

REGULACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD DE LA β -CATENINA POR FOSFORILACIÓN DE RESIDUOS TIROSINA

Memoria presentada por **Jose Piedra Bueno**
para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas.

Trabajo realizado en la Unitat de Biofísica del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona bajo la dirección de la Dra. Mireia Duñach Masjuan y del Dr. Antonio García de Herreros Madueño.

Mireia Duñach Masjuan

Unitat de Biofísica
Dept. Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona

Antonio García de Herreros Madueño

Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular
Inst. Municipal d'Investigació Mèdica
Universitat Pompeu Fabra

Bellaterra, 20 de enero de 2003

Este 21 de septiembre **L**legó el otoño más duro
de toda mi vida. El recuerdo del maravilloso verano
del que aprovechamos juntos cada instante
me da fuerzas para seguir...
Sé que puedes verme y
quiero que te sientas orgulloso.
TQ ∞

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

aa	aminoácido
Amp	ampicilina
ATP	adenosintrifosfato
BSA	albúmina de suero bovino
CytoEcad	dominio citosólico de E-cadherina
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilendiaminotetraacetato de sodio
EGF	factor de crecimiento epidérmico
GN	genisteína
GST	glutation-S-transferasa
Hb	herbimicina
IPTG	β -D-isopropil-tiogalactopiranosido
K_a	constante de afinidad
kDa	kilodalton
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
mAb	anticuerpo monoclonal
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	par de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PS	proteasa PreScission™
SDS	dodecilsulfato de sodio
St	estándar, muestra de referencia
TAE	tampón Tris/ acetato/ EDTA
TBP	proteína de unión a cajas TATA
TBS	tampón Tris salino
TE	tampón Tris/ EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
TSS	solución de transformación
TTBS	tampón Tris salino con 0,2% de Triton X-100
Tyr(P)	fosfotirosina
WT	salvaje (<i>wild type</i>)

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. LAS UNIONES CELULARES	1
1.1. LAS UNIONES ADHERENTES	3
1.1.1. Las cadherinas	4
1.1.1.1. E-cadherina	6
1.1.2. Las cateninas	8
1.1.2.1. α -catenina.....	8
1.1.2.2. β -catenina	10
1.1.2.3. p120-catenina (p120 ^{ctn}).....	14
1.1.3. Regulación del complejo cadherina-cateninas	17
1.1.3.1. Regulación a nivel transcripcional	17
1.1.3.2. Regulación post-transcripcional.....	18
II. OBJETIVOS	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
1. OBTENCIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN PROCARIOTAS	22
1.1. ESQUEMA GENERAL	22
1.2. CEPA DE <i>E. COLI</i>, CULTIVO BACTERIANO Y VECTOR UTILIZADO ..	23
1.2.1. Cepa bacteriana	23
1.2.2. Medio de cultivo bacteriano	24
1.2.3. Vector	24
1.3. MÉTODOS DE CLONAJE DE DNA.....	25
1.3.1. Extracción del DNA plasmídico (método de lisis alcalina).....	25
1.3.2. Amplificación de fragmentos de DNA por PCR.	25
1.3.3. Digestión de DNA	26
1.3.4. Defosforilación de vectores	27
1.3.5. Relleno con la polimerasa Klenow.....	27
1.3.6. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	27
1.3.7. Extracción del DNA del gel de agarosa	28
1.3.8. Ligación	28
1.3.9. Transformación en XL1-Blue	28
1.3.10. Obtención de los mutantes puntuales	29
1.3.11. Secuenciación de DNA	29

1.4. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	30
1.4.1. Purificación por cromatografía de afinidad	30
1.4.2. Corte entre la GST y la proteína recombinante	31
1.4.3. Cuantificación de proteínas	31
2. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN EUCARIOTAS	32
2.1. LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS	32
2.1.1. Cultivo celular	33
2.1.2. Contaje de células	33
2.1.3. Congelación y almacenaje	33
2.2. VECTORES	34
2.3. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS	35
2.4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES	35
2.5. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS EXPRESADOS EN EUCARIOTAS	35
3. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS	36
3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i>)	36
3.2. Electrotransferencia de proteínas. <i>Western Blot</i>	36
4. ENSAYOS PROTEÍNA QUINASA	38
5. ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA	39
5.1. Interacción directa (sólo proteínas recombinantes purificadas)	39
5.2. Ensayo de <i>pull-down</i>	41
5.3. Ensayo de purificación con níquel-agarosa	41
5.4. Inmunoprecipitación	41
5.5. Determinación de la constante de afinidad de una interacción proteína-proteína. Representación de Scatchard	42
6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL	42
IV. RESULTADOS	44
1. INTERACCIÓN E-CADHERINA-β-CATENINA y E-CADHERINA-p120^{ctn}	44
1.1. Expresión de los distintos productos recombinantes	44
1.2. La tirosina quinasa pp60 ^{c-src} fosforila <i>in vitro</i> a β -catenina y p120 ^{ctn}	45
1.3. La fosforilación <i>in vitro</i> de β -catenina por c-src, afecta negativamente a su interacción con E-cadherina	46

1.4. La fosforilación <i>in vitro</i> de p120 ^{ctn} por pp60 ^{c-src} , afecta positivamente a su interacción con E-cadherina.....	48
1.5. β -catenina y p120 ^{ctn} (fosforiladas o no por pp60 ^{c-src}) no compiten por unirse al dominio citosólico de E-cadherina	49
1.6. Las tirosinas 86 y 654 de β -catenina son fosforiladas por pp60 ^{c-src} ..	51
1.7. Interacción del fragmento citosólico de E-cadherina con mutantes de β -catenina de las tirosinas 86 y 654. La modificación de la Tyr-654 inhibe la unión E-cadherina/ β -catenina <i>in vitro</i>	52
1.8. La fosforilación de la Y654 <i>in vivo</i> también inhibe la interacción E-cadherina/ β -catenina	56
1.9. El Receptor de EGF fosforila activamente la tirosina 654 de β -catenina	57
2. INTERACCIÓN α-CATENINA-β-CATENINA.....	59
2.1. En la zona de β -catenina que se une a α -catenina únicamente hay una tirosina (Tyr-142)	59
2.2. Las tirosina-quinazas Fer o Fyn fosforilan la Tyr142 <i>in vitro</i>	59
2.3. La fosforilación de la tirosina 142 disminuye la interacción β -catenina/ α -catenina <i>in vitro</i>	61
2.4. La fosforilación de la tirosina 142 disminuye la interacción β -catenina/ α -catenina <i>in vivo</i>	62
2.5. IEC18 K-ras: un sistema <i>in vivo</i> con interacciones E-cadherina/ β -catenina y β -catenina/ α -catenina reducidas.....	63
2.6. Las tirosinas 142 y 654 de β -catenina se fosforilan en las IEC18 K-ras.	65
2.7. Las quinazas Fer y Fyn se activan en las IEC18 K-ras	66
2.8. Fer y Fyn interaccionan con p120 ^{ctn}	68
2.9. p120 ^{ctn} también se une a la quinasa Yes (pero sólo a la forma activa)	70
2.10. Yes se activa en las IEC K-ras y activa a su vez a Fyn y Fer.....	71
3. LA FOSFORILACIÓN DE β-CATENINA MODIFICA SU ESTRUCTURA Y SU INTERACCIÓN CON OTROS FACTORES.....	74
3.1. Interacción β -catenina-TBP <i>in vitro</i>	75
3.2. Interacción β -catenina-TBP <i>in vivo</i> y análisis de los niveles de transcripción mediada por β -catenina-Tcf-4	77
3.3. La fosforilación regula la unión del dominio C-terminal de β -catenina y, por extensión, la interacción de β -catenina a distintas proteínas	78

3.3.1. Interacción de los dominios terminales con la región central de β -catenina	78
3.3.2. La interacción entre el dominio central y el C-terminal afecta a la asociación de β -catenina con otras proteínas	81
V. DISCUSIÓN	86
1. Interacción β-catenina-E-cadherina	86
2. Interacción β-catenina-α-catenina	89
3. Interacción p120^{ctn}-E-cadherina	91
4. Regulación de las uniones adherentes por K-ras	92
5. El papel de p120^{ctn} como sitio de anclaje de quinasas	94
6. Interacción β-catenina-TBP y actividad transcripcional de β-catenina	97
7. Implicaciones estructurales de la fosforilación de β-catenina	98
VI. CONCLUSIONES	105
VII. BIBLIOGRAFIA	107

I. INTRODUCCIÓN

1. LAS UNIONES CELULARES

Las uniones celulares se dan en los puntos de contacto célula-célula y célula-matriz en todos los tejidos, pero son especialmente abundantes e importantes en el tejido epitelial. Formalmente se caracterizan por tener proteínas transmembrana que se unen al citoesqueleto a través de proteínas adaptadoras. Funcionalmente las uniones celulares se distinguen en:

- ❖ **uniones estrechas** (*tight junctions*)
- ❖ **uniones de anclaje**
 - **a filamentos de actina**
 - **uniones adherentes** (célula-célula)
 - **contactos focales** (célula-matriz)
 - **a filamentos intermedios**
 - **desmosomas** (célula-célula)
 - **hemidesmosomas** (célula matriz)
- ❖ **otras** (*gap junctions*, *dystroglycan complex* o uniones mediadas por proteínas de la familia ERM –ezrina/radixina/moesina-).

Las uniones estrechas sellan el espacio entre células adyacentes de forma que impiden el paso de pequeñas moléculas entre ellas. Además, impiden la difusión de lípidos y proteínas entre distintos dominios de la membrana plasmática contribuyendo al establecimiento de polaridad celular. La integridad de las uniones estrechas es dependiente de calcio extracelular. Encontramos en ellas proteínas transmembrana como las ZO-1 y ZO-2 que unen estrechamente proteínas transmembrana (claudina, ocludina) de células adyacentes por su región extracelular e interaccionan por su región citoplásmica con el citoesqueleto de actina (Anderson, et al. 1993).

Las uniones adherentes contienen cadherinas, cuyos dominios extracelulares median interacciones homofílicas, dependientes de calcio extracelular, con cadherinas de células adyacentes, proporcionando especificidad tisular a la unión. El dominio citoplásmico de las cadherinas

interacciona con el citoesqueleto de actina (F-actina) indirectamente, a través de su unión con β -catenina y α -catenina (Nagafuchi, 2001).

En los contactos focales proteínas transmembrana de la familia de las integrinas establecen la unión de la célula a la matriz extracelular. Por el lado citoplásmico, mediando la unión entre integrinas y filamentos de actina, se encuentran proteínas como talina, paxilina, filamina o α -actinina, acompañadas de otras como vinculina, tensina o FAK (*focal adhesion kinase*) (Liu et al. 2000).

Los desmosomas contienen desmogleína y desmocolina (cadherinas desmosómicas) que en contraposición a las cadherinas clásicas de las uniones adherentes, pueden establecer interacciones heterotípicas con cadherinas de células adyacentes e intracelularmente conectan con la red de filamentos intermedios. La unión entre las cadherinas desmosómicas y los filamentos intermedios puede darse de distintos modos. En todos ellos la Desmoplakina (DP) interacciona directamente con los filamentos intermedios. Entre las cadherinas y la DP pueden encontrarse plakoglobina o plakofilina (homólogas de β -catenina) (Kowalczyk et al. 1999).

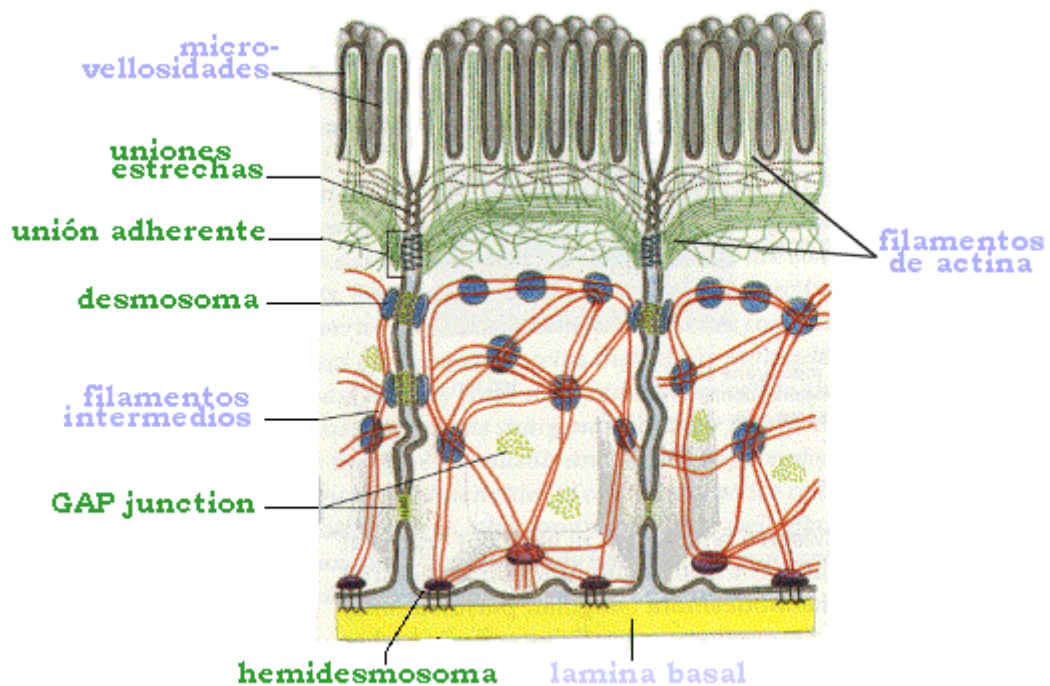


Fig.1 Representación de las distintas uniones celulares que se establecen en células epiteliales (adaptado de Alberts et al. 1994).

Los hemidesmosomas, morfológicamente similares a los desmosomas, conectan la superficie basal de las células epiteliales con la *lamina basal* (tipo de matriz extracelular) sobre la que yacen. Las proteínas transmembrana en hemidesmosomas son principalmente integrinas (p.e. integrina $\alpha_6\beta_4$) (Turner and Burridge, 1991).

1.1 LAS UNIONES ADHERENTES

En casi la totalidad de los tejidos humanos, en forma de contactos puntuales o asociadas en líneas o cintas alrededor de las células (*adhesion belts*), las uniones adherentes se establecen entre células adyacentes para poner en contacto sus citoesqueletos y así conferir resistencia mecánica al tejido a la vez que proporcionan puntos de anclaje para los propios movimientos del citoesqueleto. El establecimiento de las uniones adherentes es necesario para que se puedan formar los otros tipos principales de uniones célula-célula: uniones estrechas y desmosomas.

Las proteínas transmembrana que forman contactos homotípicos en las uniones adherentes son las cadherinas. La principal cadherina en tejido epitelial es la E-cadherina que, para su correcta funcionalidad requiere interactuar con los filamentos de actina del citoesqueleto. Esta interacción se da a través de unas proteínas citosólicas denominadas cateninas: α y β (Cowin and Burke, 1996). Otra catenina, la p120^{ctn}, también interacciona con E-cadherina (Daniel and Reynolds, 1995) aunque su función exacta aún no ha sido aclarada.

Cada día está más claro que las uniones adherentes van más allá de la mera adhesión estructural o mecánica de los tejidos. Por un lado facilitan el establecimiento de señales intercelulares (vía uniones *GAP*) por el simple hecho del acercamiento entre células; pero por otro lado, la formación o rotura de las uniones está íntimamente ligada a los cambios profundos que se dan en el citoesqueleto en los procesos normales de desarrollo y morfogénesis de los

tejidos (cambios en la forma, motilidad o polaridad celular) (Jamora and Fuchs, 2002).

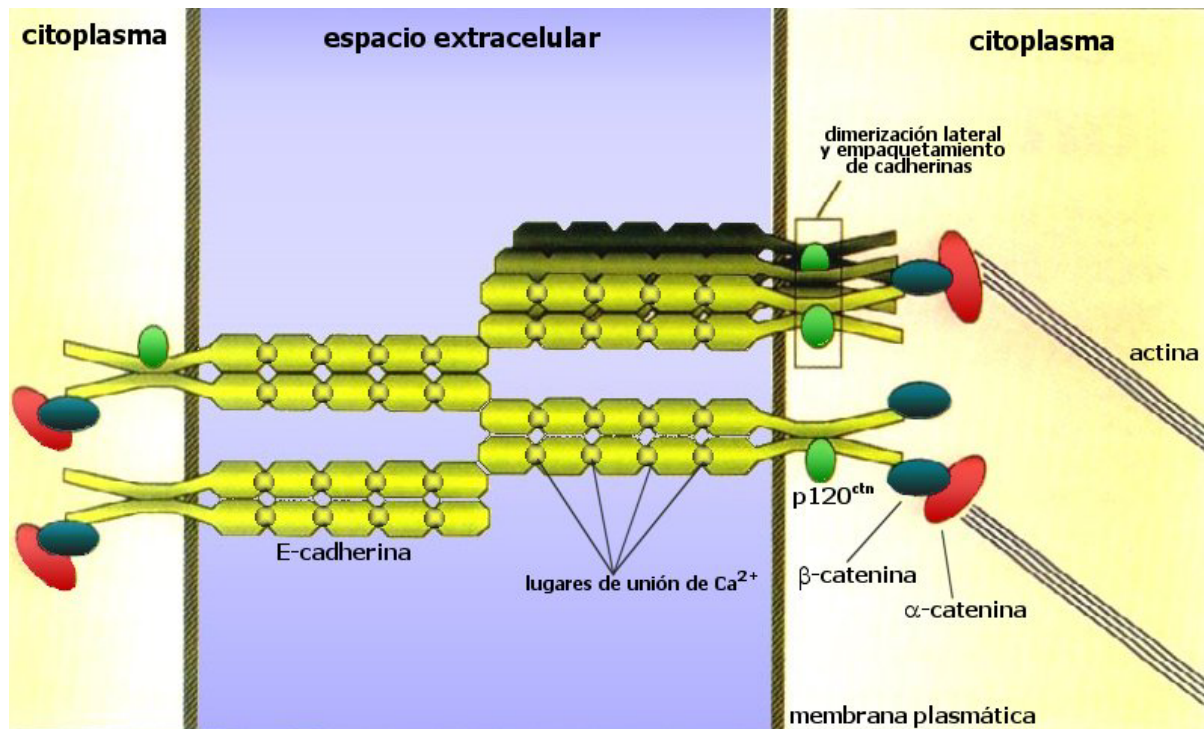


Fig.2 Representación esquemática de una unión adherente en el epitelio (adaptado de Vleminckx and Kemler, 1999)

1.1.1 Las cadherinas

Las cadherinas median adhesión célula-célula en todos los tejidos sólidos del cuerpo. Como su nombre indica, esta unión es calcio-dependiente (*ca-dherin*). Las primeras tres cadherinas descubiertas se nombraron de acuerdo con el tejido principal en el cual fueron encontradas: *E-cadherina* está presente en multitud de epitelios, *N-cadherina* en nervio o músculo y *P-cadherina* en células de la placenta o la epidermis. Todas se encuentran de forma transitoria en otros varios tejidos durante el desarrollo. Actualmente se conocen al menos treinta y toda célula de vertebrado parece expresar una o más cadherinas, cada una codificada por un gen independiente, en una combinación particular en cada tipo celular. Las cadherinas clásicas parecen haber evolucionado a partir de un gen común que se duplicó varias veces y migró a localizaciones cromosómicas diversas.

En los tejidos del embrión, las cadherinas son las principales moléculas de adhesión que mantienen las células unidas. Así, *in vitro*, retirando el calcio extracelular o tratando las células con anticuerpos anti-cadherina, el tejido se disocia, mientras que el tratamiento con anticuerpos contra otras moléculas de adhesión, no tienen efectos. *In vivo*, mutaciones que inactivan la función de las cadherinas impiden el desarrollo embrionario tardío (Takeichi, 1990).

Las cadherinas se caracterizan por ser glicoproteínas de 750-900 aminoácidos con un solo dominio transmembrana. El dominio extracelular supone la mayor parte de la cadena polipeptídica y generalmente se estructura en cinco dominios, de 100 residuos cada uno. Cuatro de estos subdominios son capaces de unir el calcio extracelular. En ausencia de calcio, la estructura global sufre un gran cambio conformacional y es degradada por enzimas proteolíticas (Shapiro et al. 1995; Overduin et al. 1995).

Las cadherinas suelen mediar adhesión célula-célula por un mecanismo homofílico. Transfectando una línea de fibroblastos (denominados *L cells*, que no expresan cadherinas y no se adhieren entre sí) con distintas clases de cadherinas y mezclando las células, se pudo comprobar como sólo las que expresan el mismo tipo de cadherina son capaces de agregarse entre sí (Takeichi, 1991).

La mayoría de las cadherinas, como la E-, N- o P-, funcionan como puentes transmembrana entre los citoesqueletos de las células que mantienen en contacto. La región citoplásmica –que consta de unos 150 aminoácidos– está altamente conservada entre estas cadherinas. La interacción de la cadherina con el citoesqueleto es imprescindible para el correcto establecimiento de las uniones adherentes: moléculas de E-cadherina sin el dominio citoplásmico son incapaces de mantener las células unidas. (Pokutta and Weis, 2002). Las cadherinas presentes en los desmosomas, tienen dominios citoplásmicos distintos e interaccionan con otros tipos de proteínas acopladoras, que a su vez interaccionan con filamentos intermedios de queratina en lugar de los de actina.

1.1.1.1 E-cadherina

E-cadherina es la primera cadherina en expresarse durante el desarrollo, donde participa en la compactación, un importante cambio morfológico que tiene lugar en las primeras divisiones del embrión (estado de ocho células). Su importancia en las primeras fases del desarrollo queda patente en ensayos donde embriones de ratón carentes del gen de E-cadherina no superan el cuarto día, la fase de blastocisto, por la incapacidad de formar epitelio trofotodermal (Larue et al. 1994). Su aparición y desaparición en estadíos posteriores también está íntimamente ligada a acontecimientos morfogénicos en los cuales los tejidos deban separarse selectivamente unos de otros.

La E-cadherina es la mejor cadherina caracterizada y la primera en ser descrita. Se concentra en las uniones adherentes de las células epiteliales maduras. Las cadherinas de una misma célula forman dímeros paralelos. Estudios bioquímicos con la cadherina de *Xenopus* (Brieher et al. 1996) indican que el dímero lateral es la unidad funcional del dominio extracelular de la cadherina. En presencia de calcio extracelular se establecen uniones homotípicas entre los extremos N-terminales de los dímeros de cadherina de células vecinas, constituyendo una especie de cremallera entre células.

El dominio citoplásmico, de unos 150 residuos, contiene el lugar de unión para β -catenina, con la que interacciona en proporción 1:1. La β -catenina, a su vez, actúa de puente entre la E-cadherina y la α -catenina. La α -catenina, que no puede interaccionar directamente con la cadherina, sí lo hace con componentes del citoesqueleto como la actina o la α -actinina (Aberle et al. 1996). Otras cateninas pueden interaccionar con el dominio citoplásmico de la cadherina, como es el caso de la p120^{ctn}. Esta catenina se une a la región contigua a la membrana de la E-cadherina y diversos autores (Yap et al. 1998) sugieren que la p120^{ctn} podría jugar un papel relevante en la regulación de la interacción y reagrupamiento lateral de las cadherinas, aunque este último punto aún no ha sido demostrado.

A parte de la mera función física de la E-cadherina en las uniones adherentes, el hecho de interaccionar directa o indirectamente con elementos

con una potencial actividad de transducción de señales (β -catenina, y tirosina quinasas como EGFR, erbB2 o Fer) amplía sus posibilidades funcionales, desde la adhesión celular y morfogénesis hasta la señalización y diferenciación.

Regulación de los niveles de E-cadherina. Claramente, una forma de reducir la fuerza de las uniones adherentes es disminuir la cantidad de E-cadherina disponible en la célula. De hecho, el paso limitante en la formación de los complejos de adhesión parece ser el nivel de expresión de E-cadherina (Gumbiner, 2000). La transcripción basal de E-cadherina, en las células epiteliales, está constitutivamente activada por un complejo transcripcional donde se combinan factores como RB, c-Myc o AP-2 (Batsche et al. 1998). Esta activación constitutiva se considera la base del fenotipo epitelial. Otros factores como el Wt-1 (Hosono et al. 2000) o el Receptor de Vitamina D (Palmer et al. 2001), también estimulan la expresión de E-cadherina. Factores nucleares como la *Smad Interacting Protein* (SIP1), E12/E47 o miembros de la familia de Snail, se unen al promotor de E-cadherina (en unas regiones del promotor denominadas *E-boxes*) e inhiben la transcripción de E-cadherina. La sobreexpresión en células epiteliales de Snail o E12/E47, comporta la pérdida de adhesión celular e induce transiciones epitelio-mesénquima en estas células (Batlle et al. 2000; Pérez-Moreno et al. 2001).

Mutaciones en el gen de la E-cadherina o hipermetilación de su promotor son mecanismos encontrados en diversos tumores, que también afectan negativamente a la expresión de E-cadherina y comprometen el mantenimiento de las uniones adherentes (Hirohashi, 1998). En general, E-cadherina es considerada como producto supresor de tumores, por su capacidad de interaccionar con β -catenina y limitar así la concentración de esta catenina libre en el citosol, y la sobreexpresión de E-cadherina afecta negativamente a procesos proliferativos (Orsulic et al. 1999). En tumores colo-rectales, la parte central del tumor presenta E-cadherina unida a β -catenina, pero el frente del tumor presenta la mayoría de la β -catenina en el núcleo e inapreciable expresión de E-cadherina (Brabletz et al. 2001). Otros autores han demostrado

que la pérdida de expresión de E-cadherina media la transición hacia metástasis, durante el proceso tumoral hacia la malignidad (Perl et al. 1998).

1.1.2 Las cateninas

Como se ha comentado, en las uniones adherentes, tres tipos de cateninas (α -, β - y p120-) median la interacción, de forma no covalente, del dominio citosólico de la E-cadherina con componentes del citoesqueleto de actina. De ellas, β - y p120-catenina interaccionan directamente con E-cadherina, mientras que α -catenina interacciona con β -catenina por un lado y elementos del citoesqueleto por otro (ver Figura 2). Otra catenina, denominada γ -catenina o plakoglobina, puede unirse también a cadherina aunque su localización preferencial es en los desmosomas. La participación de las cateninas es imprescindible para el establecimiento de las adhesiones entre células y son un importante punto de regulación de los complejos de adhesión. Defectos en la expresión o función de cateninas se asocian con pérdida de adhesión y metástasis (revisado en Beavon, 2000).

1.1.2.1 α -catenina

La α -catenina es una proteína citosólica de 102 kDa que contiene tres regiones de gran homología a vinculina (proteína que une F-actina). Tiene dos isoformas específicas de nervio y epitelio, denominadas N o E- α -catenina, generadas por *splicing* alternativo de su RNA (Hirano et al. 1992). Recientemente se ha caracterizado una tercera isoforma, denominada T- α -catenina, predominante en testículo y corazón (Janssens et al. 2001).

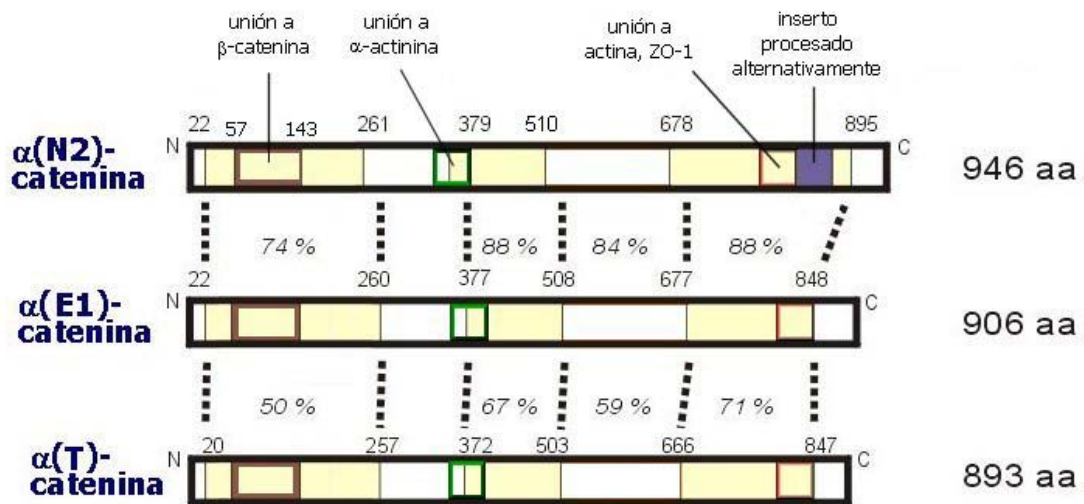


Fig.3 **Esquema de las tres isoformas conocidas de α-catenina:** N neural, E epitelial y T de testículo. En amarillo se indican los dominios principales de homología a Vinculina. Con recuadros coloreados se indican las zonas de unión a varias proteínas o el dominio que es objeto de *splicing* (adaptado de Yang et al. 2001; Janssens et al. 2001).

α-catenina se presenta como homodímero, en solución, que se disocia para unirse 1:1 con β-catenina a través de su dominio N-terminal (Koslov et al. 1997). Por su extremo opuesto, el C-terminal, puede interactuar directamente con la actina (Aberle, 1996). Aunque su principal papel es estructural, mediando la unión entre el complejo E-cadherina-β-catenina y el citoesqueleto, su acción se extiende también a procesos de señalización y proliferación celular (Ben-Ze'ev, 1999).

Niveles de expresión. La sobreexpresión de α-catenina, tiene efectos anti-proliferativos, inhibiendo básicamente la transcripción mediada por β-catenina; el exceso de α-catenina parece unir β-catenina libre e impedir que ésta interactúe en el núcleo con el factor de transcripción Tcf-4 (Giannini et al. 2000). La eliminación condicionada del gen de α-catenina induce hiperproliferación en células de la piel (Vasioukhin et al. 2001) y defectos en el gen de α-catenina, que conllevan importantes reducciones en la expresión de la proteína, se encuentran en varias líneas cancerosas (Hirano et al. 1992; Morton et al. 1993; Kallakury et al. 2001). Embriones de ratón sin α-catenina

mueren muy pronto, en la fase de blastocisto, de forma similar a los carentes de E-cadherina (Torres et al. 1997).

α -catenina y adhesión celular. Hay multitud de evidencias que indican que la participación de la α -catenina es imprescindible para el correcto establecimiento de las uniones adherentes. La expresión de α -catenina delecionada, incapaz de unir β -catenina y viceversa, de β -catenina delecionada incapaz de unirse a α -catenina, comporta la imposibilidad de formar uniones correctas (Bullions et al. 1997). La transfección, en células sin capacidad adhesiva, de una proteína quimérica constituida únicamente por parte de E-cadherina fusionada a un fragmento de α -catenina, es suficiente para conferir adhesión detectable en estas células (Imamura et al. 1999). Condiciones que inducen la disociación de α -catenina de los complejos de adhesión provocan la pérdida de los contactos celulares (Ozawa and Kemler, 1998a). La pérdida de α -catenina en las uniones adherentes mediada por competición directa con IQGAP1, un efector de las GTPasas Rac1 y Cdc42 –pertenecientes a la familia de Rho-, induce disociación celular (Fukata et al. 2001).

Unión de α -catenina a β -catenina o al citoesqueleto. La región N-terminal de α -catenina se une a β -catenina. La zona de α -catenina suficiente para esta interacción se limita a los aminoácidos 117-143 (Huber et al. 1997a). La resolución de la estructura tridimensional de un complejo constituido por los fragmentos N-terminales de α - y β -catenina, mostró además que los residuos de α -catenina del 57 al 81 son importantes para unir de forma completa la β -catenina (Pokutta and Weis, 2000). Los residuos del 82 al 279 constituyen el dominio de dimerización entre α -cateninas y más hacia el extremo C-terminal se median los contactos con el citoesqueleto. Estas interacciones pueden darse de forma directa con la F-actina o bien de forma indirecta a través de la asociación de α -catenina con proteínas que unen actina como vinculina, α -actinina, ZO-1 o ZO-2 (Nagafuchi, 2001). Las interacciones que α -catenina establece con el citoesqueleto varían específicamente según el tipo celular analizado.

1.1.2.2 β -catenina

La β -catenina es una proteína de 92 kDa cuya estructura primaria consta de un extremo amino-terminal de unos 149 aminoácidos, un cuerpo central de unos 525 aminoácidos que contiene 12 repeticiones de 42 aminoácidos, conocidas como repeticiones armadillo y una zona carboxilo terminal formada por unos 108 aminoácidos (Peifer et al. 1994).

El homólogo de β -catenina en *Drosophila* es Armadillo; proteína que participa en la vía de señalización que regula el establecimiento de la polaridad durante el desarrollo de la mosca (McCrea et al. 1991). Hasta el momento la β -catenina ha sido encontrada en tres compartimentos celulares distintos: en membrana (formando parte del complejo de adhesión celular cadherina--cateninas), en el citoplasma (en forma libre o asociado a otras proteínas como APC, axina y GSK3 β) o en el núcleo (unida a factores de transcripción de la familia LEF-Tcf) (Hülsken and Behrens, 2000).

Papel de β -catenina en la formación de las uniones adherentes. La primera función atribuida a β -catenina fue la de proteína estructural constituyente de las uniones adherentes. En estas uniones, interacciona, por la región central de repeticiones armadillo, con el dominio citosólico de E-cadherina (Hülsken et al. 1994). Durante la realización de esta tesis, se ha descrito la estructura de la región de repeticiones armadillo de β -catenina unida al dominio citosólico de E-cadherina (Huber and Weis, 2001). La interacción se da en una amplia zona que implica unos cien residuos del extremo terminal de la cadherina y toda la longitud del dominio de repeticiones armadillo de β -catenina.

El dominio N-terminal de β -catenina interacciona a su vez con α -catenina. Intervienen en esta unión una secuencia de 31 aminoácidos, del 120 al 151, de β -catenina (Aberle et al. 1994). Para el correcto establecimiento de las uniones adherentes, es requisito imprescindible la conexión entre cadherina y α -catenina mediada por la β -catenina. La falta de β -catenina en embriones de ratón provoca su muerte temprana, justo tras la gastrulación (Haegel et al.

1995). El estudio de las interacciones E-cadherina- β -catenina y β -catenina- α -catenina ha constituido el hilo conductor de esta tesis.

La β -catenina como activador transcripcional. Conocida primero por su implicación en la funcionalidad de la E-cadherina, se llegó con posterioridad al descubrimiento de su papel como coactivador transcripcional de genes implicados en el desarrollo tumoral, como componente crítico de la vía de señalización de Wnt (Korinek et al. 1997; Behrens et al. 1996). La capacidad de β -catenina de translocar al núcleo, depende de los niveles de esta proteína que se encuentran libres en el citosol, no asociados a E-cadherina. El control de los niveles citosólicos de la β -catenina está finamente regulado. Así, en una célula normal de colon, la β -catenina que no se encuentra unida a α -catenina y E-cadherina -en los complejos de adhesión celular- se localiza en el citosol formando un complejo con la Ser/Thr quinasa GSK3 β (glicógeno sintasa quinasa 3 β), la axina y APC, entre otros factores. En estas condiciones, la GSK3 β fosforila 4 residuos del extremo N-terminal de la β -catenina –serinas 33, 37 y 45 y treonina 41-, lo que induce su rápida degradación por el sistema ubiquitin-proteosoma (Cavallo et al. 1997; Polakis et al. 1997; Cadigan and Nusse, 1997). Aunque el marco general de la ruta Wnt ha sido ya caracterizado, siguen identificándose componentes; la caseína quinasa I (CKI) y la fosfatasa PP2A, por ejemplo, pueden actuar sobre componentes como APC, axina y β -catenina y regular la estabilidad del complejo de degradación de la β -catenina (Gao et al. 2002). Concretamente CKI, actuaría entre *dishevelled* y GSK3 β , promoviendo la estabilización de β -catenina y la inducción de genes que son diana de la vía Wnt (Peters et al. 1999).

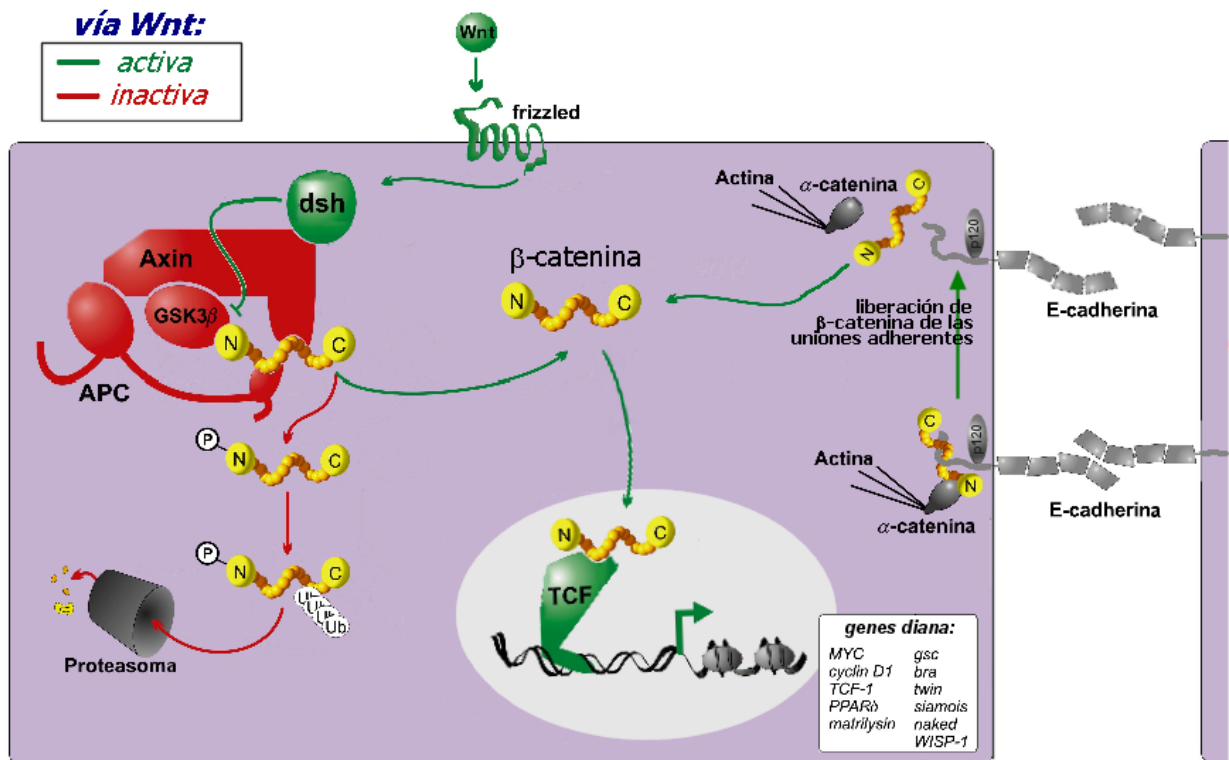


Fig.4 **Regulación de los niveles de β -catenina en una célula normal de colon.** En condiciones normales los niveles de β -catenina están regulados por el complejo cuaternario GSK3 β / axina/ β -catenina/ APC (adaptado de Hülken and Behrens, 2000).

Alteraciones en este sistema de regulación que conllevan niveles elevados de β -catenina en el citosol son habituales en cáncer de colon. Así, mutaciones en la proteína acopladora APC, que se detectan en más del 85% de los tumores de colon (Kinzler and Vogelstein, 1996), impiden que β -catenina sea fosforilada en Ser/Thr y degradada. Al aumentar la concentración citosólica de β -catenina libre se induce su translocación al núcleo donde interacciona con factores de transcripción de la familia LEF/Tcf (Miller et al. 1999). La interacción de β -catenina con estos factores, los convierte en activadores transcripcionales (Van de Wetering et al. 1997), estimulando la transcripción de genes que contienen secuencias diana para Tcf-4 en sus promotores (He et al. 1998 y 1999; Tetsu et al. 1999; Roose et al. 1999).

Estructura de β -catenina. Como ya se ha comentado, la estructura primaria de β -catenina consta de un extremo amino terminal de unos 149 aa,

un dominio central de 525 aa con 12 repeticiones armadillo y una zona C-terminal de unos 108 aa.

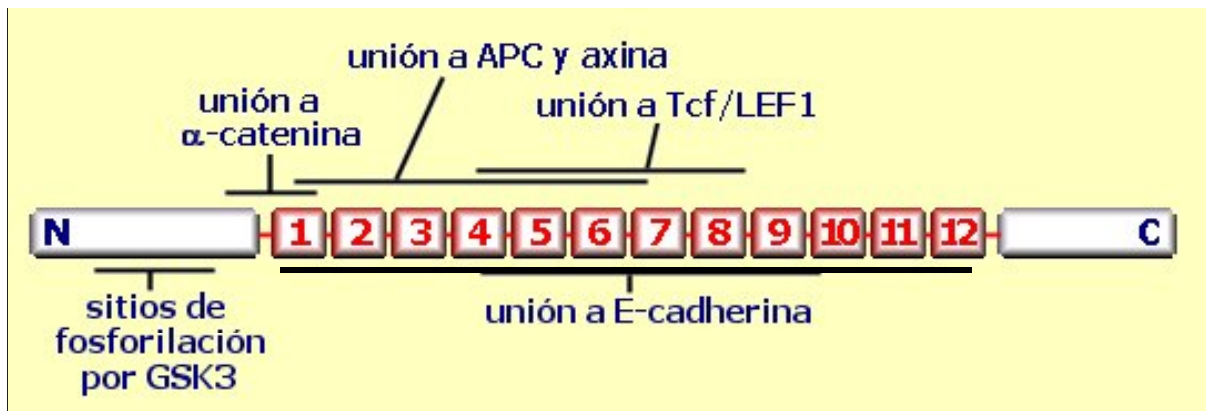


Fig.5 **Dominios de interacción de la β -catenina.** Se representan con recuadros numerados las doce repeticiones Armadillo así como las zonas de interacción con diferentes cofactores.

Recientemente ha sido determinada por difracción de RX de resolución 2.1Å la estructura tridimensional del dominio armadillo de la β -catenina; desde el residuo 149 al 666 (Huber et al. 1997b). Cada una de las repeticiones armadillo forma tres hélices α que a su vez constituyen una gran superhélice cilíndrica confiriendo al conjunto una estructura de gran rigidez. Las cargas están distribuidas dejando un surco de potencial positivo por donde la β -catenina se une a otras proteínas como E-cadherina, APC o hTcf-4. La proteína entera todavía no ha podido ser cristalizada.

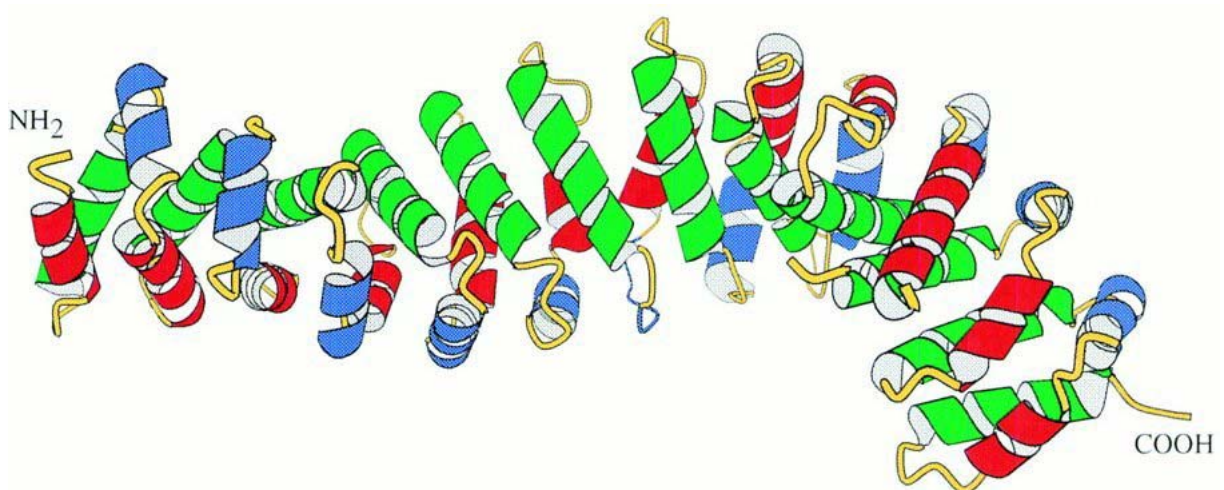


Fig.6 **Estructura de las doce repeticiones Armadillo de la β -catenina.** Cada

repetición armadillo (de 42 aa) forma tres hélices α que se representan en rojo, verde y azul. Estos motivos repetidos doce veces presentan un grado de homología elevado en su secuencia y determinan una estructura compacta donde cada repetición interacciona fuertemente con las repeticiones vecinas (de *Huber et al., 1997b*).

1.1.2.3 p120-catenina (p120^{ctn})

La p120^{ctn} es una proteína con diversas isoformas con un rango de peso molecular de 85 a 115 kDa, con cierta similitud a la β -catenina y que posee como ésta repeticiones de tipo armadillo. Identificada primero como sustrato de variantes oncogénicas de la tirosina-quinasa pp60^{c-src} (Reynolds et al. 1989), posteriormente se descubrió que también formaba parte del complejo cadherina-cateninas ya que se une a la región citosólica de la E-cadherina en la zona más próxima a la membrana. No interacciona con otros elementos como α -catenina, β -catenina o APC (Daniel and Reynolds, 1995) por lo que su función en las uniones adherentes sería distinta a la del mero anclaje cadherina-citoesqueleto.

Isoformas. La p120^{ctn} presenta múltiples isoformas, que se derivan de un solo gen, por procesamiento o *splicing* alternativo de dicho gen. Estos fenómenos de *splicing* en la zona N-terminal, provocan el uso de cuatro ATG iniciales distintos, que dan lugar a las isoformas 1, 2, 3 o 4 de p120^{ctn}. Procesos de *splicing* en la zona C-terminal, llevan al uso del exón A, B, ambos o ninguno de ellos. En total, las diversas combinaciones generan un mínimo de 32 isoformas que se expresan diferencialmente según los tejidos (Keirsebilck et al. 1998; Anastasiadis and Reynolds, 2000). Por ejemplo, las células epiteliales expresan mayoritariamente isoformas de tipo 3 (ver figura). Las isoformas difieren en sus extremos terminales pero todas mantienen intacto el dominio armadillo, con el que interaccionan con las cadherinas. Se ha especulado que las diversas isoformas pudieran afectar diferencialmente a la actividad de las cadherinas mediante su interacción con proteínas distintas.

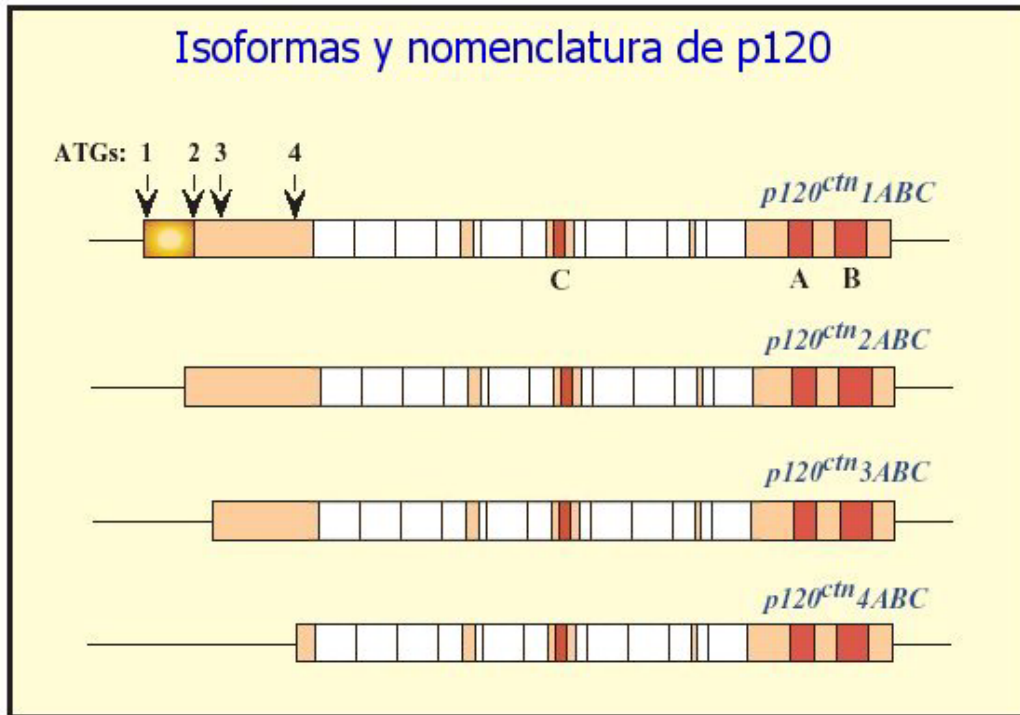


Fig.7 Esquema de las distintas isoformas de p120^{ctn} por *splicing* alternativo. Las cajas blancas representan las 10 repeticiones Armadillo de la p120^{ctn}, interrumpidas en algunas secuencias por pequeños *loops*. Los cuatro posibles ATGs se indican con flechas numeradas. Los exones denominados A, B y C también se indican en rojo. En amarillo, el dominio *coiled-coil* sólo presente en las isoformas de tipo 1 (adaptado de Anastasiadis and Reynolds, 2000).

Unión p120^{ctn}-cadherina. Los primeros ensayos de inmunoprecipitación, ya mostraron que β -catenina y p120^{ctn} podían unirse simultáneamente a E-cadherina (Reynolds et al. 1994). Estudios posteriores acotaron la zona de unión de la p120^{ctn} a una zona mínima de unos 10 residuos, adyacente a la membrana, en el dominio citosólico de la E-cadherina (Thoreson et al. 2000) sin competir con la unión de β -catenina que interacciona con la cadherina más hacia el C-terminal de ésta. Este dominio yuxtamembrana al que se une la p120^{ctn}, es el más altamente conservado entre las cadherinas clásicas.

Recientemente, también se ha encontrado que la p120^{ctn} interacciona con el complejo cadherina-cateninas de forma independiente de la E-cadherina. En *Drosophila*, p120^{ctn} puede asociarse a la GTPasa Rho1, que a su vez interacciona con α -catenina en las uniones adherentes (Magie et al. 2002).

La p120^{ctn} en adhesión celular. En este punto hay una fuerte controversia y los diversos experimentos llevados a cabo arrojan resultados aparentemente opuestos. Por un lado p120^{ctn} aparece como responsable del agrupamiento lateral de las cadherinas; pero también hay evidencias sobre la p120^{ctn} como regulador negativo de la adhesión entre células.

A continuación indico un ejemplo de resultados que muestren a p120^{ctn} como regulador negativo de las uniones. 1) En células Colo205, con el complejo cadherina-cateninas básicamente intacto, la hiperfosforilación de p120^{ctn} se correlaciona con la imposibilidad de formar uniones (Aono et al. 1999). 2) En células de leucemia K-562, la expresión de E-cadherina delecionada, que sólo puede unir p120^{ctn}, se asocia con pérdida de contactos entre células (Ozawa and Kemler, 1998b) y 3) la expresión de p120^{ctn} delecionada en su N-terminal, a la que le faltan la mayoría de los sitios de fosforilación, devuelve la adhesividad en fibroblastos L murinos (Ohkubo and Ozawa, 1999).

Trabajos que indican un efecto positivo de p120^{ctn} en la adhesión son, por ejemplo; 1) cadherinas delecionadas en el C-terminal, que no pueden unir β -catenina ni establecer contactos con el citoesqueleto pero sí con p120^{ctn}, son capaces de inducir adhesión cuando se transfectan en células CHO (Navarro et al. 1995; Yap et al. 1998); 2) la expresión en células de mutantes de E-cadherina que no pueden unir p120^{ctn}, provoca que no se puedan formar uniones tan sólidas como las que induce la expresión de E-cadherina salvaje en las mismas células (Thoreson et al. 2000). Estas evidencias sugieren un papel para la p120^{ctn} en el reforzamiento o *clustering* de las cadherinas. Según esto, las cadherinas primero se asociarían al citoesqueleto vía β - y α -catenina y posteriormente se agruparían y reforzarían su interacción vía p120^{ctn}.

Señalización nuclear. p120^{ctn} ha sido encontrada también en el núcleo (Van Hengel et al. 1999) donde interacciona por su dominio armadillo al menos con kaiso (Daniel and Reynolds, 1999), un nuevo factor de transcripción del tipo BTB/POZ/ZF que ha sido descrito como represor transcripcional (Kim et al. 2002). El significado funcional de la interacción p120^{ctn}/ Kaiso es aún especulativo y debe profundizarse en su estudio pero abre nuevas posibilidades funcionales y de regulación para los complejos de adhesión. Una

observación interesante es que varias isoformas de p120^{ctn} se acumulan en el núcleo de células deficientes en cadherina (Van Hengel et al. 1999).

1.1.3. Regulación del Complejo cadherina-cateninas

La adhesión celular es un determinante fundamental para la morfogénesis de los tejidos. Durante el desarrollo del organismo, las células establecen uniones con la matriz extracelular –vía integrinas- y migran hasta encontrar células con cadherinas expuestas homólogas a las suyas. Una vez allí, se sellan las uniones adherentes entre células vecinas; a ello contribuyen las cateninas, necesarias para la interacción entre cadherinas. Se ha relacionado la expresión de las cadherinas con la inhibición de la expresión de integrinas (Yap, 1998). Errores en este proceso de *locomoción celular* se encuentran en la base de los procesos de invasión neoplásica.

El establecimiento de las uniones adherentes es un proceso dinámico que debe ser finamente regulado en el tiempo y en el espacio para permitir la correcta funcionalidad de los órganos y tejidos. Las evidencias hasta el momento, indican que la regulación de las uniones adherentes puede darse principalmente a nivel de transcripción de las proteínas presentes en los complejos de adhesión o bien mediante modificaciones post-transcripcionales que alteren la estabilidad de dichos complejos.

1.1.3.1. Regulación a nivel transcripcional. El estudio de la expresión de las cadherinas, muestra que su correcta expresión tiene unos márgenes espacio-temporales muy estrechos y limitados. Como se ha comentado, los niveles de expresión de cadherinas parecen ser el paso limitante en la formación de las uniones adherentes (Gumbiner, 2000). La vía de señalización Wnt, cuya activación lleva al incremento de β -catenina nuclear y la estimulación de genes diana para los factores de transcripción de la familia LEF/Tcf, afecta a la estabilidad de los complejos adherentes. Así, el incremento de la β -catenina intracelular –por transfección de Wnt, *dishevelled* (diana del receptor de Wnt) o de la propia catenina-comporta el aumento de la vida media de las uniones (Hinck et al. 1994; Yanagawa et al. 1997; Wong et al. 1998a).

Especulativamente, los niveles de β -catenina y/o de sus acompañantes nucleares, podrían regular la activación de genes implicados en la formación o desensamblaje de las uniones adherentes. Ciertos autores han sugerido que miembros de la familia de LEF/Tcf podrían regular directamente al promotor de E-cadherina (Huber et al. 1996).

1.1.3.2. Regulación post-transcripcional. Ya como proteínas maduras, el dominio citosólico de E-cadherina y las cateninas β - y p120- son objeto de modificaciones post-transcripcionales que afectan a su funcionalidad. Gran parte de los datos existentes sugieren que la regulación se da principalmente por fosforilación y defosforilación. Diversas quinasas y fosfatasas pueden actuar sobre miembros del complejo cadherina-cateninas.

Fosforilación de p120^{ctn}. p120^{ctn} es un buen sustrato de la tirosina-quinasa pp60^{c-src} tanto *in vivo* como *in vitro*. La transformación celular inducida por Src se correlaciona con fosforilación en p120^{ctn} (revisado en Daniel and Reynolds, 1997). Varios estudios sugieren que la p120^{ctn}-fosforilada, interacciona mejor con las cadherinas (Kinch et al. 1995; Skoudy et al. 1996; Calautti et al. 1998). p120^{ctn} se fosforila en respuesta a factores de crecimiento: EGF, PDGF, VEGF o NGF aunque no está claro si los receptores involucrados en cada caso fosforilan directamente a p120^{ctn} o lo hacen a través de quinasas asociadas. La tirosina-quinasa citosólica Fer, se asocia directamente a p120^{ctn} (Kim and Wong, 1995). Diversas tirosina-fosfatasas se asocian con p120^{ctn} y la proteína también se fosforila extensivamente en serinas, y en menor grado en treoninas, en la mayoría de células (revisado en Daniel and Reynolds, 1997). Se ha relacionado esta modificación con su acción desestabilizadora de las uniones.

Fosforilación de β -catenina. En condiciones *in vitro* en que se induce la pérdida de funcionalidad de la E-cadherina –transformación celular mediada por los oncogenes Ras o v-Src, tratamiento con inhibidores de fosfatasas o con TGF α -, también se detecta una mayor fosforilación de la β -catenina en residuos de tirosina. Inversamente, la estimulación de la fosforilación de β -catenina promueve la pérdida de las uniones adherentes (Behrens, 1993; Kinch et al. 1995; Shibata et al. 1996; Ozawa and Kemler, 1998a). Las quinasas citosólicas

Fer; y miembros de la familia de Src-quinasas como el propio pp60^{c-src}, Fyn o Yes interaccionan con miembros de las uniones adherentes (Tsukita et al. 1991; Kim and Wong, 1995; Rosato et al. 1998; Thomas and Brugge, 1997). Receptores con actividad tirosina-quinasa –como el EGFR, erbB1 o erbB2- se han encontrado asociados directamente a β -catenina (Hoschuetzky et al. 1994, Shibata et al. 1996). Diversos estudios implican a la tirosina-fosfatasa LAR, la PTP κ o a la PTP-1B-like como capaces de unir y defosforilar a β -catenina (Kypta et al. 1996; Fuchs et al. 1996; Balsamo et al. 1996). La fosforilación de β -catenina se asocia con la disminución de su interacción con E-cadherina y el citoesqueleto y su liberación al citosol (Hoschuetzky et al. 1994; Kinch et al. 1995; Balsamo et al. 1996). La interacción de β -catenina y α -catenina también se debilita al tratar las células con pervanadato, un inhibidor general de tirosina fosfatasas (Ozawa and Kemler, 1998a). Tampoco se detecta β -catenina en inmunoprecipitados de α -catenina cuando la primera está fosforilada (Nagafuchi et al. 1991). En general, la β -catenina en forma fosforilada, se encuentra preferentemente libre, en la fracción soluble por detergente, no asociada a E-cadherina ni a citoesqueleto.

Fosforilación de E-cadherina. Sobre la fosforilación de E-cadherina hay menos evidencias, pero también se ha encontrado fosforilada en tirosinas, en condiciones experimentales que provocan la pérdida de los contactos celulares; como tras el tratamiento de células MDCK y A431 con inhibidores de tirosina-fosfatasas (Xu et al. 1997) o tras estimular la fosforilación en tirosina, activando una forma mutante de v-Src sensible a temperatura en MDCK (Fujita et al. 2002). Se sugiere además en este trabajo que la fosforilación de la E-cadherina sirve para regular su interacción con componentes de la maquinaria de degradación celular (Fujita et al. 2002). Recientemente se describió que el dominio citosólico de E-cadherina podía fosforilarse en serinas por la CK-II aumentando su interacción con β -catenina (Lickert et al. 2000).

El desensamblaje de las uniones adherentes se correlaciona con un aumento de fosforilación en tirosinas y la pérdida de contacto entre las

cadherinas y el citoesqueleto. Al comienzo de esta tesis se postulaba que tal efecto podía ser debido a la fosforilación de alguna de las cateninas asociadas.

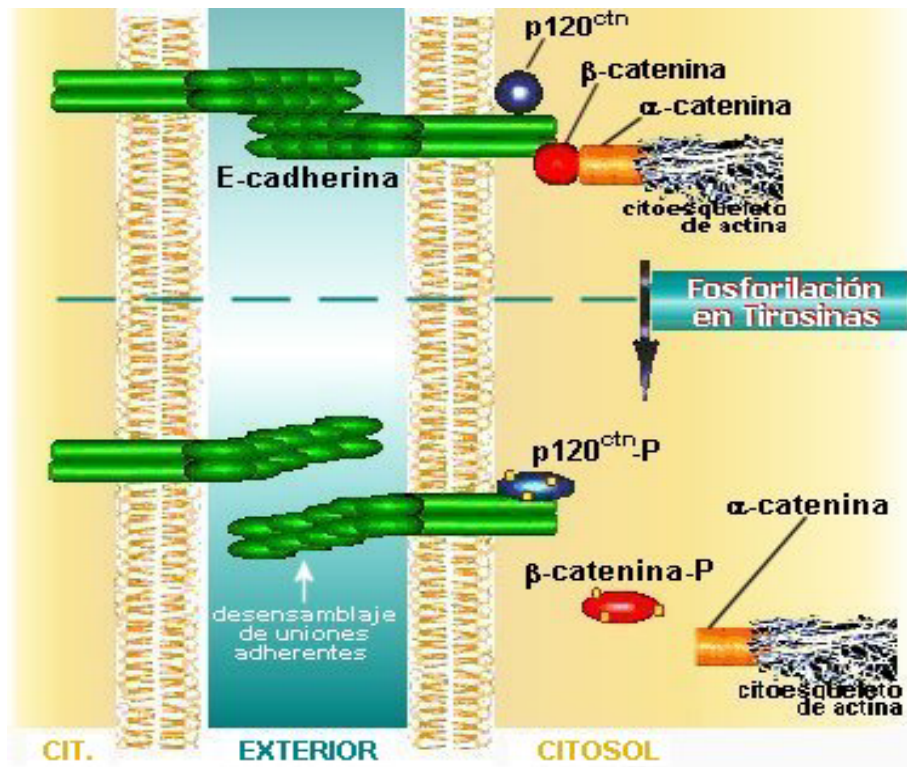


Fig.8 Regulación de la asociación de la E-cadherina con el citoesqueleto de actina mediante fosforilación en tirosina de las cateninas.

En el momento de iniciar este trabajo, se carecía de datos bioquímicos sobre las afinidades de la E-cadherina por las diversas cateninas, tanto en estado basal como al ser fosforiladas. También se desconocían qué residuos eran fosforilados y cómo incidía la fosforilación en la formación de los complejos de adhesión *in vitro*. Tampoco se sabía qué tirosina quinasa o quinasas eran las responsables de la fosforilación *in vivo* de las cateninas. Miembros de la familia de pp60^{c-src}, c-erbB-2, EGFR, Fer entre algún otro, contaban como posibles candidatos.

II. OBJETIVOS

Los objetivos iniciales que nos planteamos al empezar este trabajo pueden resumirse en:

- Estudiar los efectos que produce la fosforilación en tirosinas sobre la afinidad de p120^{ctn} y β -catenina por la E-cadherina, utilizando proteínas recombinantes.

- Si la fosforilación de β -catenina tuviera una relevancia funcional, identificar los residuos concretos que estén siendo modificados, mediante la construcción y análisis de mutantes puntuales. Asimismo, localizar la quinasa o quinasas que puedan catalizar eficientemente estas reacciones *in vitro*.

- Analizar si la interacción entre β -catenina y α -catenina pueda verse igualmente afectada por la fosforilación en tirosinas de β -catenina e identificar los residuos concretos que estén siendo modificados.

- En caso de poder cumplir con todos los objetivos anteriores, explorar si los comportamientos descritos, los sitios de fosforilación identificados y las quinasas participantes, juegan un papel igualmente *in vivo*, en condiciones que comporten el desensamblaje de las uniones adherentes.

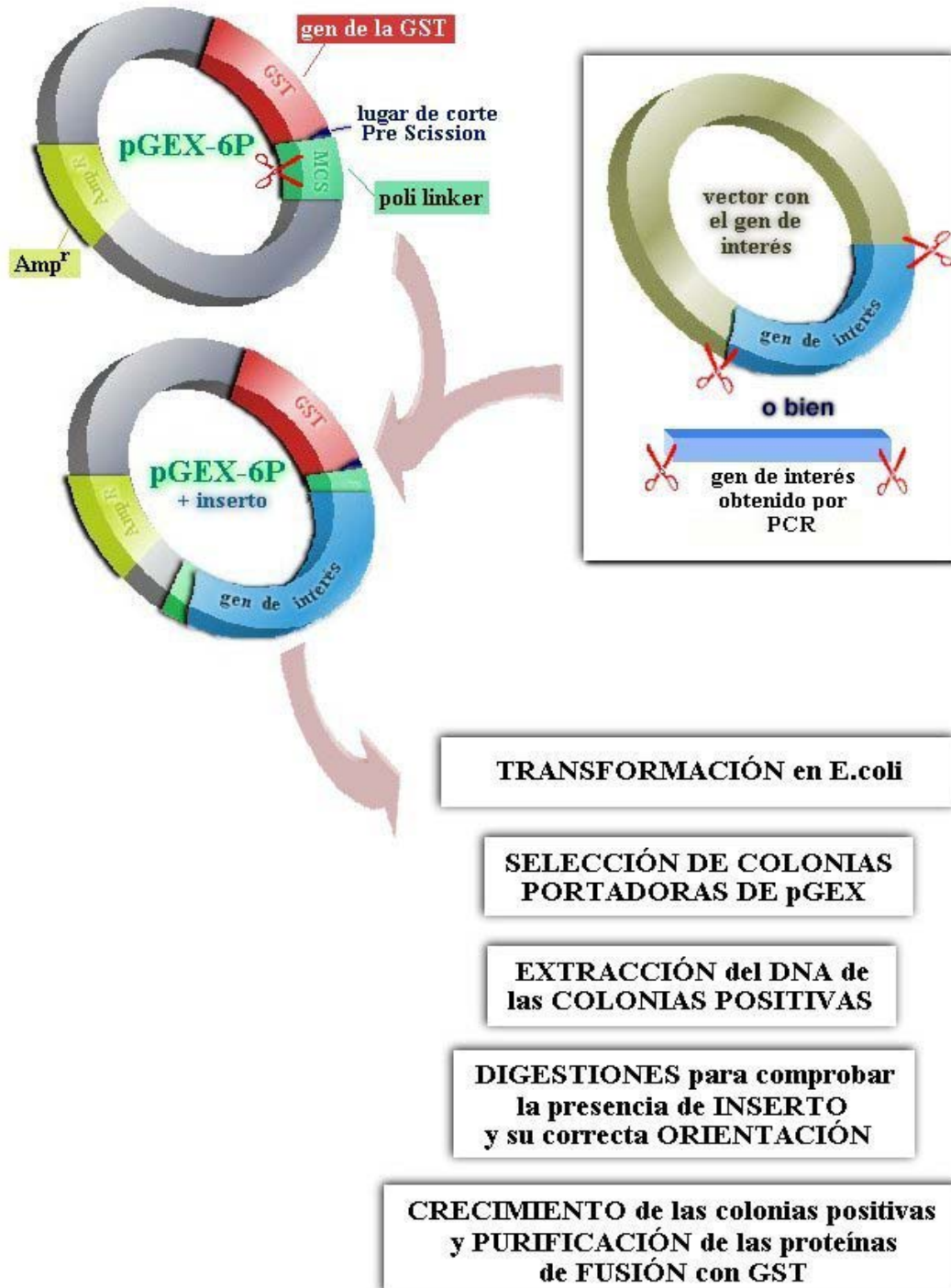
- Determinar la influencia de la fosforilación en los diversos residuos tirosina en la estructura de β -catenina y en la interacción con otros factores relacionados con su actividad transcripcional (TBP, Tcf-4).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN PROCARIOTAS

1.1. ESQUEMA GENERAL

Los diferentes productos recombinantes necesarios para llevar a cabo este trabajo fueron obtenidos como se indica en el siguiente esquema general (figura 9):



En la siguiente tabla, se citan con más detalle las características de cada construcción llevada a cabo:

Tabla I. Detalle de las construcciones llevadas a cabo para la realización de este trabajo.

Nombre construcción	Origen/ obtención del inserto	Insertado en
A.- pGEX- β catenina (aa 1-782)	cDNA cedido por Dr.R.Kemler, digerido <i>BamHI</i>	pGEX-6P-3 abierto con <i>BamHI</i>
B.- pGEX- β catenina (aa 1-106)	digestión de A con <i>SphI</i> + <i>NotI</i>	relleno con Klenow-polimerasa y religado
C.- pGEX- β catenina (aa 1-575)	digestión de A con <i>EcoICRI</i> + <i>NotI</i>	relleno con Klenow-polimerasa y religado
D.- pGEX- β catenina (aa 575-782)	digestión de A con <i>EcoICRI</i> + <i>NotI</i> y aislamiento de la banda de ≈ 630 pb	relleno con Klenow-polimerasa e insertado en pGEX-6P-3 abierto con <i>SmaI</i>
E.- pGEX- β catenina (aa 575-696)	digestión de D con <i>BglIII</i> + <i>NotI</i>	relleno con Klenow-polimerasa y religado
F.- pGEX- β catenina (aa 696-782)	digestión de A con <i>BglIII</i> + <i>SmaI</i> y aislamiento de la banda de ≈ 270 pb	relleno con Klenow-polimerasa e insertado en pGEX-6P-2 abierto con <i>SmaI</i>
G.- pGEX- β catenina (aa 138-683) “Repeticiones Armadillo”	por PCR a partir de A . Los cebadores contienen dianas <i>BamHI</i> y <i>SmaI</i>	pGEX-6P-1 abierto <i>BamHI</i> + <i>SmaI</i>
H.- pGEX- β catenina (aa 422-683) “Rep. Armadillo 7 a 12”	digestión de G con <i>EcoRI</i> + <i>SmaI</i> y aislamiento de la banda de ≈ 790 pb	pGEX-6P-2 abierto <i>EcoRI</i> + <i>SmaI</i>
I.- pcDNA-p120 ^{ctn} (aa 1-911)	CAS-1-pcDNA cedido por Dr.A.Reynolds, digerido <i>EcoRI</i> + <i>KpnI</i>	relleno con Klenow-polimerasa e insertado en pcDNA3.1/His abierto <i>EcoRV</i>
J.- pGEX-p120 ^{ctn} -I (aa 7-911)	digestión de I con <i>Sall</i> + <i>NotI</i>	pGEX-6P-2 abierto <i>Sall</i> + <i>NotI</i>
K.- pGEX-p120 ^{ctn} -II (aa 232-911)	digestión de I con <i>SmaI</i> + <i>NotI</i>	pGEX-6P-1 abierto <i>SmaI</i> + <i>NotI</i>
L.- pGEX-Ecadherina (aa 732-883) “Región citosólica”	por PCR a partir de cDNA murino total. Los cebadores contienen dianas <i>BamHI</i> y <i>EcoRI</i>	pGEX-6P-3 abierto <i>BamHI</i> + <i>EcoRI</i>
M.- pcDNA- β catenina (aa 1-782)	digestión de A con <i>BamHI</i>	pcDNA3.1/His(C) abierto con <i>BamHI</i>
N.- pGEX- α -catenina (aa 1-472) “Dominio N-ter”	Por RT-PCR a partir de RNA total. Los cebadores contienen dianas <i>EcoRI</i> y <i>Sal I</i>	pGEX-6P-3 abierto <i>EcoRI</i> + <i>Sal I</i>
Ñ.- pGEX- α -catenina	α -cat(mouse)-pBKS cedida por Dr.R.Kemler, digerida	N digerido con <i>NotI</i> + <i>XhoI</i> , (banda aislada de 5400 pb)

(aa 1-906) "Humano-ratón"	por Dr.R.Kemler, digerida <i>NotI</i> + <i>XhoI</i> y aislamiento de la banda de 2500pb	(banda aislada de 5400 pb).
------------------------------	---	-----------------------------

1.2 CEPA DE E.coli, CULTIVO BACTERIANO Y VECTOR UTILIZADO

1.2.1 Cepa bacteriana y preparación de células competentes

La cepa utilizada para expresar las proteínas recombinantes fue la XL1-blue de *E.coli*. Para preparar XL1-blue competentes, se creció un cultivo durante 16 h de 2 mL de LB (10 g Triptona/L, 5 g levadura/L, 5 g NaCl/L, ajustado a pH 7 con NaOH) con unos pocos microlitros de células XL1. A continuación, se diluyó 1/100 en LB recién preparado y se creció hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,4-0,5. Se centrifugó suavemente a 2.500 xg durante 15 min y se resuspendió el pellet celular en una décima parte del volumen inicial (20 mL) en tampón TSS (10% PEG, 5% DMSO en LB con 50 mM MgCl₂); se alicuotó y congeló a -80°C.

1.2.2 Medio de cultivo bacteriano

Para el crecimiento de las XL1-blue se utilizó un medio rico: el LB en su forma líquida o sólida (con un 2% de agar). El medio se esterilizó por autoclave (121°C, 20 min). Para la selección de las bacterias transformadas se añadió al medio ampicilina (Sigma), a una concentración de 100-150 mg/L (siempre después de autoclavar y cuando la temperatura del medio había bajado por debajo de los 50°C).

En el caso del medio sólido, tras la adición del antibiótico, se virió el LB-agar en placas de Petri y se dejaron solidificar al aire en una atmósfera estéril como por ejemplo una campana de flujo laminar.

CONDICIONES DE CULTIVO : En placa a 37°C sin agitación.

Líquido a 37°C y 220 rpm.

CONDICIONES DE ALMACENAJE de COLONIAS TRANSFORMADAS:

En placa a 4°C durante 4-6 semanas.

Líquido con glicerol al 50% a -80°C por años.

1.2.3 Vector

Como vehículo de expresión de los productos a clonar se utilizaron los vector pGEX-6P –en sus tres pautas de lectura 1,2 o 3- (Amersham-Pharmacia). Este tipo de vector permite expresar cualquier producto clonado como proteína de fusión con GST (Glutation-S-transferasa). Además de un origen de replicación, contiene:

- 1.- gen para resistencia a ampicilina (Amp^r),
- 2.- gen codificante para la GST controlado por el promotor Tac, que permite alta expresión de forma controlada (inducible) químicamente con IPTG,
- 3.- una secuencia con múltiples sitios de corte único por enzimas de restricción a continuación del gen de la GST para facilitar el clonaje unidireccional del producto de interés,
- 4.- el sitio de reconocimiento para la proteasa PreScission (PS) (Amersham-Pharmacia) para cortar entre la GST y la proteína deseada una vez obtenida la proteína de fusión.

1.3 MÉTODOS DE CLONAJE DE DNA

1.3.1 Extracción del DNA plasmídico (Método de lisis alcalina).

A partir de un cultivo líquido saturado de bacterias, se puede obtener su DNA plasmídico aislado para ser digerido, subclonado o transformado. Se han utilizado indistintamente los kits comerciales de minipreps de Pharmacia, Gibco y QiaGen, y seguido sus instrucciones. En todos ellos, se partió de un cultivo de 16 h de 1-5 mL en LB-ampicilina (que generalmente contenía bacterias de una de las colonias crecidas en placa). Se centrifugó y el pellet se resuspendió en un tampón que contenía RNasa, SDS y NaOH para provocar la lisis celular y degradar RNA. Se dejó actuar 5 min tras los cuales se neutralizó la solución y se precipitó el dodecil sulfato con acetato potásico. Se centrifugó 10 min a 14.000 xg y se descartó el pellet (compuesto por membranas y restos celulares).

Se aplicó el sobrenadante a unas columnas que tienen una matriz generalmente de silica gel o algún otro material capaz de adsorber

selectivamente el DNA plasmídico a alta fuerza iónica. Posteriormente, se eluyó el DNA bajando la concentración de sales del medio.

1.3.2. Amplificación de fragmentos de DNA por PCR.

PCR son las siglas correspondientes a *reacción en cadena de la polimerasa*. En presencia de DNA (en estos casos genómico), se añaden al medio un par de oligonucleótidos que hibridan al principio y al final del fragmento a amplificar y uno con cada una de las dos hebras de DNA, 1,5 mM Mg^{2+} , 125 μ M dNTPs, tampón para PCR (Gibco), agua autoclavada y tratada con luz UV (para provocar dimerización de timidinas en posible DNA contaminante, y evitar que sea amplificado) y polimerasa Taq termoestable.

Todos estos elementos se introducen en un termociclador (Perkin-Elmer) que los mantiene, consecutivamente:

- 1.- a 95°C por 10-20 segundos para deshibridar las dos cadenas del DNA
- 2.- a 50-55°C por 10-20 segundos para permitir el anillamiento de los cebadores con las cadenas madre de DNA
- 3.- a 72°C por varios minutos (a razón de 1 min por kilobase del fragmento a amplificar) para que la polimerasa pueda elongar las cadenas.

Los pasos 1, 2 y 3 se suceden repetidamente durante 20-30 ciclos para conseguir la amplificación exponencial del DNA donde hibridan los cebadores.

- 4.- Finalmente se dejan 5 minutos a 72°C para permitir que se acaben de elongar fragmentos.

Estas son unas condiciones estandarizadas. En cada caso pueden verse modificadas hasta conseguir un resultado donde se amplifique solamente la región del DNA que ha de clonarse. Ejemplos de parámetros modificables son la concentración de Mg^{2+} , la temperatura de ensamblaje de los cebadores o el tiempo de elongación a 72°C (paso 4), entre otros. Los cebadores utilizados llevan en su extremo 5' dianas para enzimas de restricción. Se obtiene así un producto de DNA de doble hebra flanqueado por estas dianas de restricción, que permitirán su clonaje en el vector de expresión.

1.3.3 Digestión de DNA

Los fragmentos de DNA de interés contenidos en un vector y que debían ser subclonados se digirieron con nucleasas de restricción. Los enzimas y tampones fueron suministrados por Promega, Amersham y New England Biolabs.

La cantidad de DNA a digerir osciló entre 100 ng y 4 μ g en un volumen de 20 a 100 μ L. La cantidad de enzima, el tampón utilizado y la temperatura fueron en cada caso los especificados por el fabricante, en un tiempo de reacción de 2 a 3 h.

1.3.4 Defosforilación de vectores

La defosforilación se realiza cuando se digiere el vector con un solo enzima de restricción, para evitar que el vector linearizado pueda recircularizar. A los 5 μ g de vector digerido, se añadieron 0,1 unidades de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Promega) disuelta en el tampón adecuado y se incubó por 30 min a 37°C. A continuación se inactivó el enzima a 85°C durante 15 min y se aisló el DNA de la mezcla extrayendo con fenol y cloroformo y precipitándolo con 0,3 M de acetato sódico a -80°C. Se resuspende el DNA en TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA).

1.3.5 Relleno con la polimerasa Klenow

Los fragmentos de DNA digeridos necesitan en ocasiones tener extremos romos para poder ligarlos con los extremos romos de un vector. En este caso se rellenó con la polimerasa Klenow aquellos nucleótidos que estaban desaparejados tras una digestión previa. La reacción tuvo lugar a 37°C durante 1h mezclando unos 3-4 μ g de DNA con 2 μ L de Klenow (10 unidades) con 25 μ M de deoxiribonucleósidos trifosfato en un volumen final de 50 μ L.

1.3.6 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Esta técnica ha sido usada rutinariamente para visualizar el DNA obtenido en los distintos pasos del clonaje de todos los productos: tras las digestiones, aislamiento de DNA plasmídico de E.coli, etc. En la mayor parte de los casos se utilizó una concentración de agarosa del 1% en TAE (50 mM Tris, 1 mM acetato, 2 mM EDTA, pH 8,5) usando como marcador de peso molecular DNA del fago λ digerido con Hind III y corriendo el gel a 5-10 V/cm.

Las bandas se visualizaron sumergiendo el gel durante 10 min en una solución con 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de bromuro de etidio en TAE (1x) y colocando el gel sobre una fuente de luz UV. La emisión de luz se captó con una cámara fotográfica o de video.

1.3.7 Extracción del DNA del gel de agarosa

La digestión nos conduce generalmente a la obtención de fragmentos de distinto tamaño que se separan electroforéticamente. Para aislar el fragmento deseado, se recortó la banda concreta del gel y se extrajo el DNA de la agarosa. Se utilizó el kit QIAquick (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.3.8 Ligación

Una vez abierto el vector y listo el producto a clonar, ambos se encuentran linealizados y con sus extremos compatibles para ser ligados.

Se mezcló una relación molar vector:inserto de 1:5 (poniendo generalmente unos 50-100 ng de vector) en un medio que contenía tampón de ligación (con 1 mM ATP) y 1-5 unidades de T4-DNA ligasa (Pharmacia). Se incubó durante 20 h a 15°C.

Si los extremos de vector e inserto eran romos, se aumentó la cantidad de ligasa hasta 10-15 unidades y se realizó la reacción a 20-24°C.

1.3.9 Transformación en XL1-Blue

Se mezcló, en hielo, 0.15 mL de XL1-Blue competentes (recién preparadas o descongeladas lentamente a 4°C) con el producto de ligación. A continuación, se dejó en hielo durante 30-45 min. Se propició un choque térmico poniendo las bacterias 90 seg a 42°C, seguido de 90 seg a 4°C. Se añadió 0,9 mL de LB (sin ampicilina) y se incubó 1 h a 37°C, para permitir que las bacterias transformadas pudieran desarrollar la resistencia a antibiótico que llevan codificada en el vector. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min para descartar parte del volumen del sobrenadante. Unos 200 µL de bacterias se sembraron en placas de LB-agar-ampicilina y se incubaron durante 16 h a 37°C.

Cada colonia aislada que se obtiene proviene de una sola *E.coli* que ha incorporado el pGEX y de esta manera se ha hecho resistente al antibiótico. Se comprobó, mediante digestión, que el pGEX tuviera el inserto del tamaño deseado y colocado en la orientación correcta.

1.3.10. Obtención de los mutantes puntuales

Para la realización de los mutantes puntuales de β -catenina, se partió de la construcción de β -catenina nativa (*wild type*) clonada en pGEX-6P-3. Se empleó para ello el Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene.

Se aisló el DNA plasmídico por miniprep (ver 1.3.1). Este DNA de doble cadena y en forma de *supercoil* se desnaturaliza y se hibridan dos oligonucleótidos que contienen la mutación deseada –uno con cada hebra del DNA-. Los oligonucleótidos son extendidos en un ciclo de PCR por la DNA polimerasa *Pfu* de forma que se genera un nuevo vector completo, de doble hebra, que contiene el gen de interés alterado en las bases adecuadas. Para eliminar de la mezcla el vector parental, se añade *Dpn I*, enzima de restricción que digiere DNA metilado y hemimetilado. El nuevo vector generado *in vitro*, al no presentar ningún tipo de metilación, no es digerido. La mezcla de reacción es entonces transformada en *E.coli* XL1-Blue. Varias de las colonias que

crecen se analizan por secuenciación en busca de positivas con el vector modificado adecuadamente.

mutación	oligos utilizados
Tyr-86→Glu	5'- GCT GAT ATT GAC GGG CAG GAA GCA ATG ACT AGG -3'
Tyr-86→Phe	5'- GCT GAT ATT GAC GGG CAG TTT GCA ATG ACT AGG -3'
Tyr-142→Glu	5'- TTG ATT AAC GAG CAG GAT GAC -3'
Tyr-142→Phe	5'- TTG ATT AAC TTT CAG GAT GAC -3'
Tyr-654→Glu	5'- GGC GTG GCA ACA GAA GCA GCT GCT GCT GTC C -3'
Tyr-654→Phe	5'- GGC GTG GCA ACA TTT GCA GCT GCT GCT GTC C -3'

1.3.11. Secuenciación del DNA

Se utiliza el *dRhodamine terminator Cycle Sequencing Kit* (Perkin Elmer) en un secuenciador automático de DNA *ABI Prism 310* (Perkin Elmer), utilizando cebadores de β -catenina próximos a la mutación a analizar (máximo 300 pb de distancia).

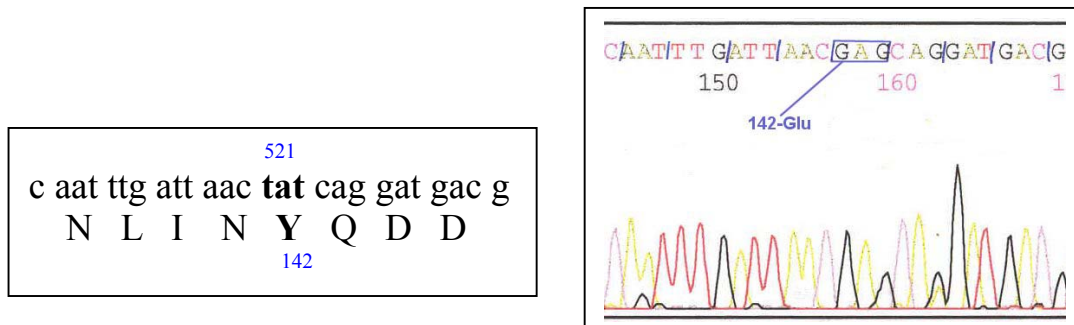


Fig 10. Secuencia de la β -catenina salvaje (WT) y del mutante Y142E. A la izquierda se muestra parte de la secuencia de la β -catenina WT (GenBank™, Accession M90364). A la derecha, detalle de la secuencia del mutante Tyr142→Glu.

1.4. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

1.4.1 Purificación por cromatografía de afinidad

Una vez conseguida una colonia de E.coli XL1-Blue transformada con un pGEX que incluía el producto deseado, se creció hasta saturación en un pequeño volumen de LB-ampicilina. Se diluyó en 50% glicerol y se guardó a -80°C. Una pequeña alícuota se creció 16 h a 37°C/220 rpm en LB-ampicilina (125 mg/L). A continuación se diluyó 1:10 en LB-ampicilina recién preparado y se mantuvo en agitación a 37°C/220 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6-0,8 (lo que indica que el cultivo está en fase de crecimiento exponencial). Entonces se indujo la expresión de los productos codificados en el pGEX añadiendo al medio 0,1 mM de isopropil β-D-tiogalactosido (IPTG) manteniendo las condiciones de crecimiento durante 2 h más.

Se centrifugaron las células a 8000 xg/ 4°C durante 10 min y el pellet se resuspendió en PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3). A continuación, se lisaron las bacterias sometiendo la mezcla a sonicación durante 2 x 15 s en pequeñas alícuotas. Se añadió Triton X-100 (Sigma) a una concentración final del 1% para ayudar a solubilizar las proteínas de fusión. Se centrifugó a 10.000 xg/ 4°C durante 10 min y se descartó el pellet, que contiene los fragmentos de membrana y otros restos celulares.

Para aislar la proteína de interés (que se encuentra como producto de fusión unida a la GST) se incubó el sobrenadante (que contiene una mezcla de proteínas bacterianas) con 1:100 (vol:vol) de glutathione-Sepharose-4B (Pharmacia). Esta sepharosa lleva unida glutatión lo que permite la unión específica de la GST. De esta manera, en un solo paso de cromatografía, la proteína de fusión con GST es retenida, mientras el resto de proteínas son descartadas. Tras lavar la sepharosa con PBS, la resina se incubó con 10 mM glutatión reducido (Sigma) en 50 mM Tris pH 8,0, con lo que se consiguió separar la proteína de fusión unida a GST de la glutatión-sepharosa-4B (ya que la GST tiene más afinidad por el glutatión reducido de la fase móvil que por el glutatión oxidado inmovilizado en la resina).

Estas condiciones estándar han sido aplicadas con éxito sobre todos los productos clonados, en cultivos de volúmenes entre 100 y 1000 mL obteniendo un rendimiento de 0,5-2 µg de proteína/ mL cultivo.

1.4.2 Corte entre la GST y la proteína recombinante

La utilización de vectores de la serie pGEX-6P permite la posibilidad, una vez aislada la proteína de fusión unida a GST, de cortar específicamente entre la GST y el producto de interés gracias a ocho aminoácidos que son codificados en el extremo C-terminal de la GST y que son diana de corte para la proteasa PreScission (PS).

La proteína obtenida tal como se describe en el apartado anterior, se dializó frente al tampón de corte de la PS (50 mM Tris pH7,8, 120 mM NaCl, 1mM DTT y 1mM EDTA). Se añadió 1 unidad de PS por cada 100 µg de proteína de fusión y la mezcla se mantuvo a 4°C y en agitación durante 4-16 h. Tras la digestión y para eliminar la GST y la PS (que es a su vez una proteína de fusión con GST), la mezcla volvió a incubarse con glutation-Sepharosa. La GST que había sido cortada de nuestro producto y la GST-PS fueron retenidas, mientras que la proteína deseada se obtuvo de forma libre en la fracción eluida.

1.4.3 Cuantificación de proteínas

Se llevó a cabo con el kit Bio-Rad Protein Assay basado en el método desarrollado por Bradford (1976, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254). Alternativamente, se valoró por electroforesis en poliacrilamida comparando la intensidad de las bandas con cantidades conocidas de albúmina de suero bovino (BSA).

2. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN EUCARIOTAS

2.1 LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS

Caco-2: línea epitelial humana derivada de carcinoma colorectal. Forma uniones adherentes bien definidas.

IEC-18 control: línea enterocítica de rata, inmortalizada, no tumorigénica, de epitelio intestinal normal.

IEC-18 Kras: IEC-18 tranfectadas establemente con el mutante Val-12 del gen humano del oncogén K-ras. Presentan pérdida de contactos celulares. Cedida por H.G^a. Palmer (I. Investigaciones Biomédicas, CSIC)

MiaPaca-2: línea de carcinoma pancreático humano. Presenta contactos celulares poco definidos y deficiente expresión de E-cadherina.

NIH-3T3: línea fibroblástica de ratón. No expresan E-cadherina.

RWP1: línea epitelial humana derivada de carcinoma pancreático con uniones adherentes bien definidas.

SW-480: línea epitelial humana establecida a partir de un adenocarcinoma primario de colon. Presenta contactos celulares poco definidos y deficiente expresión de E-cadherina. Hay poca β -catenina retenida en membrana y alta actividad transcripcional mediada por el complejo β -catenina-Tcf-4.

2.1.1 Cultivo celular

Las líneas celulares se mantuvieron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Life Technologies, Inc.) suplementado con un 10% de suero bovino fetal -FCS- (Biological Industries), al que se añade además piruvato sódico, glutamina y penicilina/streptavidina (Life Technologies, Inc.) creciendo a

37°C en una atmósfera con 1/20 parte de CO₂. Cuando las células alcanzaron la confluencia fueron tratadas con Tripsina (Life Technologies) y resembradas.

2.1.2 Contaje de células

Para determinar el número de células presente en una solución, se recurrió a la ayuda de un microscopio óptico y una cámara de Neubauer, de volumen acotado. Así, se pudieron visualizar y contar las células presentes en un determinado volumen de solución. La adición de Trypan Blue (Sigma) a la mezcla aplicada a la Neubauer, permitió a su vez controlar la supervivencia e integridad celular, descartando siempre cultivos con más de un 5% de tinciones positivas.

2.1.3 Congelación y almacenaje

Para conservar durante largo tiempo las líneas celulares, entre 4 y 8 millones de células se resuspendieron en 900 µL de DMEM/ 10% FCS y fueron pasadas a un criotubo con 100µL de dimetilsulfóxido –DMSO- (Sigma) a 0°C. Suavemente se homogenizó la mezcla a temperatura ambiente. El criotubo se congeló en etapas sucesivas pasando varias horas a –20°C, -40°C, -80°C y finalmente al tanque de nitrógeno líquido.

La descongelación de células desde los tanques de nitrógeno se llevó a cabo de forma inmediata sometiendo los criotubos a un baño de 37°C hasta la casi completa licuación de su contenido, que rápidamente se diluyó 10-20 veces en DMEM/10% FCS y se procesó con normalidad.

2.2 VECTOR PARA EXPRESIÓN EUCARIÓTICA

El vector utilizado para producir las distintas proteínas (nativas o mutantes puntuales) en células eucariotas fueron los pcDNA3.1/His (Invitrogen). A parte

de ser adecuados como vehículos de alto nivel de expresión en eucariotas, estos vectores generan la proteína de interés con una cola de histidinas y el epítipo Xpress™ en su extremo N-terminal. La cola de histidinas es útil para purificar luego la proteína (utilizando columnas de níquel, ión con afinidad por la histidina) y el epítipo Xpress™ es reconocido por el anticuerpo comercial homónimo.

De esta manera, se generaron en pcDNA3.1/His: β catenina WT, β cat-86E, β cat-86F, β cat-142F, β cat-654E y β cat-654F; todos ellos subclonados de su construcción correspondiente en pGEX-6P.

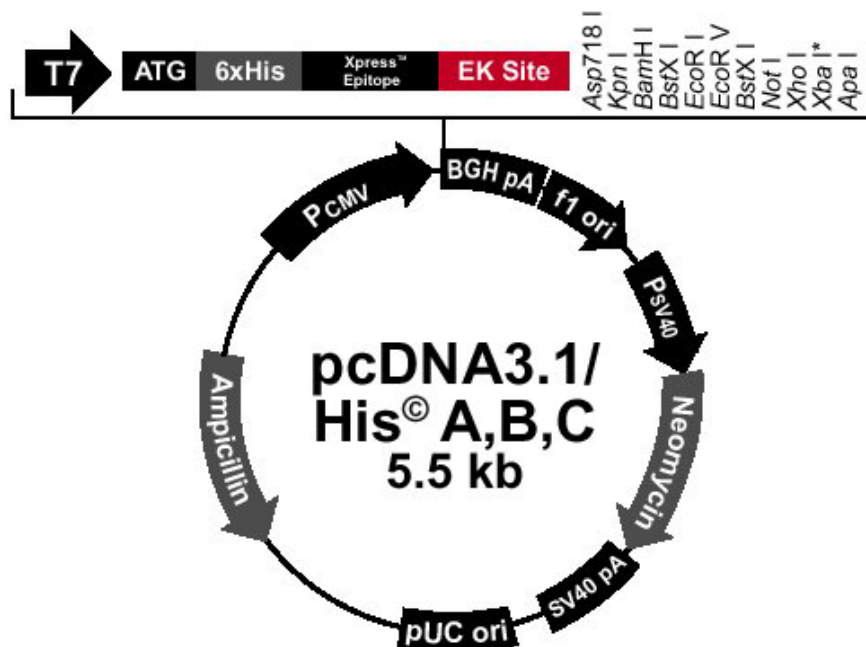


Fig 11. Mapa de las características generales de los pcDNA3.1/His (Invitrogen)

2.3 TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

Se solubilizaron, contaron y sembraron entre $2-5 \cdot 10^4$ células cm^{-2} en placas de distinto tamaño, según el experimento. Las células se incubaron entre 16-24 horas (como en 2.1.1) hasta alcanzar entre un 50-75% de confluencia.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se mezclaron unos 0,2 μg de DNA cm^{-2} (del plásmido adecuado), 2-5 μL de LipofectAMINE™ y Plus™ por μg de DNA en Opti-MEM® (todos de Life Technologies). La mezcla de transfección se añadió a las células y se incubaron durante 4-5 horas.

Una vez transfectadas, las células se reincubaron con DMEM/ 10% FCS durante unas 40-48 horas para permitir la expresión de los productos de interés. Transcurrido este tiempo, las células fueron lisadas como se describe a continuación. En algún caso, se añadió 0,25 mM de ortovanadato sódico (Na_3VO_4) a las células en las últimas 6 horas previas a la lisis.

2.4 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

Las células se solubilizaron en PBS (mediante *scrapping* o rascado). Tras varios lavados y resuspensiones en PBS para eliminar restos de suero y medio, las células se resuspendieron en tampón de Lisis (10 mM Tris·HCl, pH 7,6, 200 mM NaCl, 0,1% Nonidet P-40, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT) suplementado con 10 mM NaF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina, 1 mM PMSF y 0,2 mM Na_3VO_4 .

Así homogeneizadas, se mantuvieron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron a 12000 xg, 15 minutos y 4°C. Tras la centrifugación, se descarta el precipitado celular y el sobrenadante se cuantifica por Bradford (Bio-Rad) y se almacena a -20°C para su uso posterior.

2.5 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS EXPRESADOS EN EUCARIOTAS

Las células transfectadas con pcDNA, expresan los productos de interés con una cola de histidinas. Se aprovechó la afinidad de las histidinas por el ión níquel para purificar cromatográficamente tales productos. 250-500 µg de extractos celulares se incubaron en un volumen final de 250µL con 60µL de una suspensión al 50% (p/V) de níquel-NTA-agarosa® (Qiagen) durante 30-60 minutos a 4°C. Tras centrifugación, lo retenido en la resina se lava 3-4 veces con 500 µL de tampón de Lisis (ver 2.4) suplementado con 20mM Imidazol y 10-50 mM NaCl, para eliminar uniones inespecíficas en la níquel-agarosa. Según el caso, las proteínas unidas a la resina fueron eluidas con Tampón de Lisis /200mM Imidazole para su posterior uso o bien directamente solubilizadas en tampón de carga de electroforesis y sometidas a PAGE (ver 3.1).

3. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (*SDS-PAGE*)

Para determinar el grado de pureza de las proteínas recombinantes, tanto en forma de proteínas de fusión como en forma libre, se utilizó la electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida, siguiendo el método de Laemmli.

Se utilizaron geles de 1,5 mm de grosor con porcentajes de acrilamida (en el gel separador) entre el 8 y el 16,5% según el peso molecular de los fragmentos proteicos a resolver. Se mantuvo una relación acrilamida:bis-acrilamida de 37,5:1 en todos los casos. A las muestras se les añadió tampón de carga 5x (con 20% glicerol, 10% SDS, 0,32% de 2-mercaptoetanol en Tris 0.5 M pH 6,8) y se hirvieron 4 minutos. Se corrió a voltaje constante y las muestras se visualizaron sumergiendo el gel unos 15 minutos en una solución 0,1% de Coomasie Brilliant Blue, 40% metanol y 10% acético y destiñendo con

40% metanol y 10% acético. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron el Broad Range, Low Range o Kaleidoscope (todos ellos de Bio-Rad).

3.2 Electrotransferencia de proteínas. Western Blot.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a un filtro de nitrocelulosa (0.45 μm Protran, Schleicher & Schuell) en una cámara de transferencia (BioRad) a 400 mA durante 90 minutos. Los filtros se bloquearon con 1% BSA en TBS (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 136 mM NaCl, 4 mM KCl) suplementado con 0,2% Triton X-100 (TTBS) durante 1 hora a temperatura ambiente o durante 16 h a 4°C. A continuación, se incubaron con la dilución recomendada por el fabricante del anticuerpo primario adecuado durante 1-4 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas tres veces, de 10 minutos cada vez, con tampón TTBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron con anticuerpo secundario -anti IgG- conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) durante 1-1,5 h a temperatura ambiente. Se reveló con luminol utilizando el kit SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate de Pierce y películas fotográficas Kodak X-Omat (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla II. Lista detallada de los anticuerpos utilizados.

Organismo	Anticuerpo 1ario	Epítopo	Casa Comercial
ratón	α -Catenina, <i>clon 5</i>	729-906(final)	BD Transduction Labs
ratón	β -Catenina, <i>clon 14</i>	571-781(final)	BD Transduction Labs
ratón	β -Catenina, <i>clon 9G10</i>	dominio armadillo	Alexis biochemicals
ratón	E-Cadherina, <i>clon 36</i>	735-883(final)	BD Transduction Labs
ratón	Fyn, <i>clon 25</i>	1-132	BD Transduction Labs
cabra	GST, <i>27-4577</i>	no caracterizado	Amersham Pharmacia
ratón	Pan Ras, <i>clon Op41</i>	no caracterizado	Calbiochem
ratón	Fosfotirosina, <i>PY20/PY54</i>	Tyr-P	BD Transduction Labs
ratón	p120 ^{ctn} , <i>clon 98</i>	790-911(final)	BD Transduction

			Labs
ratón	Src, <i>clon GD11</i>	no caracterizado	Upstate biotechnology
ratón	TBP, <i>clon 17</i>	no caracterizado	BD Transduction Labs
cabra	TCF-4, <i>clon N-20</i>	N-terminal	Santa Cruz biotech.
ratón	X-press	X-press	Invitrogen
ratón	Yes, <i>clon 1</i>	10-193	BD Transduction Labs
Organismo	Anticuerpo Zario		Casa Comercial
cabra	Immunopure [®] Goat Anti-Mouse IgG-HRP		Pierce
conejo	Peroxidase-conjugated Rabbit Anti-Goat IgGs		Dako

Una vez revelada, la membrana de nitrocelulosa se estripó sumergiéndola en *Stripping buffer* (62,5mM Tris-HCl, pH 6,7, 100 mM β -mercaptoetanol, 2% SDS) a 55°C durante 45 minutos. Se comprobó cada vez la ausencia de señal tras los *strippings* incubando la nitrocelulosa con el anticuerpo secundario correspondiente y revelando nuevamente con luminol.

4. ENSAYOS PROTEÍNA QUINASA

Los ensayos de fosforilación se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ L en las siguientes condiciones: 25 mM Tris-HCl pH 6,8, 25 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 0.5 mM EGTA, 0,25 mM ortovanadato sódico (Na₃VaO₄), 1 mM DTT, 0,1 mM ATP o γ -³²P-ATP (1.000 cpm/pmol) según el ensayo. La quinasa empleada y los tiempos y temperaturas de reacción varió según el caso (ver tabla).

Las muestras se analizaron por electroforesis SDS-PAGE. En los ensayos no radioactivos, a la PAGE le siguió el Western Blot revelado con anti Phosphotyrosine (Transduction). En el caso de los ensayos radioactivos, los geles se tiñeron con Coomassie en 40% metanol y 10% ácido acético, se secaron y se expusieron a una película sensible a rayos X a -80 °C durante 12 h. La cuantificación de la fosforilación de la β -catenina se determinó cortando la banda radioactiva del gel y analizándola en un contador de centelleo líquido.

En algunos casos las reacciones de fosforilación también se llevaron a cabo en las mismas condiciones utilizando p120^{ctn}-GST o β -catenina-GST como sustrato y GST como control. Las reacciones finalizaron por dilución de

las muestras en tampón fosfato salino PBS (10 mM tampón fosfato pH 7,4, 136 mM NaCl, 4 mM KCl) y añadiendo 20 μ L de Glutathione-sepharose[®] (resuspendida al 50% en PBS). Las muestras se incubaron 10 min, se microcentrifugaron, se lavaron dos veces con PBS y la radioactividad presente se determinó cómo se ha descrito anteriormente.

Tabla III. Quinasas utilizadas, tiempos y temperaturas de reacción.

quinasa	obtención	condiciones de reacción
pp60 ^{C-src}	recombinante, adquirida de Upstate biotechnology	1-4h a 22°C
Fer	clonada en pcDNA3-His, expresada en células como proteína con poli-histidina en su N-terminal y purificada con níquel-agarosa	1h a 30°C
Fyn	purificada de extractos celulares (nativos o que sobreexpresan la quinasa) mediante inmunoprecipitación	1h a 30°C
erbB2	clonada en pcDNA3, y sobreexpresada en células	30 min a 30°C
EGF-R dominio citósólico	recombinante, adquirida de Sigma	30 min a 30°C
Yes	purificada de extractos celulares (nativos o que sobreexpresan la quinasa) mediante inmunoprecipitación	1h a 30°C

5. ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA

A lo largo de todo el trabajo, se han realizado ensayos de interacción proteína-proteína. Pueden clasificarse en cuatro grupos principales que llamaremos: *interacción directa* (ensayo únicamente con las dos proteínas de interés), *pull-down* (incubación de una proteína con extractos celulares totales), *ensayos con níquel-agarosa* (expresión de un gen en células y purificación proteica posterior) e *inmunoprecipitación* (purificación selectiva de una proteína endógena de un extracto celular).

5.1 *Interacción directa (sólo proteínas recombinantes purificadas)*

Aprovechando la capacidad de generar proteínas en *E.coli* fusionadas o no a GST y la afinidad de la Glutathione-sepharose[®] para unir específicamente los productos con GST, se mezclaron las diversas formas proteicas como se describe en el siguiente ejemplo: los distintos ensayos de unión de la β -catenina con el dominio citosólico de la E-cadherina se llevaron a cabo incubando concentraciones crecientes de β -catenina con una cantidad fija de E-cadherina unida a GST (GST-cytoEcadherina) en un volumen final de 200 μ L en 50 mM Tris pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 3 mM MgCl₂ y 0,1% (p/V) Triton X-100 (tampón de *Binding*) durante 40 min a 25°C.

Los complejos de GST-cytoEcadherina/ β -catenina formados se aislaron añadiendo 20 μ L de Glutathione-sepharose 4B[®] (retiene específicamente a la GST) e incubando 20 min a 25 °C. Seguidamente, se lavó la resina tres veces con 500 μ l de tampón de *Binding* para eliminar la β -catenina libre, no unida a la cytoE-cadherina. Los complejos GST-cytoEcadherina/ β -catenina retenidos por la resina se solubilizaron añadiendo tampón de carga de electroforesis (5x) e hirviendo las muestras 4 min.

Los complejos solubilizados se analizaron por electroforesis de poliacrilamida, SDS-PAGE, siempre por duplicado. Posteriormente el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para ser analizada por western blot con anticuerpo monoclonal (Transduction Labs) contra la β -catenina. En todos los casos se llevaron a cabo experimentos control en los que se incubó la β -catenina con GST sola; para eliminar cualquier asociación inespecífica de β -catenina con GST.

En los ensayos en que se determinó la afinidad de la β -catenina o p120^{ctn} fosforiladas por c-src (durante 1 a 4 horas a 22°C), se incluyeron en el mismo blot incubaciones con β -catenina o p120^{ctn} no fosforiladas, como control. Estas cateninas no fosforiladas se mantuvieron en las mismas condiciones que las cateninas a fosforilar: el mismo tiempo a 22°C y en una mezcla de reacción (ver punto 4 para más detalle) carente únicamente de quinasa c-src.

Las muestras que previamente habían sido fosforiladas por pp60c-src y sometidas a ensayos de interacción con la GST-cytoEcadherina, se analizaron

en paralelo por western blot con anticuerpo específico anti-fosfotirosina (Transduction Labs), para comprobar que había habido fosforilación.

Para cuantificar la cantidad de proteína, las películas fotográficas se analizaron en un densitómetro G-700 de BioRad. Los resultados obtenidos se compararon con cantidades conocidas de cada proteína presentes en el mismo western blot.

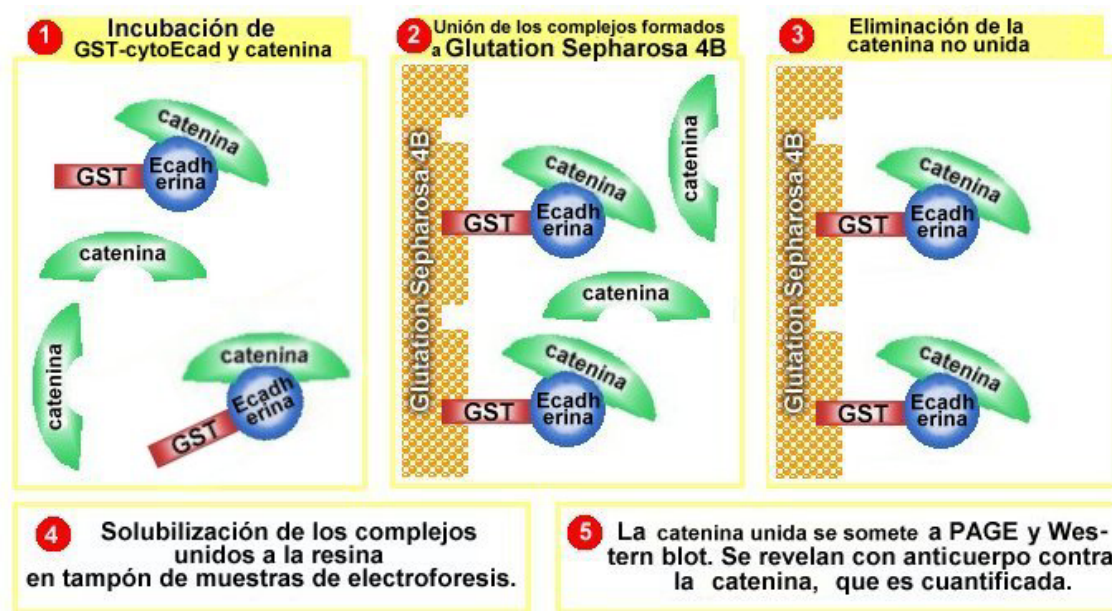


Fig 12. Representación esquemática de los ensayos de interacción *in vitro* (*bindings*) llevados a cabo.

5.2 Ensayo de *pull-down*

Una aproximación más fisiológica al estudio de las interacciones que una proteína establece con el resto de proteínas celulares son estos ensayos que denominamos de *pull-down*, donde una proteína recombinante que dispone de una modificación o *tag* fusionada, es incubada con extractos celulares para posteriormente ser purificada y analizar las proteínas que se hayan copurificado con ella o el grado de fosforilación que haya podido sufrir. Este tipo de ensayo se ha usado sobretodo para comparar el comportamiento de proteínas nativas y mutantes puntuales frente a distintos entornos celulares.

En general, entre 6 y 12 picomoles de GST, GST-cytoEcadherina o GST- β catenina (nativa o mutantes puntuales) se incubaron con 40-50 μ g de extractos celulares totales de IEC18 K-ras, SW480 o RWP1 en las mismas condiciones citadas en el apartado anterior (5.1). Los complejos proteicos formados fueron purificados con Glutathione-sepharose 4B[®], lavados y procesados (ver 5.1).

5.3. Ensayo de purificación con níquel-agarosa

Otro tipo de experimento desarrollado consistió en la transfección de diversos productos, clonados en pcDNA, en células y la subsiguiente expresión como proteínas de fusión con poli-histidinas. Aprovechando la capacidad de la níquel-NTA-agarosa[®] de unir polihistidinas (ver apartado 2.5), los complejos formados fueron retenidos. La realización de lavados en condiciones poco restrictivas (baja concentración de imidazol y sales), permitió aislar los complejos formados por las proteínas fusionadas a histidinas con el resto de proteínas celulares.

5.4. Inmunoprecipitación

Se purificaron las proteínas endógenas a partir de extractos celulares y se analizó su asociación a diversas proteínas celulares de interés. Para ello, se incubaron de 200 a 400 μ g de extractos totales (preparados como se describe en 2.4) con 4 μ g/mL del anticuerpo correspondiente durante 16 horas a 4°C. Se centrifugó brevemente para eliminar el material insoluble a 12.000 xg. El sobrenadante se incubó durante 90 minutos a 4°C con 60 μ L (de una solución al 50% p/V) de proteína A-agarosa (Sigma).

El material inmunoprecipitado se lavó dos veces con 500 μ L de tampón de Lisis (ver 2.4). Los complejos proteicos se eluyeron directamente con tampón de carga de electroforesis (ver 3.1) y fueron analizados por Western blot o bien fueron utilizados para ensayos quinasa (ver 4).

5.5 Determinación de la constante de afinidad de una interacción proteína-proteína. Representación de Scatchard.

Con el fin de caracterizar la interacción de β -catenina o p120^{ctn} con cyto-E-cadherina, los datos se analizaron mediante representaciones de Scatchard. Este tipo de análisis permitió determinar la constante de asociación, K_a , del equilibrio, representando el cociente de las concentraciones de ligando unido/ligando libre *versus* la concentración de ligando unido (todo para una cantidad fija de GST-cytoEcadherina). La pendiente de la gráfica corresponde a la constante de asociación.

En nuestro caso la concentración de proteína unida se determinó a partir del densitometrado de las películas y la concentración de proteína libre se determinó sustrayendo, a la concentración total de β -catenina o p120^{ctn} puesta en el ensayo, la cantidad de proteína unida.

6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL

Para analizar la actividad transcripcional mediada por β -catenina, distintas líneas celulares fueron cotransfectadas con 150 ng de pcDNA- β catenina (nativa o mutante) o 150 ng de pcDNA vacío, 20 ng de TOP-FLASH y 20 ng de pTK-*Renilla luciferase*.

Los plásmidos TOP-FLASH contienen tres copias de la secuencia de unión del Tcf-4 al DNA, un promotor mínimo de Fos y, a continuación (hacia el 3') está el gen de la luciferasa de *Firefly*.

Los plásmidos pTK-*Renilla* contienen el gen de la luciferasa de *Renilla* bajo el control de un promotor constitutivamente activo de timidina kinasa.

48 horas después de la cotransfección, las células se lisaron y se expusieron a distintos sustratos que son procesados por cada una de las luciferasas, siguiendo las instrucciones del fabricante (Dual Luciferase Reporter Assay System, Promega). La actividad de las luciferasas se siguió con un luminómetro FB-12 (Berthold Detection Systems). La actividad relativa de la luciferasa de *Firefly* fue normalizada respecto a la de la luciferasa de *Renilla* en cada caso para evitar disparidad de resultados debidos a la distinta eficiencia

de transfección entre muestras. Cada transfección se repitió por triplicado y se calculó la media y la desviación estándar.