en les seves seqüències 5'. Mentre que el gen *Zfhx1a* té el lloc d'inici de transcripció molt proper a l'inici de la traducció, el gen *Zfhx1b* té una organització de l'extrem 5' molt més complexa de manera que presenta el seu inici de transcripció a una distància d'entre 2 i 3 Kb de l'inici de transcripció (vegeu figura RI-11b) (Nelles *et al.*, 2003). Això juntament amb el fet que els exons presents en aquesta regió (exons U1 a U9) estan molt conservats entre les diferents espècies suggeriria que aquesta àrea podria ser molt important a l'hora de regular la transcripció o la traducció del gen *Zfhx1b*.

Segons Nelles *et al.* la pèrdua de la regió situada entre els exons U5 i l'exó 1 està conservada en els vertebrats inferiors. Els resultats obtinguts en aquest treball indiquen que les línies que han patit una TEM (M6 A4, M6 *tet-off* SNA1 i SW-480 SNA), excepte les IEC ILK-1 i les IEC-Ha-Ras, mantenen aquesta regió. D'aquesta manera, la regió de complementarietat que hi ha entre l'ARNm *antisense* de Zeb-2 i la regió 5' de l'ARNm *sense* del mateix gen s'allunya del lloc d'inici de la traducció. Aquesta diferència en la regulació de la presència o absència d'uns o altres introns entre les línies M6 A4, M6 *tet-off* SNA1, SW-480 SNA i les línies IEC ILK-1 i IEC Ha-Ras podria ser deguda a diferències entre espècies ja que estem comparant

línees cel·lulars humanes i de rata. En les cèl·lules eucariotes existeixen dos grans mecanismes responsables de l'inici de la traducció (i) un mecanisme dependent de *cap* i (ii) un altre mecanisme dependent d'un lloc intern per a l'entrada del ribosoma (seqüències IRES). Aquest últim mecanisme es basa en el reclutament, per part de l'ARNm, de la subunitat ribosomal 40S de forma independent de *cap*, de manera que el ribosoma reconeix una estructura secundària formada en el 5' UTR (Pickering and Willis, 2005). Sabent això, existeix la possibilitat de que la regió mantinguda entre l'exó U5 i l'exó 1 presentés una seqüència IRES que permetés reclutar el ribosoma independentment de *cap* que, en el cas de les cèl·lules M6 A4, M6 tet-off SNA1 i SW-480 SNA, quedaria inutilitzat pel dúplex format entre l'exó U5 del transcrit *sense* i l'ARNm *antisense* de Zeb-2. D'aquesta manera, les línees cel·lulars que presenten l'intró en l'ARNm *antisense* però que mantenen la seqüència situada entre l'exó U5 i l'exó 1 de l'ARNm *sense* podrien reclutar els ribosomes a partir d'alguna seqüència IRES present en aquesta regió. En aquests moments, el nostre laboratori està portant a terme la identificació d'algun possible lloc IRES en aquesta regió. A la taula RI-1 s'exposa un resum dels resultats obtinguts sobre la regulació de l'expressió de Zeb-2.

Intró ARNm antisense Zeb-2	Intró ARNm sense Zeb-2	Síntesi proteica	Línies cel·lular
No	No	Traducció	IEC ILK-1 IEC Ha-Ras
Sí	No	No Traducció	IEC CON M6 CON M6 tet-off CON SW-480 CON
Sí	Sí	Traducció	M6 A4 M6 tet-off SNA1 SW-480 SNA

Taula RI-1: Taula resum de la regulació traduccional de Zeb-2. Aquesta taula resumeix les diferents combinacions de presència o absència dels diferents introns analitzats, del transcrit *sense* i de l'*antisense*, i la seva repercussió en la traducció de l'ARNm *sense* de Zeb-2 en diferents línees cel·lulars.

Com es pot veure en la figura RI-12, l'ARNm antisense, tant de ratolí com d'humà, té altres llocs d'*splicing* a més a més del que hem analitzat en aquest treball (vegeu figura R-14). Una possible explicació de quin seria el mecanisme pel qual es conservaria la regió situada entre l'exó U5 i l'exó 1 de l'ARNm *sense* de Zeb-2 consistiria en analitzar la presència o absència de l'intró 1 que hi ha just per davant de l'intró 2 que és el que hem analitzat en aquest capítol (vegeu figura RI-15). Si aquest intró es conservés, la regió complementària que abans només afectava a l'exó U5 de l'ARNm *sense* de Zeb-2 s'estendria al llarg de bona part de l'intró que separa l'exó U5 de l'exó 1 (vegeu figura RI-15) de manera que emmascararia el lloc de donació d'*splicing* present en l'exó U5 i aquest no es podria produir, conservant, d'aquesta manera, tota la regió present entre l'exó U5 i l'exó 1.

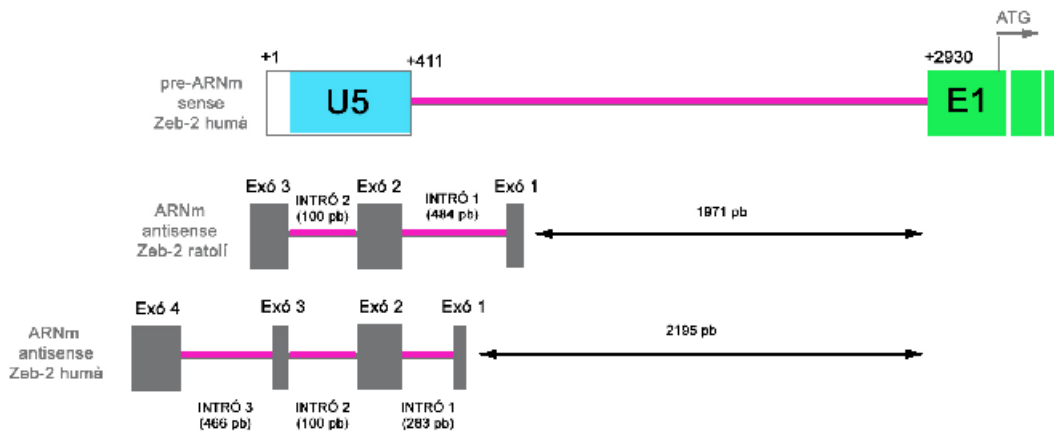


Figura RI-15: Organització dels introns i exons dels ARNm *antisense* de ratolí i humà. L'ARNm *antisense* de Zeb-2 de ratolí presenta 3 exons i 2 introns (rosa) i l'ARNm *antisense* de Zeb-2 humà té 4 exons i 3 introns (rosa). L'intró 2, tant de ratolí (que presenta una alta homologia amb el de rata) com d'humà, correspon a l'intró analitzat en el treball. L'intró 1, tant de ratolí com d'humà, tot i tenir llargades diferents, mantenen una complementarietat de quasi el 100% amb la regió nucleotídica contínua a l'exó U5 de l'ARNm *sense* de Zeb-2 humà. Seqüències EST: ARNm *sense* Zeb-2 humà (NM014795), ARNm *antisense* Zeb-2 ratolí (AI549808), ARNm *antisense* Zeb-2 humà (BE048858).

Resumint podríem dir que, pel que fa als introns de l'ARNm de l'*antisense*, la presència de l'intró 2 regularia de forma negativa la traducció de la proteïna mentre que la presència de l'intró 1 la regularia positivament i, a més a més, la regulació positiva de la presència de l'intró 1 prevaldria per sobre de la regulació negativa de la presència de l'intró 2. Per tant, seria la regulació de l'*splicing* de l'ARNm *antisense* el que regularia la

traducció o no de la proteïna, regulant indirectament l'*splicing* de l'ARNm *sense* de Zeb-2. Per tant, l'estudi de la regulació de intró 1 de l'ARNm *antisense* aportaria més dades que recolzarien aquesta hipòtesi. A continuació s'exposa un esquema resum en el qual es planteja un possible mecanisme de la regulació de la síntesi de la proteïna de Zeb-2 consistint en la regulació indirecta de l'*splicing* de l'ARNm *sense* de Zeb-2. Tot i així, cal recordar, que algunes premisses no han estat encara comprovades (vegeu figura RI-16).

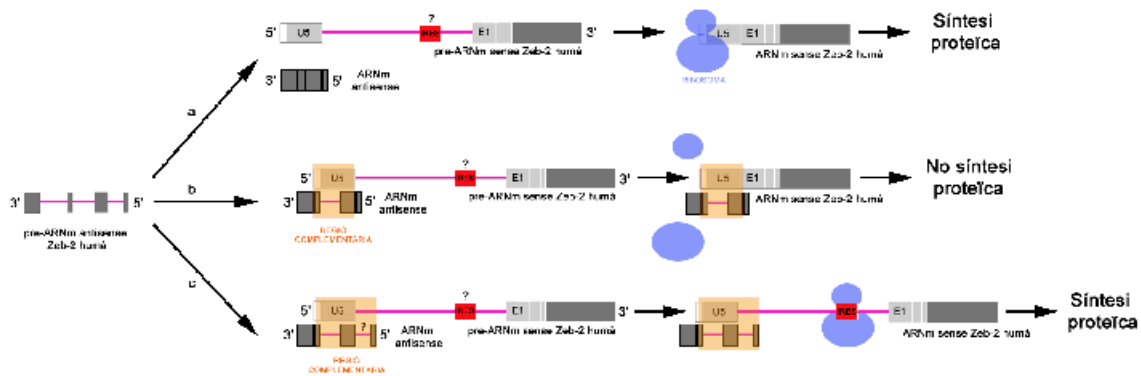


Figura RI-16: Les diferents formes d'*splicing* de l'ARNm antisense podria regular la síntesi de la proteïna Zeb-2. El pre-ARNm *antisense* de Zeb-2 podria patir diversos *splicings* alternatius que donarien lloc a diferents formes de l'ARNm *antisense* madur. **(a)** El pre-ARNm *antisense* podria perdre els dos introns i donar lloc a un ARNm *antisense* madur amb varis *gaps* (de 100 i 283 pb) entre les regions complementàries a l'ARNm *sense* de manera que no es produiria el dúplex entre les dues cadenes. Això, afavoriria l'*splicing* de la regió situada entre l'exó U5 i l'exó 1 (E1) ja que el lloc donador d'*splicing* de l'exó U5 i el lloc acceptor de l'*splicing* de l'exó 1 estarien al descobert. D'aquesta manera, les subunitats del ribosoma s'acoblarien a l'extrem 5' de l'ARNm *sense* i, escanejant tota la seqüència, començaria la síntesi de la proteïna de Zeb-2 al reconèixer l'ATG. **(b)** El pre-ARNm *antisense* podria processar tots els seus introns excepte l'intró 2 que es conservaria. Això afavoriria la presència d'una seqüència d'uns 400 pb complementaris, al quasi 100 %, a l'extrem 5' de l'ARNm *sense*. Tot i així, aquesta complementarietat deixaria al descobert el lloc donador d'*splicing* de l'exó U5, la qual cosa, provocaria la pèrdua de l'intró U5-1. Al haver-hi el dúplex format en l'extrem 5' de l'ARNm *sense*, el ribosoma seria incapaç d'entrar per aquest extrem per escanejar la seqüència i no es produiria la síntesi de Zeb-2. **(c)** El pre-ARNm *antisense* podria conservar els dos introns, intró 1 i intró 2, donant lloc a una complementarietat d'uns 700 pb amb l'ARNm *sense*. A més a més, la formació d'aquest dúplex emmascararia el lloc donador d'*splicing* de l'exó U5 inhibint d'aquesta manera la pèrdua de la regió U5-1. La possible presència d'una seqüència IRES en aquesta regió permetria el reclutament del complex ribosòmic de forma independent a l'entrada per l'extrem 5' afavorint d'aquesta manera la traducció de la proteïna.

CAPÍTOL I: Gens epitelials i mesenquimals regulats per Snail durant la TEM

En aquest esquema no s'ha tingut en compte la possible regulació de l'*splicing* de l'intró 3 de l'ARNm *antisense* humà, s'ha centrat en els introns 1 i 2. aquesta explicació s'ha fet amb l'ARNm *antisense* humà però valdria d'igual manera per l'ARNm *antisense* de ratolí.

CAPÍTOL II: Regulació de la transcripció d'Snail.

ANTECEDENTS

S'han descrit alguns factors capaços d'induir fenòmens de TEM en diversos sistemes cel·lulars (Hay, 1995). Tenint en compte que Snail és un factor important a l'hora d'iniciar els mecanismes responsables d'un procés de TEM, es va pensar en la possibilitat de que aquests factors inductors de la TEM activessin una sèrie de vies de senyalització responsables de l'activació de l'expressió d'Snail. Els èsters de forbol (TPA o PMA) són capaços d'induir una TEM, i en alguns sistemes sembla ser que ho fan a través de la PK-C α , ja que línies estables d'HT-29 M6 que sobreexpressen una forma activa d'aquesta quinasa presenten un fenotip compatible amb la TEM (Batlle et al., 1998). Encara més, l'aspecte fenotípic i el comportament biològic d'aquestes cèl·lules és força semblant al dels clons estables d'HT-29 M6 que expressen constitutivament Snail. Això ens faria pensar en la possibilitat de que PK-C α pogués induir un fenomen de TEM a través de l'activació de l'expressió d'Snail.

Una altra via de senyalització implicada en la inducció de la TEM és la PI3K/Akt (Grille *et al.*, 2003). ILK té la capacitat de regular positivament, de forma dependent de PI3K, l'activitat de l'Akt mitjançant la seva fosforilació (Delcomenne *et al.*, 1998). La sobreexpressió de la quinasa ILK promou una transformació tumoral acompanyada de la pèrdua d'expressió de l'E-cadherina (Somasiri *et al.*, 2001). S'ha vist que un alt percentatge de pòlips provenint de pacients amb poliposi adenomatosa familiar (FAP) o de carcinomes de colon presentaven un augment de l'expressió i de l'activitat de l'ILK. A partir d'aquí, es va demostrar que la sobreexpressió de l'ILK era capaç de regular positivament l'expressió d'Snail, el qual al seu torn, regularia negativament l'expressió de l'E-cadherina (Tan et al., 2001). Però de quina manera l'ILK era capaç de regular l'expressió d'Snail encara quedava per descobrir.

Com ja s'ha comentat en la introducció, s'havia observat una cooperació sinèrgica entre l'activació de Ha-Ras i la senyalització per TGF- β per tal d'induir la TEM. Està descrit que TGF- β i altres estímuls tenen la capacitat d'induir el fenomen de TEM a través de l'activació d'ERK2 i de la via de

senyalització PI3K/Akt (Ellenrieder et al., 2001; Grande et al., 2002; Janda et al., 2002; Bates and Mercurio, 2003; Grille et al., 2003; Peinado et al., 2003). Donat tots aquests antecedents, es va voler comprovar si aquestes vies de senyalització podien explicar el seu efecte inductor de la TEM a través de la regulació de l'expressió d'Snail.

En el capítol II s'ha intentat explicar quins podrien ser els possibles factors implicats en la regulació de l'expressió d'Snail i, més específicament, s'ha estudiat la possible implicació d'oncoproteïnes i proteïnes de la matriu extracel·lular a l'hora d'induir l'expressió d'aquest factor transcripcional.

RESULTATS

El fragment del promotor d'Snail -78/ +59 és el que presenta major activitat en dues línies cel·lulars mesenquimals.

Es va situar el lloc exacte d'inici de transcripció d'Snail mitjançant l'amplificació dels extrems finals 5' de l'ADNc (tècnica anomenada RACE) a partir de la purificació d'ARN provenint de dues línies cel·lulars anomenades SW-620 i Mia-Paca2 que es caracteritzen per tenir alts nivells d'expressió d'Snail. D'acord amb això, el constructe del promotor d'Snail va passar a anomenar-se -869/+59 respecte al nou inici de transcripció caracteritzat. A partir d'aquest promotor, es va realitzar una sèrie de deleccions progressives de l'extrem 5' de la seqüència del promotor clonat obtenint, així, diversos fragments que ens facilitaria l'estudi de la seva regulació. En línia amb això, es van analitzar les activitats basals dels diferents promotors mutants en les dues línies que es van utilitzar per determinar l'inici de transcripció d'Snail, SW-620 i Mia-Paca2. El resultat va ser que l'eliminació progressiva de seqüències per davant de 5' gairebé no afectava l'activitat basal del promotor; en canvi, es va constatar que el fragment del promotor -125/+59 presentava una activitat lleugerament major que la del promotor -869/+59 (vegeu figura RII-1).

En consonància amb aquest resultat, també es va verificar, en ambdues línies cel·lulars, que el fragment que va de -78 a +59 també presentava major activitat basal que el fragment del promotor complet. Altres deleccions que van donar lloc als fragments -29/+59 i -78/-29 afectaven severament l'activitat del promotor (vegeu figura RII-1). Per tant, donat

que la seqüència del promotor -78/+59 representava el fragment més petit de promotor que conservava la màxima activitat del mateix, aquesta regió va ser denominada com a promotor mínim d'Snail.

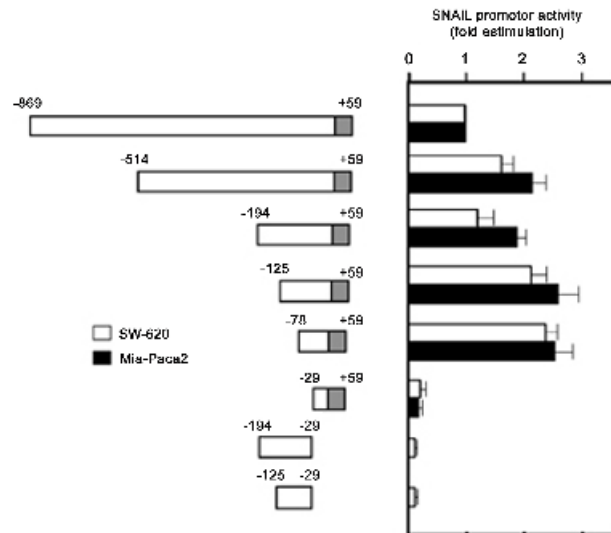


Figura R11-1: Determinació del promotor mínim d'Snail. Es van generar delecions progressives del promotor d'Snail -869/+59 mitjançant PCR i es van insertar en el plàsmid pGL3. L'activitat de les diferents construccions es van analitzar en dues línies cel·lulars, Mia-Paca2 i SW-620, i es van representar com a vegades d'estimulació respecte a l'activitat basal del promotor -869/+59 en cada línia cel·lular (mitjana±s.d. de tres experiments realitzats per duplicat).

A més a més d'això, també es va poder constatar que l'activitat del promotor -869/+59 era diferent segons si el fenotip cel·lular era mesenquimal o epitelial. Com es podria esperar, línies cel·lulars caracteritzades per una alta expressió d'Snail (SW-620 i Mia-Paca2) presentaven una activitat basal del promotor major que les línies cel·lulars amb nivells d'expressió més baixa (HT-29 M6 i SW-480 ADH) (dada no mostrada). Aquesta diferència d'activitat, depenent de la morfologia cel·lular, fou també detectada en el promotor mínim d'Snail (-78/+59).

El promotor mínim d'Snail és sensible a senyals que augmenten els nivells d'Snail en cèl·lules epitelials.

Per tal de portar a terme l'estudi de la regulació transcripcional d'Snail, es van utilitzar les línies cel·lulars següents: IEC-18 control, IEC ILK-1, IEC Ha-Ras, M6 control i M6 A4 descrites anteriorment. Com ja s'ha explicat en

l'anterior capítol, aquestes línies havien estat forçades a patir un procés de TEM mitjançant la transfecció estable de diversos oncogens.

A partir d'aquí, per estudiar els elements del promotor d'Snail que li confereixen especificitat mesenquimal, es va procedir a analitzar les activitats basals dels diversos fragments del promotor d'Snail en aquests diferents sistemes cel·lulars. Això ens va permetre observar que les tres condicions responsables de la TEM soferta per les línies cel·lulars parentals, que són la sobreexpressió de l'ILK-1, Ha-Ras i PK-C α (+), estimulaven significativament l'activitat del promotor -869/+59 d'Snail (vegeu figura RII-2a).

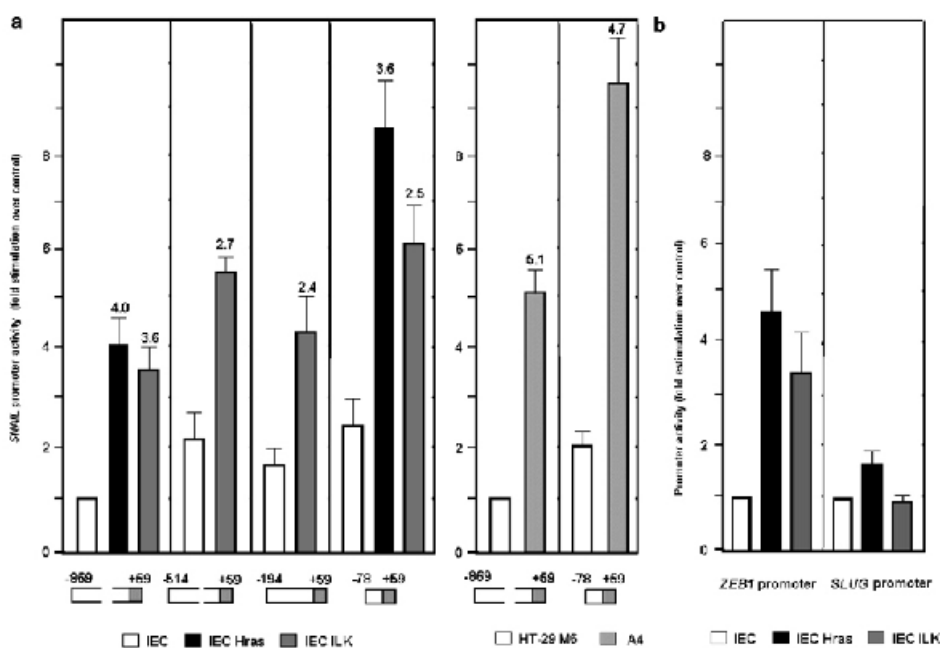


Figura RII-2: El promotor mínim d'Snail és sensible al senyals que augmenten l'expressió d'Snail en cèl·lules epitelials. (a) l'activitat dels diferents promotors es va analitzar en les línies cel·lulars indicades. L'activitat del promotor es va referir al valors obtingut pel promotor -869/+59 en les cèl·lules IEC i HT-29 M6. Els números indicats sobre cada barra correspon a l'estimulació observada de cada promotor respecte el control; és a dir, IEC-ILK-1 i IEC-Ha-ras *versus* IEC-18, o A4 *versus* M6. (b) L'activitat dels promotors de Zeb-1 i d'Slug es va analitzar en les cèl·lules IEC-ILK-1 i IEC-Ha-ras, i es van comparar amb les cèl·lules IEC-18 com a control. Els resultats corresponen a la mitjana \pm s.d. de tres experiments realitzats per duplicat.

Com a controls, es va estudiar l'activitat d'altres dos promotors, el de Zeb-1 i el d'Slug, en les cèl·lules IEC-18 parentals, ILK-1 o Ha-Ras. Com era d'esperar, i coincidint amb els resultats de les RT-PCR semi-quantitatives

presentades en la figura RI-8, l'activitat del promotor de Zeb-1 estava incrementada en les línies cel·lulars que presentaven un augment del transcrit del mateix gen, mentre que l'activitat del promotor d'Slug s'incrementava molt poc (vegeu figura RII-2b).

A més a més, també es va constatar que l'activitat del promotor mínim d'Snail (-78/+59) estava incrementada de forma molt similar a la del promotor complert (-869/+59) en aquelles cèl·lules que havien experimentat una TEM, exceptuant el cas de les ILK-1 on el promotor mínim presentava una activitat significativament menor que el promotor complert. Aquesta observació ens va indicar que, segurament, existeixen altres seqüències no presents en el promotor -78/+59 que contribuïrien a l'activació de l'expressió d'Snail (vegeu figura RII-a). Tots aquests resultats suggerien que el promotor mínim d'Snail contindria molts dels elements responsables de la seva expressió específica en cèl·lules tumorals invasives.

La via de senyalització d'ERK és responsable de l'activació del promotor d'Snail.

A partir d'aquí es va voler verificar quines podrien ser les vies de senyalització cel·lulars implicades en l'activació de l'expressió d'Snail en els diferents sistemes cel·lulars; IEC-18 parentals, IEC-18 ILK-1 i IEC-18 Ha-Ras, i HT29-M6 parentals i HT29-M6 PK-C α (+). Es va voler provar la rellevància de dues vies de senyalització, ERK2 i PI3K/Akt implicades en la inducció de TEM (vegeu antecedents), en les nostres condicions experimentals. No es va observar cap tipus d'efecte dels inhibidors de la PI3K, LY294002 (vegeu figura RII-3a) o Wortmanina (dada no mostrada), sobre l'activitat de cap dels diferents fragments del promotor d'Snail o sobre els nivells del transcrit d'Snail (dada no mostrada), en la majoria de línies cel·lulars examinades i utilitzant un ampli rang de concentracions. Només en les cèl·lules IEC-ILK, es va detectar un lleuger efecte de l'inhibidor LY294002 a una concentració de 30 μ M. Aquest efecte es va observar només sobre el promotor -869/+59 (vegeu figura RII-3a). En canvi, dos inhibidors de les MEK1/2, PD98509 i UO126, van afectar significativament l'activitat de tots els fragments del promotor d'Snail a concentracions normals d'us (50 μ M i 20 μ M, respectivament) en línies tumorals.

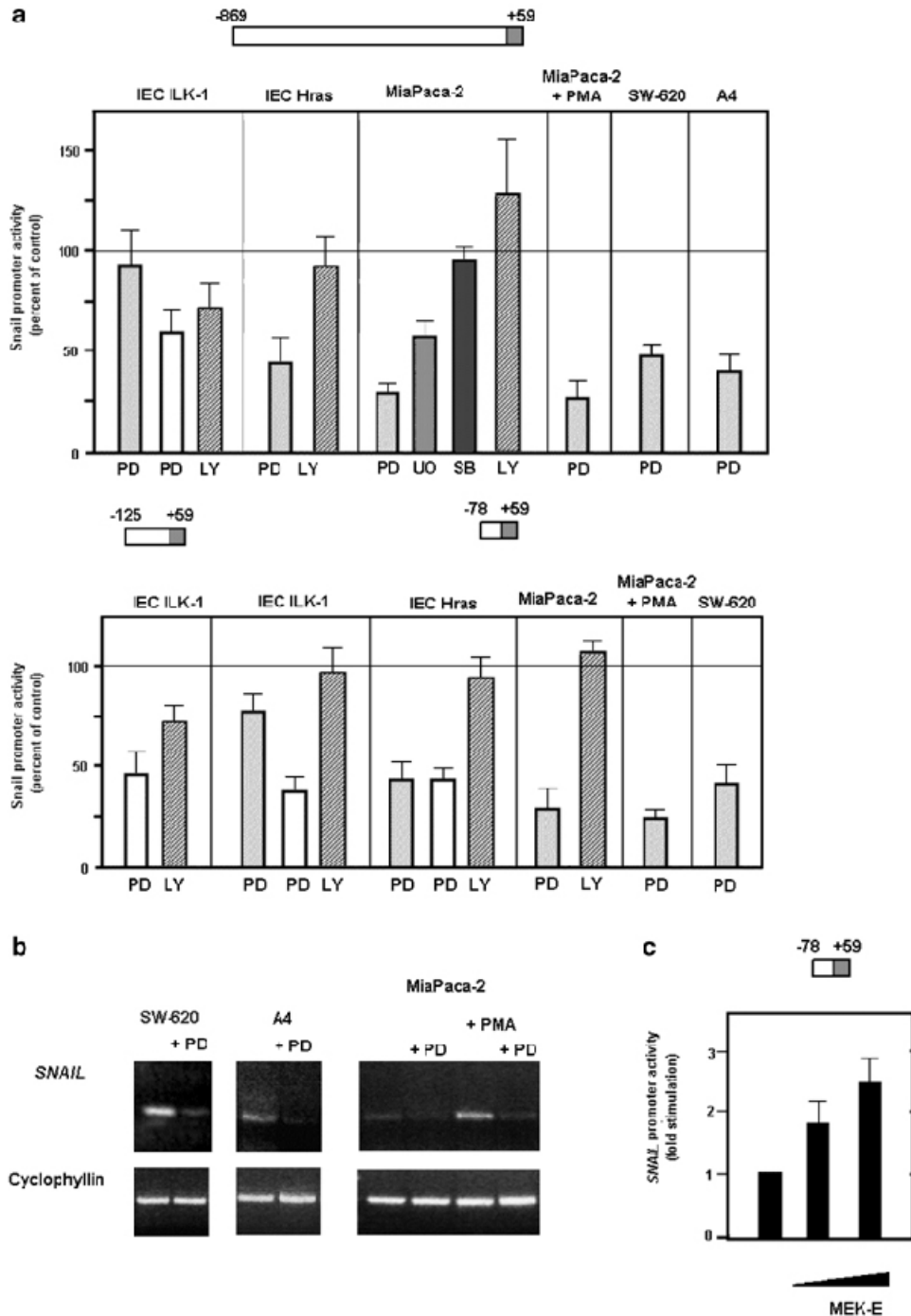


Figura RII-3: La transcripció d'Snail és dependent de l'activitat de la via d'ERK. Les línies cel·lulars es van incubar amb PD98059 (PD) (50 μ M, barres grises; o 100 μ M, barres blanques), UO126 (UO) (20 μ M), SB203580 (SB) (10 μ M), LY294002 (LY) (30 μ M) o el vehicle (DMSO) durant 20 h. Quan s'indica, es va afegir PMA al mateix temps que l'inhibidor. L'activitat dels promotors **(a)** es van determinar com anteriorment. Els nivells de transcrit dels gens indicats **(b)** es van determinar com a la figura R1. El número de cicles utilitzats per amplificar Snail va ser de 27 per les cèl·lules Mia-Paca2 i de 30 per les A4 i les SW-620. L'activitat dels promotors d'Snail indicats es va determinar en cèl·lules transfectades amb concentracions creixents d'una forma constitutivament activa de MEK-1 (MEK-E) o amb plàsmid buit.

Es va observar també, que l'inhibidor PD98509 disminuïa l'activitat dels promotors -869/+59 i -78/+59 de forma similar en cèl·lules tumorals que presenten una alta activitat d'aquests mateixos promotors, com són les cèl·lules SW-620 i les Mia-Paca2, tant abans com després de tractar-les amb PMA (vegeu figura RII-3a). També es va observar que l'inhibidor UO126 reprimia l'activitat dels dos promotors en les cèl·lules Mia-Paca2. En canvi, l'inhibidor de la quinasa p38, SB203580 a concentracions majors de 10 µM, no va modificar l'activitat dels promotors, indicant així que és la via de senyalització d'ERK i no la de p38 la que afecta la transcripció d'Snail de forma selectiva.

Com s'ha dit anteriorment, les activitats dels dos promotors, el complet i el mínim, en les cèl·lules A4, IEC-ILK i IEC-Ha-Ras es van veure també afectades per l'inhibidor PD98509, encara que les cèl·lules IEC-ILK es van mostrar menys sensibles a l'inhibidor en qüestió i necessitaven concentracions més altes (100 µM) per obtenir una disminució comparable a l'observada en les altres dues línies cel·lulars, A4 i IEC-Ha-Ras (vegeu figura RII-3a). Els efectes concomitants de l'inhibidor sobre els nivells dels transcrits d'Snail es van detectar per RT-PCR tant en cèl·lules Mia-Paca2 (abans i després de ser tractades amb PMA) com en cèl·lules SW-620 i A4 (vegeu figura RII-3b). Aquests resultats van suggerir que la via de senyalització d'ERK està involucrada en l'activació del promotor mínim d'Snail. Per confirmar aquesta observació, es va utilitzar una forma mutada constitutivament activa de MEK (MEK-E) que s'havia utilitzat en treballs anteriors per mimetitzar l'activació d'aquesta via de senyalització (O.A. Coso *et al.*, 1995; N. Ajenjo *et al.*, 2000). Com es pot veure en la figura RII-4c, la transfecció d'aquest mutant de MEK (MEK-E) va estimular significativament l'activitat del promotor mínim d'Snail de manera dosi-dependent. Com es podria esperar, MEK-E també augmenta l'activitat del promotor complet d'Snail (-869/+59) (dada no mostrada).

El factor Sp1 pot unir-se al promotor mínim en les cèl·lules IEC-ILK1 i IEC-Ha-ras.

El promotor mínim humà d'Snail, de la mateixa manera que el promotor d'Snail d'altres espècies, està mancat de caixa TATA (Mayor *et al.*, 1993). L'absència d'aquesta caixa fa que els elements reguladors del promotor no

puguin activar directament la transcripció del gen. De manera que la caixa TATA juga un paper important a l'hora de mediar l'estimulació del promotor pels elements que el regulen. L'activació d'aquest tipus de promotors que no tenen caixa TATA solen presentar dianes per al factor de transcripció Sp1 (Nothias *et al.*, 1995). Per tant, Sp1 està considerat com un activador transcripcional d'aquest tipus de promotors.

A partir d'aquestes dades, es va analitzar la seqüència del promotor mínim d'Snail i es va trobar, en la regió pròxima a l'inici de transcripció, una seqüència rica en –GC– que podria ser una regió diana pel factor transcripcional Sp1. Per tal de demostrar si Sp1 era capaç d'unir-se al promotor mínim, es va realitzar un assaig de *BOPA* (*Biotinilated Oligonucleotid Precipitation Assay*) amb un oligonucleòtid que corresponia als 70 pb just per davant de l'inici de transcripció d'Snail i que contenia la regió rica en –CG–. Es va observar que en les línies cel·lulars que augmenten l'expressió d'Snail, IEC-ILK-1 i IEC-Ha-Ras, Sp1 és capaç d'unir-se a la sonda (vegeu figura RII-4).

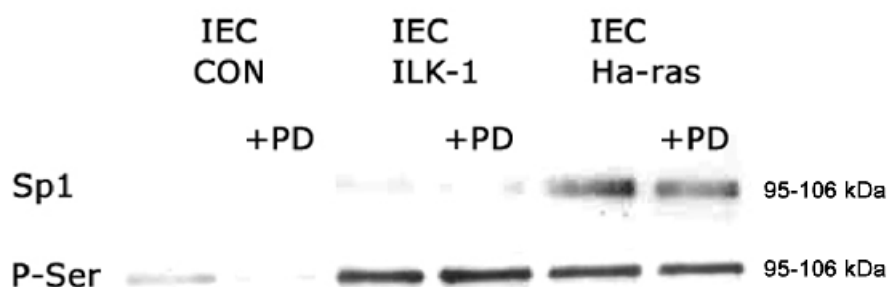


Figura RII-4: Sp1 té la capacitat d'unir-se a la regió rica en –CG– del promotor mínim. Els extractes proteics corresponents a cada una de les línies cel·lulars indicades es van incubar amb l'oligonucleòtid de 70 pb marcat amb biotina i contenint la regió rica en –CG–. A continuació, es va precipitar la sonda unida al factor Sp1 amb estreptavidina-agarosa i es va córrer el resultat de la precipitació en un gel de poliacrilamida que posteriorment es va transferir a una membrana. Finalment, es va realitzar un Western blot contra SP1 i contra serines fosforilades.

Es pot observar, però, que hi ha força més quantitat de Sp1 unit a l'oligonucleòtid en les cèl·lules que expressen Ha-ras que no pas en les que expressen ILK-1. També es va observar, que el tractament de les cèl·lules amb l'inhibidor PD98509 no afecta la quantitat de Sp1 amb la capacitat

d'unir-se a la sonda. Per tant sembla ser que no hi ha una correlació entre l'unió de SP1 al promotor d'Snail i l'inhibició de les vies de senyalització responsables de l'increment de l'activitat del promotor d'Snail. El mateix assaig realitzat amb altres línies cel·lulars, com les Mia-Paca2, les SW-620 o les M6 CON o A4, no s'apreciava unió de Sp1 o bé, si hi havia unió no presentava una bona correlació.

Alguns autors han descrit que la fosforilació en serines del factor Sp1 pot estar correlacionat amb un augment de la seva unió a l'ADN i amb un augment de la seva activitat transactivadora (Bowman and Philipsen, 2002). Per tal de saber l'estat de fosforilació del factor Sp1 unit a la sonda corresponent al fragment -70/-1 del promotor d'Snail, es va procedir a realitzar un Western blot contra serines fosforilades. Efectivament, es va observar que els nivells proteics de Sp1 units a la sonda estaven fosforilats en serina. Cal remarcar, però, que en el cas de les cèl·lules IEC-ILK els nivells de proteïna fosforilada en serines eren majors que els nivells de Sp1 units a l'oligonucleòtid. Això suggeriria, que potser en aquest tipus cel·lular, s'hi uneix algun altre factor que també es fosforila en serines i que podria fer una funció redundant a la realitzada pel factor Sp1.

NF κ B/ p65 estimula la transcripció d'Snail a través d'una regió situada immediatament per davant del promotor mínim en SW-480.

Com ja s'ha comentat en la introducció, la proteïna transcripcional Dorsal, la homòloga humana de la qual és el factor anomenat NF κ B, està involucrada en l'activació transcripcional d'Snail durant el desenvolupament embrionari. Per tal de verificar si el promotor d'Snail és sensible a aquest factor transcripcional, es va procedir a co-transfectar la subunitat p65 del factor NF κ B o bé, la proteïna quimèrica Rel-Vp16 que conté el domini d'unió a l'ADN de p65 (Rel) fusionat a l'element transactivador víric Vp16 o bé, el domini Rel sol, amb els diferents fragments del promotor d'Snail en cèl·lules SW-480. Es va observar que tant la subunitat p65 com la proteïna quimèrica Rel-Vp16 estimulaven l'activitat dels diferents fragments del promotor d'Snail, i que la forma inactiva d'aquest factor, el domini Rel, no era capaç d'activar-los (vegeu figura RII-5a). També es va comprovar que el promotor -194/+59 responia a l'activació causada per p65 de forma dosi-dependent (vegeu figura RII-5b). Aquests resultats es van confirmar

mitjançant l'anàlisi dels nivells d'ARN d'Snail en cèl·lules SW-480 transfectades amb p65 (vegeu figura RII-5c).

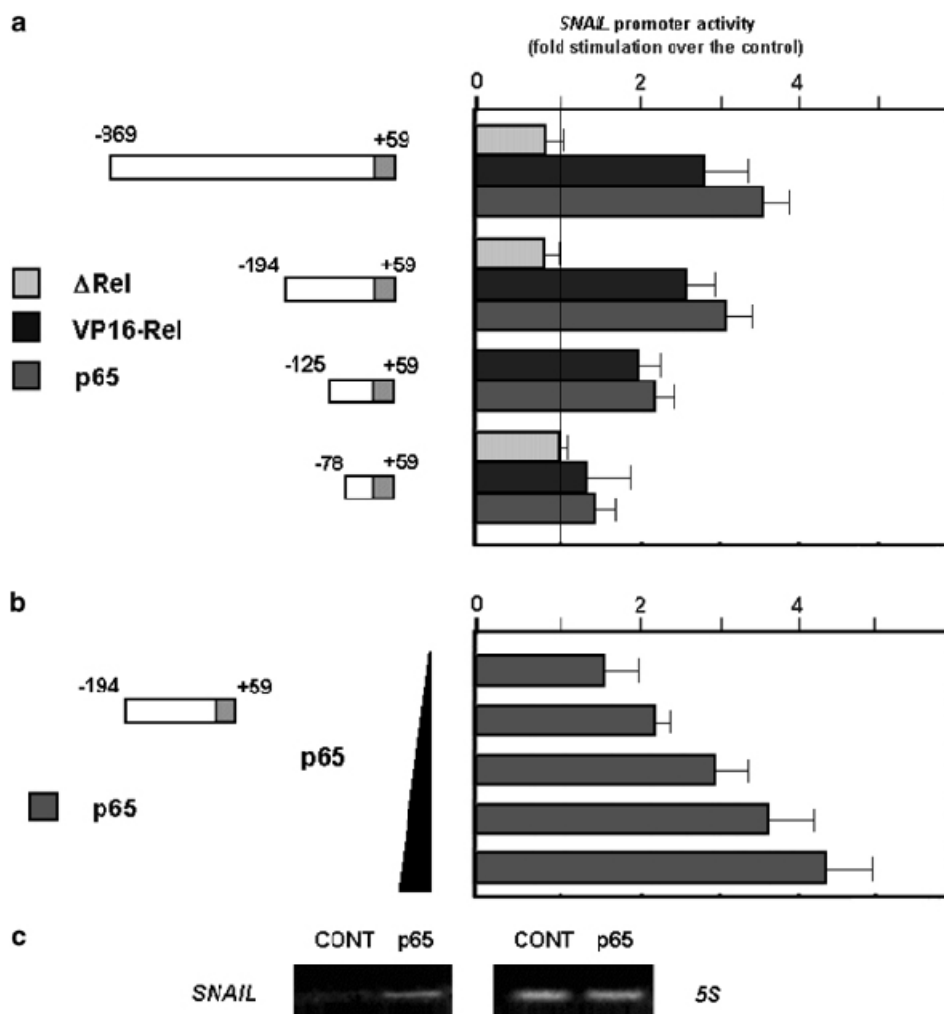


Figura RII-5: p65 estimula l'activitat del promotor d'Snail. Les cèl·lules SW-480 es van transfectar amb el plàsmid pcDNA3-p65, una proteïna de fusió quimera Rel-VP16 que consisteix en el domini p65 homòleg a Rel i el domini transactivador de VP16, o bé, el domini d'unió a l'ADN del factor. Després de 48 h es va analitzar l'activitat dels diferents promotor d'Snail **(a,b)**. El plàsmid pcDNA3-p65 (10-200 ng) es va transfectar en els experiments mostrats en l'apartat **(b)**. **(c)** Cèl·lules SW-480 es van transfectar amb 50 ng de pcDNA3-p65 i, 48 h després, es van determinar els nivells d'ARN d'Snail i d'ARNr 5S.

A més a més, es va constatar que, així com el fragment del promotor -194/+59 responia de forma molt similar a l'efecte d'aquests activadors que el fragment -869/+59, el fragment -78/+59 ho feia de forma molt més atenuada, indicant que les seqüències involucrades en la resposta a aquesta via deuen estar situades en el fragment de promotor que va de -194 a -78. També es va observar, que l'activitat del promotor -125/+59 era intermitja

entre l'activitat dels promotors $-869/+59$ i $-194/+59$ i l'activitat del promotor mínim ($-78/+59$). Això suggeria que podria haver-hi més d'una seqüència de resposta a aquest factor transcripcional que contribuiria a l'estimulació del promotor. Al analitzar la seqüència del promotor $-194/+59$ d'Snail es va observar la presència de 3 possibles regions consens per a NF κ B. El fragment del promotor d'Snail $-125/+59$ perd una d'aquestes caixes de manera que en manté dues, mentre que el fragment $-78/+59$ només conserva una caixa. De totes maneres, cal puntualitzar que l'activació dels diferents fragments del promotor d'Snail per part de p65 només es va observar en la línia cel·lular SW-480.

DISCUSSIÓ

En aquest estudi s'ha caracteritzat el promotor d'Snail humà i la seva apropiada especificitat per a les cèl·lules mesenquimals. S'ha identificat un inici de transcripció diferent al proposat per altres autors (Paznekas *et al.*, 1999), els quals l'havien situat a 55 pb més per endavant. En tot cas, cal mencionar que la longitud del 5' UTR determinat en *Xenopus* (33 pb) (Mayor *et al.*, 1993) concorda molt més bé amb la longitud del 5' UTR calculat, en aquest estudi, amb el nou lloc d'inici de transcripció descrit (80 pb) que no pas amb l'inici transcripcional suggerit anteriorment.

L'anàlisi realitzat amb els diferents fragments del promotor d'Snail evidencia que el promotor mínim correspon a la seqüència -78/+59, la qual presenta una activitat comparable als fragments més llargs. Com ja s'ha comentat en els resultats, aquest promotor mínim està mancat de caixa TATA, de la mateixa manera que els promotors d'Snail d'altres espècies (Mayor *et al.*, 1993; Peinado *et al.*, 2003). Com en la gran majoria de promotors sense caixa TATA, el promotor mínim d'Snail pot unir el factor Sp1 en algunes de les línies cel·lulars que presenten una alta activitat del mateix promotor, IEC-ILK-1 i IEC-Ha-ras. Tot i així, en la línia IEC-ILK-1 la quantitat d'Sp1 unida al promotor és molt més petita en comparació amb la línia IEC-Ha-ras, en canvi, s'hi uneix un altre factor a la mateixa regió que Sp1 que pot ser fosforilat en serines. El factor Sp3 forma part de la família de factors de transcripció Sp/XKLF de la mateixa manera que Sp1. Està descrit que Sp3 presenta una gran homologia amb el factor Sp1 i que la seva afinitat per unir-se a seqüències riques en -CG- és comparable a la que s'observa per Sp1. Sp3 té la capacitat d'activar la transcripció de diferents promotors en cèl·lules SL2 de *Drosophila* i, també, en algunes línies cel·lulars de mamífer. Recentment s'ha descrit, que una fosfatasa anomenada PP1 és capaç de defosforilar els factors Sp1 i Sp3 de cèl·lules epitelials de mama, reduint d'aquesta manera la unió d'aquests dos factors de transcripció al promotor α -EnaC2 i disminuint, així, l'activitat del mateix (Bowman and Philipsen, 2002; Chu *et al.*, 2003). Per tant, el factor Sp3 podria resultar ser un bon candidat com a factor, fosforilat en serines, que s'uniria al promotor mínim d'Snail en les cèl·lules IEC-ILK-1 i supliria la funció de Sp1. Aquests dos factors de transcripció, Sp1 i Sp3, estan

considerats com a activadors transcripcionals constitutius pels promotors mancats de caixa TATA, segurament és per aquesta raó que el tractament amb l'inhibidor PD98509 no afecta la unió d'aquests factors al promotor ja que la seva funció no seria la de regular la transcripció del promotor sinó la de permetre que aquest pugui ser activat per reguladors positius.

Existeix un altre membre de la família Sp/XKLF que, a diferència del patró d'expressió ubicat presentat per Sp1 i Sp3, s'expressa seguint un patró més restrictiu al llarg del desenvolupament embrionari primerenc. Aquest factor de transcripció és molt homòleg al factor Sp1 i pot unir-se a les mateixes seqüències riques en –GC– amb la mateixa afinitat que el primer membre de la família. Sp5 s'expressa en el solc primitiu durant la gastrulació (Harrison *et al.*, 2000). Considerant la multitud de gens que tenen en el seu promotor una o diverses seqüències riques en –GC–, és podria pensar en la possibilitat de que hi hagués una regulació diferencial simultània de diversos gens que dependria del balanç entre l'expressió de proteïnes de tipus Sp1 que s'expressen ubiquament i l'expressió de factors amb un patró d'expressió molt més específica, com seria Sp5. Per tant, Sp5 podria ser un bon candidat com a possible membre de la família Sp/XKLF responsable de modular l'activitat del promotor d'Snail.

L'activitat del promotor mínim d'Snail està incrementat en aquelles cèl·lules que han experimentat una TEM, suggerint que aquest fragment de promotor conté diversos dels elements requerits per a estimular la transcripció d'Snail durant aquest procés. Només la seqüència de resposta al factor NF- κ B semblaria estar situada per davant del promotor mínim, entre les bases –194 i –78. La presència de tots aquests elements en el fragment petit del promotor d'Snail humà concordaria amb els resultats previs obtinguts amb el promotor d'Snail de *Xenopus*, en els quals la seqüència d'ADN suficient per a l'expressió estaria localitzada, també, en una petita regió (entre les bases –160 i –45) (Mayor *et al.*, 1993). Tot i així, els resultats anteriorment exposats no exclouen que hi hagin elements situats més a 5' que puguin jugar un paper rellevant, com seria en d'altres línies cel·lulars no utilitzades en aquest treball, o bé, en situacions *in vivo* on el promotor està pròpiament empaquetat en la cromatina.

Com s'ha indicat anteriorment, Snail és un potent repressor de la transcripció de l'E-cadherina i un inductor de la TEM (Batlle *et al.*, 2000;

Cano *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2002). Encara que l'activitat d'Snail pot estar també regulada post-transcripcionalment (Domínguez *et al.*, 2003), la transcripció d'snail és normalment contrària a la d'E-cadherina i es detecta en cèl·lules que han perdut les característiques epitelials. En aquest estudi es mostra que, de forma concomitant amb la pèrdua de l'E-cadherina i amb l'adquisició d'un fenotip mesenquimal, les cèl·lules que expressen Snail tenen activat el seu promotor. L'activació de la transcripció d'Snail requereix l'activació de la via d'ERK; l'element sensible a ERK estaria localitzat en el promotor mínim donat que aquest fragment és sensible als inhibidors de MEK. Com ja s'ha comentat en la introducció, existeixen dades experimentals prèvies que indiquen que la via d'ERK podria ser necessària per a la inducció de gens mesodèrmics durant el desenvolupament (Christen and Slack, 1999; Yao *et al.*, 2003) o per a induir una completa TEM a través de citoquines o altres estímuls en línies cel·lulars tumorals (Ellenrieder *et al.*, 2001; Grande *et al.*, 2002; Janda *et al.*, 2002; Bates and Mercurio, 2003; Peinado *et al.*, 2003). Els resultats obtinguts aquí recolzen aquesta idea, indicant que l'expressió d'Snail, procés clau en l'adquisició del fenotip mesenquimal, respon a l'activació d'aquesta via. D'acord amb això, Snail estaria classificat com a gen primerenc immediat dependent de l'activació de receptors tirosina quinasa i de l'addició de cicloheximida en els fibroblasts (Fambrough *et al.*, 1999).

Tot i així, MEK no aconsegueix estimular el promotor mínim d'Snail de forma comparable a l'estimulació obtinguda en cèl·lules mesenquimals. Aquests resultats van suggerir que, segurament, es necessiten altres senyals que ajudin a obtenir una estimulació completa del promotor – 78/+59. La caracterització d'aquestes senyals addicionals que actuarien sobre el promotor mínim segueixen encara sota investigació en el nostre laboratori. Una altra via de senyalització que ha estat relacionada amb l'expressió d'Snail és la que requereix l'activació de PI3K. Els resultats obtinguts no suggereixen un gran involucrament d'aquesta via en l'activació de la transcripció d'Snail en vàries de les línies tumorals estudiades, però, no es descarta que pugui contribuir a l'expressió d'Snail en algunes línies cel·lulars, ja que en la línia IEC-ILK-1 altres seqüències addicionals que no estan presents en el promotor mínim semblen necessàries per aconseguir una estimulació completa del promotor d'Snail.

Com s'ha mostrat en aquest estudi, la transcripció d'Snail està activada en tres sistemes cel·lulars que han estat induïts a partir un fenomen de TEM mitjançant la transfecció de diferents gens. Concomitantment amb aquest procés, i amb la regulació a l'alça del marcador mesenquimal fibronectina i amb la regulació a la baixa de l'E-cadherina, es van detectar canvis en nivells d'ARNm tant d'snail com del gen sensible a Snail, Zeb-1. No es van detectar modificacions sistemàtiques en els nivells dels transcrits d'Slug o Zeb-2. Segurament, no es van veure canvis en l'expressió de Zeb-2 a causa de la seva possible regulació post-transcripcional (descrit en capítol I). Pel que fa a Slug, no s'exclou que l'augment d'aquesta proteïna pugui ser important per a la TEM en cèl·lules que presenten un *background* genètic diferent, sent responsable de la regulació a la baixa de l'E-cadherina en certes circumstàncies com, per exemple, la resposta a la senyalització per β -catenina independent de la via d'ERK (Connacci-Sorrell et al., 2003).

CAPÍTOL III: Importància de WT1 en la co-regulació de gens regulats per Snail.

ANTECEDENTS

Un dels factors transcripcionals responsables de la regulació positiva de l'expressió de l'E-cadherina és WT1. S'ha demostrat que WT1 té la capacitat d'unir-se al promotor d'aquesta proteïna d'adhesió cel·lular i activar la seva expressió (Hosono *et al.*, 2000). La transfecció estable de WT1 en cèl·lules NIH 3T3 produeix l'augment de l'expressió de l'E-cadherina endògena en un dels tres clons estables obtinguts (Hosono *et al.*, 1999). A més a més, la transfecció d'un dominant negatiu de WT1, anomenat WTAR, inhibeix l'activació del promotor de l'E-cadherina en cèl·lules NIH 3T3 transfectades amb WT1 (Hosono *et al.*, 2000). Això indicaria que el gen de l'E-cadherina actuaria com a pont entre WT1 i la diferenciació cel·lular. Els mateixos autors descriuen que l'activació del promotor de l'E-cadherina induïda per WT1 és molt més eficient quan es delecionen les caixes-E del promotor clonat. Això suggereix que, potser, en els fibroblasts de ratolí, hi ha algun regulador negatiu capaç d'unir-se a aquestes caixes emmascarant, així, el potencial activador de WT1. Ja hem demostrat que Snail s'expressa en aquelles línies cel·lulars que presenten un fenotip mesenquimal. De manera que es podria suggerir Snail com a candidat idoni a l'hora d'unir-se a les caixes E i donar lloc a aquest emmascarament de l'activació del promotor de l'E-cadherina per WT1.

Com a resultat d'això, el nostre grup va analitzar la seqüència del promotor de l'E-cadherina i va constatar que la seqüència de reconeixement per WT1 estava situada entre dues caixes E del promotor de l'E-cadherina. De manera que vam voler estudiar l'acció reguladora transcripcional positiva donada per WT1 en relació a l'activitat repressora de la proteïna Snail en els promotors que presenten ambdues seqüències de reconeixement.

RESULTATS

WT1 estimula l'expressió de l'E-cadherina.

Per fer aquest estudi es van utilitzar principalment dues línies cel·lulars, les cèl·lules NIH 3T3 que són fibroblasts de ratolí i es caracteritzen per presentar un fenotip marcadament mesenquimal i per expressar poca E-cadherina i les SW-480 que, tot i ser cèl·lules epitelials, expressen nivells d'E-cadherina més alts que les NIH 3T3 però més baixos que qualsevol línia epitelial ben diferenciada, com per exemple les RWP1. De manera que aquests dos sistemes cel·lulars són adequats per tal d'estudiar el possible efecte estimulador de l'expressió de l'E-cadherina per part de WT1.

A partir d'aquí es va decidir determinar la capacitat activadora de WT1 sobre el promotor de l'E-cadherina en cèl·lules NIH 3T3 i SW-480. Com es pot veure en la figura RIII-1a, la transfecció transitòria de WT1 dona lloc a una clara estimulació de l'activitat del promotor d'E-cadherina de forma dosi-dependent en totes dues línies cel·lulars. La menor activació del promotor observada en la línia SW-480 pot ser deguda a que, aquesta línia, té una activitat basal d'aquest mateix promotor més elevada que no pas en les cèl·lules NIH 3T3, per la qual cosa no es veurà una diferència d'activitat tan gran a l'hora de sobre-estimular el promotor.

Per tal de veure que passava amb els nivells endògens de l'ARNm de l'E-cadherina al transfectar WT1 en aquestes dues línies cel·lulars, es va procedir a transfectar transitòriament aquestes cèl·lules amb concentracions creixents de WT1 i posteriorment, es va realitzar un anàlisi dels nivells endògens d'ARNm d'E-cadherina per RT-PCR semi-quantitativa o quantitativa (vegeu figura RIII-1b i c). Els resultats van indicar que amb concentracions no molt elevades de WT1 ja es produïa un augment dels nivells de l'ARNm de l'E-cadherina i que grans quantitats de WT1 provocaven la disminució d'aquests nivells segurament per un problema de saturació del sistema, és a dir, que la maquinària de factors d'activació de la transcripció podria quedar segrestada per la gran quantitat de WT1 que ha de produir. Es va realitzar el mateix assaig amb la línia cel·lular NIH 3T3 però no es va aconseguir veure cap pujada de l'expressió de l'E-cadherina a cap concentració de WT1 (10-1000 ng).

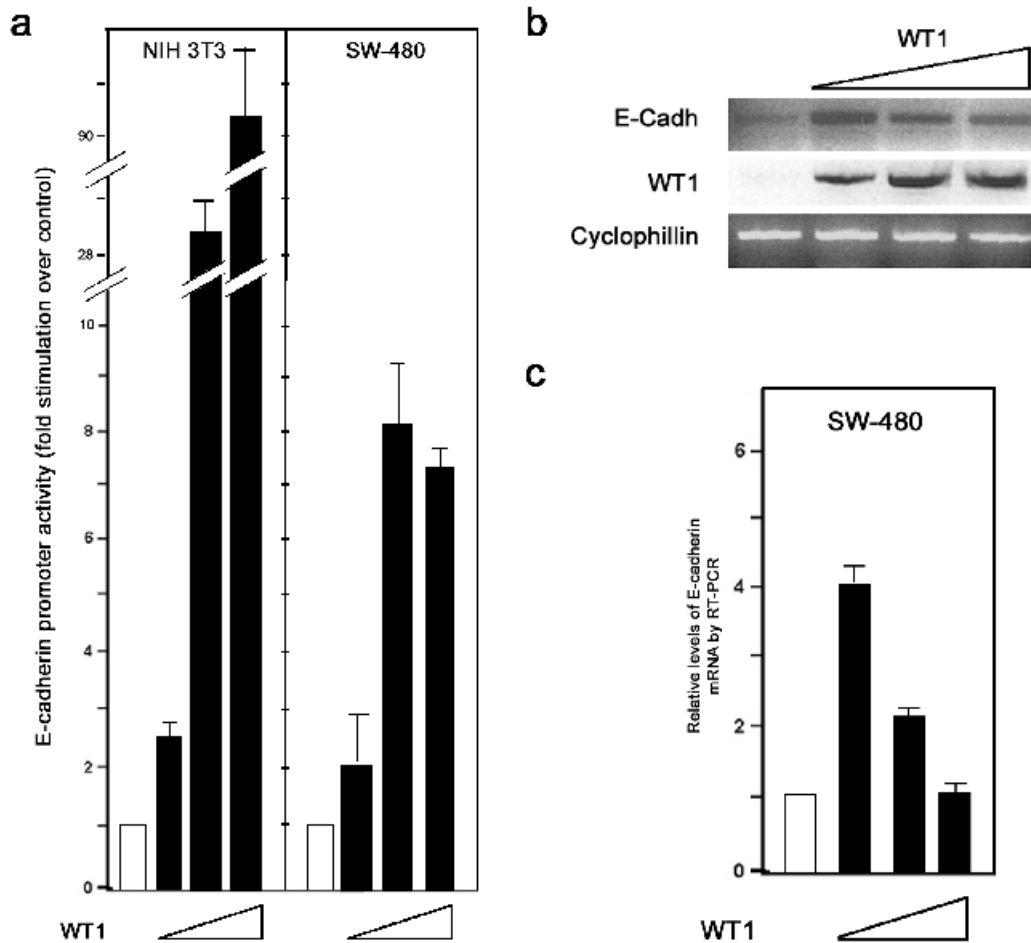


Figura RIII-1: WT1 activa l'expressió de l'E-cadherina. (a) Les cèl·lules NIH 3T3 i SW-480 es van co-transfectar transitòriament amb 100-200 ng del promotor d'E-cadherina clonat en pGL3 i concentracions creixents de WT1 (10-500 ng). Els valors es van normalitzar mitjançant els valors obtinguts de l'activitat de la *luciferasa Renilla* (10 ng). Els resultats representen les vegades d'activació del promotor de l'E-cadherina estimat per WT1 *versus* la seva activitat basal. Aquests resultats corresponen a un experiment representatiu de tres experiments independents realitzats per duplicat o triplicat. (b) Mitjançant la tècnica de RT-PCR semiquantitativa es van analitzar els nivells d'expressió de l'E-cadherina endògena i WT1 transfectat en concentracions creixents (10-1000 ng) en cèl·lules SW-480. Els oligonucleòtids utilitzats per fer aquestes amplificacions estan descrits en l'apartat de *Materials i Mètodes*. Es va amplificar la ciclofilina per normalitzar la quantitat d'ARN carregat. (c) Representació dels nivells relatius de l'ARNm de l'E-cadherina mitjançant la tècnica de la *real-time RT-PCR* en cèl·lules SW-480 transfectades amb concentracions creixents de WT1 (10-1000 ng). Cada barra representa de mitjana \pm s.d. de les PCRs realitzades per triplicats.

WT1 i Snail competeixen en la seva funció reguladora del promotor de l'E-cadherina.

La gran proximitat observada entre la seqüència d'unió per WT1 i dues caixes E, ens va suggerir la possibilitat de que aquests dos factors transcripcionals competissin a l'hora d'unir-se a les seves respectives seqüències consens. Per tal de comprovar si això era possible, es van realitzar una sèrie d'anàlisis d'activitat del promotor d'E-cadherina co-transfectant amb WT1 i Snail.

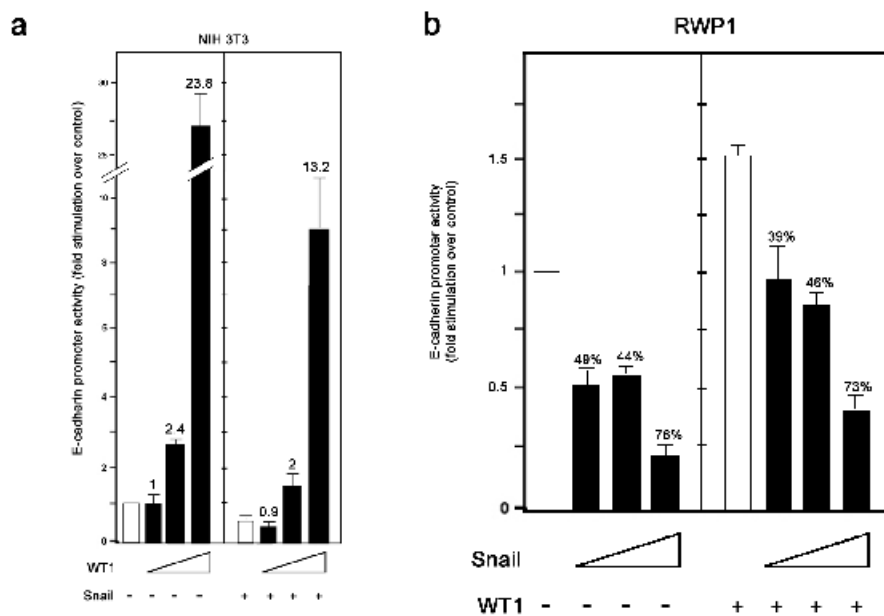


Figura RIII-2: Efecte de la co-expressió d'Snail i WT1 sobre la regulació de l'expressió de l'E-cadherina. Les cèl·lules NIH 3T3 **(a)** i RWP1 **(b)** es van co-transfectar de forma transitòria amb 200 ng del promotor de l'E-cadherina, una concentració fixa d'Snail-RSV o RSV buit (10 ng) en el cas de les NIH 3T3 o bé una concentració fixa de WT1-RSV o RSV buit (20 ng) en el cas de les RWP1 i concentracions creixents de WT1-RSV o RSV buit (1-100 ng) en el cas de les NIH 3T3 o bé concentracions creixents d'Snail-RSV o RSV buit (1-100 ng) en el cas de les RWP1. Els valors es van normalitzar mitjançant els valors obtinguts de l'activitat de la *Luciferasa Renilla* (10 ng). Els números indicats sobre cada barra corresponen a l'estimulació del promotor observada respecte el control en el cas **(a)** i corresponen al percentatge de repressió del promotor observat respecte el control en el cas **(b)**. Els resultats representen les vegades d'activació del promotor de l'E-cadherina *versus* la seva activitat basal. Aquests resultats corresponen a un experiment representatiu de tres experiments independents realitzats per duplicat o triplicat. La taula situada a la dreta del *panell (a)* representa l'activitat del promotor de l'E-cadherina en presència o absència de WT1 o/i Snail.

Al co-transfectar les cèl·lules NIH 3T3 amb concentracions creixents de WT1 i una concentració fixa d'Snail, es va poder observar que la presència d'Snail disminuïa la capacitat activadora de WT1 sobre el promotor d'E-cadherina (vegeu figura RIII-2a). Aquesta disminució de la capacitat estimuladora de WT1 s'observava, sobretot, a altes concentracions del mateix factor transcripcional. Es va realitzar un experiment similar amb la línia cel·lular RWP1 que es caracteritza per ser una línia de cèl·lules epitelials ben diferenciades i que expressen grans quantitats d'E-cadherina. Com ja s'ha pogut veure en el capítol I, Snail és capaç de reprimir l'activitat del promotor de l'E-cadherina en un 50% aproximadament (vegeu figura RIII-2b). Al co-transfectar aquestes mateixes concentracions d'Snail amb una concentració fixe de WT1, es va observar que Snail continuava inhibint el promotor de l'E-cadherina obtenint un grau de repressió similars als observats sense WT1 (vegeu figura RIII-2b). Això suggereix que Snail és molt més eficient que WT1 a l'hora de realitzar la seva funció sobre el promotor de l'E-cadherina.

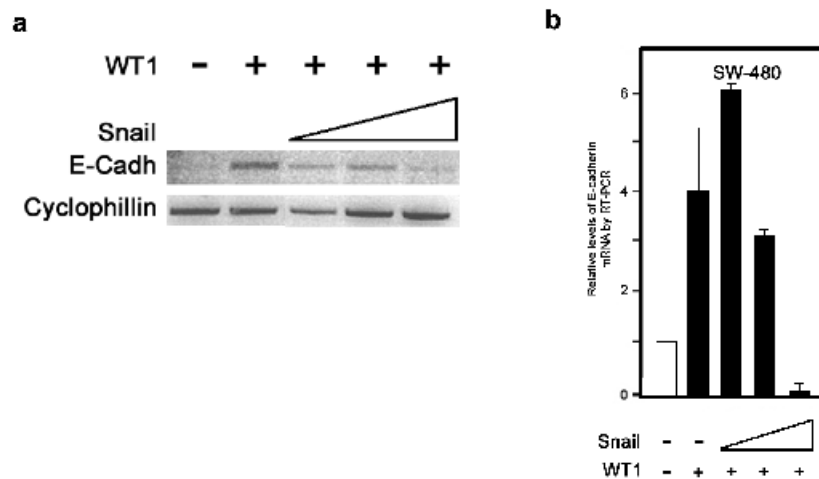


Figura RIII-3: Nivells d'expressió de l'E-cadherina al transfectar WT1 o WT1 i Snail.

(a) Mitjançant la tècnica de RT-PCR semiquantitativa es van analitzar els nivells d'expressió de l'E-cadherina endògena de cèl·lules SW-480 co-transfectades amb una concentració fixa de WT1 (10 ng) i concentracions creixents d'Snail (1-100 ng). Els oligonucleòtids utilitzats per fer aquestes amplificacions estan descrits en l'apartat de *Materials i Mètodes*. Es va amplificar la ciclofilina per normalitzar la quantitat d'ARN carregat. **(b)** Representació dels nivells relatius de l'ARNm de l'E-cadherina mitjançant la tècnica de la *real-time RT-PCR* en cèl·lules SW-480 co-transfectades amb una concentració fixa de WT1 (10 ng) i concentracions creixents d'Snail (1-100 ng). Cada barra representa de mitjana \pm s.d. de les PCRs realitzades per triplicats.

Aquests resultats es van corroborar amb l'anàlisi per RT-PCR semi-quantitativa i quantitativa dels nivells d'expressió endògens d'E-cadherina en la línia cel·lular SW-480. Amb aquest anàlisi es va poder observar que, efectivament, la co-transfecció d'Snail i WT1 disminuïa els nivells d'ARNm d'E-cadherina respecte els nivells obtinguts amb la sola transfecció de WT1 (vegeu figura RIII-3a i b).

Snail reprimeix l'activitat del promotor de l'E-cadherina activat per WT1 en NIH 3T3 a través de les caixes E1 i E2.

Es va voler analitzar quina o quines caixes E contingudes en el promotor de l'E-cadherina són necessàries perquè Snail pugui reprimir l'expressió d'aquesta proteïna d'adhesió cel·lular. La repressió del promotor de l'E-cadherina salvatge (wt) induïda per Snail es va poder observar al transfectar transitòriament Snail en cèl·lules MDCK i RWP1. En totes dues línies cel·lulars, Snail va reprimir l'activitat del promotor fins un 50% en les MDCK i un 80% en les RWP1 (vegeu figura RIII-4a). Es va realitzar el mateix assaig però, en aquesta ocasió, es van utilitzar formes del promotor de l'E-cadherina amb una de les caixes E mutades.

La transfecció d'aquests diferents promotors mutants juntament amb Snail va mostrar que és necessària la integritat de les caixes E2 i E3 perquè Snail pugui realitzar la seva funció repressora. Gràcies a aquest assaig, també es va poder observar que la pèrdua de les caixes E1 i E2 provoquen un petit augment de l'activitat basal del promotor de l'E-cadherina, mentre que la mutació de la caixa E3 redueix significativament aquesta activitat (vegeu figura RIII-4a). Això podria suggerir que potser la caixa E3 és important per la unió d'algun regulador positiu de l'expressió de l'E-cadherina específic de les cèl·lules epitelials. Es va realitzar aquest mateix assaig en cèl·lules NIH 3T3 transfectades o bé amb WT1 o bé amb WT1 i Snail. Els resultats van mostrar que, en aquest cas, les caixes E indispensables perquè Snail reprimeixi l'activitat del promotor de l'E-cadherina prèviament estimulat per WT1 són les caixes E1 i E2 (vegeu figura RIII-4b).

Aquest experiment també va permetre observar que la pèrdua de qualsevol de les 3 caixes E del promotor provoca una davallada en la eficiència d'activació del promotor per part de WT1. Això podria ser perquè WT1 podria necessitar algun co-activador que li calgués aquestes caixes íntegres per tal de realitzar la seva funció activadora correctament.

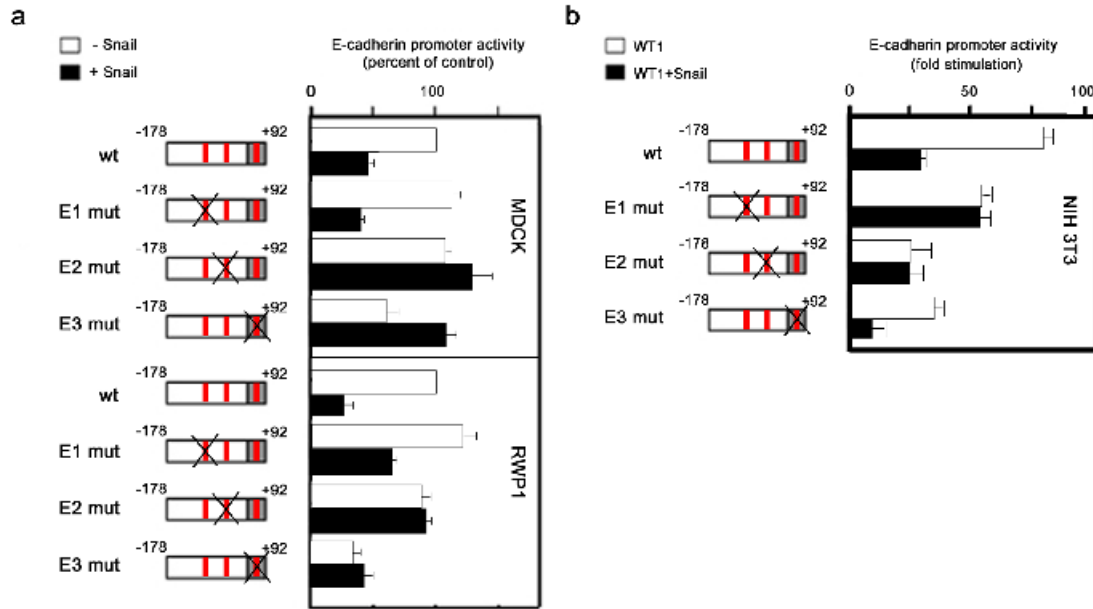


Figura RIII-4: Activitat dels promotors d'E-cadherina salvatge i mutats en resposta a Snail i WT1. (a) Les línies cel·lulars epitelials MDCK i RWP1 es van transfectar amb 250 ng de cada promotor i 2 ng de pcDNA3 en el cas dels controls (-Snail) o 2 ng de pcDNA3-Snail (+Snail). **(b)** Les cèl·lules NIH 3T3 es van co-transfectar transitòriament amb 100 ng del promotor d'E-cadherina corresponent a cada cas, 100 ng de WT1 i 10 ng del plàsmid RSV buit o d'Snail-RSV. Els valors es van normalitzar mitjançant els valors obtinguts de l'activitat de la *Luciferasa Renilla* (10 ng). Els resultats representen el percentatge de repressió del promotor de l'E-cadherina *versus* la seva activitat basal. Aquests resultats corresponen a un experiment representatiu de tres experiments independents realitzats per duplicat o triplicat.

Tots aquests resultats van mostrar que, per aconseguir una repressió de l'activitat del promotor de l'E-cadherina per part d'Snail en cèl·lules epitelials és necessari que les caixes E2 i E3 estiguin íntegres cosa que suggereix que WT1 no jugaria un paper important en augmentar l'activitat del promotor de l'E-cadherina en les línies cel·lulars epitelials MDCK i RWP1. Per altra banda, el fet que Snail necessiti la integritat de les caixes E1 i E2 per tal de reprimir l'activitat del promotor prèviament activat per WT1 en cèl·lules mesenquimals NIH 3T3 suggeriria un possible mecanisme de competició entre ambdós factors de transcripció per tal d'unir-se al promotor.

Snail i WT1 competeixen per unir-se al promotor de l'E-cadherina.

Tots aquests resultats, ens van portar a pensar en la possibilitat de que Snail i WT1 competissin estèricament per unir-se al promotor de l'E-

cadherina. Que Snail no fos capaç de reprimir l'activitat del promotor de l'E-cadherina induïda per WT1 quan les caixes E1 o E2 estan mutades podria explicar-se pel fet de que Snail, al no poder-se unir a la seva caixa de reconeixement, perdria la seva capacitat de competència amb WT1.

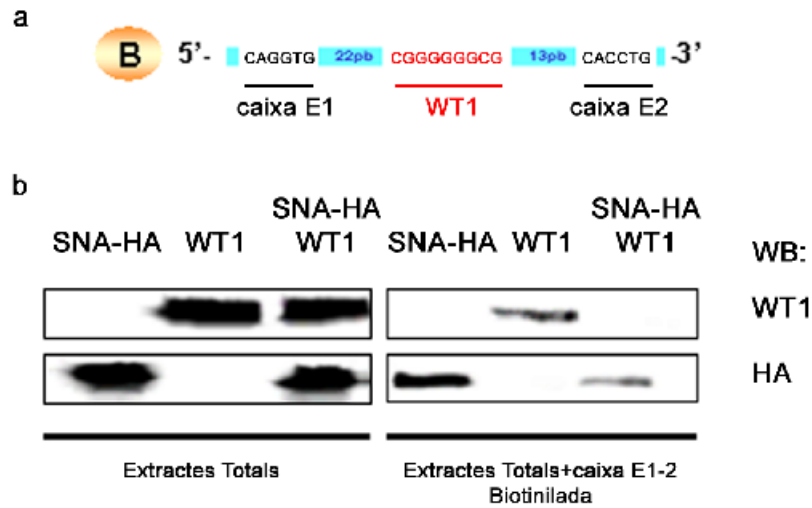


Figura RIII-5: Assaig BOPA amb sonda del promotor d'E-cadherina. (a) Esquema de la sonda del promotor d'E-cadherina contenint la seqüència de reconeixement per WT1 (vermell) entre les dues caixes E (negre) dianes per Snail. La biotina està associada a l'extrem 5' de la sonda. **(b)** Els extractes totals corresponen a cèl·lules NIH 3T3 transfectades de forma transitòria amb Snail marcat amb HA o amb WT1 o amb Wt1 i Snail conjuntament. Les cèl·lules es van lisar 48 h després de la transfecció amb un tampó a l'1% de SDS. Aquests extractes totals es van incubar posteriorment amb la sonda biotinilada. A continuació es va fer un *Western blot* contra WT1 i HA (per visualitzar Snail). La senyal dels extractes totals (*inputs*) corresponen a una exposició curta (5 s), mentre que la senyal dels extractes incubats amb la sonda corresponen a una exposició llarga de (10 min).

Per tal de demostrar aquesta hipòtesi, es va decidir realitzar un experiment de BOPA utilitzant una sonda que correspon a la porció del promotor de l'E-cadherina que conté la seqüència de reconeixement per WT1 flanquejada per les dues caixes E1 i E2 i marcada amb una molècula de biotina a l'extrem 5' (vegeu figura RIII-5a). Amb aquest assaig es va poder observar que tant Snail com WT1 tenen la capacitat d'unir-se a les seves respectives seqüències consens. En canvi, l'expressió conjunta d'ambdós factors de transcripció provoca el desplaçament de llurs unions al promotor de manera que quan un s'uneix no pot unir-se l'altre (vegeu figura RIII-5b). A més a més, aquest experiment verifica que Snail té més

afinitat pel promotor que WT1 desplaçant, d'aquesta manera, WT1 de la seva unió al promotor de l'E-cadherina. Aquest últim resultat recolzaria l'observació obtinguda amb els assatjos d'activitat de promotor (vegeu figura RIII-2).

L'expressió estable de WT1 en cèl·lules que expressen exògenament Snail dona lloc a un canvi fenotípic.

Seguint en la línia de la hipòtesi que postula una competència estèrica entre Snail i WT1 a l'hora d'unir-se al promotor i regular-lo, es va voler verificar si aquest esdeveniment succeïa d'igual manera al moment de regular el promotor endogen de l'E-cadherina d'un sistema cel·lular. Per aconseguir això, es van crear una sèrie de clons que expressessin, de manera estable, WT1, Snail o bé WT1 i Snail conjuntament. Es va partir de dues línies de clons cel·lulars desenvolupades anteriorment en el nostre grup anomenades MDCK SNA, que corresponen a cèl·lules MDCK que expressen Snail de forma estable, i MDCK CON que no són més que les seves homòlogues control transfectades amb els vector d'expressió buit (vegeu figura RIII-6a).

Un cop es van seleccionar els clons utilitzant dos antibiòtics, un que seleccionava l'expressió d'Snail i l'altre que seleccionava l'expressió de WT1, es va procedir a realitzar el crivell dels clons per tal d'esbrinar quins, de tots els clons seleccionats, expressaven WT1. Es van fer extractes proteics totals dels clons i es van analitzar mitjançant la tècnica de Western blot utilitzant un anticòs específic contra WT1 (vegeu figura RIII-6b) i també contra l'epítot HA que correspon a l'etiqueta associada a l'Snail exogen. El resultat va ser de tres clons que expressen WT1 i dos clons que expressen WT1 i Snail.

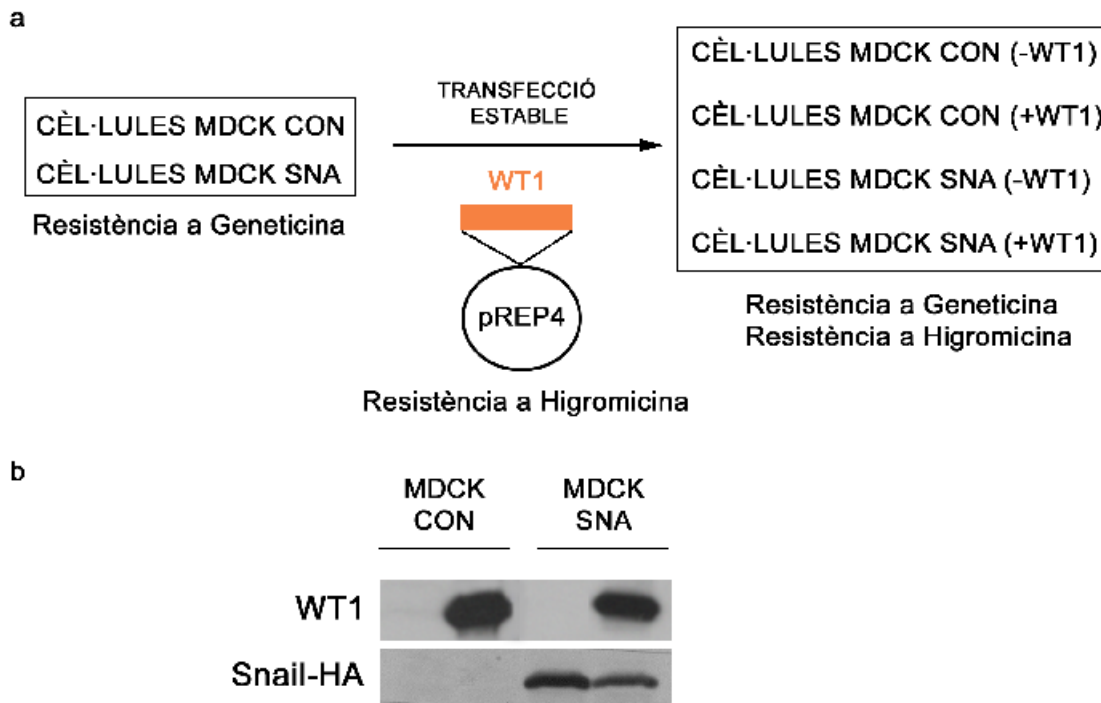


Figura RIII-6: Crivellatge dels clons MDCK estables per WT1. (a) WT1 es va clonar en el plàsmid d'expressió pREP4 que té resistència a l'Higromicina. Aquest plàsmid es va transfectar en les cèl·lules MDCK CON que ja havien estat prèviament transfectades amb un plàsmid buit, i en les cèl·lules MDCK SNA que expressen de forma estable el factor transcripcional Snail. A partir d'aquí es van seleccionar clons resistents a l'Higromicina (400 µg/ml) i a Geneticina (500 µg/ml). **(b)** Western blot contra WT1 i HA (per visualitzar Snail) d'alguns clons seleccionats. El tampó de lisi utilitzat per obtenir extractes proteics totals contenia un 1% de SDS.

Seguidament es va analitzar el fenotip que presentaven aquestes noves línies cel·lulars estables. Es va observar que els clons que expressen només Snail tenen un fenotip marcadament mesenquimal, són cèl·lules força allargades i que creixen de forma dispersa per la placa de cultiu (vegeu figura RIII-7a). En canvi, les cèl·lules que expressen conjuntament Snail i WT1 presenten un fenotip molt més epitelial i creixen agrupades formant colònies compactes i ben delimitades (vegeu figura RIII-7b). Per tant, l'expressió exògena de WT1, en cèl·lules que expressen establement Snail, afecta el fenotip.

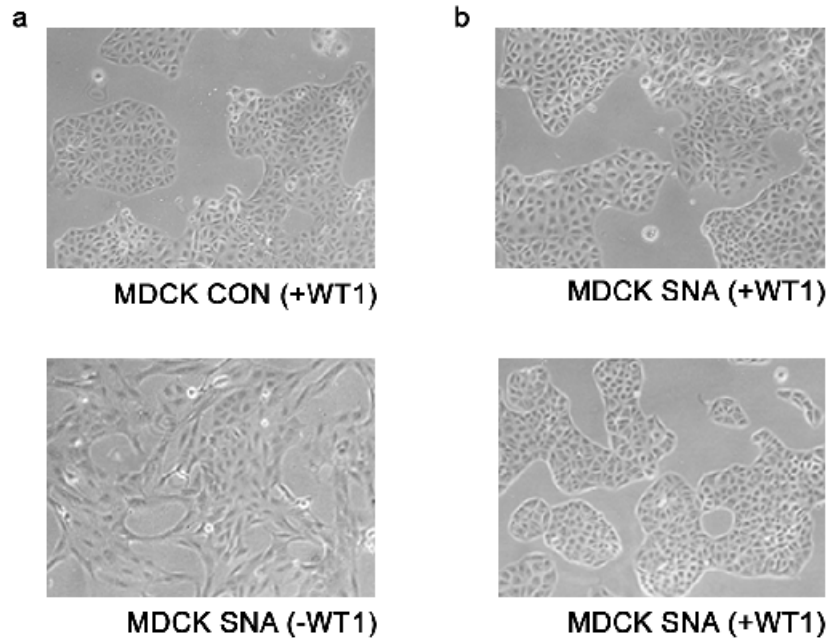


Figura RIII-7: Fenotip dels clons MDCK estables per WT1, Snail i Snail/ WT1. (a) *Pannell superior*, clon MDCK control que expressa establement WT1. *Pannell inferior*, clon MDCK que expressa establement Snail. (b) Dos clons MDCK que expressen conjuntament Snail i WT1. Fotografies captades amb una càmera fotogràfica acoblada al microscopi òptic. 100 augments.

WT1 provoca una reorganització del citoesquelet cortical d'actina.

L'organització dels filaments d'actina en una cèl·lula pot donar certa informació sobre el seu fenotip. En les cèl·lules epitelials, l'actina es presenta cortical. Contràriament, en cèl·lules mesenquimals es visualitza l'actina com a fibres d'estrès. Es va procedir a realitzar una tinció dels filaments d'actina dels diversos clons estables MDCK. Mitjançant aquesta tècnica es va poder observar que la distribució dels filaments d'actina entre els clons estables per Snail i els estables per Snail i WT1 era diferent. Les cèl·lules que expressen ambdós factors de transcripció presentaven marcatge d'actina al voltant de tota la membrana i un gran nombre de filopodis que s'extenia d'una cèl·lula a altra, en canvi, les cèl·lules que expressen únicament Snail presentaven un marcatge més compacta al citoplasma disposant-se al llarg dels filaments d'estrès (vegeu figura RIII-8).

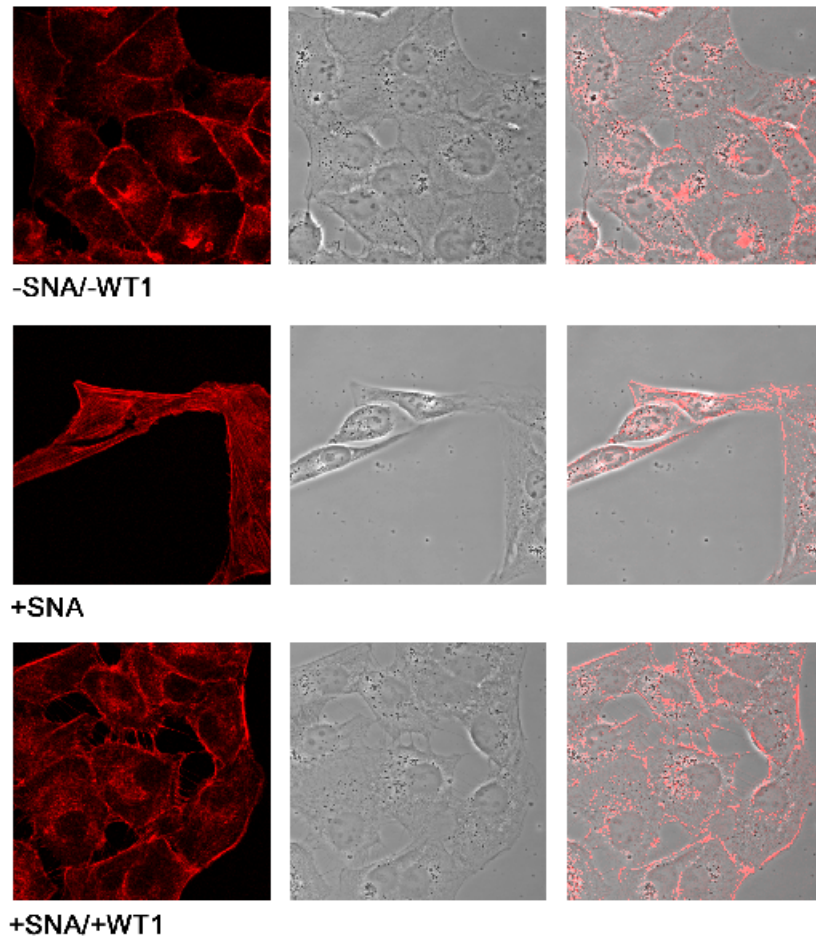


Figura RIII-8: Tinció del citoesquelet d'actina dels clons MDCK estables. Es va tenir l'actina dels diferents clons MDCK mitjançant la incubació de les cèl·lules, prèviament permeabilitzades, amb fal·loïdina conjugada a Rhodamina (TRITC). *Pannell esquerra*, visualització de la disposició de l'actina en els diferents clons MDCK (vermell). *Pannell central*, visualització de les mateixes cèl·lules mitjançant contrast de fases. *Pannell dret*, visualització de les dues imatges anteriors acoblades, imatge transmissa. Imatges realitzades amb el microscopi confocal.

WT1 afavoreix l'adhesió cel·lular.

Per tal de visualitzar millor el canvi fenotípic sofert per les cèl·lules que expressen Snail i WT1 respecte a les que només expressen Snail, es va procedir a realitzar una sèrie de talls ultrafins dels clons que van ser, posteriorment, observats a través d'un microscopi electrònic. A baixos augments, es va poder veure com les cèl·lules transfectades amb els dos factors transcripcionals formen una monocapa més compacta que les cèl·lules que només expressen Snail, a més a més, són cèl·lules amb un aspecte més columnar, creixen juntes les unes de les altres i estan

adherides al substrat. Observant més detalladament, es pot veure que aquestes cèl·lules presenten un aspecte molt més polaritzat típic de cèl·lules diferenciades, a més a més de ser més altes i amb una forma més poligonal que les seves homòlogues transfectades únicament amb Snail. Aquestes últimes, en canvi, són força més estirades i aplanades, creixen separades entre si, a més a més d'estar menys adherides al plàstic (vegeu figura RIII-9a).

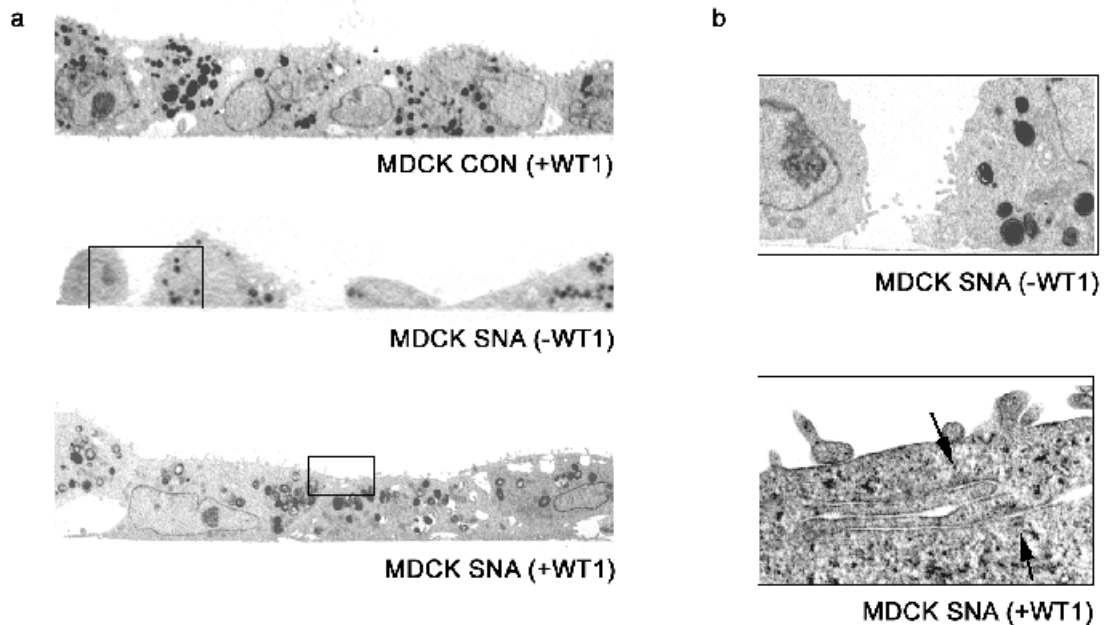


Figura RIII-9: Talls ultrafins dels clons MDCK estables. (a) Observació al microscopi electrònic de les cèl·lules MDCK que expressen WT1 (pannell superior), Snail (pannell central) i Snail i WT1 conjuntament (pannell inferior). **(b)** Detalls de les regions intercel·lulars dels clons MDCK que expressen Snail i MDCK que expressen Snail i WT1. Les dues fletxes indiquen dues estructures d'adhesió cel·lular. En tots els casos les cèl·lules havien crescut durant 10 dies en confluència.

Una observació d'aquestes mateixes mostres a més augments va revelar que les cèl·lules positives per Snail no presenten cap tipus de contacte entre elles (vegeu figura RIII-9b, pannel superior). En canvi les cèl·lules que expressen conjuntament Snail i WT1 presenten algunes estructures d'unió intercel·lular poc desenvolupades, cosa que dificulta determinar si corresponen a unions adherents o a desmosomes (vegeu figura RIII-9b, pannel inferior). També es va advertir que, tant les cèl·lules que expressen WT1 i Snail com les que només expressen WT1, presenten un gran nombre d'interdigitacions entre les membranes de cèl·lules veïnes.

WT1 no activa l'expressió de l'E-cadherina en els clons que co-expressen Snail i WT1.

Tenint en compte que WT1 té la capacitat d'activar el promotor de l'E-cadherina, es va pensar que fora possible que els clons que co-expressen Snail i WT1 expliquessin el seu canvi de fenotip per un augment dels nivells d'expressió d'aquesta proteïna d'adhesió cel·lular. Per tal de confirmar aquesta hipòtesi es van analitzar els nivells d'expressió de la proteïna E-cadherina a partir d'extractes totals dels clons MDCK CON (-WT1), MDCK CON (+WT1), MDCK SNA (-WT1) i MDCK SNA (+WT1) per *Western blot*.

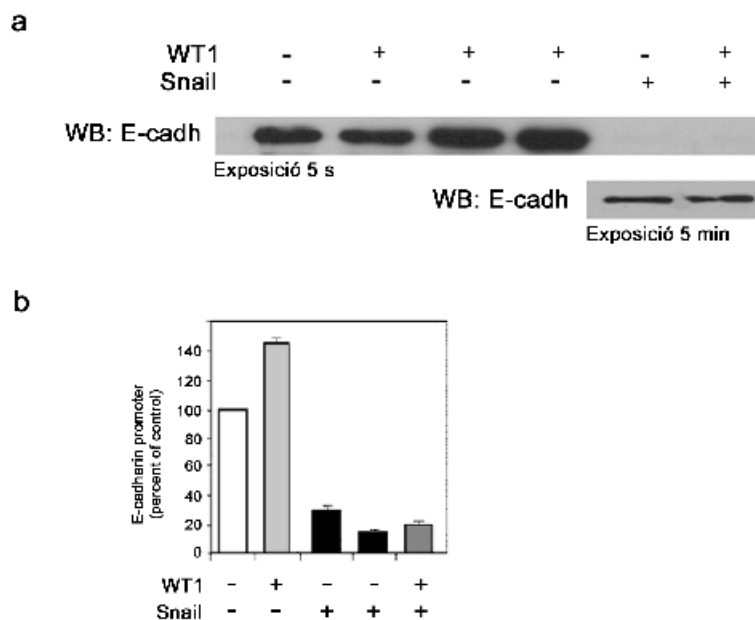


Figura RIII-10: Anàlisi dels nivells d'expressió de l'E-cadherina dels diferents clons MDCK. (a) *Western blot* contra l'E-cadherina dels diversos clons MDCK estables. Els extractes totals de cada línia cel·lular es van realitzar utilitzant un tampó de lisi contenint un 1% de SDS. *Pannell superior*, temps d'exposició curta (5 s). *Pannell inferior*, temps d'exposició llarg (5 min). **(b)** Els diferents clons estables es van transfectar de manera transitòria amb 100 ng de promotor d'E-cadherina. Els valors es van normalitzar mitjançant els valors obtinguts de l'activitat de la *Luciferasa Renilla* (10 ng). Els resultats representen el percentatge d'activitat del promotor de l'E-cadherina en els clons estables respecte a l'activitat del promotor en les cèl·lules control que no expressen cap dels dos factors transcripcionals. Aquests resultats corresponen a un experiment representatiu de tres experiments independents realitzats per duplicat o triplicat.

Aquest assaig va revelar que els nivells d'E-cadherina totals no es recuperaven en els clons que expressen de forma estable Snail i WT1 respecte als nivells d'E-cadherina presents en els clons control que no

expressen cap dels dos factors de transcripció o que només expressen WT1 (vegeu figura RIII-10a). Per tal d'esbrinar si aquests baixos nivells d'E-cadherina presents en els clons estables per Snail i WT1 es devien a una falta de capacitat d'activació del promotor de l'E-cadherina per part de WT1, es va procedir a realitzar un assaig d'activitat d'aquest mateix promotor en els diferents clons MDCK. Aquest experiment va aclarir que els baixos nivells d'E-cadherina en els clons MDCK SNA (+WT1) eren conseqüència de la baixa transcripció d'aquest gen (vegeu figura RIII-10b).

WT1 afavoreix la unió entre l'E-cadherina i la β -catenina.

S'ha demostrat que WT1 no és capaç de recuperar els nivells d'E-cadherina en els clons estables per Snail i WT1 però, per altra banda, s'han observat complexes d'adhesió intercel·lular de tipus adherent en aquests mateixos clons. A partir d'aquí, es va plantejar la possibilitat de que, potser, aquest factor transcripcional era capaç d'afavorir la localització d'aquesta poca E-cadherina present en la cèl·lula en els contactes cel·lulars mitjançant un altre mecanisme independent de la regulació transcripcional. Com ja s'ha mencionat en la introducció, l'E-cadherina forma complexes amb la β -catenina, l' α -catenina i l'actina per donar lloc a les adhesions adherents en la cèl·lula. Sabent això es va tractar de determinar si la poca E-cadherina dels clons estables per Snail i WT1 es trobava activa formant contactes entre les cèl·lules, és a dir, formant els complexes abans esmentats. Per comprovar això, es va decidir fer una immunoprecipitació de l'E-cadherina dels diversos clons MDCK i veure per *Western blot* els nivells de β -catenina associada a l'E-cadherina. Es van poder observar diferències entre les cèl·lules que expressen únicament Snail i els estables per Snail i WT1 respecte als nivells d'E-cadherina associada al citoesquelet (vegeu figura RIII-11). Per contra, aquestes diferències observades en els nivells de l'E-cadherina entre les cèl·lules que expressen Snail i les que expressen ambdós factors de transcripció no es van observar en el *Western blot* per l'E-cadherina total realitzat anteriorment (vegeu figura RIII-10a).

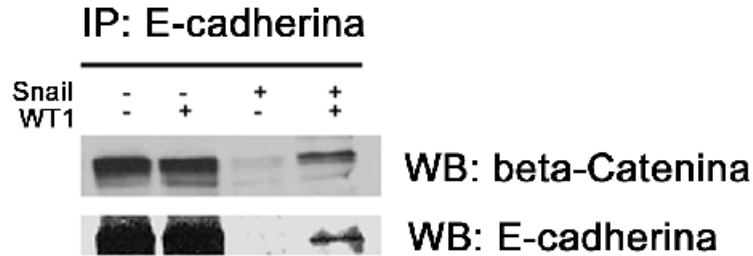


Figura RIII-11: Nivells de beta-catenina i E-cadherina funcionals dels clons estables per WT1, Snail i Snail/ Wt1. Immunoprecipitació d'extractes proteics dels clons utilitzant un anticòs contra l'E-cadherina. Posteriorment, es va realitzar un anàlisi per Western blot de la beta-catenina i l'E-cadherina presents en aquests immunocomplexes.

Això es deu a que, en el cas de l'anàlisi proteic de la figura RIII-10a, es va fer un extracte proteic total de les cèl·lules indicades utilitzant un tampó de lisi contenint un 1% de SDS mobilitzant, així, totes les fraccions proteiques presents en la cèl·lula. En canvi, la immunoprecipitació es va realitzar a partir d'un extracte cel·lular que contenia només aquella porció proteica associada al citoesquelet cel·lular. De manera que, els nivells d'E-cadherina observats en aquest assaig corresponen a l'E-cadherina associada al citoesquelet, és a dir, la que és funcional i responsable de mediar les unions entre les cèl·lules veïnes. A partir d'aquests resultats, es podria concloure que les cèl·lules que expressen Snail i WT1 presenten més E-cadherina funcional que les que només expressen Snail, i en conseqüència, les primeres tenen els nivells de β -catenina associada a E-cadherina superiors als de les cèl·lules MDCK estables per Snail. Per tant, sembla ser que WT1 afavoriria que la poca E-cadherina present en la cèl·lula estigués associada al citoesquelet potenciant, així, les unions entre les cèl·lules veïnes.

WT1 recupera l'expressió de la desmocolina.

Tot i així aquests petits canvis no semblen ser suficients per explicar el canvi de fenotip observat en els clons estables per Snail i WT1. Per aquesta raó es va voler determinar si hi havia algun canvi en l'expressió d'altres proteïnes implicades en les unions intercel·lulars. Els desmosomes connecten de forma puntual el citoesquelet de filaments intermedis (queratines) de cèl·lules adjacents. Les proteïnes que componen els desmosomes es divideixen en: (i) la desmoplaquina i la plakoglobina (o γ

catenina) que formen la placa proteica i que s'encarreguen d'unir els filaments intermedis a la membrana, i (ii) dues proteïnes de la família de les cadherines (les desmocelines i les desmogleïnes) que travessen la membrana i formen unions homotípiques intercel·lulars (vegeu figura RIII-12a).

Mitjançant la tècnica de *Western blot*, es van analitzar els nivells de desmogleïnes, desmocelines i plakoglobines en els clons estables. Es va observar que els nivells d'expressió de la desmogleïna i la plakoglobina no canviaven entre els diferents clons estables. En canvi, es va detectar una disminució dels nivells de desmocolina en els clons estables per Snail respecte als controls (MDCK CON (-WT1) i MDCK CON (+WT1)), mentre que s'observa una recuperació dels nivells d'expressió de l'esmentada proteïna en un dels clons estables per Snail i WT1 (vegeu figura RIII-12b).

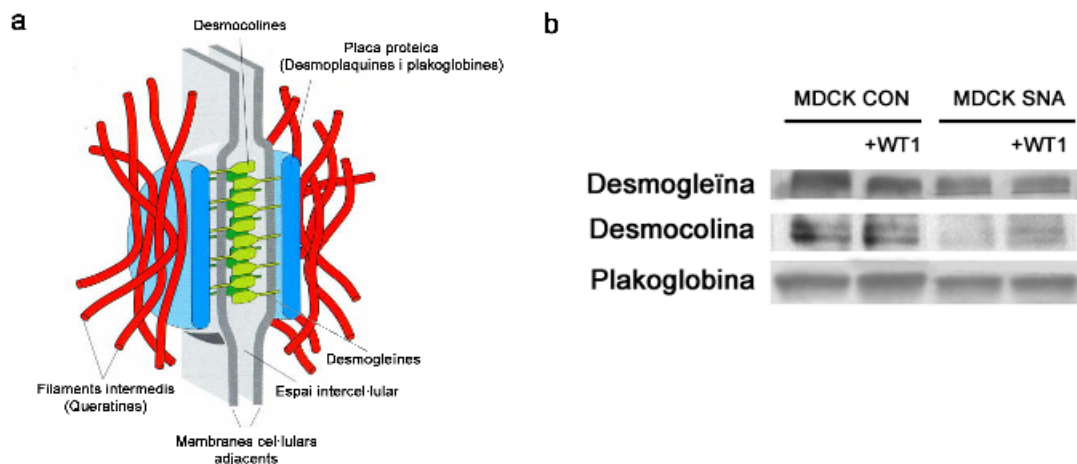


Figura RIII-12: Nivells d'expressió de diferents proteïnes implicades en la formació dels desmosomes en els diversos clons MDCK. (a) Esquema de l'estructura d'un desmosoma. Els filaments intermedis formen una tensa xarxa que creua tot l'interior de la cèl·lula. Aquests filaments es troben lligats a les plaques proteiques dels desmosomes formades per desmoplaquina i plakoglobina. Altres filaments, anomenats *linkers* de transmembrana, connecten les plaques proteiques dels desmosomes a través de l'espai intercel·lular. Les proteïnes implicades en aquesta tasca són les anomenades desmocelines i desmogleïnes. **(b)** Mitjançant la tècnica de *Western blot* es van analitzar els nivells d'expressió d'algunes de les proteïnes implicades en la formació dels desmosomes com són la desmogleïna, la desmocolina i la plakoglobina a partir d'extractes totals dels clons MDCK que expressen establenent WT1, Snail, Snail i WT1 o cap dels dos factors transcripcionals.

WT1 recupera l'expressió del gen marcador epitelial MUC-1 i disminueix els nivells del gen marcador mesenquimal Fibronectina.

Com ja s'ha dit en el capítol I, hi ha un augment de l'expressió de fibronectina en les cèl·lules MDCK transfectades establement amb Snail. Per aquesta raó, aquesta proteïna es considera un bon marcador mesenquimal. A partir d'aquí es van analitzar els nivells d'ARNm d'aquest marcador mesenquimal en els diferents clons estables i es va observar que els clons estables per Snail expressen fibronectina mentre que els clons doble transfectants perden l'expressió d'aquest marcador de la mateixa manera que les cèl·lules control (vegeu figura RIII-13a).

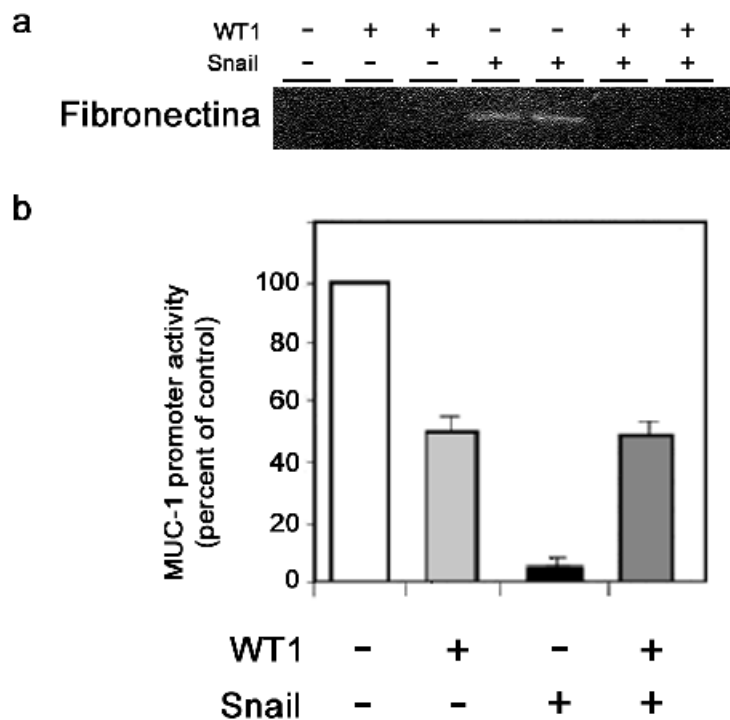


Figura RIII-13: Anàlisi de l'expressió d'altres gens marcadors epitelial (MUC-1) i mesenquimal (Fibronectina). (a) Anàlisi per RT-PCR dels nivells d'expressió de la fibronectina a partir d'extractes totals d'ARNm dels diferents clons MDCK. Els oligonucleòtids utilitzats per fer aquestes amplificacions estan descrits en l'apartat de *Materials i Mètodes*. (b) Els diferents clons MDCK es van transfectar transitòriament amb 100 ng del promotor de MUC-1. Els valors es van normalitzar mitjançant els valors obtinguts de l'activitat de la *luciferasa Renilla* (10 ng). Els resultats representen el percentatge de repressió del promotor de MUC-1 respecte la seva activitat en les cèl·lules control que no expressen cap dels dos factors transcripcionals. Aquests resultats corresponen a un experiment representatiu de tres experiments independents realitzats per duplicat o triplicat.

A continuació es va analitzar l'expressió d'un altre marcador epitelial en aquest clons estables, MUC-1. Com ja s'ha explicat en el Capítol I, MUC-1 presenta dues caixes E de reconeixement per Snail en la seva regió promotora. Al analitzar la seqüència del promotor es va detectar la presència de diverses regions consens per la unió de WT1 que flanquejaven les caixes E. Mitjançant un anàlisi de l'activitat del promotor de MUC-1 es va veure que l'activitat del promotor augmentava en les cèl·lules estables per Snail i WT1 respecte als clons estables per Snail (vegeu figura RIII-13b).

A més a més, aquest assaig va revelar que els clons que expressen WT1 patien certa repressió del promotor de MUC-1 respecte als clons controls negatius per a l'expressió d'aquest factor de transcripció. En les cèl·lules estables per Snail també s'apreciava una repressió del promotor però de forma molt més acusada que la produïda per WT1. En canvi es va veure que les línies estables per Snail i WT1 tenien una activitat del promotor de MUC-1 similar a l'activitat observada en les cèl·lules estables per WT1. Aquests resultats mostraven que podia desplaçar la unió d'Snail del promotor de MUC-1.

DISCUSSIÓ

Durant el desenvolupament embrionari, cada membre de la superfamília de les cadherines mostren un patró d'expressió espai-temporal específic. L'E-cadherina està considerada com una de les cadherines prototipus en els teixits epitelials i està involucrada en la regulació de diversos esdeveniments morfològics com serien la gastrulació, la formació del teixit neuronal, la cardiogènesi i la somitogènesi. L'E-cadherina és una de les primeres molècules d'adhesió expressada en l'embrió de ratolí, en l'estadi de vuit cèl·lules, i és essencial per a la compactació de la mòrula i la subseqüent organització dels teixits epitelials. Per tant, l'expressió de l'E-cadherina es manté en tots els teixits epitelials, però es perd durant el procés de TEM, procés essencial perquè es doni la gastrulació, i en l'establiment de les cèl·lules mesenquimals. Però, l'E-cadherina també està implicada en un altre procés important pel desenvolupament que és l'invers del ja anomenat fenomen de TEM, l'anomenada transició mesènquima-epiteli (TME). Aquest procés esdevé crític durant la morfogènesi renal. Per tant, podríem dir que la regulació positiva o negativa de l'expressió de l'E-cadherina durant els processos de desenvolupament està molt controlada i associada al guany o la pèrdua de l'adhesió cel·lular (Peinado *et al.*, 2004). Com ja s'ha comentat en la introducció, alguns processos patològics també pateixen un fenomen de TEM, com per exemple, quan les cèl·lules tumorals adopten característiques metastàsiques. Aquesta regulació a la baixa de l'E-cadherina en les cèl·lules epitelials tumorals s'ha correlacionat directament amb un augment en l'expressió del factor transcripcional Snail. Aquesta proteïna, com ja s'ha dit anteriorment, té la capacitat d'unir-se a les seqüències E contingudes en el promotor de l'E-cadherina i donar lloc a la repressió de la seva expressió.

A partir d'aquí, es va considerar Snail com la proteïna responsable de la repressió de l'expressió de l'E-cadherina durant el procés de TEM que es pot donar tant al llarg del desenvolupament embrionari com en processos d'invasió i metastasi a l'inici de la formació dels tumors. Per tant, tenint en compte que l'absència o presència de l'E-cadherina en una cèl·lula pot modular la seva morfologia i la seva funció, l'estudi de la regulació de l'expressió d'aquesta molècula d'adhesió ens ajudaria a entendre millor els

mecanismes moleculars pels quals una cèl·lula epitelial normal pot perdre les seves característiques morfològiques convertint-se en una cèl·lula capaç de moure's i d'envair altres teixits de l'organisme tant en l'inici com al llarg d'un procés tumoral.

Fins al moment es coneix clarament que Snail és un dels principals factors transcripcionals implicats en la regulació negativa de l'expressió de l'E-cadherina tant en processos implicats en el desenvolupament embrionari com en processos associats a la tumorigènesi. Però, no es coneix quin dels diversos factors descrits com a factors activadors de l'expressió de l'E-cadherina podria actuar com a regulador antagònic d'Snail, de manera que ambdós factors serien els responsables de regular la correcta expressió d'aquesta proteïna d'adhesió en el lloc i el moment adequats per tal de mantenir un correcte patró d'expressió de la proteïna en la cèl·lula i, així, controlar correctament els diferents processos implicats en el desenvolupament. La desregulació de l'expressió d'algun d'aquests dos factors transcripcionals, tant del regulador negatiu com del positiu, podria causar una incorrecta expressió de l'E-cadherina provocant l'inici d'un procés tumoral.

Aquest treball ha proposat WT1 com el factor transcripcional responsable de la regulació positiva de l'E-cadherina i ha reforçat el seu possible paper com a factor antagònic d'Snail. Com ja s'ha comentat en la introducció, WT1 és un factor transcripcional que està implicat en processos de TME durant el desenvolupament del ronyó i altres òrgans al llarg de l'embriogènesi. A més a més, aquest factor és capaç d'unir-se a unes seqüències riques en -GC- i regular, d'aquesta manera, l'expressió de diversos gens diana. Alguns grups han descrit la presència d'aquestes caixes consens en les regions proximals del promotor de l'E-cadherina (Hosono *et al.*, 2000) i del promotor del receptor de la vitamina D (VDR) (Maurer *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001) a través de les quals WT1 actua regulant positivament l'expressió d'aquests dos gens. Al analitzar la seqüència dels dos promotors abans esmentats, es va veure que les seqüències de reconeixement per Snail i per WT1 estaven molt properes unes de les altres. Els resultats obtinguts a partir dels assatjos d'activitat del promotor de l'E-cadherina al transfectar WT1 i Snail conjuntament i els anàlisis per RT-PCR dels nivells d'expressió de l'E-cadherina regulada per

l'expressió dels dos factors reguladors (vegeu figura RIII-2 i 3), mostren que Snail té la capacitat de disminuir l'acció activadora de WT1 sobre el mateix promotor. A més a més, els resultats obtinguts suggereixen que Snail podria tenir més afinitat per unir-se al promotor de l'E-cadherina que WT1 ja que s'observa que petites concentracions d'Snail poden evitar l'efecte activador d'elevades concentracions de WT1 (figura RIII-2). El fet de que WT1 no sigui capaç de disminuir el grau de repressió d'Snail sobre el promotor d'E-cadherina en les cèl·lules RWP1 podria tenir dues explicacions. La primera fora que la concentració fixa de WT1 utilitzada en aquest assaig no és gaire alta, això es va fer per tal d'evitar una saturació del sistema. Per tant, segurament els nivells d'expressió de WT1 no són prou alts com per poder desplaçar Snail del promotor. La segona explicació podria tenir a veure amb el sistema cel·lular utilitzat. Com s'observa en la figura RIII-4, Snail reprimeix l'activitat del promotor de l'E-cadherina a través de les caixes E2 i E3 en les cèl·lules RWP1, això suggereix que, en una línia cel·lular ben diferenciada, WT1 no tindria un paper important en l'estimulació del promotor d'aquesta proteïna d'adhesió cel·lular cosa que explicaria perquè la transfecció de WT1 en aquest sistema cel·lular no és capaç de produir el seu efecte activador. En canvi, WT1 sí juga un paper clau en l'augment de l'expressió de l'E-cadherina en un sistema cel·lular mesenquimal com són les cèl·lules NIH-3T3 (vegeu figura RIII-1a).

Això ens va fer pensar en un possible mecanisme de competició entre WT1 i Snail a l'hora de regular l'expressió d'aquesta proteïna d'adhesió. Està descrit que, normalment, perquè dos factors transcripcionals competeixin a l'hora d'unir-se al promotor les seqüències de reconeixement d'aquests factors en qüestió han d'estar solapades o bé sobreposades (Villard, 2004). Però hi han autors que suggereixen que perquè un factor inhibidor i un activador competeixin no tenen perquè tenir solapats els seus respectius llocs d'unió a l'ADN. En els organismes procariotes, el control negatiu de l'expressió gènica es dona per la unió dels factors repressors al la regió proximal del promotor i, en conseqüència, es produeix una competició estèrica amb l'ARN polimerasa implicant la seva unió a l'ADN i evitant l'inici de la transcripció. També pot passar que el factor transcripcional repressor, després d'unir-se a l'ADN, formi un complex repressor que interferiria en la unió de diversos factors activadors a les seves respectives seqüències de

reconeixement. Aquest escenari seria similar al que succeeix quan la proteïna α -2 homeo-domini forma un complex repressor amb les proteïnes tup1/ssn6 (Gray *et al.*, 1994; Keleher *et al.*, 1992). Els resultats obtinguts amb l'assaig de BOPA utilitzant com a oligonucleòtid marcat amb biotina la regió del promotor de l'E-cadherina contenint dues caixes E i una seqüència consens per WT1, demostra la existència d'algun tipus de competència, segurament estèrica, entre els dos factors transcripcionals per tal d'unir-se al promotor (vegeu figura RIII-5). Aquest experiment confirma que Snail té una major afinitat pel promotor de l'E-cadherina que WT1, això quadraria amb els resultats obtinguts en els experiments d'anàlisi del promotor. Al voler demostrar si aquest mecanisme és complia en un sistema *in vivo*, es va observar que, tot i que WT1 tenia la capacitat de provocar un canvi fenotípic al ser transfectat establement en una línia cel·lular prèviament induïda a patir un procés de TEM per l'expressió exògena del factor transcripcional Snail, aquest regulador positiu no aconseguia activar l'expressió de l'E-cadherina (vegeu figura RIII-10). Cal tenir en compte que en els assatjos de BOPA la sonda marcada amb biotina correspon a una regió del promotor amb només dues de les tres caixes E que hi ha presents. Per tant, en aquest experiment no es contempla la possible acció repressora d'Snail duta a terme a través de la tercera caixa E.

De fet, ja s'havia observat que en un sistema epitelial, la repressió de l'expressió de l'E-cadherina per part d'Snail es fa, sobretot, a través de la tercera caixa E (vegeu figura RIII-4a). Aquests resultats juntament amb la major afinitat d'Snail pel promotor pot suggerir que possiblement els clons MDCK que expressen establement Snail i WT1 tindrien uns nivells prou alts d'Snail com per prevenir la unió de WT1 al promotor de l'E-cadherina i no permetre la seva acció activadora. En canvi, s'ha vist que l'activitat repressora d'Snail sobre el promotor de MUC-1 era abolida pel factor transcripcional WT1 (vegeu figura RIII-13b). Això podria explicar-se pel fet que aquest promotor només té dues caixes de reconeixement per Snail i estan flanquejades per diverses seqüències d'unió per WT1 de manera que la competència entre ambdós factors, en aquest cas, seria més eficient per part de WT1.

En aquest estudi s'ha observat que WT1 té la capacitat d'augmentar els nivells d'E-cadherina associada a citoesquelet, és a dir, l'E-cadherina

funcional, potenciant així les unions entre cèl·lules veïnes en els clons MDCK positius per Snail i WT1. El receptor d'EGF (EGFR, Epidermal-Growth Factor Receptor) s'havia descrit com una tirosina quinasa capaç d'interaccionar i fosforilar la β -catenina (Hoschuetzky *et al.*, 1994). S'havia demostrat que aquesta fosforilació disminueix la interacció de la β -catenina amb l'E-cadherina i el citoesquelet donant lloc a la seva alliberació al citosol i la consegüent pèrdua de les unions adherents (Miravet *et al.*, 2003). També es coneix que WT1 regula negativament l'expressió de l'EGFR (Englert *et al.*, 1999). Per tant, WT1 podria reprimir l'expressió de l'EGFR en els clons estables per Snail i WT1 de manera que disminuiria la fosforilació de β -catenina en les unions adherents permetent, així, una major estabilització dels contactes intercel·lulars. Això explicaria perquè els nivells de l'E-cadherina associada al citoesquelet, i per tant funcional, són majors en les cèl·lules que expressen Snail i WT1 que en els clons estables per Snail (vegeu figura RIII-11).

També es va procedir a analitzar els nivells d'expressió d'altres proteïnes implicades en l'adhesió cel·lular com són la desmogleïna, la plakoglobina i la desmocolina, i es va observar que així com els nivells de la desmogleïna i la plakoglobina no canviaven, es veien alguns canvis en els nivells de la desmocolina. La baixada dels nivells de desmocolina en els clons estables per Snail fa sospitar que aquest factor transcripcional podria regular d'alguna manera, directa o indirecta, aquesta proteïna. A més a més, es va veure una certa recuperació dels nivells de desmocolina en les cèl·lules que expressen Snail i WT1, cosa que suggeriria que WT1 podria revertir la regulació d'aquesta proteïna per Snail (vegeu figura RIII-12). Al analitzar la seqüència del promotor de la desmocolina (Núm. GenBank HSDSC2X1) descrita per Marsden *et al.*, (1997) s'ha comprovat que aquest promotor conté una caixa de reconeixement per Snail situada a 403 pb per davant de l'inici de transcripció. Per tant, Snail podria reprimir l'expressió d'aquesta cadherina, específica de desmosomes, a través de la seva unió directe al promotor. A més a més, també s'ha observat que existeixen dues seqüències consens de reconeixement per WT1 situades a -181 i -110 pb respecte l'inici de transcripció. Possiblement, la presència d'aquestes 2 caixes de reconeixement per WT1 permetria que la funció estimuladora d'aquest factor de transcripció fos més eficient que l'acció repressora

d'Snail, de manera, que WT1 seria capaç de recuperar, en part, els nivells d'expressió de la desmocolina en els clons doble transfectants. A més a més, el canvi fenotípic, observat en els clons estables per Snail i WT1 respecte la morfologia observada en els clons estables per Snail, podria explicar-se per un increment en membrana dels complexos d'adhesió cel·lular formats per l'E-cadherina i la β -catenina i per l'augment de l'expressió de la desmocolina. Tot i així, cal tenir en compte que les cèl·lules provenint de ronyó expressen dues cadherines diferents en la formació dels contactes intercel·lulars. Una d'aquestes cadherines és l'àmpliament caracteritzada E-cadherina que ja s'ha estudiat en aquest capítol. L'altra, correspon a una cadherina recentment descrita anomenada K-cadherina. La K-cadherina està considerada com la segona cadherina més important present en les cèl·lules MDCK, on trobem una proporció d'E-cadherina:K-cadherina de 3:2 (Stewart *et al.*, 2000). Aquesta nova cadherina s'associa, d'igual manera que l'E-cadherina, a la β -catenina que al seu torn s'uneix al α -catenina i aquesta última s'associa als filaments d'actina donant lloc a la típica estructura d'unió adherent (Shimoyama *et al.*, 1999).

L'expressió de la K-cadherina durant el desenvolupament del ronyó es localitza en els agregats de cèl·lules mesenquimals propers a la gemma uretèrica i en les cèl·lules precursoras del túbul proximal renal. Utilitzant anticossos específics contra el domini extracel·lular de la K-cadherina es va comprovar que no es produïa la condensació de les cèl·lules mesenquimals que han de donar lloc a les estructures epitelials corresponents als futurs túbuls renals (Cho *et al.*, 1998). Curiosament, l'expressió de la K-cadherina en el desenvolupament del ronyó coincideix, en temps i espai, a l'expressió del factor transcripcional WT1. Al analitzar la seqüència del promotor de la K-cadherina s'ha observat la presència de tres possibles motius consens de reconeixement per WT1 solapats i situats entre l'inici de transcripció i l'inici de traducció de la proteïna. A més a més, no s'han trobat seqüències d'unió per Snail properes a les d'unió per WT1. Per aquesta raó, creiem que la K-cadherina podria ser una altra proteïna candidata implicada en el canvi fenotípic sofert pels clons estables per Snail i WT1. Donada aquesta observació, seria interessant estudiar l'expressió d'aquesta proteïna en els diferents clons estables.

MODEL FINAL

La causa del fracàs del tractament i de la mort dels pacients amb càncer es deu, en un elevat percentatge dels casos, a l'aparició de metàstasis. La capacitat de formar metàstasis requereix que les cèl·lules del tumor primari adquireixin capacitat invasiva. Al llarg de l'aparició i progressió d'un carcinoma es produeix un fenomen de canvi fenotípic molt important i necessari perquè les cèl·lules tumorals puguin envair, migrar i extravasar-se per formar una metàstasi: és l'anomenat procés de transició epiteli-mesènquima (TEM). En alguns casos, les cèl·lules tumorals que han aconseguit extravasar-se i entrar en un nou teixit, poden patir un procés de transició mesènquima-epiteli (TME) i donar lloc a un tumor secundari. La TEM és necessària perquè la cèl·lula tumoral tingui la capacitat d'envair i migrar, en canvi, la TME està associada a un pitjor pronòstic (Thiery, 2002). Aquest treball ha intentat explicar quins són els mecanismes moleculars que regularien aquests processos en les cèl·lules tumorals de l'epiteli de colon.

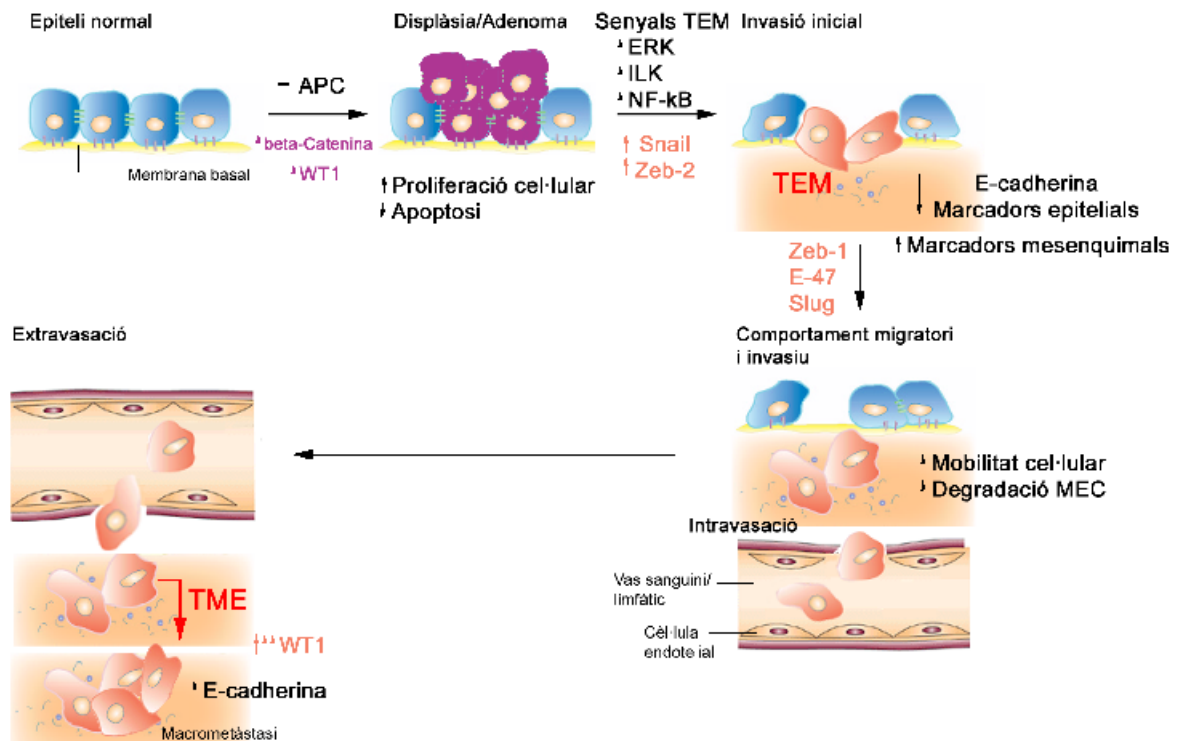
Durant el procés de TEM una de les molècules que pateix una regulació a la baixa és l'E-cadherina. L'expressió de l'E-cadherina es manté en els teixits epitelials, però es perd al llarg del fenomen de TEM establint-se, d'aquesta manera, com a cèl·lules mesenquimals (Takeichi, 1988). Aquest procés ocorre de forma normal durant el desenvolupament embrionari, concretament, durant la gastrulació i es caracteritza per ser un procés altament regulat en l'espai i el temps. Alguns autors han descrit la inducció de la TEM com a un fenomen freqüentment observat durant la invasió tumoral (Christofori and Semb, 1999). La pèrdua de l'expressió de l'E-cadherina s'ha observat en la progressió tumoral de varis carcinomes (Birchmeier and Behrens, 1994). El factor transcripcional Snail és un candidat idoni com a responsable de la repressió de l'E-cadherina i la consegüent TEM. La sobreexpressió d'Snail en cèl·lules epitelials indueix una TEM i l'adquisició per part d'aquestes cèl·lules de propietats invasives i migratòries. A més a més, s'ha observat una correlació inversa en l'expressió d'Snail i E-cadherina en diverses línies cel·lulars de carcinomes humans i de ratolí (Cano et al., 2000; Batlle et al., 2000; Poser et al., 2001). Estudis inicials d'expressió d'Snail en carcinomes de pell primaris de ratolí mostren una expressió específica d'aquest factor de transcripció en les

àrees d'invasió (Cano *et al.*, 2000), la qual cosa dona suport a la implicació d'Snail en la repressió de l'expressió de l'E-cadherina en el front d'invasió.

En l'intestí normal, el procés de maduració que determina el recanvi constant de l'epiteli es basa en un fenomen de migració cel·lular ordenada, amb un desplaçament vertical de les noves cèl·lules cap a la superfície apical de l'epiteli, fet que coincideix amb la seva diferenciació. En els tumors aquest procés és anòmal en fases inicials. Segons el nostre model (vegeu esquema model), una de les primeres alteracions moleculars responsables de la gènesi d'un procés tumoral és la pèrdua de funcionalitat del gen APC. En la majoria dels carcinomes colorectals esporàdics (un 85%), les alteracions moleculars són derivades de la pèrdua de la proteïna APC, mutació de la qual produeix també els casos de poliposi colònica familiar (FAP) (Fearon *et al.*, 1990; Bienz and Clevers, 2000). En condicions fisiològiques, la proteïna APC interacciona amb l'axina i la GSK-3 β formant un complex que regula els nivells de β -catenina citoplasmàtics (Behrens *et al.*, 1998; Barker *et al.*, 2000). La mutació d'APC dona lloc a una truncació de la proteïna que l'impedeix unir-se i formar el complex amb l'axina, la GSK-3 β i la β -catenina (Sparks *et al.*, 1998). Com a resultat d'això, la GSK-3 β no pot fosforilar la β -catenina, de manera, que no pot ser degradada a través del proteosoma i s'acumula en el citoplasma (Rubinfeld *et al.*, 1996). L'estabilització de la β -catenina implica la seva translocació al nucli on s'unirà a un membre de la família TCF/LEF donant lloc a la regulació de diferents gens implicats en l'oncogènesi com són la ciclina D1 (Shtutman *et al.*, 1999) i c-myc (He *et al.*, 1998), ambdós factors implicats en la proliferació cel·lular.

A més a més, recentment, s'ha demostrat que WT1 pot tenir també un paper important en la inducció de tumors. Varis autors han detectat un augment de l'expressió de WT1 en diferents càncers com la leucèmia (Inoue *et al.*, 1997), tumors en pulmó (Oji *et al.*, 2002), càncer de mama (Miyoshi *et al.*, 2002) i adenocarcinomes de colon (Menssen *et al.*, 2000). En la majoria de casos, la sobreexpressió de WT1 s'ha detectat en els estadis inicials del tumor. Una possible explicació de l'efecte de WT1 com a inductor de tumorigènesi és la seva capacitat per estimular l'expressió de la ciclina D1 (Tuna *et al.*, 2005) i de bcl-2 (Mayo *et al.*, 1999). Per tant, WT1 estaria implicat en l'augment de la proliferació cel·lular a través de l'augment de la

ciclina D1 i en l'augment de la supervivència cel·lular activant l'expressió del factor anti-apoptòtic bcl-2. D'aquesta manera les cèl·lules continuarien mantenint contactes elles i no perdrien el seu fenotip encara epitelial.



Esquema del model d'inducció i progressió tumoral en càncer de colon.

A partir d'aquí, tant la β -catenina lliure que pot translocar-se a nucli com WT1 jugarien un paper important en l'augment de la proliferació cel·lular i de la supervivència cel·lular donant lloc a l'aparició de l'adenoma. A continuació, diferents senyals de TEM com seria TGF- β , integrines, Ha-Ras etc. activarien tota una sèrie de vies de senyalització implicades en aquest fenomen de desdiferenciació cel·lular. Entre elles trobem la via de senyalització d'ERK que, com ja hem demostrat, activa l'expressió d'Snail, i també hi trobem la via de senyalització de l'ILK i NF- κ B, totes dues senyals importants per obtenir una activació completa del promotor d'Snail. Paral·lelament, no sabem si condicionat a l'expressió d'Snail o a altres vies de senyalització, hi hauria una expressió diferencial de l'ARNm *antisense* de Zeb-2 permetent així la traducció d'aquest factor transcripcional que juntament amb Snail donaran lloc al procés de TEM. Això estaria d'acord amb els estudis que demostren l'associació entre la pèrdua de l'expressió de l'E-cadherina i la co-expressió d'Snail i Zeb-2 o, fins i tot, amb l'expressió

preferencial de Zeb-2 en diferents línies cel·lulars de carcinoma (Comijn *et al.*, 2001). Per tant, Snail i Zeb-2 donarien lloc a la disminució de l'expressió de l'E-cadherina i d'altres marcadors epitelials, com VDR. Cal destacar que VDR regula positivament l'expressió de l'E-cadherina, per tant, la disminució de la seva expressió estaria implicada també en la pèrdua d'expressió d'aquesta molècula d'adhesió.

Com a conseqüència de l'expressió d'Snail, WT1 no podria activar l'expressió de l'E-cadherina ni del VDR ja que Snail, i probablement Zeb-2, l'estarien desplaçant de la seva unió al promotor. Pel que fa a VDR, aquest model explicaria les observacions obtingudes per altres autors sobre l'expressió d'aquest receptor al llarg de la progressió tumoral. Resulta que l'expressió del VDR augmenta en condicions d'hiperplàsia i disminueix clarament en estadis més avançats de la carcinogènesi (Vandewalle *et al.*, 1994). Segons el nostre model, l'augment de l'expressió de WT1 en els moments inicials de la formació de la displàsia donaria lloc a un augment de l'expressió del VDR. A continuació, en un estadi més avançat de la tumorigènesi, l'expressió d'Snail desplaçaria la unió de WT1 sobre el promotor i reprimiria l'expressió d'aquesta proteïna. Tot i que no s'han fet assatjos de competició entre WT1 i Snail sobre el promotor de VDR, el fet de que aquest promotor contingui tres caixes d'unió a Snail (igual que el promotor de l'E-cadherina) i dues caixes d'unió a WT1, una de les quals està solapada amb una de les caixes d'unió a Snail, suggeriria una possible competència entre ambdós factors a l'hora d'unir-se al promotor.

Però a més a més de reprimir gens marcadors epitelials, Snail té la capacitat d'augmentar l'expressió de gens marcadors mesenquimals com la fibronectina i LEF-1. Tots aquests canvis d'expressió gènica provocats principalment per Snail donarien lloc a un fenomen de TEM, moment en què la cèl·lula tumoral perdrà els seus contactes intercel·lulars i adoptarà un fenotip mesenquimal. Hem demostrat que Snail té la capacitat d'induir l'expressió de Zeb-1, el qual al seu torn, té la capacitat de reprimir l'expressió de l'E-cadherina. En el nostre model, Snail induiria l'expressió de Zeb-1, el qual contribuiria al manteniment del fenotip maligne, probablement ajudat per altres dos factors repressors, E47 i Slug, sostenint la repressió de l'E-cadherina i promovent la degradació de la matriu extracel·lular (MEC) i la mobilitat cel·lular, provocant l'aparició de cèl·lules

aïllades capaces d'intravasar-se en un vas sanguini o limfàtic. Un cop les cèl·lules tumorals s'han transportat a òrgans distants, es poden extravasar i donar lloc a una metàstasi mitjançant una TME.

Pel que se sap actualment, la reepitelització de les cèl·lules tumorals a la metàstasi pot donar lloc a la seva progressió en el nou teixit hoste, empitjorant d'aquesta manera el pronòstic del pacient. Aquest fenomen és determinant en la progressió dels tumors sòlids, i essencialment, en els epitelials; en un sistema tan ineficient com és el procés metastàtic, aquest mecanisme de reepitelització permetria l'èxit (Ilyas, 2000; Chambers *et al.*, 2002). La majoria de metàstasis detectables en carcinomes com el colorectal deriven de grups cel·lulars invasius que han estat capaços de recuperar el fenotip epitelial o revertir el procés de TEM (Thiery *et al.*, 2002). Seria en aquest moment de la progressió tumoral en que WT1 podria recuperar la seva funció "epitelitzadora" i ser responsable de la regulació d'aquesta reversió fenotípica en la metàstasi.

Segons el nostre model, durant el procés d'invasió i migració els factors responsables de mantenir el fenotip mesenquimal de les cèl·lules serien Zeb-1, E-47 i Slug. Tenint en compte que s'ha observat que Zeb-1 reprimeix, principalment, a través de les caixes E1 i E2, i havent demostrat que aquest factor transcripcional té menys afinitat que Snail per unir-se al promotor de l'E-cadherina, es podria esperar que un augment de l'expressió de WT1 en l'etapa de l'assentament de la metàstasi provoqués el desplaçament de Zeb-1 de la seva unió al promotor de l'E-cadherina. A més a més, també s'ha demostrat que Slug i E47 tenen una afinitat per unir-se a les caixes-E d'una a dues ordres de magnitud per sota de la d'Snail (Bolós *et al.*, 2003). Per tant, segurament WT1 també seria capaç de desplaçar Slug i E47 del promotor de l'E-cadherina amb més facilitat que el desplaçament d'Snail un cop les cèl·lules tumorals s'hagin establert com a tumor secundari. Aquest efecte de competició de WT1 conduiria a un augment dels nivells d'expressió de l'E-cadherina afavorint que la β -catenina sortís de nucli i quedés retinguda en els contactes cel·lulars. Com a conseqüència d'aquest fet, les cèl·lules patirien un canvi morfològic cap a un fenotip més epitelial. Això estaria d'acord amb la sobreexpressió de WT1 trobada en el 91% de mostres de carcinomes d'ovari que han fet metàstasi en el mesotelioma (Hecht *et al.*, 2002). Així que, en la inducció i en la

progressió tumoral, la regulació dels nivells d'expressió d'Snail i WT1 serien molt importants per a la carcinogènesi. Segurament, existeixen uns llindars d'expressió per a cada un dels dos factors transcripcionals que permetin que la funció d'un guanyi per sobre de la de l'altra i *viceversa*. D'aquesta manera, l'expressió d'una gran quantitat d'Snail i una petita quantitat de WT1 permetria que les cèl·lules adoptessin un fenotip mesenquimal i les seves corresponents habilitats invasores i migratòries, mentre que la sobreexpressió de WT1 podria donar lloc a la reepitelització d'aquestes mateixes cèl·lules però conservant sempre l'habilitat de tornar a transformar-se en cèl·lules mesenquimals. De manera que es podria concloure que aquest treball revela com la regulació de l'expressió de dos factors transcripcionals amb funcions totalment contràries podria orquestrà el procés d'inducció i progressió tumoral en colon.

Aquest model, però, segurament no es correspondria amb un model de ronyó. Hem demostrat que en cèl·lules de ronyó, l'expressió conjunta de WT1 i d'Snail dona lloc a una reepitelització cel·lular sense la necessitat d'augmentar els nivells d'expressió de l'E-cadherina. Segurament, això es produiria per l'augment de l'expressió d'una altra cadherina específica de ronyó anomenada K-cadherina, la qual hem vist que no té caixes de resposta a Snail però sí a WT1. Aquesta isoforma de cadherina no s'expressaria en colon, la qual cosa explicaria que durant la TEM induïda per Snail durant la progressió tumoral en càncer colorectal, WT1 continués expressant-se però sense donar lloc a una epitelització cel·lular independent de l'E-cadherina, com passa en les cèl·lules de ronyó, ja que les cèl·lules de colon no podrien suplir la pèrdua de l'E-cadherina amb l'expressió de la K-cadherina.

Això estaria d'acord amb el fet que els tumors de ronyó normalment presenten una pèrdua de funcionalitat de WT1 (Haber *et al.*, 1990; Gessler *et al.*, 1990). La formació dels tumor de Wilms es deu a la incapacitat de WT1 de condensar el mesènquima metanèfric donant lloc a la proliferació contínua del mesènquima i provocant l'aparició del tumor (Hastie, 1994; Machin *et al.*, 1984). En canvi, en els tumors de mama, leucèmies o tumors colorectals, s'ha detectat un augment de l'expressió de WT1 sense cap tipus de mutació (Menssen *et al.*, 2000). Per tant, s'ha proposat una funció dual al gen de WT1, es considera un gen supressor de tumors en els càncers de

ronyó mentre que està considerat un oncogen en la formació de tumors de mama, colon, pulmó i en leucèmies. A partir d'aquí podríem considerar que WT1 està implicat en processos de co-regulació de l'expressió de l'E-cadherina juntament amb Snail controlant d'aquesta manera el fenotip cel·lular en cèl·lules de colon, en canvi, està implicat en un fenomen de reepitelització independentment de l'augment de l'expressió de l'E-cadherina en cèl·lules renals degut a l'expressió gènica diferencial de cada tipus cel·lular.

CONCLUSIONS

1.- Snail té la capacitat de reprimir l'expressió d'altres dos marcadors epitelials, MUC-1 i VDR, a través de la seva unió a les caixes E contingudes en els seus respectius promotors. La transfecció d'Snail, tant establement com transitòriament, dona lloc a la repressió d'ambdós promotors.

2.- Snail indueix l'expressió d'un altre marcador mesenquimal anomenat Zeb-1, el qual al seu torn, pot mantenir la repressió del promotor de l'E-cadherina al llarg del temps.

3.- Les línies que han patit una TEM (transició epiteli-mesènquima) expressen una forma d'*splicing* alternatiu de l'ARNm *antisense* diferent, fet que regula l'*splicing* alternatiu de l'ARNm *sense* de Zeb-2. Aquests resultats es correlacionen amb l'activitat del promotor de Zeb-2.

4.- L'activitat del promotor mínim d'Snail (-78/+59) depèn de la via de senyalització d'ERK i és suficient aquest fragment del promotor per tal de mantenir una especificitat mesenquimal. El tractament amb un inhibidor de la MEK (PD98509) de les cèl·lules transfectades establement amb formes actives Ha-Ras o PK-C α disminueix significativament l'activitat del promotor mínim d'Snail. A més a més, també la transfecció transitòria d'una forma activa de MEK (MEK E) augmenta de forma dosi-dependent l'activitat del promotor -78/+59 d'Snail.

5.- Són necessàries altres regions fora de la regió promotora mínima d'Snail per tal d'obtenir una estimulació completa del promotor. El tractament amb un inhibidor de la PI3K (LY294002) de les cèl·lules transfectades amb una forma activa d'ILK disminueix significativament l'activitat del promotor llarg d'Snail (-869/+59), aquest efecte no s'observa en el promotor mínim. A més a més, p65 (subunitat de NF κ B) pot estimular la transcripció d'Snail a través d'una regió situada entre el -194 i el -78.

6.- Snail competeix amb WT1 per tal d'unir-se al promotor de l'E-cadherina i regular-lo. A més a més, Snail s'uneix amb més afinitat al promotor de l'E-cadherina, de manera que baixes concentracions d'aquest factor de transcripció són capaces de desplaçar l'acció activadora d'altres concentracions de WT1 .

7.- La transfecció estable de WT1 en cèl·lules que expressen ectòpicament Snail dona lloc a un canvi fenotípic. Tot i no recuperar-se els nivells de l'E-cadherina, WT1 afavoreix la presència d'aquesta proteïna d'adhesió en la membrana cel·lular formant complexes amb β -catenina. A més a més, WT1 és capaç d'evitar la repressió d'Snail sobre el promotor de MUC-1.

MATERIALS I MÈTODES

Línies cel·lulars

Totes les línies cel·lulars utilitzades han estat cultivades en medi modificat de Dulbeco (DMEM), suplementat amb 4.5 g/l de glucosa (Life Technologies), 2 mM de glutamina, 56 U/ml de penicil·lina, 56 µg/l d'estreptomicina i 10% de sèrum fetal boví (FBS;GIBCO). Es van mantenir a 37°C, en una atmosfera humida contenint 5% de CO₂ y 95% d'aire

Les següents línies cel·lulars utilitzades provenen del banc de cèl·lules de l'institut: línies cel·lulars humanes com són les HT-29 M6 (adenocarcinoma de colon, seleccionada a partir de la línia parental HT-29 amb metrotexat a una concentració de 10⁻⁶ M, amb un fenotip mucosecretor), les SW-480 (adenocarcinoma de colon), les SW-620 (adenocarcinoma de colon provenint de metàstasi a nòdul limfàtic), les ZR75 (carcinoma ductal de mama), les T47D (carcinoma ductal de mama), les MCF-7 (carcinoma ductal de mama), les Mia-Paca2 (adenocarcinoma ductal de pàncreas) i les RWP1 (carcinoma ductal de pàncreas); línies cel·lulars de ratolí com són les EpH4 (carcinoma ductal de mama) i les NIH 3T3 (fibroblasts dèrmics, immortalitzats); línies cel·lulars de rata com són les IEC-18 (íleon).

On és indicat, s'han afegit PMA (phorbol 12-myristate, 13-acetate; SIGMA) a una concentració final de 100 nM, els inhibidors de la MEK (mitogen-activated protein kinase kinase) PD98059, a una concentració final de 50 µM, o bé U0126 a una concentració final de 20 µM, l'inhibidor de la quinasa p38 SB203580 a una concentració de 10 µM o, finalment, l'inhibidor de la PI3K (phosphatidyl inositol-3 kinase) LY294002 a una concentració final de 30 µM (tots ells de Calbiochem). Per fer els controls es van suplementar les cèl·lules amb els mateixos volums del diluïent, DMSO (dimethyl sulfoxide).

Constructes d'ADNc

mZeb-1

L'ADNc de Zeb-1 de ratolí va ser cedit pel Dr. T. Geneta del *Children's Hospital of Philadelphia*, Filadèlfia, PA. Està clonat en el vector d'expressió pcDNA3HisC (Promega) en la diana de restricció EcoRI.

mZeb-2

El constructe de Zeb-2-CS2MT va ser amablement cedit per Dr. A. Postigo de la *Washington University*, St. Lluís, M.O.

mSnail

El constructe mSnail-HA clonat en el vector pRSV-neo es va generar en el nostre laboratori a mans del Dr. J. Baulida. Es va alliberar un fragment de 0.9 Kb corresponent a mSnail-HA digerint el constructe pcDNA3-Snail-HA, que ja teníem en el laboratori i que ja estava descrit (M. Gossen, 1992), amb els enzims de restricció HindIII i NotI. A continuació es va clonar mSnail-HA en el vector pRSV mitjançant la diana XhoI. Es van haver de generar extrems roms per tal de poder realitzar la lligació (pèrdua de les dianes).

MEK-E

El constructe de la forma activada de MEK-1 (MEK-E) va ser amablement cedit pel Dr. P. Crespo del CSIC, Madrid.

p65, VP16-Rel i Rel

El constructe p65-pcDNA3 va ser cedit pel Dr. M. Fresno de la UAM, Madrid. La fusió VP16-Rel es va generar en el nostre laboratori en mans del Dr. D. Domínguez. Es va obtenir l'ADNc codificant de VP16 a partir d'un constructe anterior, VP16-Snail prèviament referenciat a E. Batlle, 2000. Aquesta regió es va fusionar en pauta amb el domini d'homologia Rel del factor de transcripció NFκB, subunitat p65. El Aquesta fusió fou subclonada de nou al vector pcDNA3.

El constructe Rel-pcDNA3 es va generar a partir del constructe p65-pcDNA3. El domini Rel va ser alliberat mitjançant els enzims HindIII i NdeI, que digereixen en l'extrem 5' del clonatge i just després del domini Rel, respectivament. Aquest fragment va ser posteriorment clonat en el plàsmid pcDNA3 digerit amb EcoRV. Es van haver de generar extrems roms per tal de poder realitzar la lligació (pèrdua de les dianes).

WT1 (-KTS)

L'ADNc de WT1 (-KTS) de ratolí va ser cedit pel Dr. G. Gil. Estava clonat en el vector MSCV-GFP. Per generar el constructe WT1-pRSVneo es va digerir el constructe original amb l'enzim de restricció EcoRI. Es va alliberar un fragment de 3 Kb que, posteriorment, va ser clonat en el vector d'expressió pRSVneo mitjançant la diana XhoI. Es van haver de generar extrems roms per tal de poder realitzar la lligació (pèrdua de les dianes).

L'ADNc de WT1 (-KTS) es va clonar també en el vector d'expressió pREP4 per poder generar els clons estables. Per això, es va alliberar la regió codificant de WT1 del vector pRSVneo digerint amb NheI i Sall. El fragment obtingut es va clonar en el vector pREP4 mitjançant les dianes NheI i XhoI (el tall d'aquest últim enzim genera un extrem compatible amb Sall, però es perd la diana).

Clons estables per Snail, ILK, Ha-ras i PK-C α

La generació de clons estables per a l'expressió d'mSnail-HA i PK-C α a partir de les línies parentals HT-29 M6 i MDCK, es van obtenir al nostre laboratori i ja es van descriure prèviament (E. Batlle, 2000 i E. Batlle, 1998). Les línies estables HT29-M6 SNA1 i SNA2 corresponen a dos clons obtinguts a partir de la transfecció estable d'un vector d'expressió regulat per tetraciclina (*tet-off*) contenint un ADNc corresponent a Snail de ratolí etiquetat amb hemaglutinina (HA). Aquest promotor induïble deixa de ser funcional al afegir Doxíciclina (2 μ g/ml) al medi de cultiu. Les línies estables MDCK SNA1 i MDCK SNA3 corresponen a dos clons obtinguts a partir de la transfecció estable amb el constructe pIRES-neo m-Snail-HA. L'expressió estable d'mSnail, en els clons HT29-M6 SNA1 i SNA2, es conserva gràcies a la presència dels antibiòtics G418 (neomicina; GIBCO) i Higromicina (Invitrogen) a una concentració final de 500 μ g/ml i 200 μ g/ml en el medi, respectivament. En canvi, per mantenir l'expressió estable d'Snail en els clons MDCK SNA1 i SNA3, els medis de cultius eren suplementats amb només l'addició de G418 a una concentració final de 500 μ g/ml.

Els clons estables de IEC-18 que expressen la forma salvatge de la quinasa ILK, ja es va descriure prèviament (A. Novak, 1998). Els clons estables de IEC-18 que expressen una forma activada de Ha-Ras (mutació Val12, en

pCEFL) van ser cedides molt amablement pel Dr. H.G. Pálmer del *Instituto de Investigaciones Biomédicas*, CSIC, Madrid; així com les línies SW-480 transfectades establement amb Snail-GFP.

Clons estables per WT1

Les tranfeccions estables es van realitzar utilitzant el kit *Lipofectamine-Plus Reagent* (Invitrogen) en medi optiMEM (Invitrogen) segons les instruccions de la casa comercial. Les línies cel·lulars estables es van generar a partir de les línies estables per l'expressió d'Snail abans esmentades, les MDCK control que contenen establement un vector buit, i les MDCK SNA1 (E. Batlle, 1998). Cadascuna d'aquestes línies es van transfectar de manera estable amb el plàsmid buit pREP4 i amb la construcció pREP4-WT1 (-KTS). Posteriorment van ser seleccionades amb 500 µg/ml de G418 (Geneticina, GIBCO) per mantenir l'expressió d'Snail i amb 400 µg/ml d'Higromicina (Invitrogen) per seleccionar els clons que expressen WT1. Com a resultat, vam obtenir 8 clons control que no expressaven cap dels dos factors de transcripció (anomenats MDCK CON, -Snail/-WT1), 4 clons que només expressaven Snail (anomenats MDCK SNA, +Snail/-WT1), 3 clons que expressaven únicament WT1 (-KTS) (anomenats MDCK WT1, -Snail/+WT1) i 2 clons que expressaven ambdós factors transcripcionals, Snail i WT1 (anomenats MDCK SNA/WT1, +Snail/+WT1); tots ells eren resistents a les concentracions abans esmentades de G418 i Higromicina.

Clonació de promotors

Promotor d'E-cadherina

El constructe reporter amb el fragment -178/+92 del promotor del gen humà d'E-cadherina està descrit per E. Batlle, 2000. i prové del nostre laboratori. Aquest fragment del promotor inclou les tres caixes-E de resposta a Snail descrites prèviament en el mateix treball. A més, també conté una seqüència consens de reconeixement per WT1. Els constructes del promotor d'E-cadherina amb les caixes-E mutades es van fer per canvis de la seqüència 4'-CACCTG-3' de cada caixa per 5'-AACCTA-3'.

Promotor de MUC-1

La seqüència corresponent al promotor de MUC-1 humà -759/+49 es va clonar fent una amplificació del promotor per PCR a partir d'ADN genòmic de cèl·lules HT-29, utilitzant una taq polimerasa d'alta fidelitat (Pfx, GIBCO) i els següents oligonucleòtids: 5'-CATGGTACCGCAAGGCTCCCGGTGACC-3' i 5'-CGTAAGCTTGGGAGGGGGCAGAACAGATT-3' que contenen dues dianes de restricció per KpnI i HindIII (subratllades). El producte de la PCR purificat es va clonar en una versió mutada del vector pGL3 Luciferasa (Promega) (E. Batlle, 2000; es va eliminar un lloc putatiu d'unió a Snail) mitjançant les dianes KpnI i HindIII. El promotor de MUC-1 amb les dues caixes-E mutants es va obtenir utilitzant el kit *QuikChangeTM site-directed mutagenesis* (Stratagene). La seqüència de l'oligonucleòtid sens va ser la següent: 5'-GAGGGGGCGGGGTTTTGTAAACCTATAACCTACTCGCTGTGCCTAGGGCCG-3', en negreta s'indiquen els nucleòtids mutats.

Promotors d'Snail

El fragment del promotor d'Snail -869/+59 es va aïllar en el nostre laboratori pel Dr. E. Batlle. El promotor d'Snail es va clonar en el vector pGL3 mitjançant les dianes KpnI i HindIII. A partir d'aquí, el Dr. D. Domínguez, va realitzar una sèrie de delecions successives fins al fragment -194/+59 utilitzant oligonucleòtids específics des del punt de delecio, i als quals se'ls hi va afegir una diana KpnI + 4 pb de seqüència flanquejant a l'extrem 5' per a permetre la digestió de la diana amb l'enzim de restricció pertinent. El fragment -125/+59 es va obtenir per digestió de la diana BsmBI que es troba en aquest punt sobre el fragment -194/+59, i utilitzant la diana KpnI present en l'extrem 5' d'aquest últim. Després es va relligar el plàsmid havent fet prèviament els extrems roms. El fragment -78/+59 es va amplificar amb uns oligonucleòtids flanquejants a la seqüència i clonat en el vector pGL3 mitjançant les dianes BglII i HindIII. Finalment els fragments -194/+29 i -125/+29 es van generar per digestió aprofitant una diana AfIII en el lloc -29.

Promotor d'Slug

El fragment del promotor d'Slug humà -616/+207 es va clonar fent una amplificació del promotor per PCR a partir d'ADN genòmic de cèl·lules HT-

29, utilitzant un taq polimerasa d'alta afinitat (Pfx, GIBCO) i els oligonecleòtids següents: 5'-ATTCTCGAGGAAGCCCTGAGTAGCGCA-3' i 5'-ACCAAGCTTGGAGGCGTTGAAATGC-3' que contenen dues dianes de restricció per XhoI i HindIII. El producte de la PCR purificat es va clonar en una versió mutada del vector pGL3 Luciferasa (Promega) mitjançant les dianes XhoI i HindIII.

Promotor de VDR

La seqüència corresponent al promotor de VDR humà -600/+23 es va clonar fent una amplificació del promotor per PCR a partir d'ADN genòmic de cèl·lules HT-29, utilitzant una taq polimerasa d'alta fidelitat (Pfx, GIBCO) i els oligonucleòtids següents: 5'-GCTGCCAAGGTGATATCGGG-3' i 5'-GTTGTGCATGATTATAGGAC-3' que no contenen cap diana de restricció. El producte de la PCR purificat es va fosforilar i es va clonar en una versió mutada del vector pGL3 Luciferasa (Promega) mitjançant la diana SmaI que deixa extrems roms.

Promotor de Zeb-1

La seqüència corresponent al promotor de Zeb-1 humà -361/-53 es va clonar fent una amplificació del promotor per PCR a partir d'ADN genòmic de cèl·lules HT-29, utilitzant un taq polimerasa d'alta afinitat (Pfx, GIBCO) i els oligonecleòtids següents: 5'-ATTTACGCGTCCGCCGAGCCTCCAACTTTA-3' i 5'-TAAAAGCTTCCTTCCCCCCCACCCCTCC-3' que contenen dues dianes de restricció per MluI i HindIII (subratllades). El producte de la PCR purificat es va fosforilar i es va clonar en una versió mutada del vector pGL3 Luciferasa (Promega) mitjançant les dianes MluI i HindIII. Aquest constructe va ser generat per S. Guaita.

Promotors de Zeb-2

El fragment del promotor de Zeb-2 humà -888/+455 es va clonar fent una amplificació del promotor per PCR a partir d'ADN genòmic de cèl·lules HT-29, utilitzant un taq polimerasa d'alta afinitat (Pfx, GIBCO) i els oligonecleòtids següents: 5'-ATACGAGCTCGAAGCGTCACGTTGGAAGC-3' (sense, -888/-869) i 5'-GGAAGATCTGGATGGAGGACGAGCACAC-3' (antisense, +455/+437) respecte a l'inici de transcripció esmentat en la

seqüència del cromosoma 2 humà (núm. Accés NT_005058; gi:37547378). Aquests oligonucleòtids contenen dues dianes de restricció SacI i BgIII. El producte de la PCR purificat es va clonar en una versió mutada del vector pGL3 Luciferasa (Promega) mitjançant les dianes SacI i BgIII.

El fragment del promotor de Zeb-2 humà -888/+2976 es va clonar fent una amplificació del promotor per PCR a partir d'ADN genòmic de cèl·lules HT-29, utilitzant un taq polimerasa d'alta afinitat (Pfx, GIBCO) i els oligonucleòtids següents: 5'-ATACGAGCTCGAAGCGTCACGTTGGAAGC-3' (sense, -888/-869) i 5'-GGAAGATCTTCGATAAGAGCGGATCAGATGGC-5' (antisense, +2976/+2956) respecte a l'inici de transcripció esmentat en la seqüència del cromosoma 2 humà (núm. Accés NT_005058; gi:37547378). Aquests oligonucleòtids contenen dues dianes de restricció SacI i BgIII. El producte de la PCR purificat es va clonar en una versió mutada del vector pGL3 Luciferasa (Promega) mitjançant les dianes SacI i BgIII.

Tots els constructes es van seqüenciar per descartar possibles mutacions. Per realitzar tots aquests clonats es va haver de lligar el seu fragment amb el seu plàsmid i, en certes ocasions, es va haver de procedir a defosforilar els vectors i en d'altres casos, fins i tot, es va haver de reemplaçar extrems cohesius per obtenir extrems compatibles per a la lligació. Per a tot això es va utilitzar: la lligasa *T4-DNA* i el seu respectiu tampó de la casa comercial (Pharmacia); la *fosfatasa alcalina d'intestí de vedell* diluïda en el seu corresponent tampó (Promega); o bé, la polimerasa *Klenow* (New England Biolabs).

Anàlisi de l'activitat dels promotors

La repressió de l'activitat dels promotors d'E-cadherina o MUC-1 es va mesurar per co-transfecció de constructes de Zeb o Snail clonats en el plàsmid pcDNA3 (Invitrogen) amb els promotors abans esmentats clonats en el plàsmid pGL3 en les línies cel·lulars indicades.

La repressió de l'activitat dels promotors d'E-cadherina o VDR es va mesurar co-transfectant el constructe d'Snail clonat en el plàsmid pRSV amb els promotors abans esmentats clonats en el plàsmid pGL3 en les línies cel·lulars indicades.

L'activació del promotor de l'E-cadherina per WT1 es va mesurar co-transfectant 100 ng del constructe pRSV-WT1 (-KTS) amb el promotor d'E-cadherina clonat en pGL3 i concentracions creixents del constructe pRSV-Snail-HA en cèl·lules NIH 3T3.

Per analitzar l'activitat basal dels diferents constructes del promotor d'Snail, el promotor de Zeb-1, el promotor de Zeb-2 o bé els promotors d'E-cadherina o MUC-1, clonats tots ells en pGL3, es van transfectar en les línies cel·lulars indicades.

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

Anàlisi dels nivells d'ARN

Northern blot

Els Northern blots es van fer seguint un protocol estàndard. Breument, 12.5 µg d'ARN total es van purificar per extracció amb guanidina isotiocianat i es van separar posteriorment en un gel desnaturalitzant d'agarosa/formaldéhid, es van visualitzar amb tinció de bromur d'etidi, es van fotografia i es van transferir a una membrana *Zeta-probe* (Bio-Rad) durant tota la nit per acció de capilaritat. Al dia següent els ARN es van *cross-linkar* a la membrana utilitzant el *GS Gene Linker* (Bio-Rad) i es van hibridar amb una sonda marcada radioactivament amb [α -³²P]dCTP (*rediprime II*, Amersham Biosciences) utilitzant una solució *pressHyb* (CLONTECH). La sonda d'ADN de MUC-1 es va preparar a partir de 50 ng de la seqüència citosòlica de l'ADNc de MUC-1 purificada, que s'havia amplificat per una transcripció *reverse* associada a una reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir d'ARN total de cèl·lules HT-29 M6 utilitzant els

oligonucleòtids; 5'-CGAAAGCTTGCCGCCGAAAGAAGTACG-3' (sense, 556-574) i 5'-GAGGATATCGCAAGTTGGCAGAAGTGGC-3' (antisense, 748-765) que correspon a la seqüència registrada en el *GenBank*TM (núm. Accés X80671). Les bandes específiques es van visualitzar per autoradiografia utilitzant *Hyperfilm MP* (Amersham Biosciences).

RT-PCR semi-quantitativa

Tots els anàlisi de RT-PCR semi-quantitativa es van realitzar a partir de 0.5-1 µg provenint d'ARN total purificat i utilitzant el kit *SuperScript One-Step* RT-PCR i la *Platinum Taq polimerasa* (Invitrogen).

Els parells d'oligonucleòtids (sense/antisense), el número de cicles i les temperatures d'anellament, i els números d'accés del *GenBank*TM van ser els següents:

Nom del gen	Oligonucleòtids (sense/antisense)	Núm. cicles i TA	Núm. d'accés <i>GenBank</i>
mmActina	5'-TGAACAACATACAATCCATCATGAAGTGTGA-3' (916-949) 5'-AGGAGCGATAATCTTGATCTTCATCATGGTGCT-3' (1090-1058)	X25 55°C	BC049611
hsCiclofilina A	5'-ATGGTCAACCCACCGTG-3' (45-62) 5'-TGCAATCCAGCTAGGCATG-3' (690-708)	X22 60°C	BC005320
hsCitoqueratina 18	5'-CTGGAGACCGAGAACCAGGA-3' (352-370) 5'-TCCGAGCCAGCTCGTCAT-3' (818-835)	X40 55°C	M26326
hsEcadherina	5'-TTCCTCCAATACATCTCCCTTCACAGCAG-3' (1977-2006) 5'-CGAAGAAACAGCAAGAGCAGCAGAATCAGA-3' (2287-2316)	X29 55°C	AB025106
hsFibronectina	5'-GTGCCTGGGCAACGGA-3' (922-938) 5'-CCCGACCCTGACCGAAG-3' (1554-1571)	X30 55°C	X02761
hsLEF-1	5'-ACTGCGCCACGGACGAG-3' (704-720) 5'-GAGAGGATGGACCGCATGG-3' (1098-1116)	X35 55°C	AF288571
hsMUC-1	5'-CATGGTACCGCAAGGCTCCCGGTGACC-3' (556-574) 5'-CGTAAGCTTGGGAGGGGGCAGAACAGATT-3' (748-765)	X30 60°C	X80671
hsSlug	5'-ATTCGCACCCACACATTACCTTG-3' (696-718) 5'-TGGAGAAGGTTTTGGAGCAGTTT-3' (918-896)	X35 55°C	NM003068
rnSlug	5'-ATGCCGCGCTCCTTCCTCGTC-3' (1-21) 5'-GCTTTTCCCAGTGTGTGTTTC-5' (634-613)	X35 55°C	AF497973
hsSnail	5'-GGCGGATCCACCATGCCGCGCTCCTTCCTGGTC-3' (1-24) 5'-CCGGATATCCGCGAGGGCCTCCGGAGCA-3' (778-791)	X39 60°C	M95604
mmSnail	5'-TTCCAGCAGCCCTACGACCAG-3' (104-125) 5'-GCCTTTCCCAGTGTCTCATC-3' (290-310)	X32 60°C	NM005985
rnSnail	Es van utilitzar els mateixos oligonucleòtids que per amplificar mmSnail	X32 60°C	XM230866
mmWT1	5'-GCGGCGCAGTTCCCCAACCA-3' (979-998) 5'-ATGGTTTCTCACCAGTGTGCTT-3' (1534-1513)	X35 58°C	NM144783
hsZeb-1	5'-TTCAGCATCACCAGGCAGTC-3' (947-966) 5'-GAGTGGAGGAGGCTGAGTAG-3' (1663-1683)	X40 53°C	U12170
hsZeb-2 (ARNm sense, regió codificant)	5'-GCTACGACCATACCCAGGAC-3' (2756-2776) 5'-TCTCGCCCCAGTGAAGCC-3' (3139-3157)	X28 55°C	AB011141

hsZeb-2 (ARNm sense, regió no codificant)	5'-GGGCGAGTGGGCTTCCT-3' (2422-2406) 5'-GATAAGAGCGGATCAGATGGC-3' (2976-2956)	X40 55°C	NT005058 gi:37547378
mmZeb-2 (ARNm antisense)	5'-GCATGAAGAAGCCGCGAAGTGT-3' (112-133) 5'-CACGCGCCACCTATCTTTGT-3' (258-277)	X40 55°C	AI549808

Tots aquests oligonucleòtids, sense i antisense, anellen en exons diferents.

RT-PCR quantitativa

Tots els anàlisi de RT-PCR quantitativa es van realitzar a partir de 0.25 ng provenint d'ARN total purificat, extracció feta amb el kit *Gen Elute Mammalian total RNA kit* (Sigma), i utilitzant el kit *QuantiTect SYBR Green RT-PCR* (Quiagen). La RT-PCR i l'obtenció de les dades es va realitzar amb ABI PRISM 7900HT. Totes les quantificacions es van normalitzar amb controls interns de Ciclofilina o HPRT. El valor de quantitat relatiu per a cada gen analitzat es va expressar com a $2^{-(Ct-Cc)}$ (Ct i Cc són les mitges de les diferències dels triplicats dels cicles obtinguts després de normalitzar amb Ciclofilina o HPRT). Els parells d'oligonucleòtids (sense/antisense) utilitzats van ser els següents: **hs-E-cadherina**, 5'-TTCCTCCCAATACATCTCCCTTCACAGCAG-3' (1977-2006)/5'-CGAAGAAACAGCAAGAGCAGCAGAATCAGA-3' (2287-2316); **hsCiclofilina A**, 5'-ATGGTCAACCCACCGTG-3' (45-62)/5'-TGCAATCCAGCTAGGCATG-3' (690-708) i **mmHPRT**, 3'-GGCCAGACTTTGTTGGATTTG-5' (556-576)/3'-TGCGCTCATCTTAGGCTTTGT-5' (679-699). Les seqüències indicades corresponen a les registrades en el *GenBank*TM sota els següents números d'accés: hsE-cadherina, AB025106; hsCiclofilina A, BC005320 i mmHPRT, BC083145.

Assaig de BOPA (Biotinilated Oligonucleotide Precipitation Assay)

WT1 i Snail sobre promotor d'E-cadherina

Les cèl·lules NIH3T3 es van transfectar amb Snail-HA (SNA-HA) o WT1(-KTS) o es van co-transfectar amb Snail-HA i WT1(-KTS). A les 48 hores de la transfecció les cèl·lules es van lissar amb tampó RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.5% NaDOC, 1% Tritó X-100, 0.1% SDS, 1 mM DTT, 0.1 mM Ortovanadat Sòdic, 10mM Naf, 1 mM PefaBloc, 10 µg/ml Leupeptina i 0.7 µg/ml Pepstatina) durant 30 minuts en gel, es van centrifugar durant 5 minuts a 14 000 r.p.m. i es va obtenir el sobrenadant. Seguidament es van incubar 2 mg de proteïna total amb 4 µg de la sonda corresponent al

fragment del promotor d'E-cadherina (-92 a -12) marcat amb una molècula de biotina en l'extrem 5' i 10 µg de poli dI-dC (Promega) durant tota la nit a 4°C.

Sp1 sobre promotor d'Snail

Les cèl·lules indicades es van tractar prèviament amb l'inhibidor PD98059 (50 µM) o bé amb el diluïent DMSO com a control durant 24 h. A continuació es van lisar amb el tampó RIPA durant 30 minuts en gel, es van centrifugar durant 5 minuts a 14 000 r.p.m. i es va obtenir el sobrenedant. Seguidament es van incubar 200 µg de proteïna total amb 4 µg de la sonda corresponent al fragment d'Snail (-70 a -1) marcat amb una molècula de biotina en l'extrem 5' i 10 µg de poli dI-dC (Promega) durant la tota la nit a 4°C.

A continuació, tant en un cas com en l'altre, es va afegir a cada mostra 25 µl efectius de *Streptavidin-agarose* (SIGMA) i es van incubar durant una hora en rotació a 4°C. Transcorregut aquest temps es van centrifugar les mostres per precipitar l'agarosa, es va descartar el sobrenadant i es van rentar tres vegades l'agarosa amb RIPA. Seguidament es van resuspendre les mostres amb 25 µl de SB1x, es van bullir durant 5 minuts a 95°C i es van resoldre en un gel d'acrilamida-SDS al 10% (pel cas de WT1 i Snail) o al 7.5% (pel cas de Sp1 i P-Ser). El gel es va transferir a una membrana de nitocel·lulosa (PROTAN®) i posteriorment, aquesta membrana, es va analitzar mitjançant la tècnica de Western blot (WB) utilitzant anticossos contra HA (Roche) (per visualitzar Snail), contra WT1 (Santa Cruz), contra Sp1 (Santa Cruz) i contra P-Ser (SIGMA).

Electroforesi de proteïnes i Western blot

L'electroforesi de proteïnes es va realitzar en minigels de poliacrilamida al 7.5-10%, en condicions desnaturalitzants. Les mostres proteiques havien estat bullides prèviament en tampó de càrrega, o de Laemmli (Tris 10mM, 1% SDS, beta-mercaptoetanol, blau de bromofenol (colorant) i 10% de glicerol). Els gels han estat resolts en un tampó balancejat de Tris i Glicina, en un protocol clàssic.

La immunodetecció de les proteïnes transferides a una membrana de nitrocel·lulosa es va realitzar amb un protocol de Western blot usual: incubació de 1 hora en solució de bloqueig (Tampó Tris-Salí, Tween al 0.1% (TBS-t), llet en pols desnatada al 5%). En aquesta mateixa solució de bloqueig es diluïa l'anticòs primari específic:

Anticòs	Antigen	Dilució (WB)	Casa Comercial
E-cadherina clon 36 (1)*	735-883 (Final)	1:2500	BD Transduction Laboratories
β -Catenina clon 14 (1)*	571-781 (Final)	1:2000	BD Transduction Laboratories
Desmogleïna clon 62 (1)*	705-1029 (Final)	1:1000	BD Transduction Laboratories
Plakoglobina clon 15 (1)*	553-738	1:2000	BD Transduction Laboratories
Desmocollina ½ 7G6 (1)*	Domini extracel·lular	1:500	Zymed Laboratories
HA 3F10 (2)*	76-111	1:1000	Roche
WT1 C-19 (3)*	Domini carboxi-terminal	1:1000	Santa Cruz Biotechnologies
Sp1 (PEP-2)-G (4)*	528-546	1:1000	Santa Cruz Biotechnologies
P-Serina (PSR-45) (1)*	P-Ser conjugada a KLH	1:1000	SIGMA-ALDRICH

(1)* Ratolí monoclonal

(2)* Rata monoclonal

(3)* Conill policlonal

(4)* Cabra policlonal

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

Fotografies en microscopia de contrast de fases

Les fotografies mostrades dels clons MDCK CON, MDCK SNA, MDCK WT1 i MDCK SNA/WT1 en cultiu es van fer amb una càmera model M35W

acoblada al microscopi de contrast de fases marca Zeiss. Les fotografies es van realitzar utilitzant carrets marca Kodak TMAX-135 de 100 ASAs i per obtenir còpies en blanc i negre. Fotografies captades a 100 augments.

Talls semifins i ultrafins

Les cèl·lules després de 10 dies en confluència es van fixar en glutaraldehid al 2,5% durant 30 minuts i post-fixades amb OsO₄ al 2% durant 1 minut a temperatura ambient i protegides de la llum. A continuació es van rentar amb H₂O destil·lada i es van deshidrata incubant-les amb banys seriatos d'etanol: una vegada en 30% d'etanol, una vegada en 50% d'etanol, una vegada en 70% d'etanol, dos vegades en 95% d'etanol i cinc vegades en 100% d'etanol (5 minuts per incubació). La deshidratació es va completar amb incubacions de 5 minuts seguits de dos incubacions de 15 minuts amb hidroxipropil Metacrilat (HPMA) (MERK). Posteriorment, les mostres es van incloure en una resina EPON (*Tousimis Research Corporation*, MD, USA). A continuació, les peces es van dipositar en motlles de goma i orientats per ser incubats addicionalment durant 16-18 h a 37°C i 24 h a 60°C igualment en EPON 100%. Els talls ultrafins es van obtenir amb un ultramicròtom LKB, posteriorment es van col·locar sobre una reixeta de coure, es van tenyir amb acetat d'uranil (5% en etanol absolut) i citrat de plom. Les mostres es van analitzar a 5000-45000 augments en un microscopi electrònic PHILIPS CM 100.

Immunofluorescència

Les diferents línies cel·lulars estables es van fixar amb paraformaldehid al 4% durant 10 minuts a temperatura ambient. Després es van permeabilitzar amb Tritó X-100 al 0.2% en PBS (tampó salí-fosfat) durant 5 minuts. A continuació es va fer una incubació amb fal·loidina associada a rhodamina diluïda (Molecular Probes) durant 5-10 minuts en cambra humida i fosca. Un cop rentats els cubreobjectes es van muntar en Mowiol-DABCO i visualitzats al microscopi confocal. Les imatges de microscopia confocal es van captar per un sistema de Microscòpia Confocal Invertida Leica TCS-SP2, amb el software pertinent. Els canals d'emissió i excitació amb làser foren colimats en cada cas per tal de no tenir senyal creuat. En cada imatge es varen realitzar d'entre 4 i 8 talls per a generar després una

projecció. El contrast i la intensitat del senyal foren retocats mitjançant programes de processament d'imatge (Adobe Photoshop 6.0).

Immunoprecipitació

Les cèl·lules en cultiu es van rentar tres cops amb PBS i es van rascar per desprendre-les de la placa, sobre gel. El sediment de cèl·lules obtingut després de centrifugar-les 5 minuts a 3000 r.p.m. era resuspès en 300 µl de tampó de Kemler (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM DTT, 0.1 mM Ortovanadat sòdic, 10 mM NaF, 1 mM pefabloc, 10 µg/ml leupeptina i 0.7 µg/ml pepstatina). Les cèl·lules resuspeses en aquest tampó es van incubar durant 30 minuts a 4°C en agitació, després es van centrifugar 5 minuts a 14 000 r.p.m. i es va retirar el sobrenedant, d'aquesta manera eliminàvem les proteïnes no associades al citoesquelet. El sediment restant es va resuspendre en 200 µl de tampó RIPA (recepta explicada en assaig de BOPA) i es va incubar durant 30 minuts a 4°C en agitació. A continuació, l'extracte es va centrifugar 5 minuts a 14 000 r.p.m. obtenint un sobrenedant considerat com a extracte de proteïnes associades al citoesquelet.

Seguidament es van incubar 200ug de lisat amb 4ugml⁻¹ d'anticòs anti-E-cadherina durant tota la nit en agitació a 4°C. Després, es va afegir 25 µl efectius de resina proteïna-G-agarosa (SIGMA) i es va deixar incubant durant 1 hora i mitja a 4°C en agitació. Finalment, es va resuspendre la mostra amb tampó de càrrega i després de ser bullida, es va fer l'electroforesi en un gel de poliacrilamida-SDS al 7.5% i, un cop transferit el gel a una membrana de nitrocel·lulosa, es va immunodetectar per Western blot utilitzant els anticossos contra E-cadherina i beta-catenina.

BIBLIOGRAFIA

Adams C.L., Nelson W.J. "Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion". *Curr Opin Cell Biol.* 1998. Oct; 10(5):572-7.

Armstrong J.F., Pritchard-Jones K., Bickmore W.A., Hastie N.D., Bard J.B. "The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo". *Mech Dev.* 1993. Jan; 40(1-2):85-97.

Barker N., Morin P.J., Clevers H. "The Yin-Yang of TCF/beta-catenin signaling". *Adv Cancer Res.* 2000. 77:1-24.

Bates R.C., Mercurio A.M. "Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids". *Mol Biol Cell.* 2003. May; 14(5):1790-800.

Batlle E., Sancho E., Franci C., Dominguez D., Monfar M., Baulida J., Garcia De Herreros A. "The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells". *Nat Cell Biol.* 2000. Feb; 2(2):84-9.

Batlle E., Verdu J., Dominguez D., del Mont Llosas M., Diaz V., Loukili N., Paciucci R., Alameda F., Garcia de Herreros A. "Protein kinase C-alpha activity inversely modulates invasion and growth of intestinal cells". *J Biol Chem.* 1998. Jun 12; 273(24):15091-8.

Behrens J., Jerchow B.A., Wurtele M., Grimm J., Asbrand C., Wirtz R., Kuhl M., Wedlich D., Birchmeier W. "Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta". *Science.* 1998. Apr 24;280(5363):596-9.

Bienz M., Clevers H. "Linking colorectal cancer to Wnt signalling". *Cell.* 2000. 103(2):311-20.

Birchmeier W., Behrens J. "Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness". *Biochim Biophys Acta.* 1994. May 27;1198(1):11-26.

Birchmeier C., Meyer D., Riethmacher D. "Factors controlling growth, motility, and morphogenesis of normal and malignant epithelial cells". *Int Rev Cytol.* 1995. 160:221-66.

Blanco M.J., Moreno-Bueno G., Sarrío D., Locascio A., Cano A., Palacios J., Nieto M.A. "Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas". *Oncogene.* 2002. May 9; 21(20):3241-6.

- Bolos V., Peinado H., Perez-Moreno M.A., Fraga M.F., Esteller M., Cano A.** "The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors". *J Cell Sci.* 2003. Feb 1; 116(Pt 3):499-511.
- Bouwman P., Philipson S.** "Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors". *Mol Cell Endocrinol.* 2002. Sep 30; 195(1-2):27-38.
- Boyer B., Valles A.M., Edme N.** "Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions". *Biochem Pharmacol.* 2000. Oct 15; 60(8):1091-9.
- Brown K.W., Malik T.A.** 2001. "The molecular biology of Wilms' tumour". *Expert Rev Mol Med.* 2001. May 14; 2001:1-16.
- Buckler A.J., Pelletier J., Haber D.A., Glaser T., Housman D.E.** "Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development". *Mol Cell Biol.* 1991. Mar; 11(3):1707-12.
- Burdsal C.A., Damsky C.H., Pedersen R.A.** "The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak". *Development.* 1993. Jul; 118(3):829-44.
- Cano A., Perez-Moreno M.A., Rodrigo I., Locascio A., Blanco M.J., del Barrio M.G., Portillo F., Nieto M.A.** "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression". *Nat Cell Biol.* 2000. Feb; 2(2):76-83.
- Carver E.A., Jiang R., Lan Y., Oram K.F., Gridley T.** "The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition". *Mol Cell Biol.* 2001. Dec; 21(23):8184-8.
- Casal J., Leptin M.** "Identification of novel genes in Drosophila reveals the complex regulation of early gene activity in the mesoderm". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996. Sep 17; 93(19):10327-32.
- Castanon I., Baylies M.K.** "A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function". *Gene.* 2002. Apr 3; 287(1-2):11-22.
- Chambers A.F., Groom A.C., MacDonald I.C.** "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites". *Nat Rev Cancer.* 2002. Aug; 2(8):563-72.

- Cho E.A., Patterson L.T., Brookhiser W.T., Mah S., Kintner C., Dressler G.R.** "Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development". *Development*. 1998. Mar; 125(5):803-12.
- Christen B., Slack J.M.** "Spatial response to fibroblast growth factor signalling in *Xenopus* embryos". *Development*. 1999. Jan; 126(1):119-25.
- Christofori G., Semb H.** "The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene". *Trends Biochem Sci*. 1999. Feb; 24(2):73-6.
- Chu S., Cockrell C.A., Ferro T.J.** "Expression of alpha-ENaC2 is dependent on an upstream Sp1 binding motif and is modulated by protein phosphatase 1 in lung epithelial cells". *Biochem Biophys Res Commun*. 2003. Apr 18; 303(4):1159-68.
- Ciruna B., Rossant J.** "FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak". *Dev Cell*. 2001. Jul; 1(1):37-49.
- Comijn J., Berx G., Vermassen P., Verschuere K., van Grunsven L., Bruyneel E., Mareel M., Huylebroeck D., van Roy F.** "The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion". *Mol Cell*. 2001 Jun; 7(6):1267-78.
- Conacci-Sorrell M., Simcha I., Ben-Yedidia T., Blechman J., Savagner P., Ben-Ze'ev A.** "Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK". *J Cell Biol*. 2003. Nov 24; 163(4):847-57.
- Cruet-Hennequart S., Maubant S., Luis J., Gauduchon P., Staedel C., Dedhar S.** "alpha(v) integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells". *Oncogene*. 2003. Mar 20; 22(11):1688-702.
- Csiszar K., Houmard J., Damerval T., Tandeau de Marsac N.** "Transcriptional analysis of the cyanobacterial gvpABC operon in differentiated cells: occurrence of an antisense RNA complementary to three overlapping transcripts". *Gene*. 1987. 60(1):29-37.
- Delcomenne M., Tan C., Gray V., Rue L., Woodgett J., Dedhar S.** "Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. Sep 15;95(19):11211-6.
- Dominguez D., Montserrat-Sentis B., Virgos-Soler A., Guaita S., Grueso J., Porta M., Puig I., Baulida J., Franci C., Garcia de Herreros A.** "Phosphorylation regulates the subcellular

- location and activity of the snail transcriptional repressor". *Mol Cell Biol.* 2003. Jul; 23(14):5078-89.
- Eisaki A., Kuroda H., Fukui A., Asashima M.** "XSIP1, a member of two-handed zinc finger proteins, induced anterior neural markers in *Xenopus laevis* animal cap". *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 . Apr 29; 271(1):151-7.
- Ellenrieder V., Hendler S.F., Boeck W., Seufferlein T., Menke A., Ruhland C., Adler G., Gress T.M.** "Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation". *Cancer Res.* 2001. May 15; 61(10):4222-8.
- Englert C., Hou X., Maheswaran S., Bennett P., Ngwu C., Re G.G., Garvin A.J., Rosner M.R., Haber D.A.** "WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis". *EMBO J.* 1995. Oct 2; 14(19):4662-75.
- Fambrough D., McClure K., Kazlauskas A., Lander E.S.** "Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes". *Cell.* 1999. Jun 11; 97(6):727-41.
- Fearon E.R., Vogelstein B.** "A genetic model for colorectal tumorigenesis". *Cell.*1990. 61:759-67.
- Gary D.S., Milhavet O., Camandola S., Mattson M.P.** "Essential role for integrin linked kinase in Akt-mediated integrin survival signaling in hippocampal neurons". *J Neurochem.* 2003. Feb; 84(4):878-90.
- Gessler M., Poustka A., Cavenee W., Neve R.L., Orkin S.H., Bruns G.A.** "Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping". *Nature.* 1990. Feb 22;343(6260):774-8.
- Giroldi L.A., Bringuier P.P., de Weijert M., Jansen C., van Bokhoven A., Schalken J.A.** "Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression". *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Dec 18;241(2):453-8.
- Gotzmann J., Mikula M., Eger A., Schulte-Hermann R., Foisner R., Beug H., Mikulits W.** "Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis". *Mutat Res.* 2004. Jan; 566(1):9-20.

- Grande M., Franzen A., Karlsson J.O., Ericson L.E., Heldin N.E., Nilsson M.** "Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes". *Cell Sci.* 2002. Nov 15; 115(Pt 22):4227-36.
- Gray S., Levine M.** "Short-range transcriptional repressors mediate both quenching and direct repression within complex loci in *Drosophila*". *Genes Dev.* 1996. Mar 15; 10(6):700-10.
- Gray S., Szymanski P., Levine M.** "Short-range repression permits multiple enhancers to function autonomously within a complex promoter". *Genes Dev.* 1994. Aug 1; 8(15):1829-38.
- Grille S.J., Bellacosa A., Upson J., Klein-Szanto A.J., van Roy F., Lee-Kwon W., Donowitz M., Tsichlis P.N., Larue L.** "The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines". *Cancer Res.* 2003. May 1; 63(9):2172-8.
- Grooteclaes M.L., Frisch S.M.** "Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis". *Oncogene.* 2000. Aug 3; 19(33):3823-8.
- Haber D.A., Buckler A.J., Glaser T., Call K.M., Pelletier J., Sohn R.L., Douglass E.C., Housman D.E.** "An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor". *Cell.* 1990. Jun 29;61(7):1257-69.
- Hannigan G.E., Leung-Hagesteijn C., Fitz-Gibbon L., Coppolino M.G., Radeva G., Filmus J., Bell J.C., Dedhar S.** "Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase". *Nature.* 1996. Jan 4; 379(6560):91-6.
- Harrison S.M., Houzelstein D., Dunwoodie S.L., Beddington R.S.** "Sp5, a new member of the Sp1 family, is dynamically expressed during development and genetically interacts with Brachyury". *Dev Biol.* 2000. Nov 15; 227(2):358-72.
- Hastie N.D.** "The genetics of Wilms' tumor--a case of disrupted development". *Annu Rev Genet.* 1994. 28:523-58.
- Hay E.D.** "An overview of epithelio-mesenchymal transformation". *Acta Anat (Basel).* 1995. 154(1):8-20.
- He T.C., Sparks A.B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L.T., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W.** "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway". *Science.* 1998. Sep 4;281(5382):1509-12.

- Hecht J.L., Lee B.H., Pinkus J.L., Pinkus G.S.** "The value of Wilms tumor susceptibility gene 1 in cytologic preparations as a marker for malignant mesothelioma". *Cancer*. 2002. Apr 25; 96(2):105-9.
- Hemavathy K., Guru S.C., Harris J., Chen J.D., Ip Y.T.** "Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription". *Mol Cell Biol*. 2000. Jul; 20(14):5087-95.
- Hoschuetzky H., Aberle H., Kemler R.** "Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor". *J Cell Biol*. 1994. Dec; 127(5):1375-80.
- Hosono S., Gross I., English M.A., Hajra K.M., Fearon E.R., Licht J.D.** "E-cadherin is a WT1 target gene". *J. Biol. Chem*. 2000. 275(15), 10943-10953.
- Hosono S., Luo X., Hyink D.P., Schnapp L.M., Wilson P.D., Burrow C.R., Reddy J.C., Atweh G.F., Licht J.D.** "WT1 expression induces features of renal epithelial differentiation in mesenchymal fibroblasts". *Oncogene*. 1999. Jan 14;18(2):417-27.
- Hovanes K., Li T.W., Munguia J.E., Truong T., Milovanovic T., Lawrence Marsh J., Holcombe R.F., Waterman M.L.** "Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer". *Nat Genet*. 2001. May; 28(1):53-7.
- Ilyas M.** "Adhesion molecule expression in breast cancer: the phoenix in tumour metastasis?". *J Pathol*. 2000. Jan; 190(1):3-5.
- Inoue K., Ogawa H., Sonoda Y., Kimura T., Sakabe H., Oka Y., Miyake S., Tamaki H., Oji Y., Yamagami T., Tatekawa T., Soma T., Kishimoto T., Sugiyama H.** "Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia". *Blood*. 1997. Feb 15; 89(4):1405-12.
- Ip Y.T., Gridley T.** "Cell movements during gastrulation: snail dependent and independent pathways". *Curr Opin Genet Dev*. 2002. Aug; 12(4):423-9.
- Ip Y.T., Park R.E., Kosman D., Yazdanbakhsh K., Levine M.** "Dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the Drosophila embryo". *Genes Dev*. 1992. Aug; 6(8):1518-30.
- Janda E., Lehmann K., Killisch I., Jechlinger M., Herzig M., Downward J., Beug H., Grunert S.** "Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways". *J Cell Biol*. 2002. Jan 21; 156(2):299-313.

- Ji X., Woodard A.S., Rimm D.L., Fearon E.R.** "Transcriptional defects underlie loss of E-cadherin expression in breast cancer". *Cell Growth Differ.* 1997. Jul; 8(7):773-8.
- Jiao W., Miyazaki K., Kitajima Y.** "Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo". *Br J Cancer.* 2002. Jan 7; 86(1):98-101.
- Kang Y., Massague J.** "Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis". *Cell.* 2004 Aug 6; 118(3):277-9.
- Kataoka H., Murayama T., Yokode M., Mori S., Sano H., Ozaki H., Yokota Y., Nishikawa S., Kita T.** "A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs". *Nucleic Acids Res.* 2000. Jan 15; 28(2):626-33.
- Keleher C.A., Redd M.J., Schultz J., Carlson M., Johnson A.D.** "Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast". *Cell.* 1992. Feb 21; 68(4):709-19.
- Kemler R.** "From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion". *Trends Genet.* 1993. Sep; 9(9):317-21.
- Knight R.D., Shimeld S.M.** "Identification of conserved C2H2 zinc-finger gene families in the Bilateria". *Genome Biol.* 2001. 2(5):RESEARCH0016. Epub 2001 Apr 24.
- Kovarik A., Peat N., Wilson D., Gendler S.J., Taylor-Papadimitriou J.** "Analysis of the tissue-specific promoter of the MUC1 gene". *J Biol Chem.* 1993. May 5; 268(13):9917-26.
- Lacatena R.M., Cesareni G.** "Base pairing of RNA I with its complementary sequence in the primer precursor inhibits ColE1 replication". *Nature.* 1981. Dec 17; 294(5842):623-6.
- Lai Z.C., Fortini M.E., Rubin G.M.** "The embryonic expression patterns of zfh-1 and zfh-2, two Drosophila genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins". *Mech Dev.* 1991. Jun; 34(2-3):123-34.
- Lee S.B., Haber D.A.** "Wilms tumor and the WT1 gene". *Exp Cell Res.* 2001. Mar 10; 264(1):74-99.
- Lee T.H., Pelletier J.** "Functional characterization of WT1 binding sites within the human vitamin D receptor gene promoter". *Physiol Genomics.* 2001. Dec 21; 7(2):187-200.
- Lehner B., Williams G., Campbell R.D., Sanderson C.M.** "Antisense transcripts in the human genome". *Trends Genet.* 2002. Feb; 18(2):63-5.

- Leptin M.** "Twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development". *Genes Dev.* 1991. Sep; 5(9):1568-76.
- Machin G.A., McCaughey W.T.** "A new precursor lesion of Wilms' tumour (nephroblastoma): intralobar multifocal nephroblastomatosis". *Histopathology.* 1984. Jan;8(1):35-53.
- Marsden M.D., Collins J.E., Greenwood M.D., Adams M.J., Fleming T.P., Magee A.I., Buxton R.S.** "Cloning and transcriptional analysis of the promoter of the human type 2 desmocollin gene (DSC2)". *Gene.* 1997. Feb 28; 186(2):237-47.
- Mauhin V., Lutz Y., Dennefeld C., Alberga A.** "Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL". *Nucleic Acids Res.* 1993. Aug 25; 21(17):3951-7.
- Maurer U., Jehan F., Englert C., Hubinger G., Weidmann E., DeLuca H.F., Bergmann L.** "The Wilms' tumor gene product (WT1) modulates the response to 1,25-dihydroxyvitamin D3 by induction of the vitamin D receptor". *J Biol Chem.* 2001. Feb 9; 276(6):3727-32.
- Mayo M.W., Wang C.Y., Drouin S.S., Madrid L.V., Marshall A.F., Reed J.C., Weissman B.E., Baldwin A.S.** "WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the *bcl-2* proto-oncogene". *EMBO J.* 1999. Jul 15; 18(14):3990-4003.
- Mayor R., Essex L.J., Bennett M.F., Sargent M.G.** "Distinct elements of the *xsna* promoter are required for mesodermal and ectodermal expression". *Development.* 1993. Nov; 119(3):661-71.
- Menssen H.D., Bertelmann E., Bartelt S., Schmidt R.A., Pecher G., Schramm K., Thiel E.** "Wilms' tumor gene (WT1) expression in lung cancer, colon cancer and glioblastoma cell lines compared to freshly isolated tumor specimens". *J Cancer Res Clin Oncol.* 2000. Apr; 126(4):226-32.
- Miravet S., Piedra J., Castano J., Raurell I., Franci C., Dunach M., Garcia de Herreros A.** "Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription". *Mol Cell Biol.* 2003. Oct;23(20):7391-402.
- Nakayama H., Scott I.C., Cross J.C.** "The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor". *Dev Biol.* 1998. Jul 1; 199(1):150-63.

- Nelles L., Van de Putte T., van Grunsven L., Huylebroeck D., Verschueren K.** "Organization of the mouse Zfhx1b gene encoding the two-handed zinc finger repressor Smad-interacting protein-1". *Genomics*. 2003. Oct; 82(4):460-9.
- Nibu Y., Zhang H., Bajor E., Barolo S., Small S., Levine M.** "dCtBP mediates transcriptional repression by Knirps, Kruppel and Snail in the Drosophila embryo". *EMBO J*. 1998. Dec 1; 17(23):7009-20.
- Nieto M.A.** "The snail superfamily of zinc-finger transcription factors". *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002. Mar; 3(3):155-66.
- Nothias J.Y., Majumder S., Kaneko K.J., DePamphilis M.L.** "Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development". *J Biol Chem*. 1995. Sep 22; 270(38):22077-80.
- Novak A., Hsu S.C., Leung-Hagesteijn C., Radeva G., Papkoff J., Montesano R., Roskelley C., Grosschedl R., Dedhar S.** "Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. Apr 14; 95(8):4374-9.
- Oda H., Tsukita S., Takeichi M.** "Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during Drosophila gastrulation". *Dev Biol*. 1998. Nov 15; 203(2):435-50.
- Oji Y., Miyoshi S., Maeda H., Hayashi S., Tamaki H., Nakatsuka S., Yao M., Takahashi E., Nakano Y., Hirabayashi H., Shintani Y., Oka Y., Tsuboi A., Hosen N., Asada M., Fujioka T., Murakami M., Kanato K., Motomura M., Kim E.H., Kawakami M., Ikegame K., Ogawa H., Aozasa K., Kawase I., Sugiyama H.** "Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers". *Int J Cancer*. 2002. Jul 20; 100(3):297-303.
- Ozes O.N., Mayo L.D., Gustin J.A., Pfeffer S.R., Pfeffer L.M., Donner D.B.** "NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase". *Nature*. 1999. Sep 2; 401(6748):82-5.
- Palmer H.G., Gonzalez-Sancho J.M., Espada J., Berciano M.T., Puig I., Baulida J., Quintanilla M., Cano A., de Herreros A.G., Lafarga M., Munoz A.** "Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling". *J Cell Biol*. 2001. Jul 23; 154(2):369-87.
- Palmer H.G., Larriba M.J., Garcia J.M., Ordonez-Moran P., Pena C., Peiro S., Puig I., Rodriguez R., de la Fuente R., Bernad A., Pollan M., Bonilla F., Gamallo C., de**

- Herreros A.G., Munoz A.** "The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer". *Nat Med.* 2004 Sep; 10(9):917-9.
- Park S., Schalling M., Bernard A., Maheswaran S., Shipley G.C., Roberts D., Fletcher J., Shipman R., Rheinwald J., Demetri G., et al.** "The Wilms tumour gene WT1 is expressed in murine mesoderm-derived tissues and mutated in a human mesothelioma". *Nat Genet.* 1993. Aug; 4(4):415-20.
- Paznekas W.A., Okajima K., Schertzer M., Wood S., Jabs E.W.** "Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAI1) and a related processed pseudogene (SNAI1P)". *Genomics.* 1999. Nov 15; 62(1):42-9.
- Peinado H., Portillo F., Cano A.** "Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis". *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):365-75.
- Peinado H., Quintanilla M., Cano A.** "Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions". *J Biol Chem.* 2003. Jun 6; 278(23):21113-23.
- Pelletier J., Bruening W., Kashtan C.E., Mauer S.M., Manivel J.C., Striegel J.E., Houghton D.C., Junien C., Habib R., Fouser L., et al.** "Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome". *Cell.* 1991. Oct 18; 67(2):437-47.
- Perez-Moreno M.A., Locascio A., Rodrigo I., Dhondt G., Portillo F., Nieto M.A., Cano A.** "A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions". *J Biol Chem.* 2001, Jul 20; 276(29):27424-31.
- Perl A.K., Wilgenbus P., Dahl U., Semb H., Christofori G.** "A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma". *Nature.* 1998. Mar 12; 392(6672):190-3.
- Pickering B.M., Willis A.E.** "The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease". *Semin Cell Dev Biol.* 2005. Feb; 16(1):39-47.
- Poser I., Dominguez D., de Herreros A.G., Varnai A., Buettner R., Bosserhoff A.K.** "Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail". *J Biol Chem.* 2001. Jul 6; 276(27):24661-6.
- Postigo A.A., Dean D.C.** "Differential expression and function of members of the zfh-1 family of zinc finger/homeodomain repressors". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000. Jun 6; 97(12):6391-6.

- Pritchard-Jones K., Fleming S., Davidson D., Bickmore W., Porteous D., Gosden C., Bard J., Buckler A., Pelletier J., Housman D., et al.** "The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development". *Nature*. 1990. Jul 12; 346(6280):194-7.
- Rashid M.G., Sanda M.G., Vallorosi C.J., Rios-Doria J., Rubin M.A., Day M.L.** "Posttranslational truncation and inactivation of human E-cadherin distinguishes prostate cancer from matched normal prostate". *Cancer Res*. 2001 Jan 15; 61(2):489-92.
- Rommel C., Hafen E.** "Ras--a versatile cellular switch". *Curr Opin Genet Dev*. 1998. Aug; 8(4):412-8.
- Rubinfeld B., Albert I., Porfiri E., Fiol C., Munemitsu S., Polakis P.** "Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly". *Science*. 1996. May 17;272(5264):1023-6.
- Savagner P.** "Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition". *Bioessays*. 2001. Oct; 23(10):912-23.
- Sefton M., Sanchez S., Nieto M.A.** "Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo". *Development*. 1998. Aug; 125(16):3111-21.
- Shimoyama Y., Takeda H., Yoshihara S., Kitajima M., Hirohashi S.** "Biochemical characterization and functional analysis of two type II classic cadherins, cadherin-6 and -14, and comparison with E-cadherin". *J Biol Chem*. 1999. Apr 23; 274(17):11987-94.
- Shiozaki H., Oka H., Inoue M., Tamura S., Monden M.** "E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells". *Cancer*. 1996. Apr 15; 77(8 Suppl):1605-13.
- Shook D., Keller R.** "Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development". *Mech Dev*. 2003. Nov; 120(11):1351-83.
- Shtutman M., Zhurinsky J., Simcha I., Albanese C., D'Amico M., Pestell R., Ben-Ze'ev A.** "The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. May 11; 96(10):5522-7.
- Simons R.W., Kleckner N.** "Biological regulation by antisense RNA in prokaryotes". *Annu Rev Genet*. 1988. 22:567-600.

- Somasiri A., Howarth A., Goswami D., Dedhar S., Roskelley C.D.** "Overexpression of the integrin-linked kinase mesenchymally transforms mammary epithelial cells". *J Cell Sci.* 2001 Mar;114(Pt 6):1125-36.
- Spagnoli F.M., Cicchini C., Tripodi M., Weiss M.C.** "Inhibition of MMH (Met murine hepatocyte) cell differentiation by TGF(beta) is abrogated by pre-treatment with the heritable differentiation effector FGF1". *J Cell Sci.* 2000. Oct; 113 (Pt 20):3639-47.
- Sparks A.B., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W.** "Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer". *Cancer Res.* 1998. Mar 15;58(6):1130-4.
- Stewart D.B., Barth A.I., Nelson W.J.** "Differential regulation of endogenous cadherin expression in Madin-Darby canine kidney cells by cell-cell adhesion and activation of beta -catenin signaling". *J Biol Chem.* 2000. Jul 7; 275(27):20707-16.
- Takagi T., Moribe H., Kondoh H., Higashi Y.** "DeltaEF1, a zinc finger and homeodomain transcription factor, is required for skeleton patterning in multiple lineages". *Development.* 1998. Jan; 125(1):21-31.
- Takeichi M.** "The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis". *Development.* 1988. Apr; 102(4):639-55.
- Tan C., Costello P., Sanghera J., Dominguez D., Baulida J., de Herreros A.G., Dedhar S.** "Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells". *Oncogene.* 2001. Jan 4; 20(1):133-40.
- Tetsu O., McCormick F.** "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells". *Nature.* 1999. Apr 1; 398(6726):422-6.
- Thiery J.P., Chopin D.** "Epithelial cell plasticity in development and tumor progression". *Cancer Metastasis Rev.* 1999. 18(1):31-42.
- Thiery JP.** "Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies". *Curr Opin Cell Biol.* 2003. Dec; 15(6):740-6.
- Thiery JP.** "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression". *Nat Rev Cancer.* 2002. Jun; 2(6):442-54.

- Tuna M., Chavez-Reyes A., Tari A.M.** "HER2/neu increases the expression of Wilms' Tumor 1 (WT1) protein to stimulate S-phase proliferation and inhibit apoptosis in breast cancer cells". *Oncogene*. 2005. Feb 24; 24(9):1648-52.
- Vandewalle B., Adenis A., Hornez L., Revillion F., Lefebvre J.** "1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in normal and malignant human colorectal tissues". *Cancer Lett.* 1994. Oct 28; 86(1):67-73.
- Vanhée-Brossollet C., Vaquero C.** "Do natural antisense transcripts make sense in eukaryotes?". *Gene*. 1998. Apr 28; 211(1):1-9.
- Vestweber D., Kemler R., Ekblom P.** "Cell-adhesion molecule uvomorulin during kidney development". *Dev Biol.* 1985. Nov; 112(1):213-21.
- Villard J.** "Transcription regulation and human diseases". *Swiss Med Wkly.* 2004. Oct 2; 134(39-40):571-9.
- Vleminckx K., Vakaet L. Jr., Mareel M., Fiers W., van Roy F.** "Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role". *Cell*. 1991. Jul 12; 66(1):107-19.
- Wagner E.G., Simons R.W.** "Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids". *Annu Rev Microbiol.* 1994. 48:713-42.
- Yang J., Mani S.A., Donaher J.L., Ramaswamy S., Itzykson R.A., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg R.A.** "Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis". *Cell*. 2004. Jun 25; 117(7):927-39.
- Yao Y., Li W., Wu J., Germann U.A., Su M.S., Kuida K., Boucher D.M.** "Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. Oct 28; 100(22):12759-64.
- Yokoyama K., Kamata N., Hayashi E., Hoteiya T., Ueda N., Fujimoto R., Nagayama M.** "Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro". *Oral Oncol.* 2001. Jan; 37(1):65-71.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.