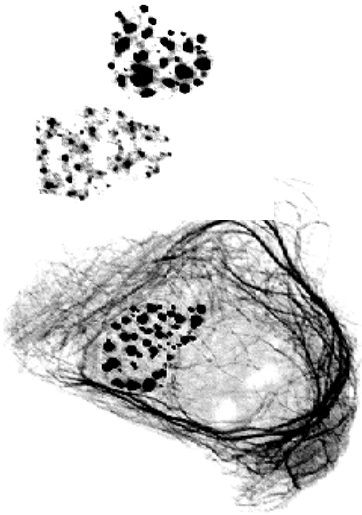
MECANISMES DE REGULACIÓ EN L'ACTIVITAT BIOLÒGICA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ SNAIL



TESI DOCTORAL

DAVID DOMÍNGUEZ SOLÀ

ANY 2003

Dipòsit legal: B.24347-2003
ISBN: 84-688-2286-8

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

MECANISMES DE REGULACIÓ EN L'ACTIVITAT BIOLÒGICA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ SNAIL

O UNA PROPOSTA MOLECULAR DE PERQUÈ EL PROCÉS DE TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA ÉS REVERSIBLE EN LA SEQÜÈNCIA INVASIÓ-METÀSTASI DELS TUMORS EPITELIALS

Memòria presentada per en David Domínguez Solà
per a optar al grau de Doctor
pel Departament de Ciències Experimentals i de la Salut,
Universitat Pompeu Fabra
Any 2003

Treball realitzat sota la direcció del Dr Antonio García de Herreros Madueño,
a la Unitat de Recerca en Biologia Cel·lular i Molecular,
Institut Municipal d'Investigació Mèdica i Universitat Pompeu Fabra
de Barcelona

Programa de Doctorat en Anatomia Patològica,
del Departament de Ciències Morfològiques,
Universitat Autònoma de Barcelona (1996-1998 i 2002)

Antonio García de Herreros Madueño,
Director de la Tesi

David Domínguez Solà,
Doctorand

A LA MEVA PETITA FAMÍLIA,
DÍDAC I CHELI,
PELS SOMRIURES GRATUÏTS
APARESCUTS ENTRE MILERS DE LLETRES,
PEL CONSOL CONSTANT
DE SABER QUE SEMPRE HI SÓN,
PER INFINITAT DE RECORDS,
D'AVUI I DEMÀ.
PER LA TESI DIÀRIA,
DEL CONVIURE QUOTIDIÀ.
PER SER QUI SOU,
COM SOU.

PAG INDEX TEMÀTIC

1 SUMARI

1 INTRODUCCIÓ

3 **Com envaeix un tumor i quines lliçons en podem treure**

4 **El procès invasiu I metastàsic dels carcinomes és basat en la transició epiteli-mesènquima**

5 Què passa dins un tumor epitelial, o com s'organitza i com es dissemina un càncer colorectal

6 Les cèl·lules dels fronts d'invasió pateixen una transició epiteli-mesènquima

7 De com els tumors epitelials fan metàstasis d'arquitectura ordenada i recuperen el fenotip epitelial

8 **Els processos conservats en càncer són dependents de gens essencials en desenvolupament, o com buscar en l'embriogènesi respostes per al càncer**

8 Com les alteracions d'un traçat molecular originen el carcinoma colorectal

10 La senyalització per Beta-catenina és essencial en els tumors, i ho és en gastrulació

12 Semblances entre gastrulació i invasió tumoral, i com els gens implicats podrien ser els mateixos

14 Snail és el gen candidat a mediar la transició epiteli-mesènquimaSnail i els fronts d'invasió i metàstasi

15 **Snail en els fronts d'invasió i metàstasi**
Snail indueix la transició epiteli-mesènquima en cèl·lules epitelials tumorals, i ho fa regulant E-cadherina

16 L'estudi d'alguns tumors epitelials recolza la relació entre Snail i el procés invasiu

17 **Com gastrular és com fer metàstasis, i com Snail ho orquestra tot**

18 Les cèl·lules invasives reverteixen el seu fenotip en els focus metastàtics.

19 Snail regulat en gastrulació, regulat en invasió-metàstasi i la hipòtesi de treball

PAG

RESULTATS

20 REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL

CARACTERITZACIÓ DEL PROMOTOR DE L'HOMOLEG HUMÀ D'SNAIL

21 **Escases dades sobre el promotor d'Snail**

21 La conservació interespècie del promotor és escassa

21 El promotor d'Snail a Drosophila Melanogaster és estructurat per respondre a un gradient dorso-ventral de morfògens

22 El promotor de Xenopus Laevis té segments d'especificitat tissular, i el de Drosophila d'especificitat intratissular

23 El promotor d'Snail és mancat de caixa TATA

24 **Caracterització del promotor humà**
Clonatge de 1000pb del promotor humà, regió 5'. No s'assembla gaire als de Drosophila, Xenopus i/o ratolí.

26 Delimitació del promotor mínim del gen humà i correlació amb l'expressió en línies cel·lulars

RESULTATS

PAG REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL

CARACTERITZACIÓ DEL PROMOTOR DE L'HOMOLEG HUMÀ D'SNAIL

28 La seqüència promotora del retrogen d'Snail al cromosoma 2, les equivalències amb el promotor mínim d'Snail i la caixa CCACCACC.

30 Organització seqüencial del promotor mínim, zones d'interés i llocs putatius diana per a factors de transcripció coneguts

31 **Regulació transcripcional dels nivells d'Snail**

Resposta del promotor a factors inductors d'EMT i com la resposta en alguns casos depèn en part de regions concretes del promotor

32 Els èsters de forbol (TPA) indueixen l'expressió d'Snail a través de l'activació de PKC

33 Alguns senyals provinents de la matriu extracel·lular poden induir l'expressió d'Snail

36 Validesa del sistema Dorsal/NF-κB en el promotor humà d'Snail

39 Modulació de l'activitat del promotor d'Snail segons el grau de confluència de la monocapa epitelial

PAG

RESULTATS

41 REGULACIÓ NO TRANSCRIPCIONAL

CONTROL DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL D'SNAIL PER MECANISMES POST-TRADUCCIONALS

41 **Evidències sobre un mecanisme no transcripcional de regulació d'Snail?**

42 Snail és dins i fora del nucli en fibroblastes i cèl·lules epitelials tumorals en cultiu

44 **Snail entra i surt del nucli per un mecanisme d'export nuclear**

La localització subcel·lular d'Snail depèn de dominis proteics concrets

47 La localització citosòlica d'Snail depèn d'un mecanisme actiu d'export nuclear

48 Alguna regió conservada en la meitat N-terminal és responsable de la localització citosòlica

49 Una regió rica en leucines media l'export nuclear d'Snail per un sistema depenent de CRM-1

51 Slug és estrictament nuclear i no té NES en la seva seqüència

52 El domini ric en serines adjacent a la seqüència d'export nuclear en modula l'activitat

52 **La localització subcel·lular d'Snail és modulada per fosforilació**

Snail és fosforilat "in vivo" i principalment en el domini ric en serines

55 L'estat de fosforilació del domini ric en serines determina la localització subcel·lular d'Snail

L'Snail fosforilat és exportat

56 La fosforilació pot ocorrer al nucli

56 **Un canvi conformacional d'Snail condiciona l'efecte modulador de la fosforilació sobre la seva localització subcel·lular**

L'extrem C terminal d'Snail també condiciona l'export nuclear d'Snail

57 Les cues N i C terminals d'Snail interaccionen entre elles

59 La presència de la meitat C-terminal permet la relocalització de la meitat N-terminal dins el nucli

59 La interacció NxC és modulable per la presència i fosforilació del domini ric en serines

RESULTATS

PAG REGULACIÓ NO TRANSCRIPCIONAL
CONTROL DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL D'SNAIL PER MECANISMES POST-TRADUCCIONALS
61 **La modulació de la localització subcel·lular d'Snail condiciona el seu efecte transcripcional**
Quan Snail és fora del nucli te un escàs efecte transcripcional
62 La fosforilació d'Snail però, no en modula l'afinitat per l'ADN

RESULTATS

PAG
64 SIGNIFICAT BIOLÒGIC DELS MECANISMES DE REGULACIÓ NO TRANSCRIPCIONAL (I)
SNAIL DINS EL NUCLI PER FER QUELCOM MÉS QUE UN EFECTE TRANSCRIPCIONAL?
64 **Quan Snail és al nucli es localitza en petits subdominis, preferentment en les formes que poden ser exportades**
eGFPSnail i mmSnail+IF es disposen en subdominis nuclears puntiformes i mòbils de petita mida, situats als espais intercromatínics
64 Els subdominis nuclears on es distribueix Snail són possiblement "speckles"
66 La localització en speckles precisa que Snail sigui desplegat (o fosforilat), del domini ric en serines i dels 3 primers dits de zenc
67 L'Snail exportable es distribueix en speckles
68 En els speckles, Snail co-localitza amb alguns factors d'splicing de l'ARN i no amb l'ADN
69 Snail co-localitza amb U2AF65

RESULTATS

PAG
71 SIGNIFICAT BIOLÒGIC DELS MECANISMES DE REGULACIÓ NO TRANSCRIPCIONAL (II)
QUÈ FA SNAIL FORA DEL NUCLI, I QUÈ TE A VEURE AIXÒ AMB LA SEVA REGULACIÓ
71 **Quan Snail és fora del nucli, té avidesa pel citosquelet**
Snail decora el citosquelet de les cèl·lules on és expressat
71 **Un sistema de regulació que juga amb la localització subcel·lular**
O perquè que hi hagi un sistema de regulació tal, fa rellevant la localització extranuclear d'Snail
71 Algunes dades recolzen un efecte no transcripcional d'Snail i excloent de la localització nuclear
73 **Snail s'uneix als microtúbuls de les cèl·lules epitelials i mesenquimals**
mSnail co-localitza amb la xarxa microtubular i no altre
73 La unió a microtúbuls és preferent en algunes línies cel·lulars i és alternativa a la localització nuclear
74 **Snail afecta la dinàmica microtubular com ho fan les proteïnes motores associades a microtúbuls**
75 Fasciculació de microtúbuls i pas de xarxa a feixos-fibres circulars quan és sobrexpressat
76 Microtúbuls i nucli només coexisteixen si al nucli Snail és en "speckles"
76 La unió d'Snail als microtúbuls és irreversible.
77 **Snail co-sedimenta "in vitro" amb els microtúbuls**

RESULTATS

PAG SIGNIFICAT BIOLÒGIC DELS MECANISMES DE REGULACIÓ NO TRANSCRIPCIONAL (II)
QUÈ FA SNAIL FORA DEL NUCLI, I QUÈ TE A VEURE AIXÒ AMB LA SEVA REGULACIÓ

78 Snail endogen en 3T3 co-sedimenta amb els microtúbuls

79 **La unió d'Snail als microtúbuls és mediada per la cua C-terminal, i és complementària al procés d'export nuclear**

Difícil predicció del domini d'interacció amb els microtúbuls

80 L'absència de dominis candidats a mediar la unió suggereix el mapeig per deleció

80 La deleció de la cua C-terminal d'Snail n'evita la unió a microtúbuls

81 L'absència de l'últim dit de zenc, però no dels últims cinc aminoàcids d'Snail, aboleix la co-localització d'Snail amb els microtúbuls

82 Les formes fosforilades d'mSnail s'uneixen de forma preferent als microtúbuls, mentre que les no-fosforilades no ho fan

83 **Snail estabilitza la xarxa microtubular**

83 Snail fa elongar persistentment i deforma els microtúbuls on es fixa

84 Snail evita la despolimerització de la xarxa de microtúbuls

85 L'efecte d'estabilització és només exercit pels mutants capaços de co-localitzar amb els microtúbuls, no pas de tots els citosòlic

85 L'estabilització permanent dels microtúbuls induïda per mSnail desencadena la detirosinació de la tubulina

85 eGFP-Snail co-localitza amb microtúbuls detirosinats i n'augmenta el nombre

87 Els filaments de vimentina es reorienten al voltant dels microtúbuls decorats per Snail

PAG

91 DISCUSSIÓ

91 **Un sistema complex per a un factor complex**

91 Efectes no transcripcionals per a Snail?

92 Snail és expressat a nivells basals en diverses línies de cèl·lules epitelials

93 Perquè expressar Snail pot ser un procés de derepressió activa

93 El promotor basal conté els elements de resposta a alguns activadors d'EMT coneguts, però tenim poques dades

94 Regula Snail la seva pròpia transcripció?

95 Una arquitectura conservada per a respondre al sistema Dorsal/ NF-kB

96 **Un sistema robust per a distribuir Snail dins la cèl·lula, basat en la fosforilació**

96 Una NES per Snail sense NLS coneguda

97 La fosforilació modula Snail per un domini ric en serines que plega la proteïna

99 La fosforilació té com a efecte final causar un canvi conformacional a la molècula

PAG DISCUSSIÓ

100 Arquitectura conservada en homòlegs allunyats, tot i no poder verificar el seu sentit funcional

102 Abolir l'efecte transcripcional d'Snail, fi o circumstància

104 **La distribució nuclear dels factors de la família Snail suggereix un efecte no únicament associat a l'ADN i la regulació transcripcional**

104 Snail i ARN, o com Snail podria tenir un efecte post-transcripcional

106 **Snail als microtúbuls, o un vincle per a la seva funció ancestral**
Snail es comporta com una proteïna motora

107 Rho , gastrulació i cresta neural, metàstasi i com canviar la forma cel·lular

109 Rho GTPases i estabilització microtubular

109 L'estabilització dels microtúbuls per Snail activa el sistema de RhoGTPases, en concret RhoA

110 Només les formes que estabilitzen els microtúbuls poden activar RhoA

110 Com començar a explicar perquè Snail fa bellugar les cèl·lules i les polaritza

112 Coordinar l'efecte transcripcional i el no transcripcional, o el "loop" dins-fora d'Snail

112 Els dits de zenc són la frontissa molecular de les funcions d'Snail

113 Quan fosforilar Snail, o quan sortir del nucli, i per això E-cadherina suprimeix migració?

114 Cal haver fet una repressió eficient de l"expressió d'E-cadherina per a què Snail es fosforili

Com vincular funció i localització d'Snail en un procés modulable
115 Fosforilació d'Snail per PKCs i el vincle amb les unions adherents suggereixen una hipòtesi mecanística per al cicle regulador de la distribució subcel·lular d'Snail i les funcions transcripcionals i no transcripcionals.

118 Un model per explicar la reversibilitat de l'EMT en gastrulació i metàstasi

121 La incongruència de la dualitat Snail/Slug

122 Només una NES per a Snail i només per a mamífers

122 Domini especial per a una gastrulació especial? O la falta de consens amb les aus

125 EPÍLEG

126 MATERIAL I MÈTODES

141 REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

150 ANNEX

II ABREVIATURES

III AGRAÏMENTS

VII ÍNDEX DE FIGURES

MECANISMES DE REGULACIÓ EN L'ACTIVITAT BIOLÒGICA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ SNAIL

O UNA PROPOSTA MOLECULAR DE PERQUÈ EL PROCÉS DE TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA ÉS REVERSIBLE EN LA SEQÜÈNCIA INVASIÓ-METÀSTASI DELS TUMORS EPITELIALS

L'adquisició de propietats invasives i de la capacitat de fer metàstasis és una característica evolutiva dels tumors sòlids i de forma destacada, dels tumors originats en epitelis. En aquests el fenotip de les cèl·lules canceroses en els focus invasius és força allunyat de l'original, i així perden les característiques pròpies d'una cèl·lula epitelial i adopten trets biològics propis de cèl·lules mesenquimals, com són l'absència d'unions intercel·lulars o l'adquisició de mobilitat. Aquesta transformació fenotípica, anomenada "transició epiteli-mesènquima", és reminiscent d'un procés similar que té lloc durant el desenvolupament embrionari, i pot ocórrer en resposta a diversos estímuls, tot i que sembla bastant clar que l'efector final n'és *Snail*.

Snail pertany a una família de factors de transcripció amb dits de zenc que desenvolupen rols essencials durant el desenvolupament embrionari. La gastrulació, la gènesi i migració de la cresta neural, la diferenciació del Sistema Nerviós i d'altres processos morfogènics són depenents de l'activitat d'aquesta família de proteïnes. *Snail* és determinant en la gastrulació de totes les espècies on ha estat identificat, des dels equinoderms fins als mamífers. Es creu que la funció més ancestral d'aquest factor i possiblement de tota la família gènica és el control de la motilitat cel·lular, però sembla bastant clar que aquest fet és associat a profunds canvis fenotípics en les cèl·lules, concretats en l'anomenada "transició epiteli-mesènquima" abans citada. Per tant, *Snail* és capaç de coordinar els diversos esdeveniments moleculars que són necessaris per a la consecució d'aquest succés, que d'altra banda és bàsic per a diversos processos morfogènics.

Snail funciona com a repressor transcripcional. La diana més ben caracteritzada és el gen que codifica per *E-cadherina*, una proteïna transmembrana que constitueix l'eix de les unions adherents. Les unions adherents són essencials en els complexes d'unió de les cèl·lules epitelials i de fet, la seva presència sembla determinant per a la diferenciació i funcionalitat dels epitelis. En els processos neoplàsics més avançats i de pitjor pronòstic, l'expressió d'*E-cadherina* desapareix o és minsa. Ocorre en alguns casos per mutacions del mateix gen que la codifica, però en els últims anys ha quedat força palès que en molts altres casos, la davallada en els nivells cel·lulars d'aquesta proteïna és deguda a l'activitat d'*Snail* en els tumors.

Es desconeix però què fa que *Snail* sigui expressat en càncer, i com se'n regula l'activitat. Sembla evident que el coneixement d'aquests fets pot aportar informació rellevant per a la comprensió de la gènesi dels fenòmens d'invasió i metàstasi, i per tant per al seu tractament mèdic. El propòsit d'aquest treball experimental ha estat estudiar quins són els mecanismes que controlen l'expressió i activitat d'aquest factor de transcripció, i de com se'n modula l'activitat biològica.

Snail és subjecte a un estricte control transcripcional. En condicions normals, les cèl·lules epitelials mantenen *Snail* en nivells d'expressió baixos, i de fet bona part de la regió 5' de la seqüència promotora rep l'efecte de possibles factors repressors. La regió promotora més propera a l'inici de transcripció conté elements capaços de respondre a estímuls activadors, i sembla que és també la que manté l'activitat basal del gen. Els factors inductors de "transició epiteli-mesènquima" indueixen l'expressió d'*Snail* mitjançant aquestes regions.

Tanmateix, el control transcripcional de l'activitat d'aquest factor de transcripció no sembla suficient per a explicar les observacions experimentals. Així, en diverses línies tumorals epitelials és possible detectar nivells

d'expressió d'*Snail* variables, i en alguns d'aquests casos, és coexpressat amb *E-cadherina*, que "a priori" n'és diana transcripcional.

Això suggereix que la presència d'*Snail* no sempre té una repercussió certa sobre el fenotip cel·lular, i indica que d'altres mecanismes deuen modular-ne l'activitat. Efectivament, és subjecte a un fí mecanisme de modulació de la seva activitat basat en el control de la seva distribució dins la cèl·lula. Inesperadament per a un factor de transcripció, *Snail* és també localitzat al citosol, fet curiosament més evident en les cèl·lules epitelials on coexisteix amb *E-cadherina*.

El control de la localització subcel·lular d'*Snail* ocorre per fosforilació d'un domini ric en Serines present a la part central de la molècula, modificació que probablement condiciona el plegament de la molècula, deixant al descobert una seqüència d'export nuclear funcional que permet el reconeixement de la proteïna pel transportador *CRM1*, i per tant la seva sortida específica fora del nucli. Al citosol, *Snail* és incapaç de reprimir amb eficiència els seus gens diana, i per tant el seu efecte transcripcional és abolit.

No obstant, la localització citosòlica d'*Snail*, lluny de ser inespecífica, té un efecte biològic evident. *Snail* s'associa amb els microtúbuls, i aquesta associació té com a efecte l'estabilització i modificació de les característiques dinàmiques i funcionals de la xarxa microtubular. Els diferents canvis observats suggereixen que aquestes modificacions són les necessàries per a induir motilitat en les cèl·lules epitelials. És possible que part d'aquest efecte sigui depenent de la capacitat que sembla tenir *Snail* d'activar la GTPasa *RhoA*.

Molt probablement ambdós efectes transcripcional i no-transcripcional, són coordinats. És factible que la unió d'*Snail* als microtúbuls sigui conseqüència de la davallada d'*E-cadherina* que deriva del seu efecte al nucli, i que això permeti coordinar la pèrdua de les unions intercel·lulars amb l'inici del moviment, aquest últim característic dels processos morfogènics basats en les "transicions epiteli-mesènquima". Amb això, *E-cadherina* sembla l'element determinant al voltant del qual gira l'activitat d'*Snail*.

Les conclusions de cada apartat de resultats són detallades a l'inici d'aquests, a mode de resum. La discussió inclou referències i figures d'experiments provisionals que han estat annexats al treball. Aquests aporten dades útils per a la congruència del fil argumental d'aquest part de la tesi, i obren hipòtesis conceptuals pendents de futures confirmacions experimentals.
Les figures segueixen una numeració independent en cada apartat (introducció, resultats, discussió). A les pàgines finals hi ha un índex detallat de totes elles. Les taules i box explicatives són també numerades de forma independent.

ENCARA NO HE TROBAT CAP PROBLEMA,
PER COMPLICAT QUE FOS, QUE,
EN EXAMINAR-LO CORRECTAMENT,
NO ESDEVINGUÉS ENCARA MÉS COMPLICAT.

POUL ANDERSON
(ESCRIPTOR DE CIÈNCIA FICCIÓ NORD-AMERICÀ)

En el si de qualsevol càncer les cèl·lules són immerses en un procés altament dinàmic i adaptatiu, per ser exposades al què hom diu que són estrictes fenòmens de selecció "darwiniana". L'adaptació a tals condicions requereix la modulació de mecanismes cel·lulars essencials. Aquests es prenen com a noves "millores" evolutives per les cèl·lules tumorals, i les permeten progressar dins l'organisme car les confereixen avantatges selectius. Això explica en bona mesura perquè el conjunt de fets biològics que fonamenten l'origen i progressió del càncer són conservats en gairebé la totalitat dels tumors descrits a la literatura, que no són pocs -n'hi ha més de cent sinó tenim en compte les variants morfològiques, i esdevenen incomptables si tenim en compte els processos neoplàstics de comportament benigne.

D'acord amb alguns autors (*Hanahan D i Weinberg RA, Cell 2000*), el procés evolutiu de tot càncer passa per l'adquisició de sis capacitats: autosuficiència en senyals de creixement, insensibilitat a senyals inhibidors del creixement, evasió dels mecanismes de mort programada, potencial replicatiu sense fi, angiogènesi mantinguda, i capacitat d'invasió i metàstasi. L'absència de control proliferatiu no respon a un creixement més ràpid, sinó a un creixement persistent, a diferència del què ocorre en els teixits normals. Tot i tractar-se de pocs elements, són suficients per causar l'aparició d'aquesta malaltia en els humans i possiblement la resta de vertebrats -si més no els ratolins. Bona part d'aquestes adquisicions evolutives permeten a les cèl·lules tumorals créixer independentment de la resta de l'organisme, en principi de forma ilimitada, i tanmateix ser capaces d'accedir a un aport energètic suficient per a mantenir aquest creixement -angiogènesi.

Però l'adquisició més significativa del càncer, sobretot per la rellevància que té en la seva història biològica i en la de l'organisme hoste, és la capacitat d'envair i fer metàstasis. La possibilitat de disseminar-se i colonitzar nous territoris és potser necessitat o bé conseqüència de l'evolució continuada i particular de les cèl·lules tumorals. En essència, poder deixar el tumor primari permet a les cèl·lules tumorals, si més no en un primer moment, l'accés a nutrients i espai sense limits[NP1]. Malgrat la progressió de les noves "colònies" dependrà directament de les altres capacitats adquirides per les cèl·lules tumorals, l'impacte biològic de l'adquisició de capacitat invasiva és extraordinari i és potser la "troballa" evolutiva més avançada per a qualsevol neoplàsia.

Per a l'organisme hoste, l'aparició de metàstasis té un efecte determinant en el pronòstic de la malaltia. Gairebé el 90% de les morts per càncer són degudes a la disseminació metastàsica dels tumors originals, i aquest fet és directament lligat al concepte de "malignitat" associat als processos neoplàstics. La conseqüència més directa d'aquest fenomen és la davallada en les possibilitats terapèutiques, que encara ara són les més limitants per al pronòstic[NP2]. En tots els sistemes

[1] L'ambient en l'interior d'un tumor primari es fa cada cop més impracticable amb el creixement progressiu de la lesió. En estadis avançats, hi ha un greu desequilibri entre aports i demandes, i les condicions de vida per a les cèl·lules tumorals en molts casos són difícils -ambient anaerobi, alts nivells de citoquines indesitjables, reacció del teixit hoste ...- Alguns autors creuen que el procés que permet a les cèl·lules tumorals deixar el lloc original és no més que un procés adaptatiu a aquesta situació.

[2] La "malignitat" del càncer és lligada a la imprevisibilitat en l'evolució i l'empitjorament en el pronòstic que suposa l'aparició de metàstasis i focus invasius en qualsevol tumor sòlid. Això fa que els tractaments més eficients dels què actualment disposem - que són aquells que es fan de forma local sobre el tumor primari, com la cirurgia o la

d'estadificació pronòstica del càncer, el pes de l'evidència de lesions metastàsiques és el què condiciona en major grau l'evolució prevista de la malaltia[NP3].

En molts casos -fins a un 30%, excloent els tumors de pell i el melanoma, en el moment del diagnòstic del tumor primari ja hi ha metàstasis detectables a distància. En d'altres casos -una elevada proporció-, les metàstasis apareixeran temps després de diagnosticada la lesió original, malgrat el tractament mèdic i quirúrgic sobre la lesió primària. Així, la incapacitat més que evident d'assolir èxits terapèutics davant càncers avançats ha fet re-orientar l'acte mèdic, diagnòstic i terapèutic a la prevenció de l'aparició de lesions neoplàsiques, i/o a la detecció precoç d'aquestes -detecció de lesions pre-neoplàsiques o de tumors incipients. La millora en el pronòstic d'alguns càncers ha derivat d'aquesta actitud. Crida però l'atenció que, malgrat la importància clínica del procés metastàsic, el coneixement dels mecanismes moleculars que hi són implicats sigui encara força escàs.

Per a alguns tipus de càncer, com els tumors hematològics, la possibilitat de disseminació per l'organisme és inherent a la biologia de les cèl·lules que els integren. De forma normal, els limfòcits o els leucòcits es desplacen a través de la sang, la limfa, o dins els teixits i de fet, és una capacitat essencial per a l'eficiència del sistema immunitari o la resolució de ferides. L'aparició de capacitats invasives i metastàsiques en els tumors sòlids i sobretot en el cas dels tumors epitelials, requereix però l'adquisició de noves propietats biològiques que en el teixit original no són evidents[NP4].

Els tumors epitelials suposen més d'un 80% de tots els tumors que afecten els humans, i d'altres vertebrats. Aquest predomini és en part degut a que els epitelis són força estesos per l'organisme, possiblement per l'elevada versatilitat de les cèl·lules epitelials. Alhora, algunes de les característiques funcionals dels epitelis fan més probable que siguin susceptibles de ser l'origen d'un càncer: per una banda, alguns epitelis com l'intestinal pateixen un recanvi cel·lular força ràpid, potser només superat per alguns tipus cel·lulars de la sang com limfòcits o leucòcits. Aquest fet fa possible l'aparició d'errors replicatius i altres alteracions moleculars associades al càncer. Tanmateix, molts dels epitelis són utilitzats per l'organisme com sistemes de barrera, que ens separen del medi extern. En conseqüència, són fàcilment susceptibles de rebre l'influx de diverses noxes -substàncies tòxiques, radiacions, ... que poden també trobar-se en l'origen de les alteracions moleculars amb capacitat oncogènica[NP5]. És possible que aquests fets condicionin el tipus d'alteracions que porten les cèl·lules epitelials a esdevenir canceroses, a diferència del tipus d'alteracions que són substrat dels càncers d'origen hematològic o

radioteràpia- siguin difícilment exitosos o útils. Així la malaltia deixa de ser controlable, i excepte en casos comptats -com els tumors testiculars-, l'efecte dels tractaments en el pronòstic i la mortalitat és escàs (*Sporn MB a Lancet, 1996*).

[3] En la classificació *TNM*, la més utilitzada en el camp clínic i patològic, *N* i *M* es refereixen a l'existència de metàstasis ganglionars o en òrgans distants, respectivament. Només el paràmetre *T* té relació amb el creixement local del tumor, i de fet, és directament condicionat com a tal per l'existència d'invasió en teixits adjacents (*T* en bona part reflexa el nivell d'infiltració del tumor).

[4] Els *sarcomes* -tumors sòlids d'estirp mesenquimal- tenen una biologia relativament diferent a la dels tumors epitelials. Malgrat tenen capacitat metastàsica, la tendència a la recurrència local és major que en els tumors epitelials.

[5] Les cèl·lules epitelials poseeixen dues característiques essencials. La primera és que poden constituir superfícies cohesives mitjançant la propietat inherent que tenen d'adherir-se íntimament a les cèl·lules epitelials veïnes. Això ha fet que siguin àmpliament utlitzades com a sistemes de revestiment -tub digestiu, pell i faneres, arbre respiratori-. Alhora, les cèl·lules epitelials es diferencien adquirint sistemes d'especialització de membrana i mitjançant la capacitat que tenen de polaritzar-se envers la superfície. Això fa que per una banda puguin adoptar fenotips molt diversos que les permeten fer funcions variades -absorbir, desplaçar, secretar- i les permet constituir òrgans amb especificitat funcional, com les glàndules.

mesenquimal[NP6].

Una propietat inherent als epitelis és la immobilitat. Per definició, les cèl·lules epitelials mantenen entre elles sistemes d'adhesió força elaborats que les permeten desenvolupar algunes de les seves funcions. Potser l'únic indici de "moviment" en el sí dels epitelis és el què generen els processos maduratius i de recanvi que hi ha en els epitelis sotmesos al contacte amb el medi extern, com l'epidermis o l'epiteli intestinal. En els estadis inicials, o fins i tot en estadis evolutius relativament avançats, els càncers epitelials mantenen aquesta coherència i cohesivitat entre les cèl·lules que els integren. Per tant, per tal que una cèl·lula epitelial pugui desplaçar-se per així infiltrar, envair i derivat d'aquesta propietat, fer una disseminació metastàsica, cal que pateixi canvis força importants en la seva biologia. Hom pot preveure que entre els requeriments bàsics per a aquesta transformació, cal que hi hagi la pèrdua del contacte amb les cèl·lules veïnes, i l'adquisició de moviment, a més de poder accedir a nous territoris on establir-se (*Thiery JP, Nat Rev Cancer 2002*), i en definitiva perdre moltes de les característiques definitòries de qualsevol cèl·lula epitelial. Un cop al nou focus metastàsic, les cèl·lules hauran d'aconseguir progressar i establir una nova colònia. Aquesta última part és la més ineficient de tot el procés metastàsic (*Chambers AF et al, Nat Rev Cancer 2002*) i és condicionada per múltiples factors que no són necessàriament relacionats amb les característiques de la cèl·lula tumoral, i ho són força amb les del teixit hoste i amb la capacitat de les cèl·lules novo-arribades d'aconseguir sistemes de manteniment per al seu creixement.

Com envaeix un tumor i quines lliçons en podem treure

En bona part dels càncers epitelials l'adquisició de característiques invasives i metastàsiques suposa l'estadi final de la història evolutiva del tumor (*Hanahan D i Weinberg RA a Cell 2000, Chambers AF et al, Nat Rev Cancer 2002, Thiery JP, Nat Rev Cancer 2002*). Per bé que "tardana" en termes evolutius, aquesta adquisició ocorre freqüentment en tumors força avançats i de gran extensió, però hi ha nombroses excepcions en les quals la progressió fins a aquest punt és prou ràpida com per ocórrer en tumors petits, de curta durada i poc extensos. No obstant, es tracta d'una adquisició mecanísticament tardana que en molts casos sembla dependre de l'existència de nombroses de les altres alteracions comunes associades a la gènesi del càncer (*Hanahan D i Weinberg RA* a *Cell 100, 2000*).

Des del punt de vista patològic, la possibilitat de que un tumor epitelial origini una disseminació metastàsica depen directament de la capacitat que les cèl·lules d'aquest tumor tenen d'envair teixits adjacents. Amb aquesta propietat, és només qüestió de temps que les cèl·lules tumorals accedeixin a vasos sanguinis o limfàtics, i des d'aquests puguin entrar a la circulació sistèmica i arribar a nous teixits hostes on establir-se. En aquest sentit, la probabilitat d'incidència de metàstasis és en relació directa amb el nivell d'infiltració que el tumor adquireix en profunditat. En funció de l'estructura de l'òrgan on es trobi

[6] Com en el cas dels tumors d'origen hematològic, les alteracions moleculars que amb més freqüència s'han associat a aquest tipus de tumors són citogenètiques, fonamentalment translocacions cromosòmiques. És curiós que en el cas dels tumors epitelials, les alteracions moleculars més destacades corresponguin a la pèrdua d'activitat de gens supressors tumorals. Els tumors mesenquimals i els hematològics són els més freqüents en l'edat infantil, mentre que els epitelials, de forma important, ocorren en individus adults, sobretot d'edat avançada. Això pot tenir a veure amb el tipus d'alteracions genètiques que s'hi detecten. Al capdavall, és molt possible que els requeriments moleculars per a l'evolució d'uns o altres tipus de càncers siguin certament divergents.

l'epiteli que dóna lloc al tumor, aquest nivell haurà de ser major o menor[NP7].

El procès invasiu I metastàsic dels carcinomes és basat en la transició epiteli-mesènquima

L'adquisició de capacitats invasives canvia profundament la biologia dels tumors epitelials, i també l'organització histològica i el context tissular, bàsicament perquè l'epiteli deixa d'estar confinat a la seva localització original. Les alteracions citològiques que hom pot observar en l'estudi d'un tumor són en bona part generades per totes les alteracions biològiques que fonamenten l'origen del càncer, com la relació entre aneuploïdia i atípia nuclear. Les modificacions arquitecturals depenen en major grau de les alteracions que deriven en l'aparició dels focus amb capacitat invasiva i metastàsica.

De tots els càncers epitelials coneguts, el càncer colorectal és possiblement el més rellevant. Ho és des del punt de vista estadístic i epidemiològic (és el segon càncer, en freqüència, en ambdós sexes, i tanmateix no hi ha una idea clara dels condicionaments ambientals que s'hi associen[NP8]), i ho és des del punt de vista biològic, perquè bona part del què sabem sobre les bases moleculars de la tumorigènesi epitelial prové del coneixement que tenim de la biologia d'aquest tumor. En conseqüència, és probablement el model més útil com a paradigma del què és exposat tot seguit.

Què passa dins un tumor epitelial, o com s'organitza i com es dissemina un càncer colorectal

L'estudi histològic d'un carcinoma colorectal aporta algunes dades conceptuals força significatives, que són reflexades a la ***Fig In-1***.

En el budell normal, el procés maduratiu 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 què coincideix amb la seva diferenciació. En els tumors, aquest procés és anòmal en fases ja inicials. Els adenomes -lesions proliferatives no infiltrants de l'epiteli intestinal[NP9]- tenen ja alteracions franques en aquest respecte. Alguns autors (*Oshima H et al. Cancer Res 1997; Wagan HS et al, J Pathol 1998*) consideren que l'adenoma respon a una alteració en el procés de maduració i migració de les cèl·lules de l'epiteli intestinal al llarg de les criptes. Una de les

---

[7] En tots els sistemes d'estadiatge pronòstic del càncer, com el *TNM* anteriorment esmentat, o per exemple l'*índex de Breslow* per als melanomes, es té en compte el nivell d'infiltració en profunditat. Això correlaciona amb la probabilitat d'accedir a vasos -usualment limfàtics-, i és pròpia de cada teixit car la seva estructura histològica i la distribució de la vascularització és sensiblement diferent. Tanmateix, les dades més recents suggereixen que la capacitat que la majoria de tumors tenen d'adquirir una xarxa vascular pròpia- sigui sanguinia o limfàtica-, és suficient per a permetre l'extravassació i disseminació de les cèl·lules tumorals, amb el qual en molts casos no hi hauria tan clara dependència del nivell d'infiltració.

En alguns tumors, la disseminació no és condicionada per l'accés a vasos, sinó que pot fer-se per altres vies. Per exemple, en els *carcinomes de pàncrees* predomina la disseminació utilitzant les *"beines perineurals"* (els plans de clibatge de les beines de teixit connectiu que envolten els nervis, o *perineuri*). Els tumors de la superfície ovàrica com els *carcinomes serosos* utilitzen el líquid que banya les seroses com a vehicle de disseminació.

[8] El càncer colorectal és el segon en prevalença en la població catalana general, i el mateix ocorre a nivell europeu. Quant a incidència, és el tercer (14%) en homes i el segon (15%) en dones, tot i que es preveu que al 2005 sigui el segon en ambdós sexes, per darrera del càncer de pulmó i vies respiratòries (homes) i de mama (dones). D'altra banda, és la segona causa de mortalitat per càncer en la població general dels països occidentals. Font: *Document "Càncer Catalunya 2001". ICO i Dept. Sanitat i Seguretat Social, Generalitat de Catalunya 2001.*

Els mètodes actuals de diagnòstic precoç han demostrat ser només eficients (cost-benefici) en individus de risc (història familiar de casos esporàdics o malalties familiars associades a càncer colorectal com la Poliposi Familiar Adenomatosa).

[9] Els adenomes, com és sabut des dels treballs de Vogelstein i cols (*Fearon ER, Vogelstein B, Cell 1990*)., acumulen successivament la majoria de les alteracions moleculars associades al càncer de colon. En principi, el pas a adenocarcinoma -que des del punt de vista diagnòstic depen de l'existència de focus infiltrants- ocorre en estadis tardans, i no es coneix molt bé en base a quines alteracions moleculars.

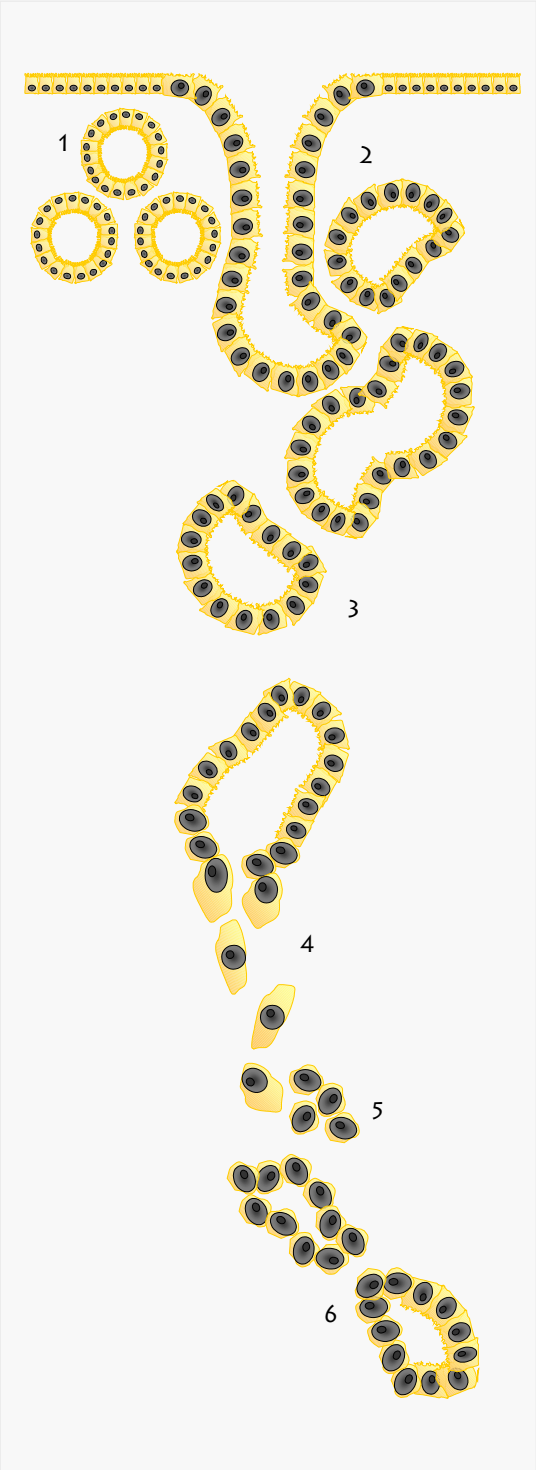


FIG IN-1 : GRADACIÓ ARQUITECTURAL EN UN ADENOCARCINOMA DE COLON

Els adenocarcinomes de colon es poden considerar un exemple paradigmàtic de càncer epitelial. En l'estudi microscòpic d'aquestes neoplàsies és possible distingir diverses zones arquitecturals que corresponen a estats morfogènics transitoris. En la zona superficial adjacent a la lesió tumoral la mucosa intestinal normal és organitzada en estructures tubulars obertes a la llum (les criptes intestinals) (1) constituïdes per cèl·lules epitelials polaritzades i cohesives, fet essencial per a la seva correcta conformació. Les zones més superficials dels adenocarcinomes (2) acostumen a presentar una organització arquitectural que recorda a la de la mucosa normal, de manera que el tret més diferencial és l'aspecte citològic de les cèl·lules que integren el tumor, sensiblement diferent del de les cèl·lules normals sobretot per la pèrdua de la seva polaritat característica i l'augment de la mida nuclear (atípia citològica), fet que condiciona en certa manera l'arquitectura (displàsia). Aquestes zones creixen i ocupen els teixits adjacents. En la zona central del tumor (3), la més extensa, les cèl·lules tumorals constitueixen encara estructures tubulars equivalents a les de les zones superficials, però com en aquestes últimes, de característiques arquitecturals aberrants. En les zones més capdavanteres de la lesió, algunes de les cèl·lules es desprenen de les veïnes en perdre les seves característiques citològiques més significatives (unions intercel·lulars, polarització), i esdevenir motils, constituint els anomenats "focus invasius"(4). Les cèl·lules soltes que constitueixen aquests focus invasius poden seguir proliferant, de manera que en estadis posteriors formen petits grups (5) que, progressivament recuperen algunes de les seves característiques epitelials, essencialment la cohesió. Així, en alguns d'aquests grups les cèl·lules tornen a organitzar-se en estructures de reminiscència tubular, anormals, però que recorden força a les àrees centrals del tumor. Aquest fenomen s'ha anomenat "reconstrucció" (6), i és possiblement del qual prové la massa tumoral principal (3), de tal manera que a mesura que el tumor progressa i infiltra, els fronts invasius (4-6) són substituïts per les àrees centrals (3) originades en fenòmens de reconstrucció.

conseqüències és l'aparició de noves criptes originades a partir de les preexistents, que creixerien en eixos aberrants i que són el substrat morfològic dels adenomes tubulars clàssics. Alhora, en els focus infiltrants l'eix de creixement canvia per fer-se oposat al normal i estendre's cap a capes profundes. Això és en part reflex de l'alteració de les propietats biològiques d'aquest epiteli intestinal.

En bona part del tumor es manté una coherència en l'estructura general de forma que és possible reconèixer criptes, les cèl·lules mantenen un cert grau de polarització que les permet per exemple constituir llums, de vegades amb secreció; i l'organització general de l'epiteli és força preservada. És per tant possible identificar el teixit tumoral com a epiteli d'origen intestinal.

La zona perifèrica dels tumors sòlids és sensiblement diferent de la part central. Es considera que és la zona d'avanç del tumor, i per definició aquest marge és anomenat "*front d'invasió*". Els fronts d'invasió dels tumors epitelials són usualment constituïts de forma heterogènia per estructures tubulars complexes, petits grups cel·lulars i tanmateix cèl·lules soltes. Dues dades destaquen en l'estudi histològic: (i) per una banda, en aquestes zones és possible

evidenciar canvis morfològics en el teixit connectiu que circumda el tumor, el què hom reconeix com a reacció estromal. Aquest fet possiblement no és més que l'evidència de l'estreta relació que s'estableix entre el teixit tumoral i l'hoste, i de la possible interacció biològica entre ambdós[NP10]. (ii) D'altra banda, l'aspecte citològic de les cèl·lules que integren el front d'invasió és en molts casos força diferent del què presenten les cèl·lules que integren la massa tumoral predominant, sobretot en el cas de les cèl·lules que infiltren soltes o en petits grups.

Les cèl·lules dels fronts d'invasió pateixen una transició epiteli-mesènquima

Els grups de cèl·lules infiltrants presents als fronts d'invasió tenen una organització histològica "primitiva", de forma que no hi trobem estructures glandulars parcialment diferenciades com les que fan les cèl·lules del centre del tumor, amb llums o fins i tot secreció. Pel contrari, les cèl·lules es separen de les veïnes i de la massa tumoral principal, i s'avancen cap al teixit adjacent. La pèrdua de cohesivitat, junt amb la pèrdua de la polaritat epitelial normal, comporta un aspecte motil que en casos és similar al d'un fibroblast. S'ha suggerit però (*Kirchner T i Brabletz T, Am J Pathol 2000*) que en els fronts d'invasió tenen lloc fenòmens de "*reconstrucció*" histològica. Aquest procés de "reconstrucció" suposa una reversió fenotípica de les cèl·lules més infiltrants, i es culmina paradoxalment amb la reorganització d'aquestes en estructures epitelials d'arquitectura similar a les què constitueixen el gruix predominant del tumor. Per tant, l'heterogeneïtat observada als fronts d'invasió no és més que la coincidència en zones properes de diferents fases evolutives del mateix procés infiltrant. Quelcom semblant ocorreria amb les cèl·lules que donen lloc a les metàstasis.

Les dues característiques que destaquen en les cèl·lules que es desprenen del front d'invasió, això és, pèrdua de cohesivitat o adhesió, i l'augment en la mobilitat -fet certament associat al primer, correlacionen directament amb la davallada de l'expressió de la proteïna *E-cadherina* en aquesta zona del tumor. Aquesta troballa és la més consistent en tots els tipus tumorals citats a la literatura (mama, bufeta, colon, pulmó, pell, estòmac), i la més significativa (*Thiery JP, Nat Rev Cancer 2002; Martinez Arias, Cell 2001*). L'*E-cadherina* és l'element principal dels sistemes d'adhesió en els epitelis, i en conseqüència, la seva absència fàcilment es correlaciona amb una pèrdua de la cohesió i coherència entre les cèl·lules que integren els grups epitelials[NP11]. En els fronts d'invasió, *E-cadherina* és desplaçada de la membrana cel·lular i es distribueix pel citosol o bé es perd.

El canvi fenotípic experimentat per les cèl·lules del front d'invasió és conegut com "*transició epiteli-mesènquima*", i fou originalment definit en el desenvolupament embrionari (*Hay ED, Acta Anat 1995*). En aquest procés, les característiques més essencials de qualsevol cèl·lula epitelial es perden en favor de l'adquisició de característiques més

[10] En l'actualitat es considera que en bona mesura, els senyals rebuts del teixit hoste condicionen sobremanera el comportament de les cèl·lules tumorals. Des de la modulació del seu comportament invasiu, fins a l'eficiència en la implantació i desenvolupament de les cèl·lules que constitueixen una metàstasi (*Chambers AF, Nat Rev Cancer 2002; Müller et al, Nature 2001*).

[11] Les *cadherines* són molècules transmembrana, que permeten l'adhesió entre dues cèl·lules veïnes mitjançant unions homotípiques, i estrictament depenent de la presència de calci. L'*E-cadherina* és la molècula que constitueix les *unions adherents* entre les cèl·lules dels epitelis, i es creu principal en el manteniment de la cohesió epitelial. Aquesta funció condiciona el comportament de les cèl·lules epitelials, perquè la funció de l'*E-cadherina* n'és essencial per a la correcta polarització -implica l'establiment correcte dels diferents dominis de membrana en els què es basa la funció epitelial-, i tanmateix és implicada en la correcta divisió cel·lular i en sistemes de senyalització. *E-cadherina* és doncs causa i conseqüència de la diferenciació correcta dels epitelis.

pròpies d'una cèl·lula mesenquimal. Equival doncs al concepte de "*desdiferenciació*" que els patòlegs utilitzen en la denominació de l'aspecte histològic de molts tumors, perquè de fet les característiques de les cèl·lules no en permeten la filiació citològica. En alguns casos, els tumors epitelials -carcinomes- presenten tal grau de desdiferenciació en totes les seves cèl·lules que de vegades es fa gairebé impossible reconèixer-ne la teòrica estirp epitelial enlloc de la mesenquimal suggerida per l'aspecte histològic i alguns marcadors addicionals[NP12] .

De com els tumors epitelials fan metàstasis d'arquitectura ordenada i recuperen el fenotip epitelial

En els focus metastàtics el patró histològic recorda el dels fronts d'invasió, si bé hi ha un predomini exagerat de les zones de "*reconstrucció*" histològica -definides en el punt anterior-, que de vegades són organitzades en estructures d'arquitectura molt similar a la de les àrees centrals del tumor primari i aspecte glandular i/o cohesiu. D'acord amb aquest aspecte histològic, l'expressió d'*E-cadherina* en les metàstasis és en bona part dels casos més elevada que en els fronts d'invasió, i fins i tot en ocasions (vora un 50% segons les cites, *Ikeguchi et al, J Surg Oncol 2001*) és similar en intensitat i distribució a la del teixit normal. En les àrees de *reconstrucció* dels fronts d'invasió ocorre quelcom equivalent.

La recuperació de l'expressió i localització normal d'*E-cadherina* en les metàstasis s'associa a un pitjor pronòstic (*Ikeguchi et al, J Surg Oncol 2001* , i *El-Bahrawym A et al., Hum Pathol 2001*). Pel què actualment sabem, el restabliment de les característiques cohesives permet a la metàstasi progressar en el nou teixit hoste, i en conseqüència això fa que el pronòstic del pacient sigui pitjor ja que és indefectiblement lligat al grau d'extensió de la malaltia. Aquest fet és determinant en la progressió dels tumors sòlids, i essencialment en els epitelials: en un sistema tan ineficient com el procés metastàsic, aquest mecanisme de "reversió" fenotípica en permetria l'èxit [NP13] (*Ilyas M, J Pathol 2000; Chambers AF et al, Nat Rev Cancer 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 *transició epiteli-mesènquima (Thiery JP, Nat Rev Cancer 2002).*

Aquests fenòmens són força conservats en la majoria dels tumors epitelials -budell, estòmac, pulmó, mama, pròstata, fetge. Com en tot allò relacionat amb la gènesi del càncer, el fet que els mecanismes implicats siguin sensiblement conservats fa pensar que són basats en processos essencials per a les cèl·lules, possiblement també per a les cèl·lules normals.

Els processos conservats en càncer són dependents de gens essencials en desenvolupament, o com buscar en l'embriogènesi respostes per al càncer

[12] És el cas dels anomenats "*carcinomes sarcomatoides*", lesions neoplàsiques certament infreqüents però de les quals hi ha referències en diversos òrgans com el ronyó, pulmó o la mama. Es creu que les cèl·lules tumorals que els integren deriven de cèl·lules epitelials que haurien experimentat una transició epiteli-mesènquima, i en casos és possible trobar focus de transició entre els dos fenotips en l'estudi histològic. Tenen una evolució agressiva, semblant als carcinomes d'alt grau.

[13] Diversos autors (*Chambers AF et al, Nat Rev Cancer 2002 i cites allí referenciades*) han demostrat que les metàstasis són processos ineficients per definició. Si bé la invasió, disseminació vascular i arribada a nous teixits són força eficaços, la progressió en el nou focus és força complexa, i només en alguns casos es generen *micrometàstasis*, integrades per petits grups cel·lulars o cèl·lules aïllades, que ocasionalment poden progressar i constituir una metàstasi macroscòpica. Es creu que les metàstasis provenen doncs de no més d'un 0.02% de les cèl·lules tumorals provinents dels focus invasius. El restabliment de les característiques adhesives en les metàstasis epitelials sembla suficent com per a permetre el creixement de les cèl·lules metastàsiques.

Cada cop entenem millor la relació que existeix entre els processos normals i els estats patològics. En el cas del càncer, hi ha una estreta relació molecular doncs bona part dels gens implicats en l'oncogènesi i progressió tumoral són gens que juguen rols importants en processos essencials en el funcionament cel·lular normal i/o en el desenvolupament embrionari (*Martínez-Arias a Cell, 2001)*. La diferència entre una cèl·lula normal i una tumoral deu ser deguda a l'ús que se'n fa d'aquests gens essencials i dels traçats moleculars que integren.

Com les alteracions d'un traçat molecular originen el carcinoma colorectal

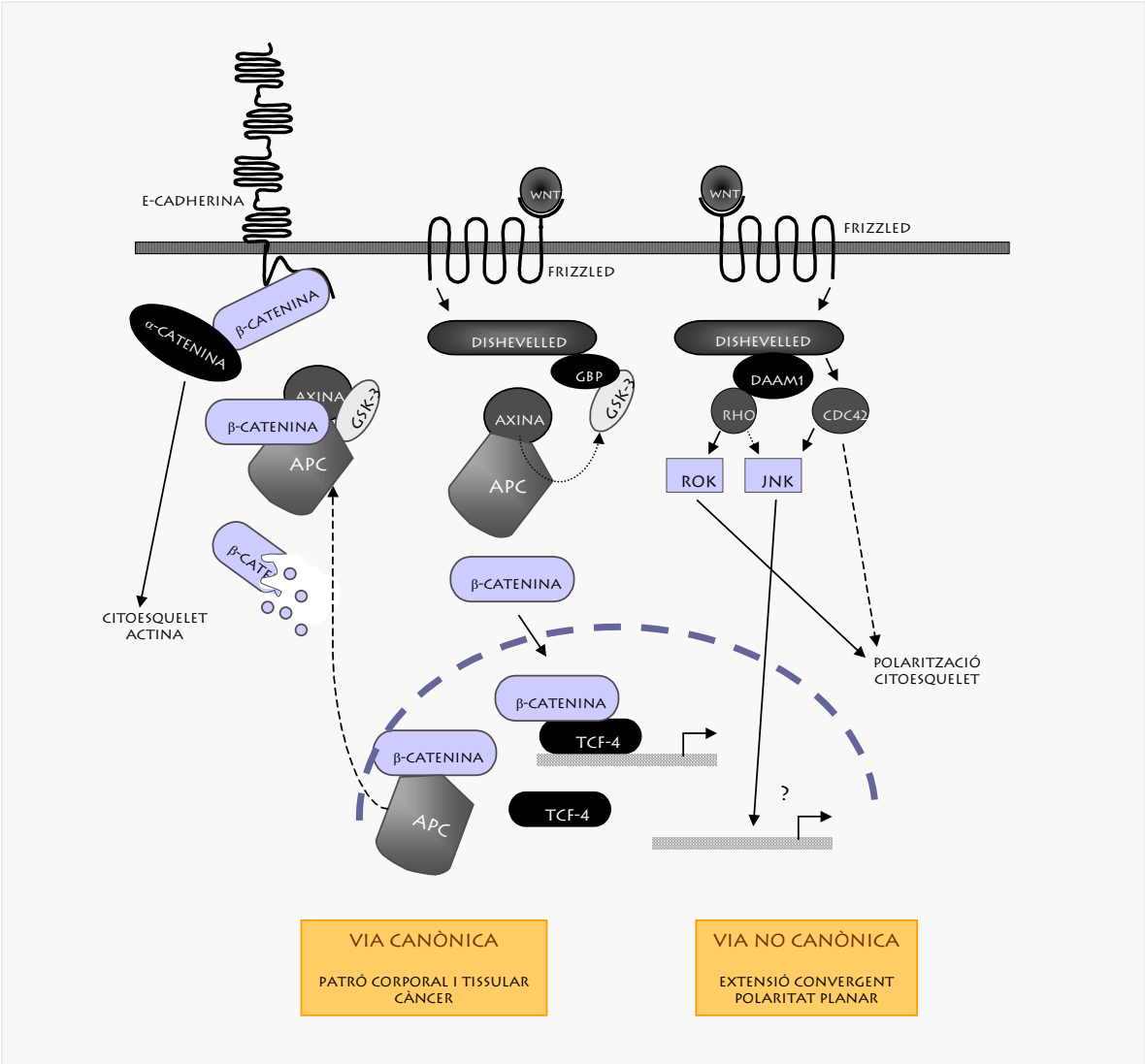
En la majoria dels carcinomes colorectals esporàdics -un 85%-, les alteracions moleculars són derivades de la pèrdua de funció de la proteïna *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli protein*, doncs la seva mutació és l'alteració genètica que fonamenta els casos de "*poliposi colònica familiar*" *-FAP-*) (*Fearon ER, Vogelstein B, Cell 1990; Bienz M i Clevers H, Cell 2000*). La majoria d'alteracions moleculars comporten la síntesi de formes truncades de la proteïna que perden així part de les seves propietats funcionals. Hom considera que la funció defectuosa d'*APC* té conseqüències suficients com per a justificar la gènesi d'un procés tumoral [NP14].

APC forma part d'un traçat molecular essencial en desenvolupament i en el funcionament de les cèl·lules epitelials en l'individu adult (***Box 1***). Possiblement per això participa del sistema d'unions adherents, el citosquelet i l'activació transcripcional al nucli. Tot i que el sistema és més complex que tot això, l'element final d'aquesta via canònica és la proteïna *Beta-catenina*.

La pràctica totalitat dels càncers colorectals presenten alteracions en aquest eix molecular[NP15] i aquest fet és essencial en el procés oncogènic (*Bienz M i Clevers H, Cell 2000*). Així, en el 15% de casos en què no hi ha alteracions mutacionals d'*APC*, hi ha mutacions en d'altres elements de la via com *Axina* o alteracions mutacionals en el gen que codifica per *Beta-catenina* (*CTNNB1, Bienz M i Clevers H, Cell 2000*). En els últims anys, s'han descrit també alteracions d'aquest traçat molecular en d'altres neoplàsies epitelials com el carcinoma de mama, l'hepatocarcinoma, el carcinoma de pulmó de cèl·lula no petita, les neoplàsies de l'arrel pilosa cutània, el medul·loblastoma, el carcinoma anaplàstic de tiroide, els carcinomes de pròstata, ovari i endometri, el mesotelioma i el melanoma (*Bienz M i Clevers H, Cell 2000; Michaelson JS i Leder P, Oncogene 2001 (mama), Fukuchi T et al, Cancer Res 1998 (endometri); Zurawel et al Cancer Res 1998 (medul·loblastoma); Chesire et al Oncogene*

[14] Cada cop hi ha més dades moleculars al voltant del rol biològic d'*APC*. Malgrat que en alguns casos les dades són contradictòries, es creu que la disfunció d'*APC* provoca dos fenòmens essencials i suficients per alterar la biologia cel·lular normal i iniciar el procés tumoral: per una banda, el procés maduratiu de l'epiteli de la cripta intestinal és anormal i això comporta alteracions arquitecturals que semblen trobar-se en l'origen dels adenomes intestinals (*Wong MH et al, PNAS 1996*). D'altra banda, dóna lloc a inestabilitat cromosòmica degut al seu rol en el procés de divisió cel·lular (*Fodde R, Smits R i Clevers H. Nat Rev Cancer 2001*), fet que pot ser suficient per permetre l'aparició de noves alteracions que deuen col·laborar en els diversos mecanismes de progressió tumoral (*Bienz M, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*). Així doncs, si bé bona part dels efectes tumorigènics de la disfunció d'*APC* deriven del seu rol regulatori sobre *Beta-catenina*, hi ha d'altres propietats biològiques no relacionades amb aquesta que per sí soles aporten fets essencials directament relacionats amb el càncer.

[15] Les *catenines* són proteïnes que en condicions normals constitueixen el nexe entre els complexes d'unió dels epitelis amb el citosquelet cel·lular. Això és així per a *alfa*, *beta* i *gamma-catenina* (*placoglobina*). Aquesta funció és essencial per al desenvolupament, funcionament i organització epitelial normal. *Beta-catenina* enllaça *E-cadherina* amb *alfa-catenina* i aquesta última connecta el complexe d'unió amb el citosquelet d'*actina*.



BOX-1 : TRAÇATS MOLECULARS DEPENENTS DE LA SENYALITZACIÓ PER WNT-WINGLESS

El senyal activat per la unió dels factors Wnt als receptors Fzl, desencadena complexos processos moleculars, que essencialment són lligats a dos traçats moleculars "divergents": la *via canònica* i la *via no-canònica*. La primera té com a efecte final l'activació transcripcional de gens diversos mediada per l'entrada de la proteïna beta-catenina al nucli cel·lular i interacció amb els factors de la família LEF/TCF. Aquesta via, curiosament, enllaça els fenòmens d'adhesió intercel·lular (unions adherents, E-cadherina) amb la senyalització al nucli. L'efecte final de l'activació transcripcional mediada per beta-catenina és la redefinició del fenotip cel·lular, fet essencial en processos morfogènics i histogènics cabdals en el desenvolupament embrionari i en la vida adulta, com la gastrulació o l'estructuració del pèl o les criptes intestinals. La funció de la proteïna APC en aquest traçat és essencial, no només per mediar el control de la localització i nivells de beta-catenina, sinó també perquè possiblement enllaça aquest traçat amb diversos fets biològics.

La *via no-canònica* depèn fonamentalment de la proteïna Dishevelled, i pel què sabem, no implica en cap moment a beta-catenina. És un traçat molecular força conservat que controla els processos de polaritat cel·lular planar (Drosophila i vertebrats) i extensió convergent (vertebrats). La polaritat cel·lular planar orienta les cèl·lules dels epitelis en un eix diferent a l'apico basal i relatiu a l'eix corporal o l'eix funcional de l'epiteli: per exemple, l'orientació a l'unison de la direcció dels cilis dels oviductes. Els moviments d'extensió convergent reorganitzen les cèl·lules en els teixits embrionaris i dirigeix la coordinació del moviment de grups cel·lulars cohesius, fet necessari en fases tardanes de la gastrulació. Dishevelled s'associa als microtúbuls i als filaments d'actina, i es creu que aquests dos fenòmens són crucials en el seu efecte biològic en aquest traçat molecular, on les Rho GTPases tenen un paper essencial.

Es coneixen també vies depenent de Wnt associades a la senyalització per calci i proteïna-quinases de la família PKC, que són enllaçades amb la via no-canònica.

Esquema modificat a partir de l'existent a "Wnt genes" (*www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html*). La part corresponent a la via no-canònica és extreta de *Mlodzik M, Trends Gen 2002; 18(11): 564-71*; i de *Tada M, Concha ML i Heisenberg CP, Sem Cell Dev Biol 2002; 13: 251-60.*

2002 (pròstata)). En alguns d'aquests casos, com és el colon o l'arrel pilosa, el rol de beta-catenina en el procés de desenvolupament normal i funcionament normal del teixit adult, s'ha provat ésser també essencial (*Huelsken J et al, Cell 2001*). *Beta-catenina* és doncs determinant per a la definició de l'organització histològica en gairebé la majoria de teixits epitelials (*Batlle E et al, Cell 2002; van de Wetering M et al, Cell 2002*).

En condicions normals, *Beta-catenina* és necessària per a connectar l'*E-cadherina* situada a la membrana de les cèl·lules epitelials amb el citosquelet cel·lular de filaments d'*actina*, i possiblement la xarxa microtubular (*Ligon LA et al, Nat Cell Biol 2001*). Aquest complex molecular esdevé així fonamental per a la polarització i diferenciació dels epitelis. *Beta-catenina* alterna essencialment entre dos "*pools*": un citosòlic -eventualment nuclear- i l'associat a les *unions adherents*, amb *E-cadherina*.

Hi ha evidències creixents que suggereixen que *APC* actua de "transportador" de *Beta-catenina* arreu de la cèl·lula, distribuint-la entre aquests dos "*pools*" i els complexes de degradació amb *Axina* (*Bienz M i Clevers H, Cell 2000; Bienz M, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*)

Però el rol oncogènic i paradoxalment histogènic de B*eta-catenina* és lligat a l'activitat transcripcional que aquesta proteïna té quan és al nucli cel·lular. En condicions normals es tracta d'un fenomen inusual donat que la majoria de molècules són associades a l'*E-cadherina* a membrana o redistribuïdes per *APC*. La senyalització per *Wnt/Fzl (**Box 1**)*, o les alteracions mutacionals que afecten l'eix molecular de B*eta-catenina* en bona part dels càncers epitelials tenen com a conseqüència la seva localització al citosol i al nucli. En la pràctica totalitat dels adenocarcinomes de colon és possible detectar *beta-catenina* nuclear, i en predomini en les cèl·lules dels fronts d'invasió (***Fig In-2***).

En l'epiteli intestinal normal només hi ha *Beta-catenina* nuclear a les cèl·lules del fons de les criptes, i es creu que aquest fet és essencial per a l'organització arquitectural d'aquestes (*Bienz M i Clevers H, Cell 2000; Batlle E et al, Cell 2002; van de Wetering M et al, Cell 2002*). No obstant, el fet que no totes les zones dels tumors intestinals presentin aquesta alteració en la localització fa pensar que malgrat que seria l'explicació més plausible, les alteracions d'*APC* - o en la resta dels casos, dels altres factors de la via, inclosa *Beta-catenina*- són necessàries però no suficients per a justificar la presència de *Beta-catenina* al nucli. L'explicació és possiblement més complexa.

La senyalització per Beta-catenina és essencial en els tumors, i ho és en gastrulació

La localització nuclear de *beta-catenina* té implicacions importants per al funcionament usual d'una cèl·lula epitelial. Això és degut a què un cop al nucli, aquesta proteïna té un efecte directe sobre l'expressió gènica, car és capaç d'actuar com a factor transactivador i activar l'expressió de gens diana[NP16]. Fins aquest moment s'ha descrit un cert nombre de gens que augmenten la seva expressió en resposta a la

[16] La interacció de *Beta-catenina* amb els promotors dels seus gens diana es fa mitjançant factors transcripcionals capaços d'unir-se directament amb l'ADN. Per tant, si més no pel què actualment sabem, *Beta-catenina* no interacciona directament amb cap seqüència. I tanmateix, només els factors de la família *TCF/LEF* medien aquesta unió -pel què fins al moment s'ha descrit (en vertebrats, *TCF-4/LEF-1*)-. Curiosament, en condicions normals aquests factors actuen com a repressors dels gens diana de *Beta-catenina*, usualment per estar units a co-factors repressors com *Groucho*, que són desplaçats per l'unió amb *Beta-catenina* (*Brantjes H et al. Nucleic Acids Res 2001*). En certa manera, doncs, *Beta-catenina* actua desreprimint gens. No es descartable, però, que pugui modificar l'activitat d'altres factors transcripcionals usualment repressors en unir-s'hi, i per tant modular el seu repertori.

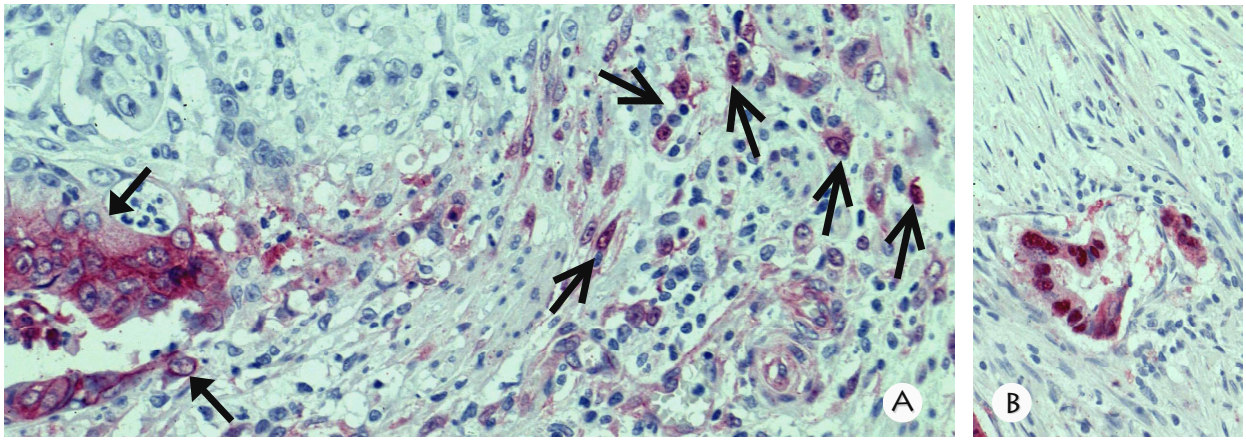


FIG IN-2 : BETA-CATENINA ESDEVÉ NUCLEAR EN ELS FOCUS INVASIUS DELS ADENOCARCINOMES DE COLON
En la gran majoria dels adenocarcinomes de colon, les alteracions de l'eix molecular que regula els nivells i distribució de beta-catenina tenen com a últim efecte la localització d'aquesta proteïna al nucli. Aquest fenomen comporta canvis essencials en la cèl·lula, en bona part per l'efecte transcripcional que beta-catenina té sobre molts gens.
(A) En els focus invasius, les cèl·lules que es deprenen de la massa tumoral principal tenen característicament elevades quantitats de beta-catenina nuclear (fletxes obertes), fet que contrasta amb la seva absència en la majoria de les cèl·lules de la massa tumoral principal (fletxes plenes). (B) Tanmateix, en els focus de reconstrucció les cèl·lules conserven en bona part beta-catenina al nucli, si bé algunes cèl·lules és descrit que poden revertir aquest fenòmen. En trets generals, la presència de beta-catenina nuclear correlaciona amb la participació de les cèl·lules que la presenten en processos morfogènics.

transcripció mediada per *beta-catenina*[NP17], si bé en alguns casos algun d'aquests gens diana no sembla ser-ho en tots els sistemes experimentals (*Chan TA et al; PNAS 2002; Sekine S et al, Oncogene 2002*). Les cèl·lules amb *Beta-catenina* nuclear són susceptibles de patir diversos canvis fenotípics i funcionals que juguen un rol essencial en el desenvolupament embrionari, però probablement també en la progressió dels tumors epitelials. L'activitat reguladora d'*APC* sobre *Beta-catenina* és en essència orientada a evitar aquesta senyalització, ja sigui excloent-la del nucli, o facilitant-ne la degradació o incorporació a les *unions adherents*.

Els diferents estadis evolutius histològics que hom pot observar en els adenocarcinomes de colon mostren una bona correlació amb la distribució subcel·lular de *Beta-catenina*. Esdevé nuclear en les zones en les quals hi ha un procés actiu de gemmació i/o infiltració (*Kirchner T i Brabletz T, Am J Pathol 2000*). En els adenomes tubulars, les cèl·lules amb *Beta-catenina* nuclear es concentren en els focus de gemmació. En les zones centrals dels adenocarcinomes, *Beta-catenina* és en predomini a membrana, tot i que en els focus de gemmació torna a esdevenir nuclear. En els fronts d'infiltració dels adenocarcinomes, o de les seves metàstasis, *beta-catenina* esdevé nuclear en predomini, tot i que les cèl·lules pioneres en tenen en major quantitat, mentre que en els focus de *reconstrucció* algunes cèl·lules la perden.

[17] Del repertori de gens diana de l'efecte activador de *Beta-catenina* en cèl·lules tumorals destaquen *c-Myc*, *Ciclina-D1*, *Fibronectina*, el receptor de l'activador del *plasminògen* tipus *urokinasa uPAR* i vàries *metaloproteases de matriu* (aquestes tres, força associades a processos de desdiferenciació i fenotip invasiu en tumors), la molècula d'adhesió *NrCAM*, alguns factors de transcripció com *Slug*, *Cdx1, SpKr1, Id2, Ovo1* (implicats en processos de diferenciació, la majoria d'ells epitelial-endodèrmica) ... Les cites són múltiples (*He et al, Science 1998* -per *c-myc-; Tetsu O i McCormick F, Nature 1999* -per *ciclina D1-, Takahashi M et al, Oncogene 2002 i Brabletz et al, Am J Pathol 1999* -per *metaloproteases de matriu-; Gradl et al, Mol Cell Biol 1999* -per *fibronectina-, Mann B et al. Proc Natl Acad Sci 1999* - per *uPAR-*).
En desenvolupament, l'establiment del patró del futur organisme té molt a veure amb la gènesi d'un centre organitzador en l'embrió, que permet establir-ne l'eix primitiu (*Huelsken et al, J Cell Biol 2000*), i que alhora delimita el punt d'on s'iniciarà el procés de gastrulació, que definirà el patró corporal definitiu. Aquest centre és variable segons les espècies i escala filogenètica, i rep noms diferents -centre organitzador de Nieukwoop (equinoderms), blastopor (amfibis), solc ventral (*Drosophila*-artròpodes), node de Hensen i línia primitiva (vertebrats)...En aquest procés és essencial l'entrada de *beta-catenina* al nucli, com és essencial la funció de diversos gens diana de *beta-catenina* (és el cas de *siamois*, o *engrailed*).

La gemmació i la infiltració-reconstrucció són els dos fenòmens morfogènics que estableixen el patró histològic dels tumors de colon, i l'aparició d'ambdós és directament lligada a la presència de *Beta-catenina* al nucli de les cèl·lules tumorals, de forma que les cèl·lules soltes i infiltrants dels fronts s'originen en els focus de gemmació. En conseqüència, hi ha una correlació clara entre la distribució subcel·lular de *Beta-catenina* i el patró morfològic.

Però tanmateix no es tracta de processos equivalents, ni per l'aspecte histològic, ni pel significat biològic que tenen. En els fronts d'invasió tenen lloc fenòmens de *transició epiteli-mesènquima* inherents al procés infiltrant, i la presència de *Beta-catenina* nuclear no és pas la què permet predir aquest comportament ni tampoc el procés de reconstrucció derivats dels focus invasius.

Gairebé la majoria dels tumors epitelials presenten en algun moment de la seva evolució alteracions en els nivells o patrons normals d'expressió d'*E-cadherina*, fonamentalment en les fases associades a desdiferenciació i/o invasió. En la majoria de casos, descartant aquells en els quals es troba una alteració mutacional de base en el gen que codifica la proteïna i en els quals la davallada d'*E-cadherina* podria ser un fenomen inicial (*Hajra KM i Fearon ER, Genes Chromosomes Cancer 2002*), la davallada i re-localització subcel·lular d'*E-cadherina* succeeixen en fases tardanes i/o en tumors poc diferenciats. Aquesta davallada d'*E-cadherina* pot justificar un augment en el pool citosòlic de *Beta-catenina*, però no és clar que això suposi un augment de l'efecte transcripcional que deriva de la seva localització nuclear. En principi, cal que hi hagi alteracions a la via compartida amb *APC* [NP18]-En els fronts d'invasió aquests dos fenòmens són coincidents, però no és gens clar que responguin a mecanismes similars.

La pèrdua d'*E-cadherina* en els tumors és doncs condicionada per altres factors. En l'absència d'un substrat mutacional -com el què té lloc al carcinoma lobel·lar de mama-, o bé epigenètic -la hipermetilació del promotor del gen d'E-cadherina s'ha descrit en diversos tumors (*Hajra KM i Fearon ER, Genes Chromosomes Cancer 2002*; *Thiery JP, Nat Rev Cancer 2002*; *Berx G et al, EMBO J 1995*)- , aquest decrement en l'expressió suggereix que hi ha alguna mena de control transcripcional que en justifica la pèrdua. Es creu que aquest fet respon a la presència d'un mecanisme repressor predominant, suficient per a causar la davallada d'expressió d'*E-cadherina* (*Hajra KM, Ji X i Fearon ER, Oncogene 1999; Hajra KM i Fearon ER a Genes Chromosomes Cancer 2002*). La "col·laboració" entre aquest mecanisme i les alteracions en l'eix de *Beta-catenina* podrien explicar l'exclusivitat dels fets biològics que tenen lloc en els fronts d'invasió.

Semblances entre gastrulació i invasió tumoral, i com els gens implicats podrien ser els mateixos

El paral·lelisme entre càncer i desenvolupament acostuma a suggerir respostes escaients per a un o altre camp. El paral·lelisme entre el procés de gastrulació i els fenòmens morfogènics que tenen lloc als fronts d'invasió, essencialment l'*EMT* i la *reconstrucció* ens ha permès descobrir quins successos moleculars són responsables de la davallada d'E-cadherina en els tumors.

La senyalització per *Beta-catenina* juga un rol essencial en l'establiment del pla corporal del futur organisme. Ho fa mitjançant la definició del punt a partir del qual s'iniciarà el procés de *gastrulació (Huelsken J et al, J Cell Biol 2000)*. En aquesta fase embrionària es refà per complert

[18] Fora possible que la davallada d'*E-cadherina* en les cèl·lules soltes del front d'invasió contribueixi a l'increment del senyal nuclear de *beta-catenina*, ja prèviament existent.

l'embrió: apareixen les tres fulles embrionàries que donaran lloc als diversos teixits un cop definits els llinatges cel·lulars, s'estableix el patró corporal, s'estructura el futur organisme. La gastrulació es considera la fase més crucial del desenvolupament embrionari, i tanmateix, és la què ha permès aportar més variabilitat als organismes, malgrat ser un procés conservat en trets bàsics durant tota l'escala filogenètica.

El procés de gastrulació és curiosament semblant, en essència, a bona part de les fases evolutives d'un càncer epitelial com l'adenocarcinoma de colon. Hi ha un estret paral·lelisme entre els fenòmens d'invasió i els de gastrulació (*Kirchner T i Brabletz T,Am J Pathol 2000; Thiery JP, Nat Rev Cancer 2002, Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*) fins a tal punt que les dades moleculars descrites, com els canvis de localització de *Beta-catenina*, són conservats.

Durant la gastrulació tenen lloc tot un seguit de processos morfogènics que són dependents del moviment cèl·lules soltes o grups cel·lulars coherents. En una primera fase, la que dóna lloc a l'origen de les 3 fulles embrionàries, les cèl·lules de l'epiblast primitiu inicien un procés de *transició epiteli-mesènquima* que les permetrà invaginar-se i travessar el solc primitiu per a penetrar en el blastocel. D'aquestes cèl·lules es generaran endoderma i mesoderma.

El procés d'invaginació ocorre per onades i és estrictament ordenat, però precisa de la pèrdua d'*E-cadherina* i l'entrada de *Beta-catenina* al nucli. Aquest últim fet permet predir quines cèl·lules de la blàstula iniciaran el procés de gastrulació. L'absència de *Beta-catenina* o el bloqueig de la seva localització nuclear és suficient per a impedir l'inici del procés de gastrulació o fins i tot l'establiment de l'eix embrionari definitiu (*Haegel H et al, Development 1995; Huelsken J et al, JCB 2000*). Per tant, la localització nuclear de *Beta-catenina* permet a la blàstula definir quines cèl·lules són susceptibles de participar en processos morfogènics, si més no transitoris. En el cas dels tumors, com havíem citat, permet definir en quines zones estan ocorrent processos com la gemmació o la invasió que deriva d'aquests.

En els amniotes -aus i mamífers- els moviments morfogènics responsables de la formació d'endoderma i mesoderma precisen de la "*transició epiteli-mesènquima*" que experimenten les cèl·lules de l'epiblast. Això suposa que després les cèl·lules del futur endoderma hauran d'experimentar una involució fenotípica per tal de recuperar el fenotip epitelial perdut en la transició a través del solc primitiu. La dada més evident serà la recuperació de l'expressió d'*E-cadherina* i de les unions intercel·lulars. En etapes ulteriors del desenvolupament els moviments que hom podrà observar en aquesta fulla embrionària seran de grups cel·lulars cohesius. És evident que aquesta successió *epiblast* $\rightarrow$ *transició epiteli-mesènquima* $\rightarrow$ *endoderma* recorda força a la què ocorre en els fronts d'invasió dels carcinomes, i que el mateix procés de reversió fenotípica és l'experimentat per les cèl·lules soltes que es desprenen del front en generar focus de "*reconstrucció*".

Com en els tumors doncs, la localització nuclear de *Beta-catenina* és associada amb l'inici de fenòmens morfogènics que generen un nou patró arquitectural, i que semblen ocórrer gràcies a fenòmens de *transició epiteli-mesènquima (EMT),* en els quals es perd l'expressió d'*Ecadherina*. Però tot i que necessària, *Beta-catenina* no sembla pas ser la desencadenant de l'*EMT :* en els focus de *reconstrucció*, com en les cèl·lules de l'endoderma en formació, continua essent nuclear si bé la *transició epiteli-mesènquima* ha estat revertida.

Snail és el gen candidat a mediar la transició epiteli-mesènquima

Les modificacions en el traçat molecular de l'eix *Wnt/Fzl/Beta-catenina* podrien ser suficients per a condicionar els moviments morfogènics i canvis fenotípics que donaran lloc a l'endoderma (*Rocheleau CE et al, Cell 1997; 90: 707-16*). Segons alguns treballs, aquestes modificacions són suficients per a induir els canvis necessaris per a una *transició epiteli-mesènquima* (*Reichert M et al, J Biol Chem 2000*). No obstant, els defectes que s'observen en els mutants defectius per *Beta-catenina* suggereixen que la participació en el procés de gastrulació és prèvia a l'inici d'aquesta fase, i responen a la incapacitat de l'embrió en generar un eix anteroposterior correcte i els futurs solc primitiu i node (*Haegel H et al, Development 1995*). Els defectes en la cohesió cel·lular de les cèl·lules de l'epiblast primitiu en semblen la causa[NP19], i diversos treballs suggereixen que el moviment de grups cel·lulars cohesius, com el què ocorre en els processos d'extensió convergent que tenen lloc al futur endoderma dels equinoderms, artròpodes, peixos o amfibis, depenen directament de l'eix *Wnt/Fzl* (***Box 1*** i *Wallingford B i Harland RM, Development 2001; Locascio A i Nieto MA, Curr Opin Gen Dev 2001*)[NP20]. Així, la formació del solc primitiu i la posta en marxa dels processos de *transició epiteli-mesènquima* semblen successos independents (*Locascio A i Nieto MA, Curr Opin Gen Dev 2001*).

La localització nuclear de *Beta-catenina* seria requisit un indispensable per a l'inici de moviments morfogènics, car és present en totes les cèl·lules que els experimenten: de fet, en alguns sistemes les cèl·lules que fan l'*EMT* tenen *Beta-catenina* nuclear (*Novak A et al, Proc Natl Acad Sci 1998*), com ocorre també en càncer de colon (*Brabletz T et al, Proc Natl Acad Sci 2001*). La coordinació entre la definició del fenotip epitelial i els moviments morfogènics és fonamentada en aquesta circumstància (*Wallingford B i Harland RM, Development 2001*). Però l'inici de la *transició epiteli-mesènquima (EMT)*, que és essencial en la gastrulació d'aus i mamífers, i en la formació del mesoderma cefàlic dels amfibis (*Xenopus)* (*Locascio A i Nieto MA, Curr Opin Gen Dev 2001*), no és pas depenent de *Beta-catenina (Thiery JP, Nat Rev Cancer 2002)*. En aquest cas, depen de factors capaços de regular a la baixa l'expressió d'*E-cadherina*, i directament associats al procés de delaminació de les cèl·lules de l'epiblast durant la gastrulació. El seu efecte ha d'ésser restringit a la *transició epiteli-mesènquima*. D'acord amb la literatura, els factors responsables són en aquest cas, *Snail* en mamífers i *Slug* en aus[NP21].

---

[19] En una primera fase de formació del *solc primitiu*, cal que les cèl·lules de l'epiblast es belluguin com una làmina coherent. Posteriorment, el procés de *transició epiteli-mesènquima* (EMT) permetrà que les cèl.lules dels marges del solc es delaminin individualment i s'invaginin cap al blastocel. Res d'això no ocorre si l'expressió de *beta-catenina* és absent.

[20] Els moviments d'*extensió convergent* són essencials en el procés de gastrulació de moltes espècies, sobretot en invertebrats i en vertebrats inferiors (anamniotes). El moviment el fan làmines cel·lulars coherents, i és precís que es mantinguin la cohesió cel·lular. En trets generals, la làmina de cèl·lules s'estreta i elonga, fet que permet que s'extengui en un dels eixos. Això s'aconsegueix mitjançant processos complexes d'intercalació cel·lular. En espècies en què el creixement embrionari és escàs, aquest procés permet augmentar-ne la longitud.

La via de *Wnt/Fzl (Wingless/Frizzled)* ha estat directament implicada en aquest procés. Tanmateix, els treballs més recents suggereixen que no és precisa la senyalització per *beta-catenina*, sinó que només alguns elements del traçat molecular hi intervinguin (essencialment, *Dishevelled*).

[21] *Snail* és la proteïna que dóna lloc a tota una superfamília de factors de transcripció (conservada en tota l'escala filogenètica des d'equinoderms a humans, i amb diversos membres en cada espècie) que es caracteritzen per disposar de dits de zenc i exercir un efecte repressor transcripcional dels gens que en són diana. La funció més ancestral assignada a tota la superfamília és la *motilitat cel·lular* (*Hemavathy K et al, Gene 2000*), que sembla associar *Snail* amb processos tan *a priori* diferents com la gastrulació, la delaminació dels neuroblasts en la maduració del sistema nerviós, la delaminació de les cèl·lules de la cresta neural, la formació dels coixinets endocàrdíacs al

Snail fou identificat en un estudi de mutants defectius en gastrulació a *Drosophila* (*Alberga et al a Development 1991*). L'absència d'expressió d'*Snail* en els embrions de *Drosophila* causava la fallida en el procés de gastrulació, que era totalment anòmala degut essencialment a la incapacitat de les cèl·lules de la blàstula de migrar per generar el futur mesoderma. Estudis posteriors en altres organismes han confirmat aquest rol essencial d'*Snail* en el procés de gastrulació (*Smith DE et al Development 1992; Carver EA et al, Mol Cell Biol 2001,* i revisat a *Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002)*, que és directament relacionat amb l'adquisició de propietats migratòries en les cèl·lules que gastrularan[NP22]. En els treballs d' Oda i cols (*Oda H et al, Dev Biol 1998*) es va suggerir per primer cop la relació entre *Snail* i la *transició epiteli-mesènquima* experimentada per les cèl·lules de la blàstula durant la gastrulació. Aparentment, la davallada en els nivells d'*E-cadherina* associada a la transició epiteli-mesènquima era genèticament lligada a l'efecte d'*Snail*.

Snail en els fronts d'invasió i metàstasi

Snail indueix la transició epiteli-mesènquima en cèl·lules epitelials tumorals, i ho fa regulant E-cadherina

La davallada d'*E-cadherina* en els tumors epitelials és conseqüència, en la majoria de casos, d'un mecanisme de repressió activa que en bloqueja l'expressió (*Hajra KM, JiX i Fearon ER, Oncogene 1999*). Coincidentment, en treballs realitzats en cèl·lules tumorals en cultiu es va poder confirmar que *Snail* era suficient per a activar el procés de

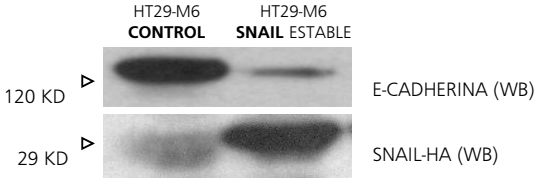


FIG IN-3 : SNAIL INDUEIX LA DAVALLADA D'EXPRESSIÓ D'E-CADHERINA
Western blot per Snail i E-cadherina en extractes totals d'HT29-M6 control i un clon que expressa de forma estable la proteïna mSnail fusionada a l'etiqueta HA (bandes inferiors). L'expressió forçada d'Snail porta a una davallada gairebé total dels nivells d'E-cadherina en aquestes cèl·lules.

transició epiteli-mesènquima (*EMT*) (*Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000; Cano A et al, Nat Cell Biol 2000*) generant un profund canvi fenotípic en les cèl·lules que l'expressen. La seva activitat transcripcional té com a conseqüència la pèrdua d'*E-cadherina* (*Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000; Cano A et al, Nat Cell Biol 2000),* però també de marcadors característics de l'estirp epitelial, com *desmoplaquina* (*Cano A et al, Nat Cell Biol 2000*), *citoqueratina 7* (*J.Pujal, observacions no publicades*), *citoqueratina-18* o *MUC-1* (*Guaita S et al., J Biol Chem 2002*), i l'adquisició de marcadors típics de l'estirp mesenquimal com *vimentina* (*Cano A et al, Nat Cell Biol 2000*), *fibronectina* o *Lef-1* (*Guaita S et al., J Biol Chem 2002*)[NP23], efectes que s'associen per tant a una transició fenotípica completa.

L'efecte més determinant deriva de la davallada en l'expressió d'*E-cadherina* (***Fig In-3***). És un fet essencial per a la correcta consecució del procés de gastrulació i de tota *EMT*, car l'expressió

cor, o l'establiment de l'asimetria dret-esquerra. En el treball s'exposen en detall els coneixements actuals sobre aquesta família de factors de transcripció.

[22] En les aus, sembla què aquest rol el desenvolupa *Slug*, l'altre membre de la família en vertebrats.

[23] *Snail* ha estat definit com un repressor transcripcional, tot i que alguns autors (*Mauhin et al, Nucleic Acids Res 1993*) suggereixen que podria tenir un efecte activador. Tanmateix, aquest últim fet no ha pogut ésser provat, i per tant els increments d'expressió d'alguns marcadors es consideren efecte secundari i no directe de l'efecte transcripcional d'*Snail*. De totes maneres, si més no en *Drosophila*, sembla que *Snail* podria exercir el seu efecte repressor mitjançant "socis" com el corepressor *dCtBP* (en altres organismes no hi ha evidències de com ho faria, però no sembla existir domini d'unió a *CtBP* aparent). No és descartable doncs que pugui també ser activador mitjançant la relació amb factors coactivadors o transactivadors, com ocorre amb *TCF-4/Lef-1* i *Groucho o Beta-catenina*.

forçada d'*E-cadherina* és capaç de bloquejar la motilitat cel·lular característica de l'*EMT (Frixen UH et al, J Cell Biol 1991),* si bé no reverteix per complert el fenotip cel·lular induït per *Snail* (*Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*), possiblement perquè hi ha moltes més dianes transcripcionals. En línies cel·lulars tumorals epitelials hi ha també una correlació inversa entre els nivells d'*E-cadherina* i *Snail*, i això es correspon en la majoria de casos amb una morfologia cel·lular més "fibroblàstica" o invasiva.

L'efecte d'*Snail* sobre *E-cadherina* és transcripcional, i ocorre per la seva unió directa a seqüències específiques en el promotor del gen d'*E-cadherina*[NP24] , fet que causa una potent repressió transcripcional (*Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000; Cano A et al, Nat Cell Biol 2000; Guaita S et al, J Biol Chem 2002; Hajra KM et al, Cancer Res 2002*). La unió al promotor ocorre en seqüències palindròmiques específiques de les què es coneix el repertori (5'CACCTG3' o 5'CAGGTG3') i que són similars a les *E-box* que són diana per a factors de la família *bHLH*[NP25] (*Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000; Mauhin V et al, Nucleic Acids Res 1993*). És possible que un nivell adicional de repressió en l'expressió d'*E-cadherina* ocorri mitjançant el factor de transcripció *ZEB-1(SIP-1),* l'expressió del qual depèn d'*Snail* (*Guaita S et al, J Biol Chem 2002*). La desaparició d'altres marcadors epitelials, en la majoria dels casos citats, és associada també a la presència d'un o més elements *Ebox* específics per a *Snail* en la seqüència promotora proximal dels gens corresponents (*Guaita S et al, J Biol Chem 2002, i observacions no publicades*).

La davallada en l'expressió d'*E-cadherina* té com a efecte final la desaparició de la cohesivitat entre les cèl·lules que sobrexpressen *Snail* i la pèrdua de la coherència de l'epiteli. La pèrdua d'adhesió entre cèl·lules veïnes és condició *sine qua non* per a l'establiment d'un fenotip migratori en cèl·lules prèviament epitelials (*Hay ED, Acta Anat 1995; Oda H et al, Dev Biol 1998*). Fora predictible doncs que en els fronts d'invasió l'expressió d'*Snail* fos la responsable dels fenòmens de *EMT* que donen lloc a les cèl·lules soltes i pioneres dels focus invasius.

L'estudi d'alguns tumors epitelials recolza la relació entre Snail i el procés invasiu

Fins al moment actual s'han identificat diversos tipus tumorals epitelials en els quals nivells elevats d'expressió d'*Snail* correlacionen amb nivells baixos o absents d'expressió d'*E-cadherina*, i que tanmateix es corresponen amb les zones infiltrants dels tumors descrits. Fins al moment s'ha pogut demostrar aquesta relació inversa en línies cel·lulars derivades de tumors de cap i coll (carcinoma escamós oral), fetge (carcinoma hepatocel·lular), en tumors de mama (carcinoma ductal infiltrant) i en línies cel·lulars de melanoma (*Yokoyama K et al. Oral Oncol 2001; Jiao W et al. Br J Cancer 2002; Blanco MJ et al, Oncogene 2002; Poser I et al, J Biol Chem 2001* respectivament). Aquesta relació és similar a la descrita originalment per a algunes línies cel·lulars epitelials tumorals de colon i pàncrees (*Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000*). És força interessant saber que en alguns d'aquests tipus tumorals s'han descrit alteracions en l'eix de *APC/Axina/Beta-catenina* i la localització nuclear de *Beta-catenina* associada als focus tumorals i invasius (*Murakami T et al, Biochem Biophys Res Commun 2001).*

[24] *Snail* i els altres membres de la família són repressors de curt abast. Això vol dir que actuen unint-se als promotors en zones properes a la caixa *TATA* i l'inici de transcripció. En el cas del promotor d'*E-cadherina*, hi ha 3 caixes d'unió d'*Snail* certes, dues d'elles abans de l'inici de transcripció i una després, en un espai de no més de 270 pb (*Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000*)

[25] Si més no per al cas d'*Slug*, l'altre membre de la família *Snail* a vertebrats, aquesta coincidència de repertori fa que existeixi una competició amb factors *bHLH* per les mateixes dianes transcripcionals (*Pérez-Moreno MA et al, J Biol Chem 2001*).

En dos treballs recents s'ha suggerit la relació entre Snail i el procés invasiu en tumors epitelials. En el primer, s'ha demostrat mitjançant hibridació *in situ* (*Blanco MJ et al, Oncogene 2002*) que l'expressió d'*Snail* en els fronts d'invasió de carcinomes de mama correlaciona amb la davallada dels nivells d'*E-cadherina* en les mateixes zones, i que tanmateix aquests fenòmens correlacionen força bé amb l'existència de metàstasis[NP26]. En el segon, s'estableix una correlació força significativa entre la pèrdua d'E-cadherina i l'augment en l'expressió d'Snail en casos de carcinoma gástric de tipus difós (*Rosivatz E et al, Am J Pathol 2002*) En conseqüència, *Snail* és possiblement el candidat més ferm a mediar el procés d'invasió que té lloc en els carcinomes, potser sobre cèl·lules en les què es compleix el prerequisit de que *beta-catenina* sigui nuclear.

Com gastrular és com fer metàstasis, i com Snail ho orquestra tot

La semblança mecanística entre la gastrulació i els fenòmens d'invasió-metàstasi suggereix un rol essencial per *Snail* en ambdós processos.

Les alteracions mutacionals associades a la gènesi del càncer de colon -fonamentalment l'afectació d'*APC* o d'elements del complex de degradació de *Beta-catenina*- suposen un record aproximat dels fenòmens de senyalització en la via de *Wnt/Fzl/Beta-catenina* que tenen lloc a les fases inicials del desenvolupament embrionari. En conseqüència, les cèl·lules dels adenocarcinomes colorectals, però possiblement també les d'altres tumors epitelials on s'han pogut constatar les mateixes alteracions moleculars, serien susceptibles d'iniciar un procés morfogènic equivalent al de la gastrulació per l'estímul d'*Snail*. A favor d'això fora argüible la coincidència entre l'expressió d'aquest factor de transcripció, els fenòmens invasius, i la localització nuclear de *Beta-catenina* en alguns d'aquests tumors. La coordinació que s'establiria entre els traçats moleculars on fora implicat *Snail* i els dependents de la senyalització per *Beta-catenina*, són fins al moment actual desconeguts. La senyalització per *Beta-catenina/Tcf-4/Lef* no és pas responsable de l'*EMT* ni de la inducció d'*Snail* (*Tan C, Oncogene 2001; Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*), pel què tot i existir possiblement el requeriment funcional de que ambdós fets coincideixin en el temps, no existeix una relació estocàstica entre ambdós factors, *Snail i Beta-Catenina*. Ningú però no ha referenciat encara si hi ha alguna relació entre els nivells d'*Snail* i els fenòmens invasius i/o metastàtics en càncer colorectal. L'única evidència deriva dels treballs fets en línies cel·lulars epitelials tumorals de budell i en tumors mamaris, i òbviament és incompleta.

El paral·lelisme entre gastrulació i invasió és evident en el camp morfològic, i proposem que gairebé segur ho és també en el camp molecular. *Snail* té un paper essencial en la coordinació de tots els fenòmens de *transició epiteli-mesènquima (Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002, Locascio A i Nieto MA, Curr Opin Gen Dev 2001)*. La complexitat d'aquest procés justifica que aquest factor hagi estat implicat en fenòmens tan diversos com la motilitat cel·lular, la regulació del fenotip mesenquimal i la diferenciació cel·lular, o el control del cicle cel·lular. Tots aquests processos han de ser modulats i coordinats per tal que la *transició epiteli-mesènquima* sigui exitosa[NP27]. *Snail* doncs hauria d'integrar tots

[26] En el mateix treball que es cita, els autors suggereixen que l'expressió d'*Snail* es manté en les metàstasis, si bé bona part d'aquestes mantenen una arquitectura epitelial similar al tumor primari. Cal confirmar si en el procés de "reconstrucció" que té lloc en els fronts d'invasió o les metàstasis això és evident.

[27] Com serà exposat al llarg de la tesi, hi ha un seguit de requeriments biològics que fan eficient la *transició epiteli-mesènquima* necessària per la formació del mesoderma durant la gastrulació. La pèrdua d'adhesió

aquells senyals que són capaços de desencadenar aquest procés morfogènic de transformació (*Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002, Ip YT i Gridley T, Curr Opin Gen Dev 2002*).

Com en el cas d'altres gens biològicament essencials, *Snail* seria també necessari en el procés invasiu tumoral, perquè és el millor candidat a coordinar tots els canvis necessaris per a l'adquisició del fenotip invasiu. Això suggereix la conservació del procés, i per tant fa pensar que el procés d'invasió en càncers epitelials és no més que un record mecanístic de la fase de gastrulació embrionària.

Les cèl·lules invasives reverteixen el seu fenotip en els focus metastàtics.

L'activació d'*Snail* durant la fase de gastrulació és transitòria i sembla subjecte a mecanismes de regulació acurats que d'altra banda, es desconeixen en gran mesura (*vegeu apartats següents*). La formació de l'endoderma en els amniotes (aus i mamífers) prové de la involució del procés de transició epiteli-mesènquima experimentat per les cèl·lules de l'epiblast primitiu que en són l'origen. Això vol dir que en l'endoderma, els canvis fenotípics que promou Snail són revertits. S'han descrit també d'altres fenòmens de reversió de la *EMT* en el procés de gastrulació de *Xenopus* i el *Peix Zebra* (*Locascio A i Nieto MA, Curr Opin Gen Dev 2001*), en els quals algunes cèl·lules pioneres expressen *Snail* de forma transitòria.

Durant la seva progressió, les cèl·lules que integren els càncers epitelials experimenten canvis força importants que per ser dispars, donen una elevada heterogeneïtat al procés. Tot i que la successió d'events necessaris per a arribar-hi deu ser variable, molts d'aquests tumors adquireixen la capacitat d'envair i metastatitzar. Malgrat la diversitat observada en els tumors epitelials, en la majoria de casos tenen lloc processos similars que són força conservats, potser perquè són els més eficients. El fenotip diferenciat de la majoria de metàstasis epitelials sembla associat a l'èxit en el desenvolupament d'aquestes metàstasis (*Chambers EF et al, Nat Rev Cancer 2002; Barker N i Clevers H, Trends Mol Med 2001*), i això implica que en la majoria de càncers epitelials la solució més òptima és adoptar mecanismes d'invasió que siguin modulables i reversibles, i per tant permetin a les cèl·lules invasives adoptar un fenotip de nou epitelial en els focus metastàtics. Els fenòmens de "*reconstrucció*" observats en els fronts d'invasió tumoral en serien un exemple.

Malgrat que en càncers com el colorectal existeix una seqüència conservada d'alteracions genètiques associades als diferents estadis evolutius de la neoplàsia (*Fearon ER, Vogelstein B, Cell 1990; 61: 759-67*), no hi ha gaires dades referides a l'existència de possibles mutacions capaces d'induir invasivitat en tumors sòlids. Tanmateix, tot i que l'existència d'una mutació particular podria induir un fenotip invasiu -en alguns carcinomes gàstrics o de mama s'han descrit alteracions epigenètiques i mutacions "invalidants" del gen de l'E-cadherina-, una alteració genètica fixada no podria explicar la reversibilitat del procés que es constata en la disseminació metastàsica de la majoria de tumors

---

intercel·lular i l'adquisició de capacitat migratòria en les cèl·lules que donaran lloc al mesoderma és coincident amb una parada en el cicle cel·lular prèvia a l'inici de la mitosi, i amb un canvi en la polaritat cel·lular i la reorganització del citosquelet. Tot són requeriments essencials, car si qualsevol és bloquejat, la gastrulació és ineficient. (*Ip YT i Gridley T, Curr Opin Gen Dev 2002; Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*). S'ha relacionat directa o indirectament *Snail* amb tots aquests processos, i el rol què hi juga sembla determinant, amb el qual és el millor candidat a coordinar tots els canvis.

epitelials[NP28] (*Barker N i Clevers H, Trends Mol Med 2001*).

Snail sembla un bon candidat a mediar el procés invasiu i metastàsic que ocorre en els carcinomes. La recuperació de l'expressió d'*E-cadherina* i el restabliment de les unions intercel·lulars en el nou endoderma embrionari, o en els focus de reconstrucció tubular dels fronts d'invasió o les metàstasis, fan pensar que existeix un mecanisme reversible de regulació de l'expressió o de l'activitat d'*Snail*. Alhora és possible que els mecanismes de regulació que modulen l'activitat d'aquest factor de transcripció en càncer, siguin similars als què la modularien en gastrulació.

Snail regulat en gastrulació, regulat en invasió-metàstasi i la hipòtesi de treball

L'objectiu del treball ha estat doncs l'estudi dels *mecanismes que regulen l'expressió i l'activitat del factor de transcripció Snail en càncer*. La hipòtesi de treball proposa que els mecanismes moleculars de regulació han de ser idealment modulables, no pas rígids, i idealment reversibles. D'aquesta manera el model seria coherent amb els fenòmens biològics observats en càncer i en desenvolupament. Car si *Snail* és regulable de forma reversible, ho són també els processos que coordina.

Com a resultat d'això, fora possible encaixar *Snail* en algun traçat molecular essencial per a algunes funcions cel·lulars o tissulars. El conjunt de mecanismes coordinats per aquest factor podria ésser utilitzat independentment durant el desenvolupament embrionari -gastrulació, maduració del sistema nerviós central, gènesi dels derivats de la cresta neural, asimetria dreta-esquerra-, o en càncer -invasió- com si fos un mòdul. Només caldria engegar o apagar el sistema.

De forma detallada doncs, els **objectius** plantejats en aquest treball són els següents:

(**a**)Caracterització estructural i funcional de la regió promotora del gen *Snail* en humans. De forma concreta, establiment de la regió mínima promotora i de l'existència de possibles elements de resposta a factors activadors de la seva expressió *(Resultats(I), Regulació Transcripcional).*

(**b**)Avaluació de possibles mecanismes de regulació adicionals a la modulació transcripcional, que puguin tenir rellevancia biològica i,

(**c**)Establiment de la relació funcional entre els sistemes de modulació de l'expressió d'*Snail* i la seva activitat biològica *(Resultats (II), Regulació No Transcripcional).*

(**d**)Finalment, descripció de possibles mecanismes que relacionin la modulació de l'expressió i/o activitat d'*Snail* amb la hipòtesi general proposada, que suggereix un mecanisme de regulació reversible del procés de "transició epiteli-mesènquima" *(Resultats (III), Significat Biològic dels Mecanismes de Regulació No-Transcripcional).*

[28] De fet, en aquests tumors on *E-cadherina* és mutada en estadis inicials -*carcinoma gàstric difús (en anell de segell)*, *carcinoma lobel·lar de mama*-, el fenotip cel·lular és força allunyat de l'aspecte de l'epiteli original, i la tendència del tumor és a crèixer, disseminar-se i fer metàstasis en cèl·lules soltes o petits grups no estructurats (*Oda T et al Proc Natl Acad Sci 1994; Keller G et al Am J Pathol 1999; Berx G et al EMBO J 1995 i Oncogene 1996; i Machado JC et al Oncogene 2001).* En aquest cas doncs, no hi ha reversibilitat en el fenotip metastàsic.

REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL

CARACTERITZACIÓ DEL PROMOTOR DE L'HOMOLEG HUMÀ D'*SNAIL*

En el promotor de l'homòleg humà d'*Snail*, una petita regió proximal de 140 pb és suficient per a dirigir la transcripció basal del gen. En zones *cis* situades més a 5' d'aquesta regió, és possible identificar elements de resposta que modulen l'activitat del promotor en funció de l'estirp cel·lular i de la presència de factors inductors del procés de transició epiteli-mesènquima (EMT) com els èsters de forbol (TPA) i l'activació de la quinasa lligada a integrines *ILK*. Un element que hem anomenat "*d'Exclusió Epitelial*" és responsable de mantenir els baixos nivells d'activitat presents en algunes cèl·lules epitelials.

L'arquitectura del promotor humà sembla també conservar una organització segmentària de diversos elements de resposta als factors de la família *Rel/Dorsal/NFκB*, similar al què és descrit per al promotor de *Drosophila*, i que és essencial durant les fases inicials del desenvolupament embrionari –gastrulació. Alguns resultats experimentals indiquen que factors d'aquesta família poden activar l'expressió de l'homòleg humà d'*Snail*, "in vitro" i possiblement també "in vivo".

En alguns dels models experimentals d'inducció de "*transició epiteli-mesènquima*" que s'han descrit s'ha pogut constatar un increment dels nivells d'ARNm d'*Snail* (*Ciruna B i Rossant J, Dev Cell 2001*; *i Tan C et al, Oncogene 2001*). Aparentment doncs, l'activació d'aquest procés per diferents sistemes sembla precisar de l'augment dels nivells de transcripció d'aquest factor. El mateix ocorre durant la gastrulació, car també es detecta un augment dels nivells de missatger d'*Snail* previ al procés d'invaginació de l'epiblast, o en fases ulteriors del desenvolupament embrionari en, per exemple, la formació i migració de la cresta neural (*Hemavathy K et al, Gene 2000; Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002; Sefton M et al, Development 1998; Smith DE et al, Development 1992; Nieto MA et al, Development 1992*).

L'activació transcripcional d'*Snail* sembla també ocórrer en tumors epitelials, i amb preferència en les zones d'infiltració (*Blanco MJ et al,Oncogene 2002*). Es desconeix però l'alteració associada a aquest increment en l'expressió. No s'han descrit mutacions d'aquest gen en cap tipus de procés tumoral. Tanmateix, no hi ha alteracions citogenètiques concloents que ho poguessin justificar. En alguns tipus de càncer epitelial -colorectal, mama, ovari i recentment pàncrees-, s'ha descrit l'amplificació freqüent del segment cromosòmic 20q13.2 (*Hidaka S et al, Clin Cancer Res 2000; Diebold J et al, J Pathol 2000; Tanner MM et al, Cancer Res 1994*), segment on també es troba el locus gènic d'*Snail*. Ningú ha fet cap mena d'estudi citogenètic (FISH o similars) per a avaluar si *Snail* es troba en el segment amplificat en algun d'aquests tipus tumorals, però aquesta possibilitat sembla descartable: El segment citat, si més no en càncer de mama, és més telomèric al locus d'*Snail*, què mapeja estrictament en la zona de transició 20q13.1, 13.2[NP29].

D'acord amb tot això, el més plausible és suggerir què l'augment de transcripció d'*Snail* en tumors respongui a la presència de factors capaços d'induir-ne l'expressió, associats a l'activació de fenòmens de transició epiteli-mesènquima, que provinguin del mateix tumor o dels teixits adjacents. En l'actualitat es creu molt probable que l'activació del procés invasiu i d'altres fenòmens en els processos neoplàstics sigui deguda a factors produits per l'estroma circumdant (*Ciruna B i Rossant J, Dev Cell 2001; Hanahan D i Weinberg RA, Cell 2000; Thierry JP, Nat Rev Cancer 2002; Chambers AF et al, Nat Rev Cancer 2002*).

[29] Els mateixos treballs referenciats sobre aquesta qüestió han proposat alguns altres gens com a candidats a mediar els efectes oncogènics derivats d'aquesta amplificació. Per exemple un homòleg de la quinasa *Aurora* associada a cicle cel·lular, o el factor de transcripció *ZNF217* (del què se'n coneix poc).

La primera aproximació fou doncs la de caracteritzar el promotor del gen homoleg d'*Snail* en humans, per tal de trobar elements regulables que fossin compatibles amb els fets exposats.

Escases dades sobre el promotor d'Snail

Es diposa de poques dades experimentals referents a la regulació transcripcional d'*Snail*. Ünicament s'ha estudiat amb cert detall l'estructura del promotor en els gens de *Drosophila* i *Xenopus*, i no obstant, no en el mateix sentit, pel qual també es desconeix si els mateixos fenòmens regulatoris són conservats en ambdós homòlegs.

La conservació interespècie del promotor és escassa

Com és sabut, la conservació de la seqüència promotora d'un gen entre els homòlegs de diverses espècies té tendència a ser baixa (*Alberts B et al, Molecular Biology of the Cell, 3ª Ed*). Aquest fenomen és en part necessari per aportar diversitat en l'escala filogenètica, i tanmateix per a donar complexitat als sistemes. Hom considera que les diferències biològiques entre espècies molt properes són únicament degudes a com es regula de forma diferent l'activitat de cada gen i com això es coordina, més que no pas a diferències en les proteïnes[NP30].

Això és possiblement més evident en aquells gens que participen de traçats moleculars essencials en desenvolupament i potser en càncer. Tanmateix, hi ha dades que permeten suposar que algunes de les seqüències més rellevants a nivell transcripcional que hi ha en cada promotor tenen tendència a estar conservades, justament perquè permeten mantenir associats aquells gens a alguns dels traçats moleculars dels què són peça important.

En conseqüència, no és del tot possible extrapolar les dades obtingudes en l'estudi del promotor d'un gen concret a les característiques del promotor d'aquell gen en d'altres espècies. Necessàriament cal verificar-ne l'adequabilitat en cada cas, i alhora és precís de confirmar la participació de cada homòleg en els processos de regulació gènica que hagin pogut ésser definits en d'altres sistemes.

El promotor d'Snail a Drosophila Melanogaster és estructurat per respondre a un gradient dorso-ventral de morfògens

L'estudi estructural més detallat sobre el promotor d'*Snail* és fet en *Drosophila* Melanogaster (*Ip YT et al, Genes Dev 1992*). El promotor de *Drosophila* és organitzat arquitecturalment per tal que l'activació transcripcional d'*Snail* sigui sensible al gradient dorso-ventral del morfògen *Dorsal*[NP31]. El gradient de nivells nuclears de *Dorsal* permet a *Drosophila* establir l'esboç de l'eix dorso-ventral, que és essencial per tal d'iniciar el patronatge de l'embrió. Tanmateix, aquest mateix procés, junt

[30] Això sembla que justificaria les diferències entre humans i primats, perquè quant a proteïnes la similitut és quasi del 100%

[31] *Dorsal* és un membre de la família de factors de transcripció *Rel*, car comparteixen entre ells aquest domini particular d'unió a l'ADN caracteritzat inicialment en el proto-oncogen *c-Rel (Steward R. Science 1987)*. En humans, les diverses isoformes del factor *NF-kappaB* en són els homòlegs. Els factors *Rel* es consideren activadors trancripcionals, si bé hi ha treballs en què es cita un possible efecte repressor, depenent del cofactor associat (*Lehming N et al, Nature 1994*).

Dorsal s'anomena així perquè els embrions defectius en la seva expressió es "dorsalitzen", és a dir, mai defineixen una regió ventral, i per tant, són inviables.

Per a ser actius, aquests factors han de ser translocats des del citosol, i per això cal que sigui fosforilada la proteïna que els manté fora del nucli (*Cactus* a *Drosophila*, *IkappaB* a humans...). L'efecte activador transcripcional de *Dorsal* precisa de l'acció del cofactor activador *p300-CBP*, si més no en alguns promotors descrits (*Akimaru H et al, Nat Genet 1997*)

En l'etapa inicial del desenvolupament, *Dorsal* és expressat a partir de l'ARNm provinent de la mare.

amb l'establiment de l'eix anteroposterior, marca el lloc d'inici dels moviments de gastrulació.

L'entrada al nucli de *Dorsal* és necessària per a activar l'expressió d'*Snail* a *Drosophila*. El nivell d'expressió d'*Snail* és regulat directament per la quantitat de *Dorsal* que és translocat al nucli de les cèl·lules de la blàstula , que és màxima en la regió ventral, i nul·la a la dorsal. La resposta a aquest gradient s'aconsegueix disposant diverses caixes de resposta a *Dorsal* al llarg del promotor, allunyades progressivament de l'inici de transcripció. L'afinitat de *Dorsal* per aquestes caixes és variable, de forma que només concentracions nuclears elevades d'aquest factor podran ocupar-ne la majoria i per tant assolir uns nivells d'activació transcripcional d'*Snail* òptims (*vegeu Ip YT et al, Genes Dev 1992* i també ***Fig Rs-9*** en pàgines successives). Aquesta organització "en tàndem" sembla un recurs òptim per a la resposta a gradients de concentració de factors transcripcionals[NP32]. Tanmateix sembla també ser important per a definir el patró d'expressió dels gens diana en l'embrió pel mateix fenòmen.

El promotor d'*Snail* a *Drosophila* té 10 caixes d'unió per *Dorsal*, disposades en una regió d'aproximadament 1Kb, allunyada també 1kb de l'inici de transcripció. Són de seqüència no coincident, i concentrades en 3 grups que defineixen elements transcripcionals que semblen dirigir l'expressió d'*Snail* en diferents regions de l'embrió -en regulen el patró, i tanmateix el nivell d'expressió.

Properes a l'inici de transcripció hi ha dues E-box que són diana de *Twist*. L'expressió d'aquest factor *bHLH* és també activada per *Dorsal*[NP33]. Alhora, la unió de Twist al promotor d'*Snail* sembla que és important per assolir uniformitat i nivells correctes en l'expressió d'*Snail*. El concert d'ambdós factors permet establir el patró d'expressió d'*Snail* que conseqüentment, és més definit que el de *Twist*, essent el d'aquest últim tanmateix més definit que no pas el patró més difós de *Dorsal*.

No hi ha evidències sòlides de que l'eix de *Dorsal*, o dels seus homòlegs, sigui el responsables dels mateixos fenòmens en d'altres espècies. Algunes dades en *Xenopus* mostren que els factors de la família *Rel* (*XrelA*) serien importants per als fenòmens de formació del mesoderma, hom suggereix que concretament en els moviments morfogènics que en donen lloc (Tannahill D i Wardle FC, *Int J Dev Biol 1995; Beck CW, Sutherland DJ i Woodland HR, Int J Dev Biol 1998; Kao R i Lockwood A, Mech Dev 1996*). Alhora, alguns autors esmenten que existeix un gradient en la localització nuclear de *Dorsal* en l'embrió de *Xenopus*, i si bé no és clar que aquest gradient sigui relacionat amb l'eix dorso-ventral, alguns autors han evidenciat que l'homòleg de *Dorsal* (*Xrel1*) es localitza al nucli de les cèl·lules del mesoderma pressumptiu específicament. No hi ha dades en d'altres vertebrats com aus o mamífers.

El promotor de Xenopus Laevis té segments d'especificitat tissular, i el de Drosophila d'especificitat intratissular

Les altres dades de les quals es disposa en referència al promotor d'*Snail* són d'un treball en *Xenopus* (*Mayor R a Development 1993),* i d'un altre fet en *Drosophila* (*Ip YT i Levine M, Development 1994*). Ambdós treballs evidencien que, com ocorre en d'altres gens, el promotor d'*Snail* a *Drosophila* i *Xenopus* inclou regions que regulen l'expressió de la proteïna de forma teixit

[32] Els gradients són freqüentment usats pels factors que intervenen a la morfogènesi de l'embrió. Permeten delimitar zones i definir fronteres de forma precisa, i això és essencial per al patronatge de l'embrió.

[33] Curiosament, el promotor de *Twist* també té vàries caixes per *Dorsal* organitzades de forma seqüencial (*IP YT et al, Genes Dev 1992*).

específica. La deleció d'aquests elements és suficient per a evitar l'expressió d'*Snail* en un teixit o regió concreta, o en un moment concret del desenvolupament. Dades similars s'extreien de l'estudi del patró de resposta del promotor de *Drosophila* a *Dorsal* (*Ip YT et al, Genes Dev 1992*).

El promotor d'*Snail* en ambdues espècies té elements que en regulen l'expressió a mesoderma i a ectoderm-neuroectoderm. L'expressió en ambdós teixits ocorre en moments diferents del desenvolupament, i possiblement la separació d'elements regulatoris hi té relació[NP34]. Tanmateix, és possible que *Snail* no sigui associat als mateixos traçats moleculars en ambdós casos, pel qual elements regulatoris diferents podrien justificar-ne la selectivitat. L'element "mesodèrmic" a *Drosophila* es correspon en bona mesura amb la regió on són concentrades les caixes de resposta a *Dorsal*, fet que pot significar que *Dorsal* certament juga un rol essencial en la gènesi del mesoderma a *Drosophila*. En l'element mesodèrmic de *Xenopus* no és referenciat aquest aspecte. L'element que dirigeix l'expressió d'*Snail* al sistema nerviós perifèric de *Drosophila* inclou les E-box d'unió a Twist.

El promotor d'Snail és mancat de caixa TATA

Previ a l'anàlisi del promotor de l'homòleg humà d'*Snail* vàrem disposar doncs de poques dades. Per una banda calia suposar que el promotor fos organitzat en elements possiblement teixit específics. En les diverses fases del desenvolupament de mamífers *Snail* també presenta patrons canviats d'expressió, i tanmateix aquesta expressió no és restringida al mesoderma, sinó com en *Drosophila* també és present al sistema nerviós, a cresta neural, i al cor si més no. D'altra banda, no fora inusual trobar elements de resposta a factors de la familia Rel, cas que una configuració similar a *Drosophila* (i potser a *Xenopus*) fos conservada a mamífers[NP35].

Finalment, fora possible que la regulació de l'activitat del promotor fos especial d'acord amb el fet que es tracta d'un promotor sense caixa TATA evident. Això és cert per al promotor de *Drosophila*, *Xenopus*, ratolí i també l'humà. Aquest fenomen no és infreqüent i és especialment destacable en promotors de gens "housekeeping" -gens essencials, expressats ubíquament i en la majoria de cèl·lules en nivells baixos-. En aquest tipus de gens, l'absència de TATA box fa que els elements o mòduls reguladors del promotor no puguin activar directament la transcripció del gen. Així la funció de la caixa TATA és justament la de mediar l'estimulació del promotor pels elements reguladors. En gens sense caixa TATA, la transcripció basal és només regulada per aquests elements amplificadors o silenciadors gràcies a la presència de seqüències riques en GC, on s'hi troben dianes per al factor de transcripció Sp1[NP36] (*Nothias JY et al, J Biol Chem 1995*).

---

[34] Aquests elements regulatoris són de fet "*enhancers*" o "amplificadors" de la transcripció. En la majoria de gens eucariotes hi ha elements d'aquests tipus que permeten l'expressió diferencial en temps i espai -teixit específic-, per damunt del nivell de transcripció basal. Els "amplificadors" o els "silenciadors" -quan reprimeixen l'expressió- són modulars,i usualment llunyans a la TATA i l'inici de transcripció.

[35] La gènesi de ratolins transgènics que expressaven un reporter *LacZ* sota el control d'elements de resposta a *NFκB-Rel* no va mostrar cap tipus d'activitat d'aquests factors en les fases inicials del desenvolupament de ratolí, i aparentment, el seu rol seria en fases més tardanes del desenvolupament del sistema nerviós -maduració- i l'hematopoiètic, però no relacionat amb processos com la gastrulació *(Schmidt-Ullrich R et al , Development 1996*)

[36] Curiosament, l'expressió d'*Sp1* és regulada a la baixa en el procés de diferenciació cel·lular, de forma que els gens "*housekeeping*" s'expressen a nivells baixos en cèl·lules diferenciades. Només durant les fases inicials del desenvolupament *Sp1* és abundant i actiu, i de fet, permet l'activació transcripcional de molts d'aquests gens. Aquest sistema permet doncs el control de la seva expressió durant el desenvolupament, i hi sembla essencial.

Tot i que en el promotor de l'homòleg a *Xenopus* això no es compleix (*Mayor R et al, Development 1993; 119: 661-71*), no era descartable que el promotor de l'homòleg humà d'*Snail* tingués zones de seqüència similar amb caixes diana per Sp1 properes a la zona d'inici de transcripció.

Caracterització del promotor humà

Clonatge de 1000pb del promotor humà, regió 5'. No s'assembla gaire als de Drosophila, Xenopus i/o ratolí.

El fragment de promotor humà clonat al nostre laboratori abasta aproximadament 1000pb (***Fig Rs-1***). El clonatge d'aquest fragment es va fer mitjançant un procés de "genome walking" a partir d'una seqüència coneguda 3' i l'amplificació a l'atzar de fragments de vàries mides amb oligonucleòtids degenerats per a cebar l'extrem 5' [NP37]. (La seqüència del fragment és dipositada al *GenBank* amb el número d'accés *AY005796*)

Certament hagués estat desitjable treballar amb un fragment molt major del promotor d'*Snail*, potser fins a 10Kb, car si esperem trobar mòduls regulatoris o amplificadors ("enhancers") és possible que la seva distància a l'inici de transcripció sigui molt gran. Tanmateix, l'objectiu del treball era delimitar i caracteritzar el promotor mínim suficient per a dirigir l'expressió d'*Snail* amb prou especificitat com per a justificar les diferències d'expressió entre línies cel·lulars o teixits. En el promotor de l'homòleg d'*Snail* a *Xenopus laevis* un fragment de no més de 115 pb (-160/-45 respecte l'inici de transcripció) és suficient per a dirigir l'expressió d'un gen reporter, i suficient per a incloure moduls discriminatius d'expressió específica de mesoderma o ectoderma (*Mayor R et al, Development 1993*).

La determinació de l'inici de transcripció es va fer respectant les dades exposades per d'altres treballs (*Paznekas WA et al, Genomics 1999*). D'acord amb això, el fragment clonat inclou l'inici de transcripció i 118 pb de la regió 5' no traduïda (5' UTR) (*-813/+117*). No obstant, aquesta dada és discutible ja que la revissió posterior de les seqüències anotades al GenBank sobre els mapes genòmics del cromosoma 20 (*Lloyd D et al, seq AL121712 LocusLink cr 20*) suggereix que l'inici de transcripció es troba 75 pb més avall del suposat, amb el què el fragment de promotor del què disposàvem fora *-888/+42*. Això deixaria una regió 5' no traduïda (5'UTR) de longitud similar (60 pb) a la observada en ratolí (56 pb, *GenBank Acc Num U95961 dipositada per Jiang R, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA i Gridley T*) i *Xenopus* (33 pb, *Mayor R et al, Development 1993*). Aquestes diferències poden explicar els resultats obtinguts en el mapeig del promotor que són exposats a continuació (*vegéu més endavant*). No obstant, plantegen el dubte de si es tracta d'inicis de transcripció alternatius o bé simplement de diferències experimentals que fora necessari discernir amb experiments addicionals.

Els programes de software predictors de seqüències promotores (*TESS, CGG, altres , citar-los com cal*) identifiquen una caixa TATA putativa 17pb amunt de l'inici de transcripció definit per Paznekas WA i cols (*-17/-13*, seqüència GATAA). De totes maneres, la predicció és dubtosa, sense evidències experimentals, i no es tracta d'una caixa TATA usual. Per tant, es pot considerar que el promotor humà no té caixa TATA. Com ha estat esmentat, tampoc hi ha caixa TATA als promotors d'*Snail* a *Drosophila* melanogaster, *Xenopus* laevis ni ratolí (*Ip Yt et al, Genes Dev 1992; Mayor R et al, Development 1993, i seqüència NCBI-GenBank pel de ratolí, Acc Num U95961.*).

[37] Josep Baulida i Eduard Batlle. Es varen obtenir 3 fragments de longitud variable, dels quals el de 1000 pb utilitzat era el més llarg.

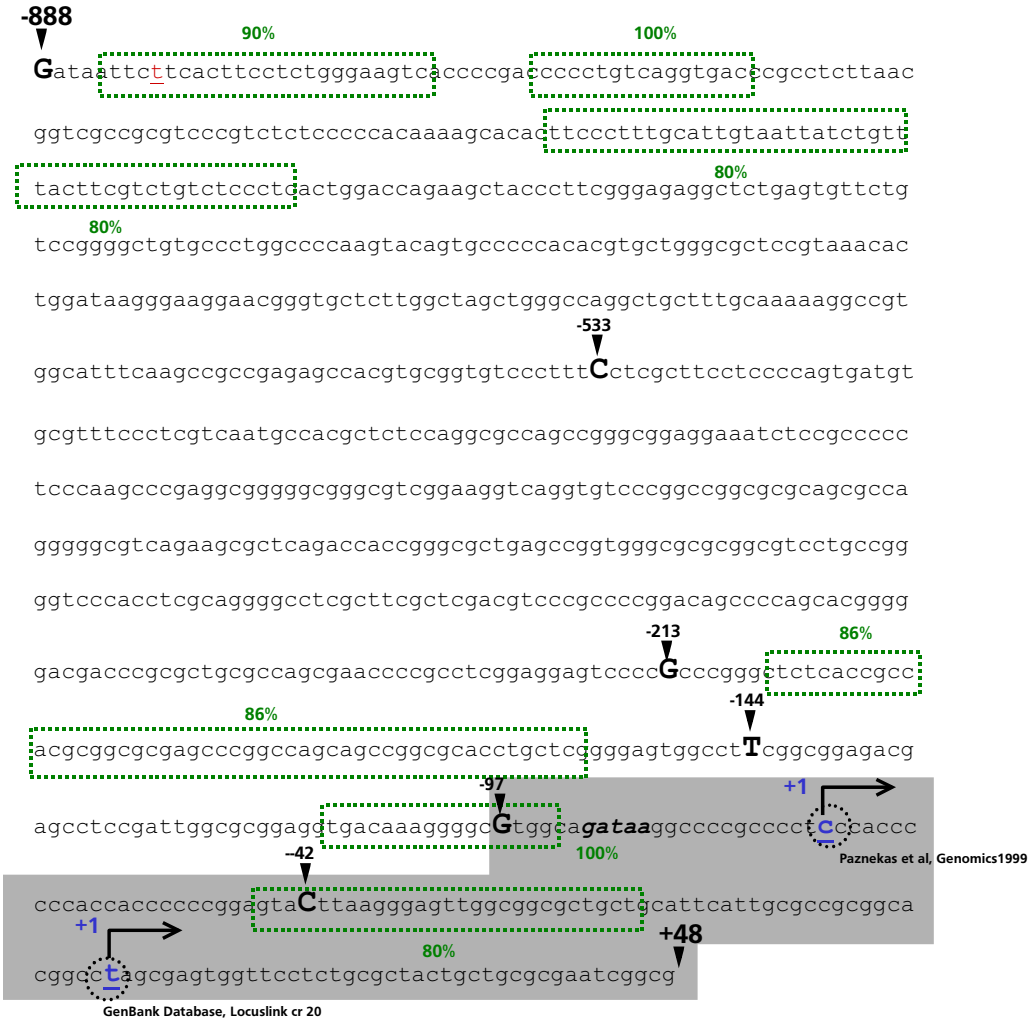


FIG RS-1 : MAPA DE SEQÜÈNCIA DEL FRAGMENT –888/+42 DE LA REGIÓ PROMOTORA DE L'HOMÒLEG HUMÀ D'SNAIL
Segment clonat del promotor d'Snail en humans. Els nucleòtids que marquen l'inici de les truncacions 5' utilitzades en els diversos assaigs són indicats en negreta, amb la posició relativa a l'inici de transcripció teòric (GeneBank Database, LocusLink cr 20). L'inici de transcripció proposat per Paznekas i col·laboradors és també indicat. Les regions assenyalades amb requadres verds corresponen als segments de seqüència conservats respecte a la del promotor d'Snail en ratolí. El grau de conservació de seqüència en aquestes regions és indicat amb un tant percent. La zona ombrejada en blau correspon a la Regió Mínima Promotora identificada en els diversos assaigs realitzats.

La comparació amb les seqüències promotores en d'altres homòlegs coneguts fa evident que la conservació de seqüència, si més no en la regió clonada de promotor, és baixa. No obstant hi ha certa conservació de l'arquitectura car es mantenen alguns segments conservats. El fragment clonat del promotor humà té 2 segments de conservació destacable amb la seqüència promotora de ratolí (*Paznekas WA et al, Genomics 1999 i alineaments CLUSTALW*). El primer es situa a la regió *-813/-667* o -888/-742, on s'hi troben regions d'aprox. 20-30 pb amb més d'un 80% dels nucleòtids conservats. Aquesta regió s'exten uns 100 pb més amunt (5'), però no és inclosa en el fragment de promotor que vàrem clonar. El segon segment és situat a la regió més proximal a l'inici de transcripció fins al final de promotor clonat, *-123/+117* o *-198/+42*, que inclou diverses regions amb conservació de seqüència de fins al 90% (*CLUSTALW*), que es situen pràcticament a idèntiques distàncies de l'inici de transcripció que en el promotor humà -si

tenim en compte l'inici de transcripció alternatiu obtingut de la seqüència cromosòmica. (***Fig Rs-1***). En el promotor humà, les dues regions conservades es troben força separades però en el ratolí no hi ha més de 150 pb entre ambdues, sense segments conservats destacables. Això pot suggerir que la conservació d'ambdós mòduls (*proximal* i *distal*) és important per al control transcripcional del gen, i que possiblement les seqüències "afegides" entre ambdós aportin mecanismes de regulació accessoris a ambdós.

Delimitació del promotor mínim del gen humà i correlació amb l'expressió en línies cel·lulars

Per tal d'identificar possibles seqüències o elements reguladors en el sí del promotor que fossin capaces de modular-ne l'activitat, vàrem avaluar la capacitat que diverses formes truncades a 5' o 3' de l'inici de transcripció tenien de dirigir l'expressió d'un gen reporter (luciferasa). Dels resultats de diversos assaigs es varen obtenir les dades exposades a la ***Fig Rs-2***. Aparentment, la deleció successiva de segments 5' s'associa a un increment progressiu en l'activitat del promotor (***Fig Rs-2A***). La forma truncada més petita (*-22/+117* segons l'inici de transcripció proposat per *Paznekas WA et al, Genomics 1999*; *-97/+42* segons l'inici de transcripció alternatiu) és relativament funcional en gairebé totes les línies cel·lulars avaluades, la seva activitat correlaciona correctament i de forma esperada amb les variacions dels nivells de missatger d'Snail comparats entre una i altra línia, i per tant l'hem considerat la *Regió Promotora Mínima* en l'homòleg humà (vegeu ***Fig Rs-2A,B***). Crida l'atenció que aquesta *Regió Promotora Mínima* es correspongui en part amb el *segment proximal* que es troba conservat entre humà i ratolí (vegeu ***Fig Rs-1***).

Segments més curts (*+27/+117* o bé el *-48/+42* alternatiu) són ja incapaços de dirigir l'expressió del gen reporter on són fusionats. Per tant, el segment eliminat en aquesta truncació (*-22/+27* o bé *-97/-48*) sembla contenir un o més elements essencials per a l'activitat basal del promotor humà. En el promotor de *Xenopus* (*Mayor R et al, Development 1993*) un segment de longitud i localització similar (-92/-45) té un efecte equivalent, però no hi ha cap similitud entre ambdós casos. Una possible explicació a aquest fet fora que en eliminar el fragment *-22/+27* estiguéssim eliminant l'inici de transcripció (*Paznekas WA et al, Genomics 1999*). Aquesta possibilitat no és descartable (excepte si assumim com a bó l'altre inici de transcripció), però sembla poc plausible donat que el segment que roman després de la truncació *(+27/+117 o -48/+42*) és vàries vegades més actiu que no pas el gen reporter nu (***Fig Rs-3***).

No obstant l'eliminació del segment *+27/+117* o *-48/+42* de qualsevol de les truncacions 5' de la seqüència promotora, inclosa la *Regió Promotora Mínima*, és suficient per colapsar-ne l'activitat transcripcional (***Fig Rs-3***). Cas que l'inici de transcripció el segon (*Lloyd D et al*, *seq AL121712 LocusLink cr 20*) situat 75 pb més 3' del primer, la deleció del segment *+27/+117* o *-48/+42* suposaria la seva eliminació i justificaria la gran davallada en l'activitat. La pèrdua d'activitat en el promotor derivada de la seva eliminació deu respondre doncs a l'existència d'elements essencials per a la transcripció basal d'*Snail* en qualsevol tipus cel·lular. Tanmateix, aquest segment no té per si sol activitat equiparable a la resta de segments del promotor, pel què suggerim que en el segment *-22/+27* o *-97/-48* hi ha elements importants per a la transcripció basal de la *Regió Promotora Mínima*.En conseqüència, prenc aquest inici alternatiu com a lloc +1 del

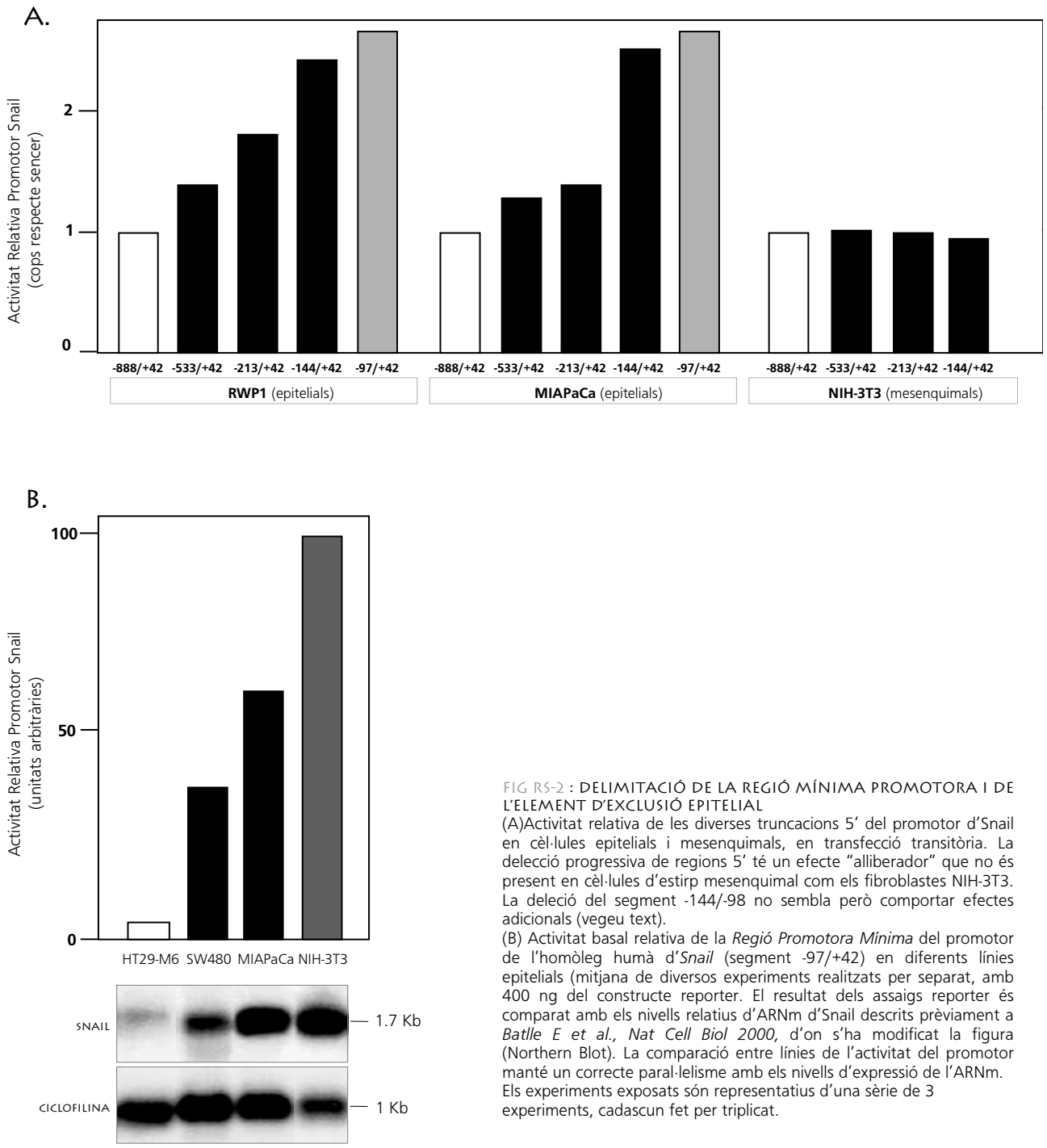


FIG R5-2 : DELIMITACIÓ DE LA REGIÓ MÍNIMA PROMOTORA I DE L'ELEMENT D'EXCLUSIÓ EPITELIAL
(A)Activitat relativa de les diverses truncacions 5' del promotor d'Snail en cèl·lules epitelials i mesenquimals, en transfecció transitòria. La delecció progressiva de regions 5' té un efecte "alliberador" que no és present en cèl·lules d'estirp mesenquimal com els fibroblastes NIH-3T3. La deleció del segment -144/-98 no sembla però comportar efectes adicionals (vegeu text).
(B) Activitat basal relativa de la *Regió Promotora Mínima* del promotor de l'homòleg humà d'*Snail* (segment -97/+42) en diferents línies epitelials (mitjana de diversos experiments realitzats per separat, amb 400 ng del constructe reporter. El resultat dels assaigs reporter és comparat amb els nivells relatius d'ARNm d'Snail descrits prèviament a *Batlle E et al., Nat Cell Biol 2000,* d'on s'ha modificat la figura (Northern Blot). La comparació entre línies de l'activitat del promotor manté un correcte paral·lelisme amb els nivells d'expressió de l'ARNm. Els experiments exposats són representatius d'una sèrie de 3 experiments, cadascun fet per triplicat.

promotor en les citacions del promotor exposades en el text d'aquí endavant. El fragment clonat de promotor humà és doncs, ***-888/+42***..

Donat que l'eliminació successiva de seqüències 5' del promotor s'associa a un increment en la seva activitat transcripcional es pot concloure que, amb elevada probabilitat, la majoria de seqüències presents en la porció reguladora del gen, si més no en el segment *-888/-144*, responen a elements repressors. El canvi en l'activitat transcripcional del gen reporter que es deriva de deleccionar el segment *-144/-97* és

escàs, i per tant considero que deu aportar poc a l'efecte regulador final. Aquest fenomen ocorre en les diverses línies cel·lulars epitelials avaluades (*HT29-M6, IEC-18* (ambdues intestinals), *RWP1* (pàncrees), *MDCK* (ronyó)), però no pas en cèl·lules d'estirp mesenquimal (*fibroblasts NIH-3T3*). En cèl·lules epitelials amb nivells d'expressió d'*Snail* relativament elevats (*MiaPaCa, SW480)* l'efecte de les deleccions 5' successives és fins i tot més evident (*vegeu* ***FIG Rs-2A***). Per tant, en cèl·lules epitelials els elements repressors serien actius i regularien a la baixa l'expressió d'*Snail*. Aquesta observació és en concordància amb les dades derivades de l'estudi d'expressió d'*Snail* en la majoria de línies cel·lulars epitelials (*vegeu Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000*). En cèl·lules mesenquimals, en les quals l'expressió d'*Snail* és elevada i gairebé constitutiva (*Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000 i Paznekas WA et al, Genomics 1999*), aquests elements repressors no serien actius, i en conseqüència, la deleció de seqüències 5' no tindria efectes rellevants. El mateix ocorreria en les línies cel·lulars epitelials amb expressió elevada d'*Snail*. El segment *-213/-144* sembla ser responsable de la repressió residual del promotor en cèl·lules *MiaPaCa* i *SW480*, ja que la seva eliminació provoca l'increment més apreciable d'activitat d'entre totes les deleccions 5'. Anomenarem aquesta regió predominant del promotor (*–888/-144)* com "*ELEMENT D'EXCLUSIÓ EPITELIAL*", tot i ser poc precisos i específics donada la longitud del segment [NP38]. No obstant, l'activitat constitutiva del promotor en cèl·lules mesenquimals també recauria possiblement en el segment més proximal a l'inici de transcripció, i d'acord amb les

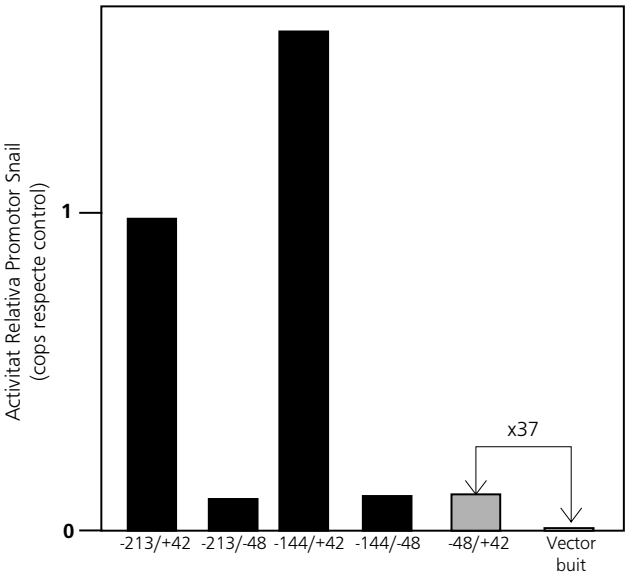


FIG RS-3 : EL SEGMENT –48/+42 INCLOU ELEMENTS *CIS* ESSENCIALS PER LA FUNCIÓ DEL PROMOTOR.
La delecció del fragment –48/+42 afecta dràsticament a l'activitat transcripcional del promotor en cèl·lules RWP1. Tanmateix, tot i ser molt més actiu que el vector pGL3basic, la seva activitat no explica la davallada que provoca la seva delecció (compareu l'activitat del fragment –144/+42 i la suma d'activitats dels fragments –144/-48 i –48/+42). Això suggereix que les regions que inclou cooperen de forma sinèrgica amb les presents en segment més 5'.
Les dades exposades són representatives d'una sèrie de 3 experiments, cadascun fet per triplicat.

dades experimentals no és possible delimitar elements específics que mantinguin l'expressió mesenquimal o epitelial diferencialment.

La seqüència promotora del retrogen d'Snail al cromosoma 2, les equivalències amb el promotor mínim d'Snail i la caixa CCACCACC.

El genoma humà té un retrogen de seqüència similar a *Snail* integrat en el cromosoma 2 (*Locascio AM, Nieto MA a JBC 2002*). Aquest retrogen és expressat en diverses línies cel·lulars i teixits en els quals no sempre es detecta l'expressió de l'*Snail* endogen [NP39]. Conserva una

[38] En el promotor de Xenopus, la delecció de bona part del segment 5', fins al -160, no suposa cap canvi en el patró d'expressió ni la intensitat (*Mayor R et al, Development 1993*), i per tant no és predible que hi hagi seqüències amb el mateix comportament que aquest element detectat en l'humà.

[39] L'existència d'un pseudogen d'*Snail* al cromosoma 2 (2q34) ja es coneixia prèviament (*Twigg SR i Wilkie AO, Hum Genet 1999; Paznekas WA et al, Genomics 1999*), però aquests autors han demostrat que es tracta d'un retrogen , amb l'ADNc d'*Snail* retrotransposat i essencialment conservat, i que arrossega 230 bp aproximadament de la seqüència 5' a l'inici de traducció. En algunes línies cel·lulars i teixits on *Snail* és mínimament expressat o no detectat,

A.

```
                                  -213                          -190
SNAI1_prom      CGGAGGAGTCCCCGCCCGGGCTCTCACCGCCACGCGGCGCGAGCCCGGCCAGCAGCCGGC
SNAI1P_prom     ----------------------------------TGCGCGAGCCCAGCCAG-GCCCGGC 24
                                                   ********** *****   *****

                 Ebox      NF-κB  Sp1                CCAAT box (CP1/NF-Y/CBF)
SNAI1_prom      GCACCTGCTCGGGGAGTGGCCTTCGGCGGAGACGAGCCTCCGATTGGCGCGGAGGTGACA
SNAI1P_prom     CCACTTGCTCAGAGCGTGGCCTTAGGGGGAGGCACGCCTCCAATTGGCGCGAAAGTGATA 84
                 *** ***** * * ******** ** **** *  ****** ********* * **** *

                 NF-κB  Sp1 TFIID GATA-1     Sp1  MAZ
SNAI1_prom      AAGGGGCGTGGCAGATAAGGCCCCGCCCCTCCCACCCCCCACCACCCCCCGGAGTACTTA
SNAI1P_prom     AAGAGGCGTGGCCGGAAAGGTCCCACCCTGCTC-------------CCCTGGAGTACTTA 131
                *** ******** *  **** *** ***   * *             *** **********
                        -97
                         Sp1                                   +1   Zeste
SNAI1_prom      AGGGAGTTGGCGGCGCTGCTGCATTCATTGCGCCGCGGCACGGCCTAGCGAGTGGTTCCT
SNAI1P_prom     AGGGAGTTGGCGGAGCGGCTGCACTCATTGCTCCAAGGCTCGGCCT AGTGAGTGGGTCGC 191
                ************* ** ****** ******* **  *** ******** ****** **

SNAI1_prom      CTGCGCTACTGCTGCGCGAATCGGCGAC
SNAI1P_prom     CTGCGCTACTTCTGCGCTACTCAGCGACCTCGTTGCCTCTGCCACCATG 240
                ********** ****** * ** *****
                                     +42
```

B.

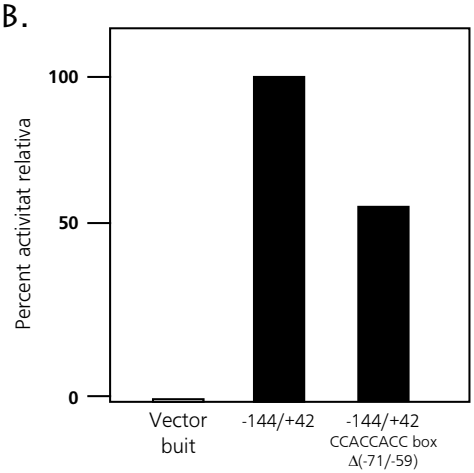


FIG RS-4 : LA REGIÓ MÍNIMA PROMOTORA ES CORRESPON AMB LA REGIÓ PROMOTORA QUE REGEIX L'EXPRESSIÓ DEL RETROGEN D'SNAIL HUMÀ, PERÒ INCLOU UNA REGIÓ CCACCACC NO PRESENT EN AQUEST ÚLTIM, I AMB RELLEVANCIA TRANSCRIPCIONAL

(A)Alineament de seqüència entre la Regió Promotora Mínima del gen humà d'Snail (SNAI1) i la que és associada al control d'expressió del retrogen humà trobat al cr 2 (SNAI1P), d'acord amb els treballs de Locascio A et al, *J Biol Chem 2002*. La seqüència de la regió de SNAI1P ha estat obtinguda basats en les dades citades per aquests autors i la seqüència genòmica del cr 2 exposada en el GenBank de l'NCBI. Els nucleòtids conservats són alineats amb un asterisc. En negreta són assenyalades les posicions corresponents als inicis de les truncacions 5' del promotor utilitzades en els assaigs, i l'inici de transcripció teòric. Les zones corresponents a dianes putatives per a factors de transcripció coneguts són marcades en color lila. Una regió de 13 pb rica en citosines, ombrejada en groc, és inexistent en el promotor del retrogen.

(B)Efecte de la delecció (-71/-59) detectada en el promotor del retrogen humà sobre el promotor del gen SNAI1 endògen. Les dades corresponen al resultat d'un sol experiment, repetit per triplicat, en cèl·lules RWP1.

regió de 230 pb aproximadament que és gairebé equivalent a la regió *-190/+42* de l'*Snail* endogen, amb un 75% d'homologia en la seqüència nucleotídica (*CLUSTALW*) (***Fig Rs-4***). Inclouria doncs el promotor mínim, però no pas les seqüències que constituirien l'"*ELEMENT D'EXCLUSIÓ EPITELIAL*". Això possiblement podria explicar perquè l'expressió del retrogen en línies cel·ulars epitelials és sempre més elevada que la d'*Snail* quan aquesta última és més o menys detectable. No obstant, el fet que en alguns teixits es detecti expressió d'*Snail* però no del retrogen -placenta, pulmó- fa també suposar que dins del què hem anomenat "*ELEMENT D'EXCLUSIÓ EPITELIAL*" o en regions més llunyanes a l'inici de transcripció deuen trobar-s'hi elements reguladors ("enhancers") específics de teixit. La seqüència de la regió promotora del retrogen no és estrictament equivalent a la del gen endogen. A més a més d'existir canvis en

aquest retrogen s'expressa en nivells apreciables. Els autors demostren que no obstant, aquest retrogen és funcional i si més no conserva lleugerament l'activitat repressora que *Snail* té com a factor de transcripció, tot i que no és pas tan eficient. El seu significat biològic és incert. En punts successius de la tesi exposarem diverses apreciacions que es referiran a aquest retrogen (vegeu *REGULACIÓ NO TRANSCRIPCIONAL*)

algunes bases, la diferència més destacable és l'absència del segment que correspondria a la regió *-71/-59* del promotor endogen (*vegeu* ***Fig Rs-4***).

Durant el procés inicial de clonatge del promotor d'*hsSnail* es va arrossegar una deleció similar en els fragments obtinguts en primera instància, que després fou corregida. La comparació entre l'activitat reporter d'un constructe amb el segment *-213/+42* del promotor amb o sense aquest element 5' *CCACCACC 3'* (***Fig Rs-4B***) mostra que la seva absència és suficient per a fer davallar a la meitat l'activitat transcripcional del promotor. Aquesta pèrdua d'activitat és de difícil explicació[NP40] en no trobar-hi cap consens clar per a factors de transcripció coneguts. Tampoc és gens clar que pugui justificar les diferències d'expressió tissular entre *Snail* i el retrogen al cromosoma 2.

Organització seqüencial del promotor mínim, zones d'interés i llocs putatius diana per a factors de transcripció coneguts

La ***Fig Rs-5*** mostra la informació obtinguda després d'enfrontar les dades arquitecturals del promotor adquirides en l'apartat anterior amb les derivades de l'estudi de la seqüència mitjançant predictors de llocs d'unió per a factors de transcripció en promotors humans (*TESS, TSSG, TSSW i les bases de dades TFD, TRANSFAC* accessibles a la Web). Donat que les dianes a valorar eren múltiples, es varen tenir en compte les que es corresponien amb la seqüència del *promotor mínim* i alhora amb els elements detectats mitjançant les truncacions 5' i 3' d'aquest. Alhora, es varen valorar aquelles coincidències que segons els predictors eren d'elevada probabilitat. Els factors de transcripció amb consens acceptable en aquest segment del promotor eren *Sp1*, la familia de proteïnes d'unió a caixes CCAAT (*CP1, NF-Y, CBF*), el factor del complexe Polycomb *Zeste*, la proteïna associada a Myc *Maz*, el factor de diferenciació *GATA-1*, *TFIID/TBP*, i l'homòleg de *Dorsal, NF-κB*.

D'acord amb les prediccions hi ha diverses zones consens per al factor de transcripció *Sp1*. Això podria estar associat al fet que el promotor d'*Snail* és carent de caixa TATA (*Nothias JY et al, J Biol Chem 1995)*. El fet que hi hagi diverses regions dins el promotor mínim que en podrien

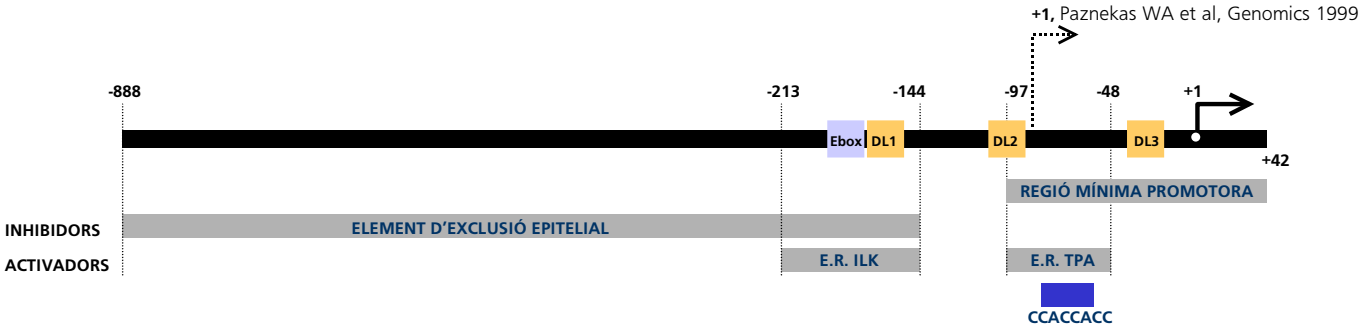


FIG RS-5 : ARQUITECTURA TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR D'SNAIL HUMÀ
Esquema de la regió –888/+42 del promotor d'Snail en humans. Els segments blaus assenyalen els elements funcionals identificats ens els diversos assaigs. Destaca la inclusió de la caixa CCACCACC, absent en el promotor del retrogen SNAI1P, en l'element de resposta al TPA. Les caixes putatives de resposta als homòlegs de Dorsal i la presència d'una Ebox destaquen com a elements possiblement conservats amb els descrits com a funcionals en el promotor de Drosophila. Són també indicats els 2 inicis de transcripció descrits per al promotor.

[40] D'acord amb els predictors (*TESS, TSSG,TSSW* amb les bases de dades *TFD* i *TRANSFAC*), en aquest segment hi ha un element de resposta a factors coneguts com "*d'unió a caixes CAC*" de funció desconeguda.

ser diana pot suposar que en algun cas les truncacions podrien afectar l'activitat del promotor per deleccionar algun d'aquests consens: És el cas de la deleció del segment *-97/-42*. La presència d'una caixa CCAAT a -120 pb (*-122/-117*) de l'inici de transcripció encaixa amb el fet que es tracti d'un promotor sense caixa TATA (*Mantovani R, Nucleic Acids Res 1998*). Aquestes seqüències són més freqüents en aquest tipus de promotors i coincideixen amb les caixes *Sp1*. Es creu que ambdues col·laboren en l'activació transcripcional per elements amplificadors -"enhancers"- en promotors sense TATA. *Maz* i *Sp1* comparteixen dianes car ambdós factors s'uneixen a zones riques en GC. *Maz* usualment actua com a repressor i es creu important en la regulació de l'expressió de gens "housekeeping" en balanç amb *Sp1*, que usualment és activador (*Song J et al, J Biol Chem 2001*).

La presència d'una seqüència consens per a *TFIID* fora esperable que, car és demostrat que és necessària per al funcionament de qualsevol promotor, sigui associada a la caixa TATA o bé a seqüències iniciadores. Usualment es situa a uns 30 pb 5' de l'inici de transcripció, però això no coincideix amb cap dels dos inicis alternatius que proposem per *Snail*.

Totes les dades exposades ens permeten establir un mapa arquitectural i organitzatiu del segment *-888/+42* de la regió promotora d'*Snail* en humans (***Fig Rs-5***). D'acord amb aquestes dades, el següent pas ha estat determinar com aquests mòduls participen en l'activitat del promotor, i quins factors candidats en són reguladors.

Regulació transcripcional dels nivells d'Snail

Resposta del promotor a factors inductors d'EMT i com la resposta en alguns casos depèn en part de regions concretes del promotor

S'han descrit alguns factors capaços d'induir fenòmens de transició epiteli-mesènquima en diversos sistemes cel·lulars (*Hay ED, Acta Anat 1995*). Els factors de creixement *FGF1, EGF, SF/HGF* semblen induir el procés mitjançant l'activació de la via de *Ras-MAPK* o *Src (Nabeshima K et al, Int J Cancer 1998; Herrera R, J Cell Sci 1998). IGF-II (insulin growth-factor II)* és capaç també d'induir efectes similars que coincideixen amb la translocació nuclear de beta-catenina (*Morali OG et al*, *Oncogene 2001*) .*FGF-1* sembla ésser el més rellevant en els sistemes avaluats in vivo i durant el desenvolupament embrionari sembla ésser essencial en el procés de gastrulació i generació del mesoderma (*Ciruna B, Rossant J, Dev Cell 2001*). *TGFbeta*, que en alguns sistemes estimula paradoxalment la diferenciació epitelial, en d'altres sembla col·laborar amb la via de *Ras* per induir desdiferenciació i un fenotip invasiu *(Janda E et al, J Cell Biol 2002; Cui W et al, Cell 1996)* . Els senyals provinents de la matriu extracel·lular són també capaços d'induir *EMT* essencialment mijançant la senyalització per integrines i la quinasa *ILK* (Q*uinasa Lligada a Integrines*) (*Tan C et al; Oncogene 2001*). Els èsters de forbol (12-O-tetradecanoylphorbol-myristate 13-acetate, *TPA o PMA*) són capaços d'induir el mateix procés, i en alguns sistemes sembla ser que ho fan a través de *PKCalfa* (*Batlle E et al, J Biol Chem 1998*).

Hem testat l'efecte d'alguns d'aquests elements sobre l'activitat transcripcional del promotor d'*Snail* (*SF/HGF, TGFbeta, TPA-PMA*). En els sistemes utilitzats per als assaigs, *HGF* i *TGFbeta* incrementen escassament l'activitat del promotor d'acord amb el resultat dels assaigs reporter. D'acord amb això, es varen descartar de posteriors assaigs.

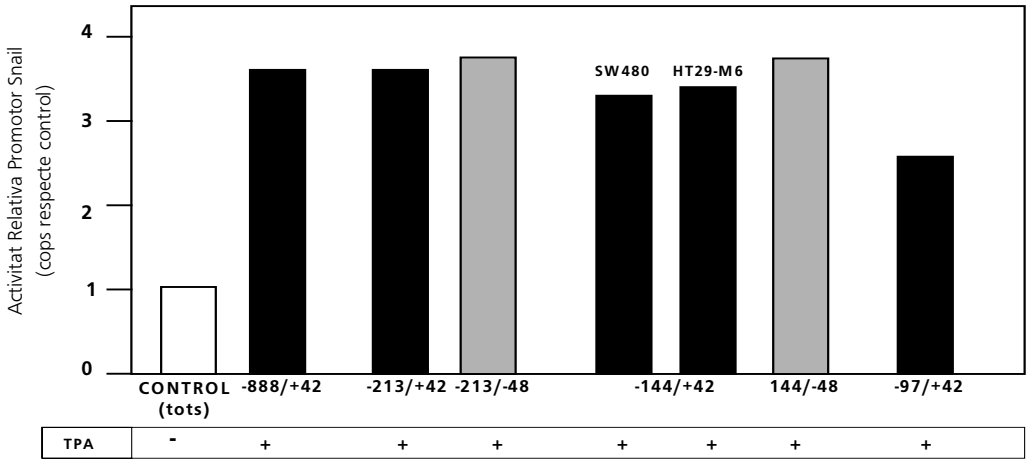


FIG RS-6 : EFECTE DEL TPA (ÈSTERS DE FORBOL) SOBRE L'ACTIVITAT DEL PROMOTOR D'SNAIL
Increment relatiu de l'activitat del promotor en resposta a l'adició de TPA 100nM, durant 24 H, en el medi de cultiu. Tots els valors són relatius als del mateix fragment en presència de DMSO (vehicle). Excepte on és indicat el contrari, totes les dades corresponen a assaigs realitzats en cèl·lules RWP1. L'assaig mostrat és representatiu de 2-4 assaigs realitzats per separat, amb 3 rèpliques per punt.

Els èsters de forbol (TPA) indueixen l'expressió d'Snail a través de l'activació de PKC

TPA-PMA és capaç d'induir l'activitat del promotor d'Snail fins a 5 cops (ratio 2'68 a 5'51 depenent del tipus cel·lular i la truncació 5' del promotor). (***Fig Rs-6***). La millor resposta s'observa en cèl·lules *MiaPaCa*, si bé és força aparent en totes les línies avaluades (*HT-29 M6, RWP1,SW-480*). La *Regió Mínima Promotora* òbviament també hi respon. L'element de resposta al *TPA* sembla localitzar-se en el segment *-97/-48*, car les truncacions 5' successives o l'eliminació del fragment *-48/+42* no modifiquen la capacitat de resposta del promotor fusionat a un gen reporter (***Fig Rs-6***). L'esmentat element de resposta al *TPA* té però, uns nivells de transcripció basals força inferiors al *promotor mínim*. Alhora, no és possible identificar-hi dianes de factors de transcripció coneguts. No es pot descartar que, tot i constituir la part essencial del promotor mínim capaç de respondre a efectors com els *èsters de forbol*, no existeixin més elements similars en altres zones 5' a aquesta.

La inducció de fenòmens de transició epiteli-mesènquima pel *TPA* és possiblement mediada per *PKCalfa*, ja que línies estables d'*HT-29 M6* que sobreexpressen una forma activa d'aquesta quinasa presenten un fenotip compatible amb la *EMT* (*Batlle E et al, J Biol Chem 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* [NP41]. En assaigs de protecció a la ARNasa es pot confirmar que el TPA és capaç d'induir un increment en els nivells d'ARNm d'Snail, i que l'expressió estable d'una forma activada de *PKCalfa* té un efecte si cap més evident (***Fig Rs-7***). *PKCalfa* podria doncs posar en marxa alguna ruta de senyalització que portés a l'activació del promotor i en conseqüència, la inducció del procés de "transició epiteli-mesènquima" desencadenada per l'activació de *PKCalfa* seria deguda, si més no en part, a l'increment de l'expressió d'*Snail*, què per sí sol ja es capaç de generar tots els canvis cel·lulars essencials en aquest procés morfogènic.

El *TPA* és capaç d'induir efectes similars en embrions d'*eriçó de mar* durant la fase de gastrulació a través de l'activació de *PKC* (*Livingston BT i Wilt FH, J Cell Biol 1992)*. En

[41] El clon *A4* establert al nostre laboratori (*Batlle E et al, J Biol Chem 1998*) té un aspecte fibroblàstic força marcat, pèrdua dels sistemes d'unió intercel·lular, i presenta una davallada en l'expressió d'*E-cadherina* i un increment de la capacitat migratòria i invasiva. Tanmateix, sembla mostrar un sever enlentiment en el creixement,

aquest cas, el tractament amb *TPA* provoca un augment en el nombre de cèl·lules que són reclutades per esdevenir mesoderma i endoderma, en forçar la diferenciació de les cèl·lules de l'ectoderm cap aquests llinatges. A *Xenopus PKC* és essencial en el procés d'inducció neural, i el *TPA* és suficient per activar-la (*Otte P i Moon RT, Cell 1992; Otte T et al, Nature 1988*).
Aquests fets coincideixen amb el rol que té *Snail* en aquestes fases del desenvolupament embrionari (*Ashraf SI et al. EMBO J 1999; Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*), i encaixen amb les dades experimentals que suggereixen que l'activació de *PKC* és capaç d'induir l'expressió d'*Snail* en cèl·lules tumorals en cultiu.

Alguns senyals provinents de la matriu extracel·lular poden induir l'expressió d'Snail

(resultats publicats a Tan C et al, Oncogene 2001; 20(1): 133-40)

Fora de funcionar de forma autònoma, els tumors són sensibles als canvis del microambient en què progressen. Els senyals provinents de la matriu extracel·lular són capaços de modular el comportament de les cèl·lules tumorals, i hom considera que això podria explicar processos com la invasió o com la reversió fenotípica i re-diferenciació en les metàstasis de carcinomes epitelials (*Barker N i Clevers H. TRENDS Mol Med 2001; Chambers AF et al. Nat Rev Cancer 2002*).
Processos com la diferenciació cel·lular, la proliferació o la migració cel·lular són estretament lligats a la interacció de les cèl·lules amb la matriu extracel·lular. Les integrines són les molècules encarregades de mediar l'adhesió de les cèl·lules a aquesta matriu extracel·lular. Alhora de mediar la interacció entre aquesta i el citosquelet, fet que n'assegura el rol en motilitat cel·lular o en el procés metastàsic, aquestes glicoproteïnes són

similar al què s'observa en els clons estables d'*HT-29 M6* que expressen *Snail*, i assimilable al fenotip d'una *transició epiteli-mesènquima*.

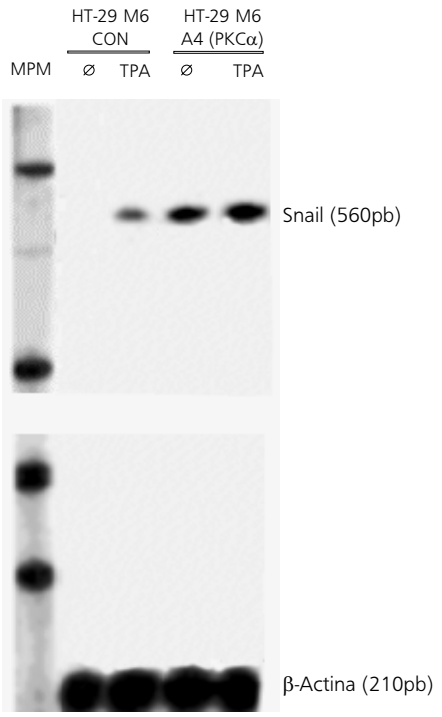


FIG RS-7 : EL TPA O L'ACTIVACIÓ DE PKCα INCREMENTA ELS NIVELLS D'ARNm D'SNAIL EN CÈL·LULES EPITELIALS
Assaig de Protecció a les ARNases (E. Batlle) per avaluar els nivells d'ARNm d'Snail en cèl·lules HT29-M6 tractades amb TPA i/o en resposta a l'expressió estable d'una forma activa de PKCα (clon A4, referenciat a *Batlle E et al, J Biol Chem 1998*). Breument, còpies d'ARNc de l'ADN codificant per un fragment d'Snail humà foren sintetitzades in vitro i hibridades amb l'ARN total extret de cada experiment. La mostra hibridada fou tractada després amb ARNases, amb el qual només els fragment protegits per la hibridació són conservats i poden després ser amplificats i/o detectats. Es tracta d'un mètode força sensible.
En el marge inferior són mostrat els nivells de β-actina, utilitzats com a estandard de normalització.
Tant el TPA com la forma activa de PKCα són capaços d'activar eficientment la transcripció d'Snail.

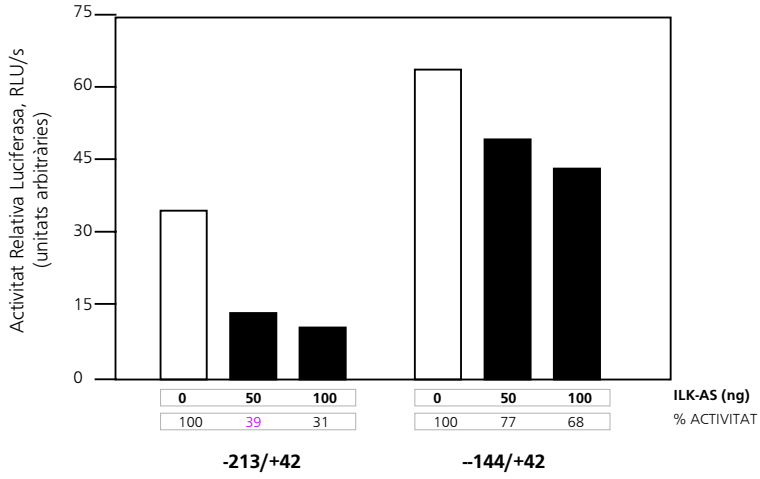
capaces de mediar la transmissió de senyals moleculars entre la cèl·lula i la matriu (*Dedhar S, Curr Opin Cell Biol 2000 i cites allí referenciades*) i aquest fenomen s'associa al seu rol en processos cel·lulars com la diferenciació o la proliferació. Molecules com el sistema de les *Rho GTPases* o la ruta de les *MAP-quinases (MAPK)* participen d'aquest rol senyalitzador. Tanmateix, la unió de les integrines a algunes molècules que composen la matriu extracel·lular, com *fibronectina*, és capaç d'activar *ILK* ("*Quinasa Lligada a Integrines*"). *ILK* forma part d'un complexe ancorat a la cara citoplasmàtica d'algunes beta-

integrines. La funció d'*ILK* en aquest complex és la de mediar-ne la interacció amb el citosquelet d'actina, però també la de senyalitzar cap a diverses rutes moleculars a través de la fosforilació de les quinases *GSK3-beta* (i amb això la ruta de *beta-catenina*) i *PKB/AKT*, i algunes molècules del citosquelet cel·lular (*miosina*), fet que en modifica l'activitat (*Wu C i Dedhar S. J Cell Biol 2001*).

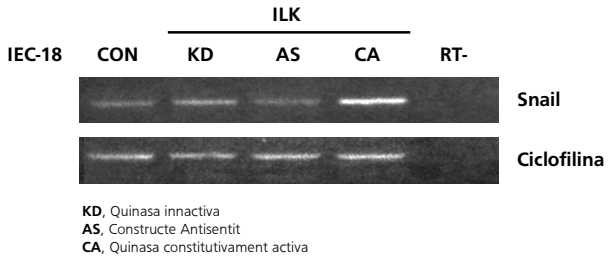
Les conseqüències de la senyalització per *ILK* són tan diverses com la supressió de l'anoikis, l'estimulació de la diferenciació (en cèl·lules de múscul esquelètic), o la inducció de "*transició epiteli-mesènquima*" en cèl·lules epitelials, coincident amb l'increment de síntesi de *fibronectina* possiblement per l'efecte d'*ILK* sobre la ruta de *beta-catenina (Novak A et al, Proc Natl Acad Sci 1998; i White DE et al., Oncogene 2001)*. Malgrat que els nivells d'*ILK* són regulats durant el desenvolupament embrionari a *Drosophila*, i que durant la gastrulació n'augmenta l'expressió, sobretot en el mesoderma prospectiu, no sembla que la seva absència s'associï a defectes greus en aquesta fase del desenvolupament ni en l'eix de beta-catenina (*Zervas CG et al, J Cell Biol 2001*). El lligam entre l'activació d'*ILK* i el procés de "transició epiteli-mesènquima" ens va fer avaluar si aquest fet era coincident amb l'activació de l'expressió d'*Snail*, com ocorre en la gastrulació i d'altres sistemes.

La primera aproximació fou avaluar l'efecte que un constructe antisentit d'*ILK* tenia sobre el promotor d'*Snail* en cèl·lules *SW480*. La transfecció de quantitats creixents del constructe antisentit comporta una davallada apreciable (de fins el 70%) en l'activitat del fragment *-213/+42* del promotor (***Fig Rs-8A***). L'existència d'una activitat constitutivament elevada d'*ILK* en aquesta línia cel·lular podria explicar aquest resultat,i tanmateix suggereix que part de l'elevada activitat basal del promotor en alguns tipus de cèl·lules intestinals tumorals pot ser conseqüència de la disregulació d'aquesta quinasa (fet consistent amb els exposats per *Marotta A et al. Oncogene 2001).* En cèl·lules *IEC-18* (*budell prim -ileon-, rata*), l'expressió estable d'una forma activada de *ILK* indueix un profund canvi fenotípic, coincident amb el descrit per a la transició epiteli-mesènquima. La comparació d'aquests clons cel·lulars amb línies d'*IEC-18* que establement expressen una forma inactiva (sense activitat quinasa) o un ARNm antisentit per *ILK* mostra que l'activació d'ILK és coincident amb l'augment dels nivells d'ARNm d'*Snail* (***Fig Rs-8B***), si més no per RT-PCR. Aquest fet és correlaciona amb la davallada dels nivells d'E-cadherina (*Guaita S et al, J Biol Chem 2002; Tan C et al, Oncogene 2001*). Cap suposar que, donada la localització subcel·lular i les funcions conegudes per *ILK*, es tracti d'un efecte indirecte, derivat de l'activació de rutes de senyalització concretes. L'activitat del promotor humà és equivalent als nivells detectats d'ARNm en els diferents clons estables (***Fig Rs-8C***). El fragment *-213/+42* és força més actiu en els clons amb la forma constitutivament activa d'ILK que no pas en els que expressen establement la forma inactiva o el constructe antisentit. No obstant, aquesta diferència es fa gairebé inexistent quan es delecciona el segment 5' *-213/-144* (vegeu ***Fig Rs-8C***). Aleshores, el segment restant de promotor és pràcticament igual d'actiu en tots els clons. Aquesta dada suggereix que en el segment *-213/-144* es troba algun tipus d'element que media la resposta del promotor a les rutes de senyalització activades per *ILK*. D'acord amb la seqüència nucleotídica, en aquest segment es troba una de les escases regions conservades respecte el promotor de ratolí, fet que possiblement en referma la

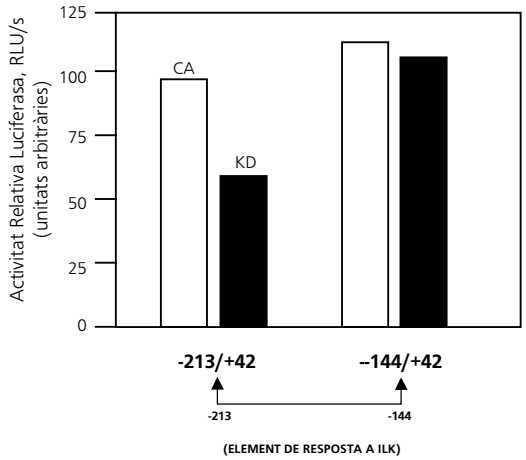
A.



B.



C.



(-213) GCCCGGGCTCTCACCGCCACGCGGCGCGAGCCCGG

Ebox NF-κB Sp1

CCAGCAGCCGGCGCACCTGCTCGGGGAGTGGCCTT (-144)

FIG RS-8 : IDENTIFICACIÓ D'UN ELEMENT DE RESPOSTA A L'ACTIVACIÓ D'ILK (QUINASA LLIGADA A INTEGRINES) EN EL PROMOTOR D'SNAIL HUMÀ

(A)Resposta del promotor d'Snail a l'expressió transitòria d'un constructe antisentit d'ILK, en cèl·lules RWP1. L'efecte del constructe és considerable i dosi depenent, però es perd en deleccionar el segment -213/-144. Experiment representatiu de 2 experiments aïllats.(B)RT-PCR per Snail en cèl·lules IEC18 que expressen de forma estable diferents formes mutants de la quinasa ILK (*Tan C et al, Oncogene 2001*). L'RT-PCR és feta sobre 450ng d'ARN total, i els nivells d'expressió de ciclofilina són utilitzats com a normalització. El clon amb expressió de la forma constitutivament activa expressa nivells certament més elevats de l'ARNm d'Snail, mentre que, d'acord amb els resultats exposats a (A), el constructe antisentit comporta una davallada apreciable. (Snail, 40 cicles; Ciclofilina 32 cicles) (C)Activitat del promotor d'Snail en els clons estables amb expressió constitutiva de la forma activada (CA) o inactiva (KD) d'ILK. Les diferències es fan minses en deleccionar el fragment –213/-144 del promotor, on possiblement doncs és situat l'element de resposta. La seqüència d'aquest segment permet identificar una Ebox amb consens putatiu per Snail i una caixa putativa per factors de transcripció de la família Rel/NFκB/Dorsal, com a factors coneguts.

rellevància, i que coincideix amb el què podria correspondre a una *Ebox* assimilable al consens 5' CANNTG 3' (*-165/-160*). Els nucleòtids flanquejants a ambdós extrems d'aquesta Ebox són també conservats en ratolí. Adjacent a l'Ebox -3 nucleòtids més avall- es troba una seqüència de 10 nucleòtids que s'adapta perfectament al consens de les dianes pels factors de la família *Rel - NF-κB* o *Dorsal* (*-156/-147*). Aquesta última regió podria ser també diana del factor *Sp1* o del co-activador *CBP/p300*, d'acord amb les seqüències consens (*TESS-TSSG*). Curiosament,

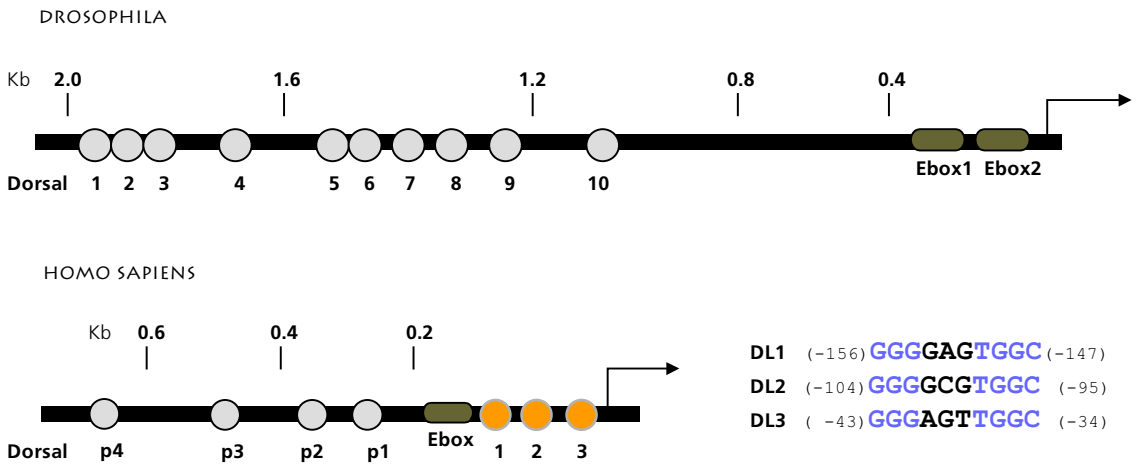


FIG RS-9 : SIMILITUDS ARQUITECTURALS ENTRE ELS PROMOTORS D'SNAIL A DROSOPHILA I HUMANS.
La distribució de les dianes putatives per a factors de la família Dorsal/NFκB en el promotor humà recorda al gradient de caixes per Dorsal descrit en *Drosophila*. Alhora, la presència d'Eboxs és també reminiscent d'aquesta. Les caixes amb consens per NFκB 1-2-3 resaltades en groc són les incloses en la zona més proximal a l'inici de transcripció, i entre elles mantenen una elevada conservació de seqüència. Aquest fet ha cridat la nostra atenció experimental. A la figura són esmentades com DL1, DL2 i DL3, i la regió consens és mostrada en color blau, amb la distància a l'inici de transcripció teòric. Les caixes p1-p4 corresponen a regions consens putatives fora d'aquestes 3 (vegeu text).

cap d'aquestes dues caixes és totalment conservada en el segment promotor del retrogen *SNAI1L* humà.

Donat que en el segment restant (*-213/-165*) s'hi troben també 2 petites regions conservades amb el promotor de ratolí, no es descartable que fos en aquest segment on s'hi pogués trobar l'element de resposta, malgrat no hi ha dianes conegudes per a cap factor transcripcional segons els predictors.

ILK és capaç d'activar la quinasa *PKB/AKT* mitjançant la fosforilació. Entre altres respostes, aquest mecanisme comporta l'activació d' *NF-κB (Madrid LV et al. JBC 2001; Kane LP et al. Curr Biol 1999)*. En alguns sistemes, la senyalització per *NF-κB* derivada d'aquesta ruta activa la transcripció d'alguns gens diana (*Tan C, Mui A i Dedhar S. J Biol Chem 2002*). En cèl·lules epitelials comporta l'increment en l'expressió de metaloproteases de matriu i l'adquisició de capacitats motils i invasives (*Kim D et al, FASEB J 2001*). Fora possible que *NF-κB* fos capaç d'augmentar l'activitat del promotor d'*Snail* i que això expliqués, si més no en part, la resposta del promotor a *ILK*.

Validesa del sistema Dorsal/ NF-κB en el promotor humà d'Snail

A excepció del què ocorre en *Drosophila* i potser en alguns organismes invertebrats com les sangoneres (o *Helobdella robusta*, *Goldstein B et al, Dev Genes Evol 2001*), no hi ha gaires evidències que el promotor d'*Snail* en d'altres espècies pugui ésser regulat per factors de la família *Rel* (*Dorsal, xRelA-xRelB, NF-κB*). No és tampoc gaire conegut el rol que *NF-κB* pot jugar en la progressió tumoral, potser perquè clàssicament s'ha estudiat aquest factor en el context dels processos inflamatoris. No obstant, hi ha alguns exemples que impliquen la senyalització per *NF-κB* en el procés invasiu i metastàsic, de forma que és possible que en les metàtasis el nivell d'expressió i activitat d' *NF-κB* siguin anormalment elevats (*Dong G et al. Cancer Res 1999*), o que en alguns tipus tumorals l'activació d' *NF-κB* s'associï a la progressió i

adquisició de propietats invasives i metastàsiques en cèl·lules epitelials tumorals, com en els carcinomes de mama no estrogen-depenents (*Nakshatri H et al, Mol Cell Biol 1997*). Alhora es creu que té funcions antiapoptòtiques en bloquejar l'efecte de *TNF-alfa*. Algunes dades recents fan pensar que en càncer de colon, mama, pàncrees, ovari i melanoma *NF-κB* hi podria jugar un rol important [NP42].

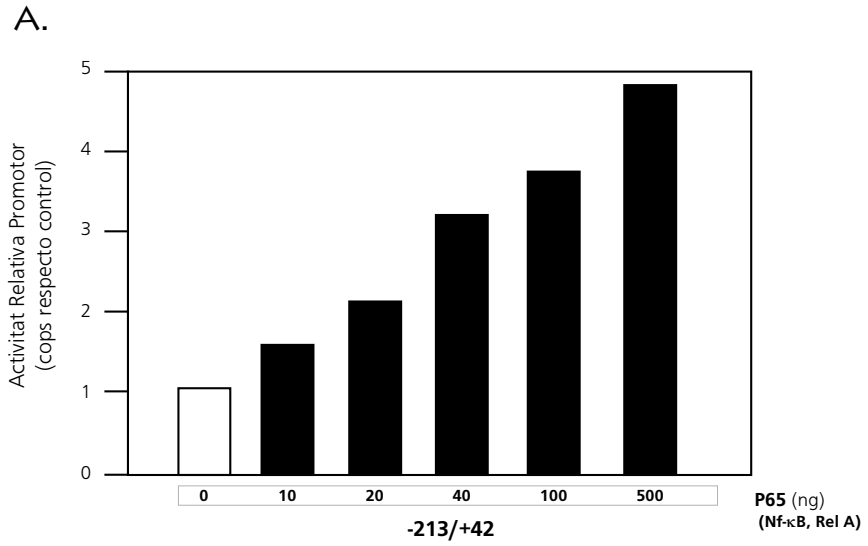
En la regió *-138/+117* o *-213/+42* del promotor humà d'*Snail* s'hi poden identificar 3 possibles regions consens per a factors de la familia *Rel/ NF-κB* (***Fig Rs-9***). En regions situades a major distància de l'inici de transcripció hi ha d'altres (fins a 4) caixes consens similars (*-224, -287, -464 i -901* respecte l' inici de transcripció (esmentades com *p1* a *p4* a la *Figura Rs-8*). Les 3 caixes incloses en el fragment esmentat són separades per 42 (*DL1-DL2*) i 50 pb (*DL2-DL3*). La tercera caixa (*DL3*) no és localitzada pels predictors per software, però té una molt elevada homologia de seqüència amb les altres dues (*vegeu Fig Rs-8*). *DL2* és totalment conservada en la seqüència del promotor de ratolí. També ho està la situada a *-901*. *DL1* és inclosa dins l'element de resposta a *ILK*. *DL3* es troba en el segment *-48/+42*, què en ser eliminat fa davallar dràsticament l'activitat de qualsevol truncació 5' del promotor. Aquesta disposició és molt suggerent, ja que recorda vagament la distribució seqüencial o en tàndem que prenen les caixes de resposta a *Dorsal* en el promotor de *Drosophila* (*Ip YT et al, Genes Dev 1992*). Aquesta dada ens va fer pensar que potser la ruta de regulació en desenvolupament pogués també ésser conservada. La transfecció de quantitats creixents d'un plàsmid d'expressió amb l 'ADNc de la subunitat *p65* d' *NF-κB* [NP43] en cèl·lules *RWP1* o *SW480* comportava un augment progressiu de l'activitat basal del segment *-213/+42* del promotor, que inclou les 3 caixes putatives (***Fig Rs-10***). En alguns assaigs aquesta activació va ser de fins a 5 cops respecte el control. Aquest augment era coincident amb un augment dels nivells d'ARNm per RT-PCR en cèl·lules *SW480* (***Fig Rs-10B***).

Per confirmar d'altra manera que *p65* s'unia al promotor d'*Snail,* el domini d'homologia *Rel* de *p65* fou fusionat al transactivador *VP16* (vegeu *Material i Mètodes*). D'aquesta manera la transactivació del gen reporter era una dada indirecta de l'existència de dianes per a factors *Rel/ NF-κB* en el promotor. En diversos assaigs, el constructe *Rel-VP16* era capaç de transactivar el promotor d'*Snail* en una forma dosi-depenent, fins a 3 cops respecte el control (***Fig Rs-11***). Aquestes dades suporten els resultats obtinguts amb la forma silvestre de *p65*.

Curiosament la *Regió Promotora Mínima* responia també de forma similar a *p65*, i aquest fet suggeria que molt possiblement les caixes *DL1* i *DL2* eren poc rellevants en la resposta, o bé que la resposta podia dependre en major mesura de la caixa *DL3*. De fet, el fragment *-48/+42* responia de manera similar a l'activació per *RelVP16*, fet que feia sospitar que l'element de resposta es

[42] Es creu que l'activació d'aquesta ruta és un succés relativament inicial durant la progressió tumoral, i d'entre les conseqüències que en deriven està l'augment de síntesi de diverses citoquines, algunes d'elles implicades en el mecanisme de selecció d'òrgans diana de les metàstasis (és el cas de *CXC. Chambers AF et al, Nat Rev Cancer 2002; Dhawan et al, J Biol Chem 2001*). CXC sembla participar en la selecció d'òrgans diana per les cèl·lules metastàsiques del càncer de mama, i de fet aquesta és la primera demostració molecular del perquè cada càncer té predilecció per metastatitzar a certs òrgans, com diu la teoria del "*seed and soil*" (llavor i terra).

[43] La familia *Rel/NF-κB* funciona constituint homo- i heterodímers que s'uneixen al ADN mitjançant el domini d'homologia Rel. *NF-κB* és l'heterodímer compost per dues de les proteïnes *Rel*, ,conegudes com *p50* (derivat del processament per proteòlisi del seu precursor *p105),* i *p65 (RelA). p52* (i el seu precursor *p100*), *Rel B* i *c-Rel*, són d'altres membres de la família. Els dímers *p50/p65* són transcripcionalment actius, i usualment en les aproximacions experimentals la transfecció de *p65* acostuma a ser suficient per activar promotors diana o gens reporter sintètics amb tàndems de caixes per aquest factor.



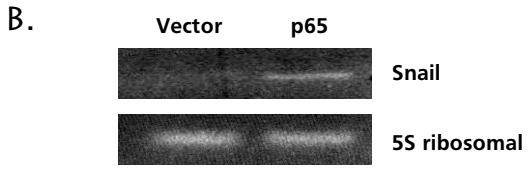


FIG RS-10 : ACTIVACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR D'SNAIL EN RESPOSTA A LA SENYALITZACIÓ PER FACTORS DE LA FAMÍLIA REL/NFκB
(A) Increment de l'activitat del fragment –213/+42 (que inclou les 3 caixes proximals consens per NFκB, DL1,2 i 3) en resposta a l'expressió de la subunitat p65 del factor de transcripció NFκB, dosi-depenent. Assaig reporter sobre cèl·lules SW480. Lectura a les 48H post-transfecció. (B) RT-PCR per avaluar els nivells d'ARNm d'Snail en cèl·lules SW480, co-transfectades o no de forma transitòria amb el constructe pcDNA3-p65 . (32 cicles sobre 500 ng d'ARN total inicial). L'ARN ribosomal de baix pes, 5S, es mostra com a control de càrrega.

trobava en aquesta regió, que forma part de la *Regió Mínima Promotora* i on és inclosa *DL3* (***Fig Rs-11***). Per avaluar aquesta hipòtesi vàrem utilitzar un sistema de mutagènesi dirigida per PCR per tal de mutar el consens de *DL3*. La substitució de les 3 primeres i de l'última *G* per *A* fou l'estratègia adoptada, essent estrictes amb el consens 5' GGGNNYTGGC 3' (on Y=pirimidina) que presentaven les 3 caixes. Amb la mutació, la *Regió Mínima Promotora* perdia entre un 25 i un 35% de la seva activitat, depenent de l'assaig (***Fig Rs-11B***), pel qual és força possible que en els tipus cel·lulars testats (*MDCK, RWP1*) l'aportació d'aquesta caixa a l'activitat total del promotor mínim, si bé és clarament apreciable, no sigui del tot determinant. Alhora fora possible que en aquests tipus cel·lulars l'activitat transcripcional basal mediada per NF-κB fos baixa i per tant, que l'efecte de la mutació fos menys apreciable que en altres sistemes, fet que caldria òbviament testar (per exemple, amb la línia cel·lular humana MDA-MB 231 de mama, que és descrit té nivells elevats de senyalització per NF-κB).

Inesperadament però, la *Regió Mínima Promotora* amb la mutació de *DL3* responia de forma similar a la del control sense la caixa mutada a l'estímul per *p65* i per *Rel-VP16*. Aquest resultat es va repetir en diversos assaigs. Quin és doncs el problema? (i) Cap la possibilitat que la mutació no sigui suficient o idònia i per tant, la diana sigui encara funcional. L'elecció de la substitució *G→A* fou relativament aleatòria, consultada en alguns treballs experimentals d'altres autors en què els funcionava. (ii) Fora possible que l'efecte de *p65* sobre el promotor d'*Snail* no depengués de les tres caixes putatives que hi hem identificat, sinó d'altres seqüències o bé que sigui un efecte secundari. (iii) Finalment,

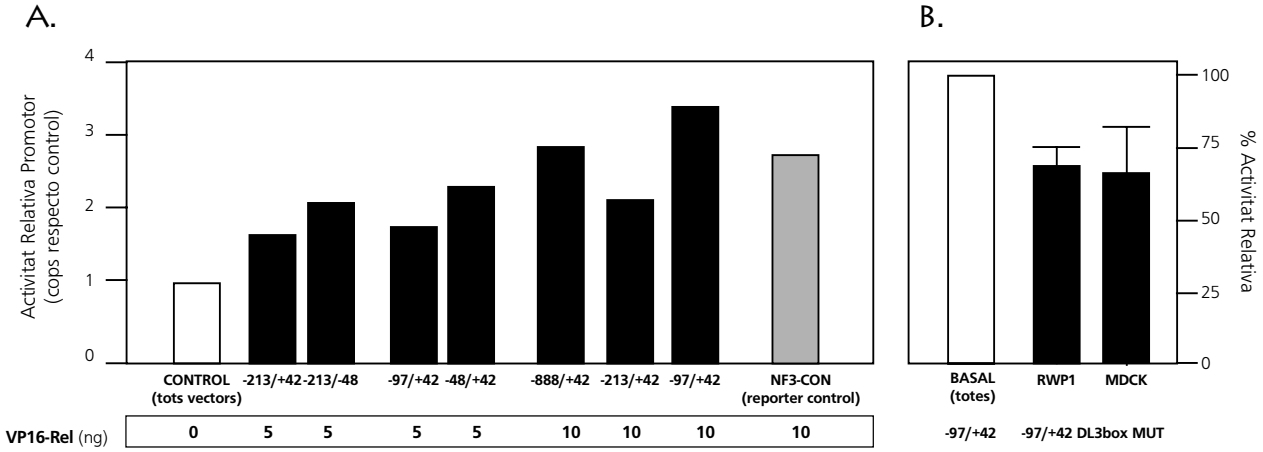


FIG RS-11 : CARACTERITZACIÓ DELS ELEMENTS DE RESPOSTA I DE L'EFECTE TRANSCRIPCIONAL DELS FACTORS DE LA FAMILIA REL/NFκB SOBRE EL PROMOTOR D'SNAIL

(A)Activació de diverses truncacions 5' del promotor d'Snail en resposta a l'expressió de la proteïna de fusió VP16-Rel, que compren el domini d'interacció amb l'ADN del factor NFκB-p65 (domini d'homologia Rel), i el domini de transactivació VP16. L'activació transcripcional ocorre per elements localitzats en diverses regions del promotor, d'acord amb la resposta transcripcional de les diverses deleccions, i és dosi depenent. Els resultats mostrats són els d'un experiment representatiu dels 3 realitzats.El constructe reporter NF3-CON, amb 3 caixes de resposta a NFκB, és utilitzat com a control de resposta transcripcional (cèl·lules RWP1). (B) Efecte de la mutació selectiva de la caixa DL3 putativa per a NFκB en la Regió Promotora Mínima (-97/+42). El consens 5'GGGAGTTGGC3' fou eliminat en substituir els nucleòtids assenyalats per Adenines. L'avaluació de l'activitat es va realitzar transfectant 250ng del constructe reporter en cèl·lules RWP1 i MDCK, de les que tanmateix se'n desconeix els nivells basals de senyalització per NFκB , i avaluant la seva expressió a les 48H. Les dades corresponen a la mitjana de 2 experiments realitzats per triplicat.

cabia la possibilitat que la resposta del constructe reporter a *p65* sigui deguda a una caixa consens per *NF-κB* que hi ha present en el vector *pGL3-basic* utilitzat per a generar els constructes. De fet, el mateix vector té en la seva seqüència una *Ebox* consens per *Snail* que en les nostres mans és mínimament funcional [NP44]. Aquesta última hipòtesi és descartable en els nostres assaigs, ja que el vector *PGL3* sol responia escasament a la presència de *p65*.

L'efecte d' *NF-κB* sobre el promotor d'*Snail* podria mediar els canvis observats en resposta al tractament amb èsters de forbol (*TPA*) o a l'activació de la quinasa *ILK*. En ambdós casos *NF-κB* s'ha demostrat que pot trobar-se en la via de transducció de senyals originada per ambdós estímuls.

Modulació de l'activitat del promotor d'Snail segons el grau de confluència de la monocapa epitelial

En les cèl·lules HT29-M6 és possible detectar nivells basals de l'ARNm d'*Snail* per RT-PCR (vegeu ***Figs Rs-12 i 13***). Tot i que en un article recent (*Locascio AM et al, J Biol Chem 2002*) s'ha confirmat que l'expressió basal del retrogen humà d'*Snail* (*SNAI1L*) situat al cromosoma 2, podria ser la causa d'aquesta observació i no pas l'*Snail* endogen, aquesta dada ens va fer valorar aleshores l'origen de l'expressió basal evidenciada per RT-PCR. Una hipòtesi de treball fou que els nivells "residuals" que detectàvem responien a l'expressió transitòria d'*Snail* per les cèl·lules M6 que es trobaven a la periferia de les colònies en la placa de cultiu. Alguns autors havien suggerit que les cèl·lules epitelials tumorals migraven en alguns casos en cohorts en el front d'invasió dels tumors, i que únicament les cèl·lules del front d'avanç

[44] Batlle E, Sancho E, Baulida J. De fet, en els assaigs fets amb *Snail* sobre el promotor d'*E-cadherina* i publicats a *Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000;* i *Guaita S et al, J Biol Chem 2002,* s'utilitzen constructes elaborats amb un vector *pGL3* sobre el què s'ha fet mutagènesi dirigida de la *Ebox*, car es va poder observar que una part minsa de la repressió exercida per *Snail* sobre els constructes reporter era deguda a aquesta caixa.

d'aquestes cohorts serien les que experimentarien canvis com la pèrdua d'adhesivitat (*Nabeshima K et al, Histol Histopathol 1999*). D'acord amb això, vàrem hipotetitzar que les cèl·lules de la perifèria de les colònies podrien l'origen de l'expressió residual d'*Snail* en les HT-29 M6.

La primera aproximació fou avaluar els nivells d'expressió d'*Snail* d'acord amb el grau de confluència de la monocapa. Com mostra la ***Fig Rs-12A***, l'increment en el nivell de confluència provoca una davallada en l'activitat del promotor d'*Snail* força destacable, de més del 50%. Aquesta davallada només ocorre si el promotor inclou "l'*Element d'Exclusió Epitelial*" (regió *-888/-97)* en la seva major part, car el fragment *-144/+42,* encara força actiu, sembla no respondre pas a l'estímul de la confluència[NP45]. En conseqüència, és possible que part de l'efecte "repressor" que té l'*Element d'Exclusió Epitelial* respongui a estímuls provinents de l'estat de confluència cel·lular, que implica l'estabilització de les unions adherents, la polarització de les cèl·lules i l'activació del procés de diferenciació definitiu de les cèl·lules epitelials. De fet, *Snail* exerceix un efecte biològic contrari a aquests. No obstant, un cop establerta la confluència la diferència en els nivells d'*Snail* per RT-PCR és escasa al llarg dels dies posteriors a l'inici d'aquesta (***Fig Rs-12B***). Desconeixem què ocorre amb els nivells d'expressió de la proteïna en aquestes condicions.

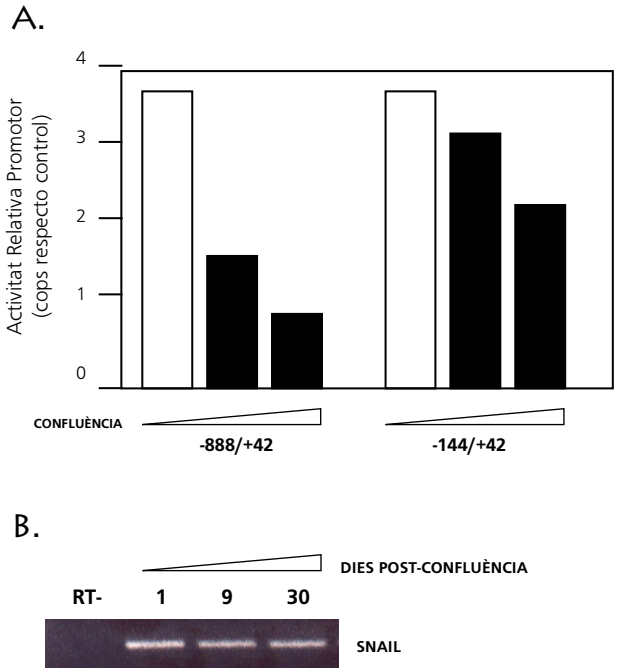


FIG RS-12 : MODULACIÓ DE L'ACTIVITAT DEL PROMOTOR D'SNAIL EN CÈL·LULES EPITELIALS DEPENENT DEL GRAU DE COHESIÓ-CONFLUÈNCIA I ROL TRANSCRIPCIONAL DE L'ELEMENT D'EXCLUSIÓ EPITELIAL
(A) Assaig reporter en cèl·lules HT29-M6 transfectades transitòriament amb 400 ng del promotor clonat sencer (-888/+42) o la truncació 5' que elimina en la seva totalitat l'element d'exclusió epitelial, que ocupa la regió –888/-144. Les cèl·lules havien estat sembrades el dia anterior a la transfecció en quantitats creixents (50-150-250x10^5 per 2cm^2) per assolir diversos graus de confluència, representats aquí amb un triangle creixent. La davallada transcripcional ocorre només amb el promotor sencer. (experiment únic, 3 rèpliques per punt). (B) RT-PCR per l'expressió d'Snail sobre 250ng d'ARNm total extret de cèl·lules HT29-M6, a diversos dies post-confluència (41 cicles, possiblement saturat en part). Les diferències són poc evidents.
(ARNs proporcionats per Clara Mayo i Xavier Mayol).

[45] Aquests experiments són en part fets per en Josep Baulida.

CONTROL DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL D'*SNAIL* PER MECANISMES POST-TRADUCCIONALS

L'homòleg d'Snail en mamífers ha perdut el primer dit de Zenc present en la resta de membres de la família gènica. En el seu lloc, i amb un molt elevat grau de conservació de la seqüència entre tots els homòlegs mamífers, ha adquirit una regió rica en Leucines que funciona com a seqüència d'export nuclear (NES) de forma molt eficient, per un mecanisme depenent del transportador específic CRM1(exportina). Snail pot ésser exportat fora del nucli, fenomen que en algunes línies cel·lulars epitelials és força predominant.

L'activitat del mecanisme d'export es modula de forma autònoma en cada cèl·lula per canvis conformacionals de la proteïna. El control d'aquest procés és mediat per l'estat de fosforilació d'un domini Ric en Serines, situat en el centre de la molècula i precedint la NES. Això condiciona la interacció entre les dues meitats N (regió 121-151) i C terminals (on l'últim dit de zenc té un rol determinant) d'Snail, determina el plegament de la proteïna i, per tant, l'emmascarament o no de la NES. Les formes fosforilades d'Snail són predominantment citosòliques, en contraposició a les no-fosforilades, i prenen una conformació desplegada.

L'exclusió nuclear d'Snail fa que no pugui actuar com repressor transcripcional dels seus gens diana. Aquesta dada podria explicar perquè en algunes línies epitelials coexisteixen els ARNm d'Snail i E-cadherina en una mateixa cèl·lula, quan hom esperaria una estricta correlació inversa donada la capacitat que té Snail de reprimir l'expressió d'E-cadherina en diversos sistemes. Així, tot i ésser actiu el seu promotor, un mecanisme de control no transcripcional en pot modular la seva localització, i de forma indirecta, l'activitat.

Evidències sobre un mecanisme no transcripcional de regulació d'Snail?

En alguns tipus cel·lulars epitelials, la presència de l'ARNm d'*Snail* en quantitats variables no es correlaciona amb la davallada dels nivells de l'ARNm d'E-cadherina, com fora esperat d'acord amb l'efecte transcripcional d'un sobre l'altre (*Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000*). Aquest fet inusual suggereix que en alguns casos, la coexistència d'ambdós ARNms (*Hajra KM et al, Cancer Res. 2002*, i vegeu ***Fig Rs-13***) es deguda a la incapacitat d'*Snail* de regular-hi a la baixa els nivells d'E-cadherina[NP46].

Assumint que *Snail* és present en aquestes cèl·lules, la pèrdua de la correlació esperada podria ser deguda a algun tipus de mecanisme no transcripcional que n'impedís l'efecte. Hi ha clares evidències que en els diferents traçats de transducció de senyals els mecanismes de regulació post-transcripcional hi juguen rols essencials (*Teruel MN i Meyer T, Cell 2000; Whiteside ST i Goodbourn S, J Cell Sci 1993*). Un exemple és el de *Beta-catenina* (vegeu *Introducció*), o el d' *NF-κB* (vegeu capítol anterior): més que controlar els nivells de transcripció, el sistema s'encarrega de controlar la localització o els factors amb qui interaccionen, i això modela de forma precisa i ràpida els efectes transcripcionals d'un o altre factor. En el cas dels factors de transcripció, el temps que aquests

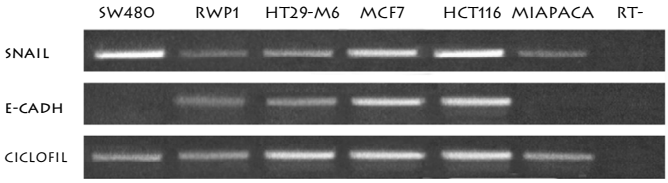


FIG RS-13 : EXPRESSIÓ D'SNAIL I E-CADHERINA EN DIVERSES LÍNIES EPITELIALS EN CULTIU

RT-PCR sobre 400 ng d'ARN total extret de diverses línies epitelials tumorals, per Snail, E-cadherina i Ciclofilina com a normalització i control de càrrega. Les cèl·lules es trobaven a un 60-70% de confluència en el moment de la lisi. La relació entre els nivells d'Snail i els d'E-cadherina és esbiaixada, ja que el nombre de cicles d'amplificació no fou el mateix (Snail, 38 cicles; E-cadherina i Ciclofilina, 32). En conseqüència, els nivells d'Snail, tot i que presents, són inferiors als mostrats. Tanmateix, en algunes de les línies epitelials testades, els ARNm d'E-cadherina i Snail coexisteixen, fet inesperat donada la previsible relació inversa a nivell transcripcional. SW480 i MIAPaCa són línies amb baixos o escassos nivells d'E-cadherina. Els nivells basals d'Snail en RWP1 i HT29-M6 són possiblement escassos, i de fet, en RT-PCRs prèvies amb menys cicles (35), els nivells d'Snail eren despreciables (vegeu *Guaita S et al, J Biol Chem 2002*). En les MCF7 o HCT116, o CaCo2 (no mostrades aqui), la coexistència és evident.

[46] Una explicació possible i no descartable amb els nostres experiments és que dins la mateixa població cel·lular puguin trobar-se subpoblacions amb només *E-cadherina* o només *Snail*, fet que en un lisat seria interpretable com a co-expressió. Per a moltes de les línies presents a la ***Fig Rs-13***, aquesta possibilitat és gairebé descartable ja que al microscopi, no hi ha colònies amb aspectes dispars com hom esperaria pels fenotips associats a l'expressió d'ambdues proteïnes.

romanen actius al nucli sembla crític per a regular el seu efecte transcripcional (*Hogan PG i Rao A, Nature 1999*), i per tant el control de la seva localització és d'importància cabdal -així ocorre en el cas d' *NF-κB* i homòlegs.

Snail és dins i fora del nucli en fibroblasts i cèl·lules epitelials tumorals en cultiu

Com és predit per tot factor de transcripció, els nivells basals d'*Snail* en qualsevol tipus cel·lular són força baixos, de forma que la detecció de la proteïna endògena sempre aporta dificultats. Tanmateix, no existeixen anticossos comercials realment fiables que en permetin la detecció, i en les nostres mans només un anticós policlonal de conill sintetitzat al nostre laboratori[NP47] dóna resultats relativament valorables.

Per tal de visualitzar la localització subcel·lular correcta d'*Snail* en les cèl·lules en cultiu, i donada la dificultat de la detecció de la proteïna endògena, l' ADNc de l'*Snail* de ratolí fou fusionat a l'extrem COOH de la proteïna fluorescent *eGFP*. D'acord amb diverses referències, aquesta fusió no interfereix en la localització ni funcionalitat de les proteïnes problema i permet visualitzar la proteïna "in vivo" [NP48].

En les diverses línies cel·lulars estudiades, la proteïna de fusió *eGFP-mSnail* presentava una rica localització subcel·lular i confirmava que no només quedava restringida al nucli (***Fig Rs-14***). Aquest resultat fou confirmat avaluant la localització de l'*mmSnail* exogen en les mateixes línies cel·lulars, ara mitjançant la immunodetecció amb l'anticós policlonal (***Fig Rs-14***). D'acord amb aquesta observació, la distribució d' *eGFP-mmSnail* és probablement equivalent a localització subcel·lular d'*Snail.*

Per tant, malgrat que *Snail* és un factor de transcripció, la seva localització no és només nuclear, sinó que també i en totes les línies cel·lulars avaluades, és també citosòlica. Això contrasta clarament amb el què ocorre amb d'altres factors de transcripció com *Tcf-4* (del tipus HMG-box) o *ZEB-1* (que disposa de dits de zenc i un homeodomini) o encara més, amb *Slug*, l'altre membre de la família *Snail* a vertebrats (vegeu més endavant, ***Fig Rs-15***).

La distribució subcel·lular d'*Snail* és variable depenent de la línia cel·lular estudiada, i alhora ho és entre les cèl·lules del mateix grup cel·lular. És possible doncs apreciar patrons diversos, que van des de la localització eminentment nuclear, en forma difusa o en petits cossos nuclears puntiformes; fins a la distribució eminentment citosòlica, que coincideix amb l'absència d'*Snail* al nucli. En la majoria de cèl·lules epitelials avaluades predomina un patró mixt, amb co-distribució d'*Snail* al nucli i al citosol. En cèl·lules mesenquimals com els fibroblasts de ratolí NIH-3T3, predomina la localització nuclear. Dins la mateixa població cel·lular, la distribució és variable. Dues cèl·lules veïnes no presenten necessàriament patrons similars (vegeu ***Fig Rs-14***). Aquest fet ens va fer pensar que possiblement la localització subcel·lular d'*Snail* fos *regulable* per algun mecanisme. Aquest mateix mecanisme podria justificar perquè en alguns tipus cel·lulars com les cèl·lules d'adenocarcinoma mamari humà, *MCF-7*, la distribució d'*Snail* és

[47] En la generació de l'anticós policlonal de conill *G1S* (vegeu *Materials i Mètodes*) han intervingut na Clara Francí, Marta Garrido, Carme Torns, Judit Grueso, Sandra Guaita i Mercè Monfar.

[48] L'ús de la *GFP* (*green fluorescent protein*) i les seves variants s'ha anat extenent cada cop més. La seva utilitat no només es restringeix a l'estudi de la dinàmica intracel·lular de les proteïnes on és fusionada, sinó que permet també avaluar interaccions entre proteïnes, ser usada com a reporter en l'estudi de promotors o en l'estudi de diversos processos que tenen lloc en desenvolupament. De fet, ha suposat una petita "revolució" en la biologia cel·lular i molecular. (*Prasher DC, Trends Genet 1995; Misteli T i Spector DL, Nat Biotechnol 1997; van Roessel P i Brand AH, Nat Cell Biol 2002*). *eGFP* és una variant millorada de *GFP*, que emet major luminiscència i és més estable.

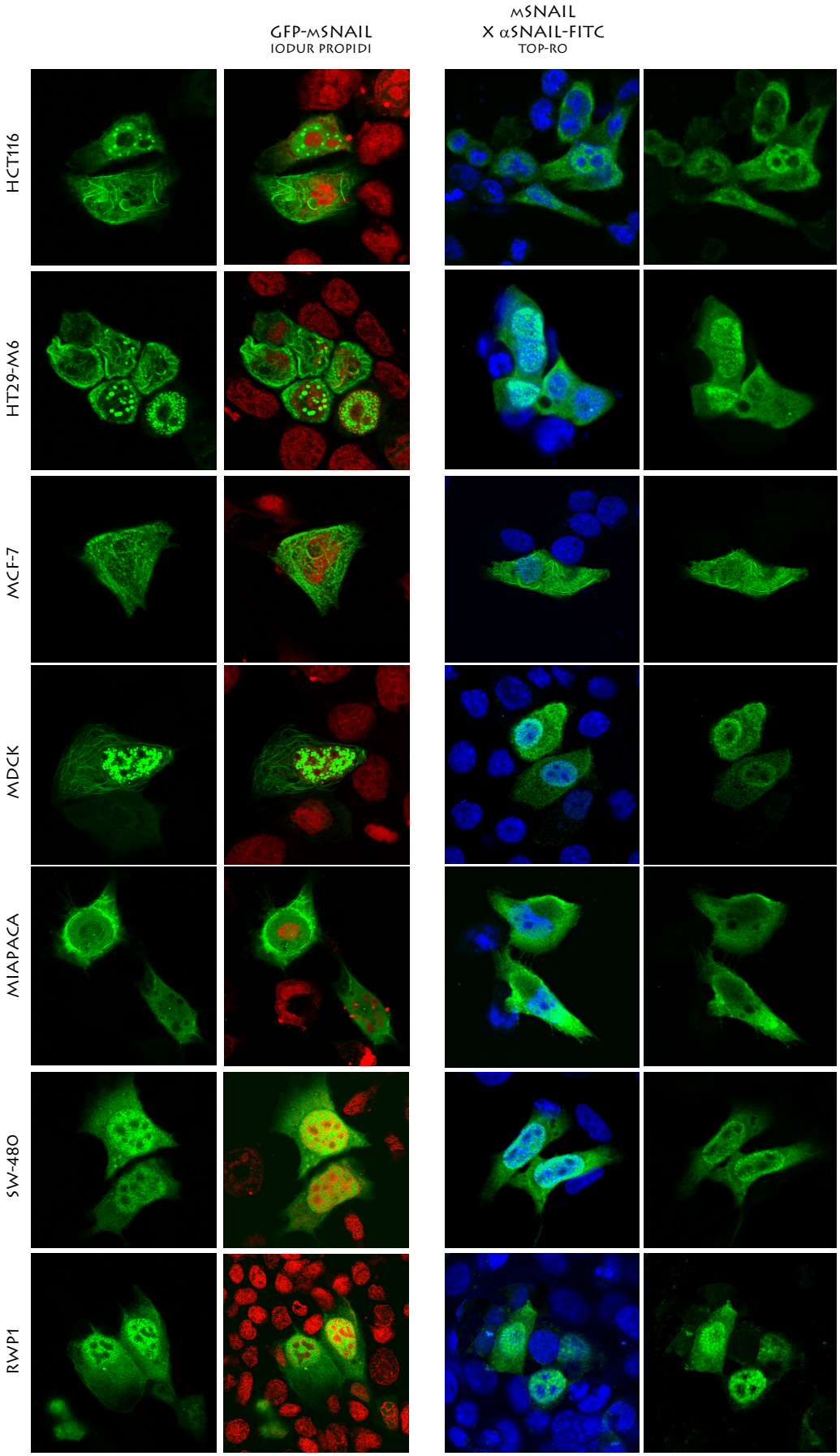


FIGURA RS-14 : DISTRIBUCIÓ SUBCEL·LULAR DE LA FUSIÓ EGFP-MSNAIL I MSNAIL-HA EN DIVERSES LÍNIES CEL·LULARS EPITELIALS

Transfeccions transitòries, i expressió durant 16H abans de la fixació amb PFA (paraformaldèhid) al 4%. Els nuclis són contratenyits amb Iodur de Propidi (vermell) o l'agent TOP-Ro (blau).

Observeu la presència de senyal citosòlic en totes les línies avaluades, i l'existència de diversos patrons de localització en les cèl·lules d'una mateixa població. La distribució dels dos constructes és similar en cada cas, fet que recolza l'especificitat en la distribució.

quasi exclusivament citosòlica.

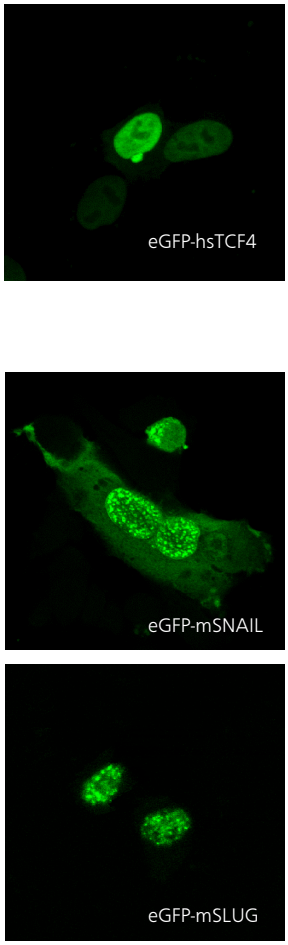
"A priori", un factor de transcripció que no pot quedar-se al nucli és improbable que pugui exercir el seu efecte transcripcional (*Hogan PG i Rao A, Nature 1999; 398: 200-1*). Aquesta hipòtesi ens podria explicar perquè en alguns tipus cel·lulars com les MCF-7 o les Caco-2 els nivells d'ARNm d'E-cadherina i *Snail* no mantenen la correlació inversa que fóra esperada (*com és mostrat a la Fig Rs-13*): malgrat que hi hagi *Snail*, E-cadherina no és regulada a la baixa ja que fora del nucli, *Snail* podria no ser transcripcionalment actiu.

Snail entra i surt del nucli per un mecanisme d'export nuclear

La localització subcel·lular d'Snail depèn de dominis proteics concrets

D'ésser regulable, la localització subcel·lular d'*Snail* hauria de dependre d'alguna regió de la molècula. Alhora, tot i les diferències de distribució entre les diverses línies cel·lulars avaluades, el mecanisme de regulació hauria d'ésser general, car té lloc en totes les cèl·lules. Finalment, hom esperaria que el domini responsable fos alguna zona relativament conservada, ja que el fenomen té lloc en cèl·lules humanes, de ratolí i de rata pel què hem pogut observar.

Snail és una proteïna relativament conservada al llarg de l'evolució (*Manzanares M et al, Trends Genet 2001*). En termes estructurals i filogenètics, la proteïna *Snail* consta de dues regions diferents (***Box 2***): un extrem C-terminal, que inclou essencialment un tàndem de 4 (en mamífers essencialment) o 5 dits de zenc (en aus, vertebrats com *Xenopus* i la resta d'espècies); i una meitat N-terminal, de la què la regió més conservada és l'extrem més amino-terminal, on es troba una seqüència de 7 aminoàcids que constitueix l'anomenat domini "*SNAG*" (*Grimes HL et al, Mol Cell Biol 1996*; *Nieto MA, Nat Rev Moll Cell Biol 2002*). Aquest domini *SNAG* sembla necessari per a l'activitat repressora d'*Snail* [NP49]. La



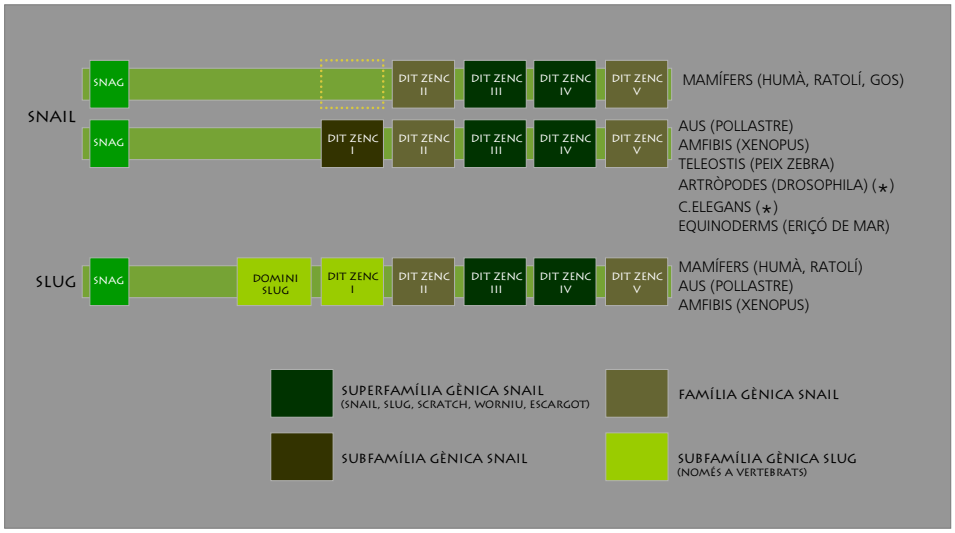
	NUC	CIT	MIX
RWP1	12%	20%	68%
MDCK	12%	8%	70%
MCF7	0%	85%	15%
NIH-3T3	70%	10%	15%
RWP1	92%	0%	8%*
NIH-3T3	100%	0%	0%

FIG RS-15 : EXCLUSIVITAT DE LA LOCALITZACIÓ CITOSÒLICA D'SNAIL EN EL GRUP DE FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ I ENTRE ELS MEMBRES DE LA SEVA FAMÍLIA PROTÈÏCA

Distribució subcel·lular de les proteïnes de fusió entre eGFP i els factors de transcripció hsTCF4 (HMGbox), mSnail i mSlug (Dits de Zenc). La distribució citosòlica és exclusiva d'mSnail, i és present en major o menor grau en totes les línies cel·lulars testades. La distribució subnuclear d'Slug és similar a la d'mSnail (vegeu més endavant, *Fig Rs-29*), però no és possible detectar Slug en localització citosòlica, excepte en cèl·lules on els nivells d'expressió són extremadament alts (*).

Els tants percent dels patrons de distribució són referents als extrets del comptatge d'entre 80 i 120 cèl·lules en cada línia. Confocal, 63X i zoom.

[49] El domini *SNAG* (MPRSFLVKK) es troba conservat únicament en els homòlegs vertebrats. No hi ha un domini similar en *Drosophila*, per exemple. El nom d'*SNAG* prové del fet que aquesta petita seqüència és present també en un altre tipus de factors de transcripció repressors, els *Gfi-1* (SNAG, *Snail*/Gfi-1) que també tenen dits de zenc, i d'altres factors coneguts com l'homeobox *Gsh-1* (*Grimes HL et al, Mol Cell Biol 1996*). S'ha demostrat que aquest domini sembla per sí sol capaç de fer



BOX-2 : ESTRUCTURA EN DOMINIS DE LA SUPERFAMÍLIA GÈNICA SNAIL, I DEFINICIÓ COMPARATIVA DE LES DIVERSES FAMÍLIES GÈNIQUES

La definició de la superfamília gènica *Snail* i dels membres que la integren va ésser feta bàsicament d'acord amb la homologia en la regió de Dits de Zenc, que són característics. Permeten separar la família gènica Snail (que inclou les subfamílies *Snail* i *Slug*) de l'altra família gènica compresa dins la superfamília, que compren *Scratch* i els seus homòlegs.
El primer Dit de Zenc s'ha perdut en mamífers (vegeu més endavant en la Discussió). La subfamília *Slug*, només present en els vertebrats, té un primer dit de Zenc característic, i una regió situada a la meitat N-terminal, que s'ha donat en anomenar "Domini Slug", altament conservada entre tots els seus homòlegs i que és una altra dada estructural definitòria d'aquest grup de gens.
El domini *SNAG* s'ha perdut a Drosophila, el nemàtode Caenorhabditis elegans i els ascidis (*). De fet, els membres de la família *Snail* corresponents a aquestes espècies són filogenèticament força allunyades de la resta.
Per tant, dins la superfamília gènica *Snail*, hi ha dues famílies ben definides, *Snail* i *Scratch*, amb característiques estructurals suficients per a diferenciar-les. Ambdues comparteixen però la seqüència del tercer i quart dits de zenc, i el domini *SNAG*. Dins la família gènica *Snail*, que es caracteritza per un segon i cinquè dits de zenc particulars, diferents dels d'Scratch, s'hi defineixen encara dues subfamílies en base a la seqüència d'algunes regions de la meitat N-terminal i la seqüència del primer dit de Zenc: les subfamílies *Snail* i *Slug*. Característicament, els factors de la subfamília *Slug* són una adquisició dels vertebrats, com ho és la cresta neural migratòria.

conservació dels dits de zenc és força elevada entre els diferents homòlegs (entre un 50 i un 70% respecte *Drosophila*), amb el què es considera que és el tret més característic i de fet definitori, de tots els membres de la família *Snail* (*Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002; Manzanares M et al, Trends Genet 2001; Hemavathy K et al, Gene 2000*). La porció N-terminal és la més variable, i entre els homòlegs la seva seqüència és en conjunt poc conservada, i molt menys amb els altres membres de la família com *Slug*. No obstant dins d'aquesta regió hi ha zones conservades per a *Slug* no existents en *Snail*, i en conseqüència, aquesta meitat N-terminal és la què permet diferenciar entre ells els diferents membres de la família i alhora els homòlegs d'*Snail* entre ells (per similituds, *artròpodes, equinoderms, vertebrats no mamífers, mamífers, vegeu* ***Box-2***). Al llarg de l'escala filogenètica, els diferents homòlegs d'*Snail* presenten una meitat N-terminal més curta, i tanmateix adquireixen "progressivament" el domini *SNAG (Nieto MA,Nat Rev Mol Cell Biol 2002)* . Donat que els dits de zenc són molt conservats, les diferències funcionals entre els diversos homòlegs deuen raure en les característiques estructurals i funcionals d'aquesta meitat N-terminal (*Hemavathy et al, Gene 2000*).
Donades aquestes diferències, vàrem optar per dividir *mSnail* en les dues meitats N-terminal, C-terminal, i les vàrem fusionar a *eGFP*. Com mostra la ***Fig Rs-16***, ambdues meitats tenen localitzacions alternatives. La meitat C-terminal és exclusivament nuclear; i la meitat N-terminal,

davallar l'activitat transcripcional dels promotors diana d'aquests repressors transcripcionals, possiblement amb llarg abast.

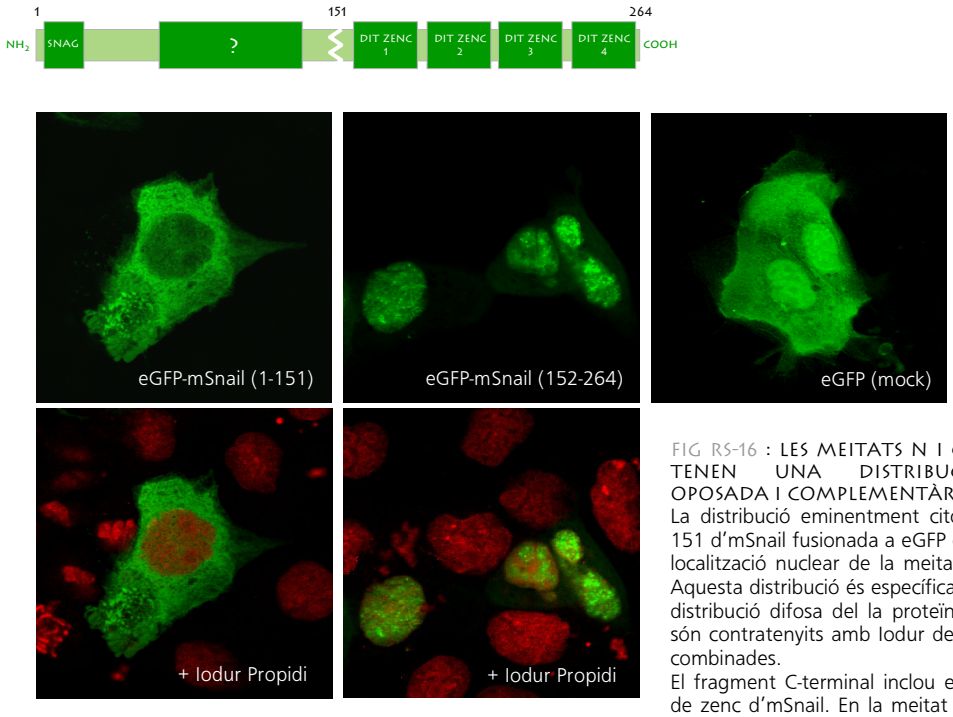


FIG RS-16 : LES MEITATS N I C TERMINAL D'SNAIL TENEN UNA DISTRIBUCIÓ SUBCEL·LULAR OPOSADA I COMPLEMENTÀRIA.
La distribució eminentment citosòlica de la meitat 1-151 d'mSnail fusionada a eGFP contrasta amb l'estricta localització nuclear de la meitat C-terminal (152-264). Aquesta distribució és específica, si tenim en compte la distribució difosa del la proteïna eGFP sola. Els nuclis són contratenyits amb Iodur de Propidi en les imatges combinades.
El fragment C-terminal inclou essencialment els 4 dits de zenc d'mSnail. En la meitat N-terminal, l'estructura de dominis era gairebé desconeguda. Cèl·lules MDCK. Confocal 63X i zoom 2X.

exclusivament citosòlica. Donat que *eGFP* té un patró de distribució homogènia arreu de la cèl·lula (vegeu ***Fig Rs-16***), la distribució alternativa de les meitats d'*Snail* fusionades a aquesta proteïna, diferents a les de l'*eGFP* sola, indica que en ambdós fragments hi ha elements essencials per a determinar la seva localització subcel·lular.

La localització estrictament nuclear de la meitat C-terminal (essencialment els 4 dits de Zenc d'*mSnail*) permet predir que, o bé existeix algun tipus de domini que estrictament fixa aquesta porció al nucli (és suficient l'unió a l'ADN per a fer-ho?), independentment de com hi entri, i/o bé que dins d'aquest fragment hi ha algun tipus de *senyal de localització nuclear* (*NLS*) que en permet l'entrada. Tot i que en la seqüència no hi ha cadenes amino-acídiques bàsiques que hi permetin la identificació inequívoca d'una *NLS* canònica, no és descartable que algun altre tipus de seqüència pugui realitzar una funció similar[NP50]. En el cas d'un altre membre de la superfamília *Snail* (*Scratch*) en vertebrats, s'ha observat una distribució similar de la meitat C-terminal (*Nakakura EK et al, Proc Natl Acad Sci 2001*) i hom suggereix que en aquesta regió, parcialment conservada amb la d'*Snail*, hi pot haver una *NLS*. La localització citosòlica d'*Snail* doncs, recau en la porció N-terminal de la proteïna. L'exclusió de la seva distribució nuclear en comparació amb el què és descrit per *Scratch* (*Nakakura et al, Proc Natl Acad Sci 2001*) suggereix que, o bé és retinguda al citosol per existir interaccions específiques amb altres proteïnes o estructures; o bé és exportada en la seva totalitat fora del nucli. Donat que de totes

[50] Cada cop hi ha més evidències que el consens usual de Lisines i/o Arginines esperable per a una *NLS* bàsica no és l'únic que pot ésser reconegut per importines nuclears específiques, i que l'espectre de les *NLS* és molt més ampli del què es coneixia.

les possibilitats, aquesta última era la més fàcilment descartable experimentalment, fou la primera en ser explorada.

Carmo-Fonseca M, FEBS Letters 2001).

El constructe *mSnail-eGFP* és essencialment nuclear en cèl·lules humanes *HeLa* i en la majoria

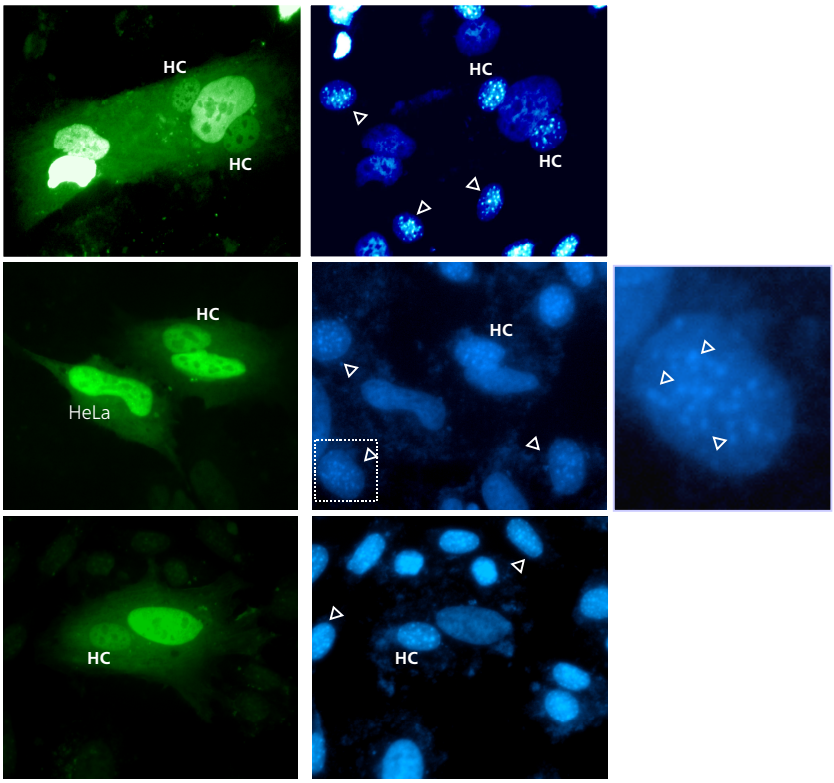


FIG RS-17 : L'ASSAIG DE FUSIÓ CEL·LULAR I FORMACIÓ D'HETEROCARIONS SUGGEREIX L'EXISTÈNCIA DE FENÒMENS D'EXPORT NUCLEAR
La fusió de cèl·lules humanes HeLa amb fibroblasts NIH-3T3 permet avaluar "in vivo" l'existència de mecanismes d'export nuclear actius que justifiquin la localització citosòlica d'una proteïna problema. La fusió mSnail-eGFP, eminentment nuclear (a diferència de la fusió eGFP-mSnail, fet que és justificat per el possible plegament d'Snail, vegeu en la Discussió), fou transfectada i expressada de forma transitòria en cèl·lules HeLa. La localització d'mSnail al nucli de les cèl·lules NIH-3T3, no prèviament transfectades, després de la fusió, va permetre confirmar l'existència d'una mecanisme d'export actiu. Els NIH-3T3 tenen una distribució puntejada i peculiar de la cromatina, que és distingible de la d'altres cèl·lules amb la tinció amb Hoescht 33258. Aquest fet és indicat en l'ampliació mostrada en la filera central. Microscopia òptica de fluorescència, 40X.

La localització citosòlica d'Snail depèn d'un mecanisme actiu d'export nuclear

Una aproximació experimental habitual per a verificar si una proteïna viatja de nucli a citosol és l'anomenat "*Assaig de Transport en Heterocarions*" (vegeu *Materials i Mètodes*). En aquest assaig es fusionen cèl·lules de dues espècies diferents, fet que permet diferenciar els nuclis dins les cèl·lules resultants de la fusió. Les cèl·lules donadores presenten de forma usual la proteïna en els seus nuclis. Les receptores, no. La presència de la proteïna problema dins els nuclis de les cèl·lules receptores suggereix que aquesta pot ésser exportada[NP51] (*Gama-Carvalho M i*

de cèl·lules avaluades, de forma diferent al què ocorre amb el constructe *eGFP-mSnail*. Aquesta diferència serà justificada en paràgrafs successius, però en essència depèn de l'extrem C-terminal d'*Snail* (vegeu més endavant). De qualsevol manera, aquestes cèl·lules foren les escollides per a realitzar un assaig d'heterocarions amb fibroblasts *NIH-3T3* usant *mSnail-eGFP*. Com mostra la ***Fig Rs-17***, *mSnail* és activament exportat del nucli de les cèl·lules *HeLa*. 16 de 18 heterocarions localitzats presentaven evidències del pas d'*Snail* al nucli dels fibroblasts. En conseqüència, un mecanisme actiu d'export és responsable de la sortida d'*Snail* al citosol des del

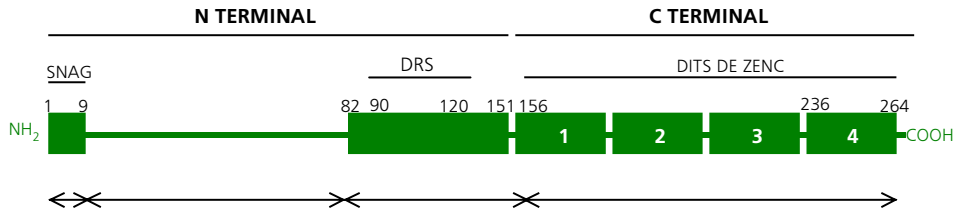
[51] La proteïna problema pot ésser detectada per mètodes immunocitoquímics, o bé pot correspondre a una proteïna marcada, per exemple amb *GFP*. Cal confirmar que en les cèl·lules donadores és essencialment nuclear, i cal tanmateix fer d'altres experiments per a verificar si la sortida del nucli és depenent de transportadors específics o ocorre per difusió.

nucli, justifica la localització exclusivament citosòlica de la meitat N-terminal de la proteïna.

Alguna regió conservada en la meitat N-terminal és responsable de la localització citosòlica

La regió N-terminal d'*Snail* és poc conservada entre els diferents homòlegs, i donat que el mecanisme d'exclusió nuclear d'*Snail* és força consistent, vàrem creure plausible que el domini d'export nuclear d'*Snail* es trobés en alguna de les poques regions conservades dins aquesta meitat. Com es mostra a la ***Fig Rs-18***, la conservació de regions en aquesta part de la proteïna és menor com més llunyans són els homòlegs. A part del domini *SNAG*, que sembla implicat en l'activitat de repressió transcripcional d'*Snail* i que es troba alternativament conservat en vertebrats i alguns invertebrats (*Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*), la regió més conservada dins aquesta meitat N-terminal és un *domini ric en serines* (i els residus adjacents), en un fragment que abasta els aminoàcids *82-151* de la seqüència proteica d'*Snail* en mamífers. En gairebé tots els homòlegs i d'altres membres de la família com *Slug* hi ha un domini ric en serines precedint el primer dit de zenc, si bé la conservació estricta de la seqüència aminoacídica és relativament variable (***Fig Rs-18***). No es coneix cap funció per a aquest domini, però la seva conservació és cridanera (*Hemavathy K et al, Gene 2000*). Aquesta conservació és en mamífers gairebé total (95%) i respecte la resta de vertebrats és força elevada. Per aquesta raó, i per les dades exposades abans, fou considerada candidata a mediar la localització citosòlica del fragment N-terminal.

La fusió del fragment *82-151* de *mSnail* a *eGFP* causa la localització citosòlica de *eGFP*, o la seva exclusió nuclear (***Fig Rs-19***). Donat que la proteïna de fusió resultant té un pes molecular que *a priori* permetria la seva difusió lliure per nucli i citosol, aquesta localització permet suggerir que és suficient per a mediar l'export nuclear d'*eGFP* i probablement d'*Snail*.



MAMÍFERS	99%	78%	**95%**	90%
VERTEBRATS	95%	40%	**60%**	90%
INVERTEBRATS	80%	20%	35%	80%
DROSOPHILA MELANOGASTER	30% *	?	?	78%

FIG RS-18 : LA CONSERVACIÓ DE SEQÜÈNCIA ENTRE ELS DIFERENTS HOMÒLEGS D'SNAIL ÉS DISCONTINUA
Percentatges de conservació de seqüència entre els diferents homòlegs d'Snail, en regions discretes. Els percentatges s'han calculat respectant els canvis de seqüència conservatius, basats en les dades extretes del resultat dels alineaments nucleòtid a nucleòtid (CLUSTALW) i diagonals (DIALIGN). Tots són referits a una seqüència tipus, en aquest cas la de l'homòleg a ratolí.
En conjunt, la zona N terminal és la menys conservada, però hi ha regions amb graus de conservació major a les circumdants (remarcades amb color morat, regió 82-151), a part del domini *SNAG*. Aquest últim és força preservat en tots els homòlegs excepte en *Drosophila* (*), on hi ha una regió (residus 41-49), coneguda com a domini d'unió al co-repressor *dCtBP*, que curiosament alinea amb millor similitud (45%) amb el domini *SNAG* de la resta d'homòlegs. (*DRS*, Domini Ric en Serines).
L'elevat grau de conservació en el domini C-terminal ocupat pels dits de zenc ha permés establir les característiques de la família protèica.

Una regió rica en leucines media l'export nuclear d'Snail per un sistema depenent de CRM-1

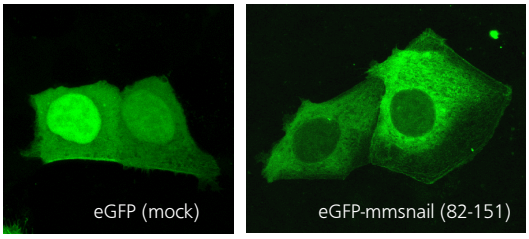
Un nombre cada cop major de factors de transcripció sembla ser subjecte a mecanismes de transport a una i altra banda del nucli. De tots els mecanismes coneguts, el sistema d'export nuclear depenent del transportador *CRM1/Exportina1* és el més universal i estudiat [NP52]. (*Fornerod M et al, Cell 1997; Fukuda M et al, Nature 1997; Ullman KS et al, Cell 1997*). En aquest sistema, la proteïna *CRM1*, mitjançant l'aport de *Ran-GTP*, és capaç d'unir-se específicament a seqüències amino-acídiques riques en leucines amb un consens característic (**L**$X_{(1-3)}$**L**$X_{(2-3)}$**L**X**L**) (on L són *Leu* o d'altres aminoàcids hidrofòbics com *Valina*, *Isoleucina* o ocasionalment *Metionina,* i *X* és qualsevol aminoàcid). Aquest tipus de seqüències hidrofòbiques són força específiques i s'han anomenat "*Seqüències d'Export Nuclear*" (*NES*). El consens és relativament plàstic, de forma que contínuament es coneixen noves NES que són lleugerament distants de la NES arquetípica identificada originalment a la proteïna Rev-1 de l'HIV (*Ullman KS et al, Cell 1997*). El sistema és depenent d'energia, però és molt eficient i media l'export específic de proteïnes, ja per tenir en la seva seqüència alguna *NES*, o bé per unir-se a proteïnes de "*càrrega*" que en tinguin -sembla que és el cas d'*APC* i *Beta-catenina (Bienz M, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*). L'export nuclear pel complex *CRM1-RanGTP-NES* es pot inhibir de forma específica per l'agent antifúngic *Leptomicina B (LMB)*. *LMB* és capaç d'unir-se covalentment a *CRM-1* i competir amb la *NES* en la formació d'un complex amb *CRM1-RanGTP*, i per tant inhibeix de forma selectiva l'export nuclear de proteïnes amb *NES*. L'efecte de *LMB* és exclusiu pel sistema, car sembla que l'única proteïna que interacciona amb aquesta molècula és *CRM1* (*Kudo N et al, PNAS 1999*).

La presència de *LMB* en el medi de cultiu bloqueja l'export nuclear d'*Snail*, de forma que la totalitat de la proteïna esdevé nuclear (***Fig Rs-19B***). El mateix ocorre, potser de forma més evident, amb la meitat N-terminal d'*Snail*, o amb el fragment *82-151*. L'efecte de *LMB* sobre la localització d´Snail és visible en tractaments molt curts (inferiors a 30 minuts), fet que indica que Snail entra de forma constitutiva al nucli, i que la distribució citosòlica prové d'un mecanisme export nuclear molt eficient depenent del transportador *CRM1*, i d'acord amb això, d'una *NES* putativa. El buidat citosòlic resultant del tractament amb LMB suggereix en primera instància que l´Snail distribuit en aquest compartiment deu recircular repetidament cap al nucli, sense poder descartar que aquest efecte sigui degut a la inestabilitat d´Snail al citosol (vegeu en capítols posteriors).

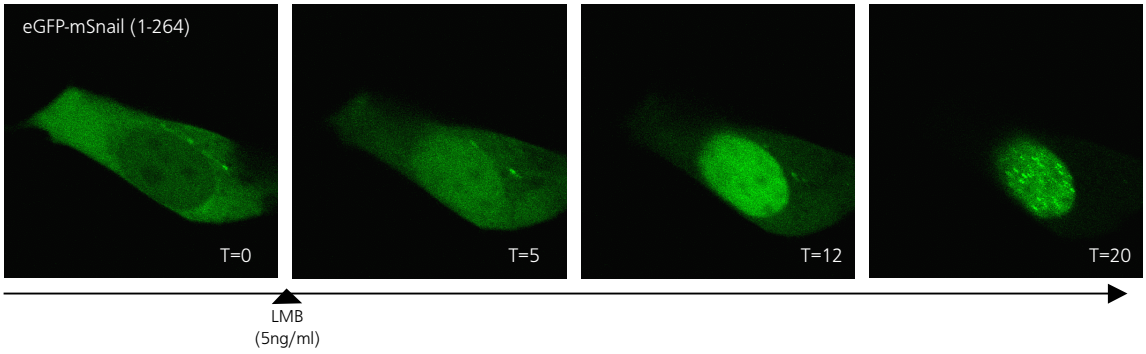
L'anàlisi de la seqüència aminoacídica del fragment *82-151* mostra que entre els residus *132* i *143* de la seqüència d'*mSnail* hi ha una regió rica en Leucines que encaixa amb el consens prèviament establert per a possibles *NES* (***Fig Rs-19C***). Aquest senyal d'export és estrictament conservat en els homòlegs de mamífer (humà, ratolí, gos, vaca i porc) coneguts, però és absent en la resta de vertebrats i en invertebrats. La funcionalitat d'aquesta *NES* i el seu rol en la localització subcel·lular d'*Snail* foren confirmats de dues formes: (i) Per una banda, la truncació parcial de la *NES* gràcies a l'existència d'una diana de restricció *BstXI* en la seqüència nucleotídica de l'*Snail* de ratolí, va permetre eliminar el fragment *138-151* de la meitat N-

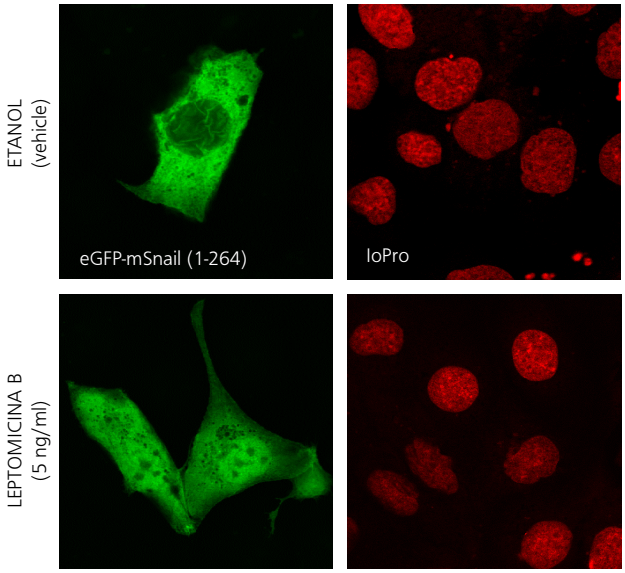
[52] *CRM1* fou identificada originalment en llevats com a element essencial en el manteniment de l'estructura dels cromosomes (*Chromosome Region Maintenance 1*). Alteracions en *CRM1* causaven tanmateix defectes en l'export nuclear en llevats (*Kudo N et al, Proc Natl Acad Sci 1999*)

A



B





C

```
SNAIL hs        132 LGQ_VPKQLAQLS 143
SNAIL mm        132 LGQ_LPKQLARLS 143
SNAIL cf        132 LGQ_LPTQLAGLS 143
SNAIL bt        132 LGQ_LPKQLTGLS 143
SNAIL ss        132 LGQ_LPKQLAGLS 143
Mek1/MAPKK       33 LQKKLEE_LE_LD  43
APC hs (NES1)    68 LLERLKE_LN_LD  78
APC mm (NES1)    67 LLERLKE_FN_L   77
HIV-Rev          75 LPP_LER_LT_LD  85

Consens            LX(1-3)LX(2-3)L X L
```

FIG RS-19 : PRESÈNCIA D'UNA SEQÜÈNCIA D'EXPORT NUCLEAR (NES), RICA EN LEUCINES, EN LA MEITAT N TERMINAL DE L'SNAIL DE MAMÍFERS (A)La fusió del fragment 82-151 d'mSnail, el més conservat en la meitat N terminal de tots els homòlegs, amb eGFP relocalitza aquesta última de forma exclusiva al citosol. Cèl·lules MDCK. Confocal, 63X. (B) *Panell superior*: El tractament amb Leptomicina B (LMB, 5 ng/ml) relocalitza ràpidament eGFP-mSnail (1-264) al nucli en una cèl·lula on presentava una localització essencialment citosòlica. Cèl·lules RWP1. Seguiment en temps real, i imatges captades al temps indicat (en minuts). Confocal, 63X i zoom 2.5. *Panell inferior*, l'efecte del tractament amb LMB és més patent en la relocalització de la meitat N-terminal d'Snail al nucli. Això confirma tanmateix que la senyal d'export nuclear sensible a LMB és present en aquesta meitat. Els nuclis són contratenyits amb Iodur Propidi. Confocal, 63X. (C) Alineament entre la regió rica en Leucines candidata a contenir la senyal d'export de l'Snail en mamífers (pos.132-143), i d'altres NES conegudes, així com amb el consens establert. Les dues leucines en blanc en la seqüència de ratolí són les referenciades a la *Fig Rs-20*. (*hs*, humà; *mm*, ratolí; *cf*, gos; *bt*, vaca; *ss*, porc). Les seqüències d'humà, ratolí i gos són accessibles al GenBank de l'NCBI, malgrat la de gos és incompleta. Les seqüències de vaca i porc són extretes dels alineaments realitzats amb el programa BLAST contra una base de dades de ESTs de l'NCBI, agafant la seqüència sencera de l'Snail de ratolí. La corresponent a vaca (*bt*) és accessible amb el número gi 16350892; la corresponent a porc (*ss*), amb el número gi 13307391.

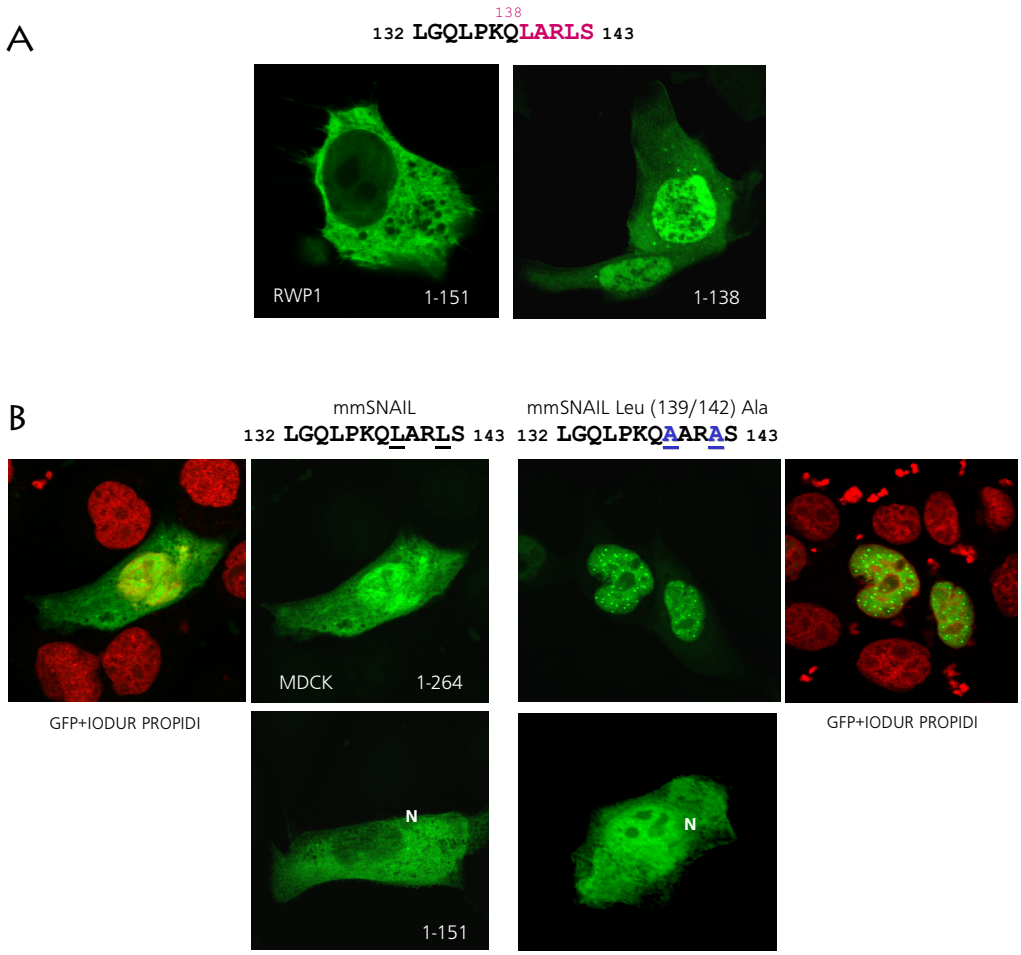


FIGURA RS-20 : LA REGIÓ RICA EN LEUCINES D'SNAIL EN MAMÍFERS ES COMPORTA COM UNA SENYAL D'EXPORT I MEDIA LA LOCALITZACIÓ CITOSÒLICA DE LA PROTEÏNA
(A)Distribució subcel·lular de la meitat N-terminal d'Snail (1-151) després de la delecció del fragment 139-151, que elimina les dues últimes Leucines. Snail és en bona mesura re-localitzat al nucli. (B) Mutació selectiva de les Leucines 139 i 142 de la seqüència d'export nuclear d'Snail, resaltades en blau, i distribució subcel·lular dels mutants. La mutació selectiva de les leucines té una efecte similar a la delecció 139-151, i és eficient tant en la proteïna sencera com en la meitat N-terminal. Els nuclis són contratenyits amb iodur de Propidi. (N, regió nuclear)
Les línies cel·lulars són les indicades a les imatges. Confocal, 63X i zoom x2.

terminal. Aquesta truncació és suficient per abolir en bona part l'activitat d'export nuclear d'*Snail* (***Fig Rs-20A***). (ii) La truncació esmentada elimina de la *NES* les dues últimes Leucines (*Leu139*, *Leu142*), conservades en els homòlegs de mamífer. Paral·lelament, la mutació puntual d'ambdues Leucines en la proteïna sencera o en la meitat N-terminal d'*mSnail* (mutants *Leu(139-142)Ala*) és suficient per abolir l'export nuclear i per tant la localització citosòlica de la proteïna (***Fig Rs-20B***), si més no en bona part. Aquestes dues dades confirmen l'existència d'una *NES* funcional en el sí de la meitat N-terminal d'*Snail* (residus *132-142*), i permeten concloure que *Snail* és exclòs del nucli per un mecanisme d'export nuclear actiu basat en el transportador *CRM1* i la *NES* present a la proteïna.

Slug és estrictament nuclear i no té NES en la seva seqüència

Slug té una distribució eminentment nuclear, com es deriva de l'observació de la fusió *eGFP-mSlug* expressat transitòriament en cèl·lules epitelials i fibroblasts (vegeu en pàgines anteriors, *Fig Rs-15C*). La distribució que presenta al nucli és similar a la de l'*mSnail* sencer (*speckles*) i es

correspon amb les observacions d'altres autors (*Hemavathy K et al, Mol Cell Biol 2000*). Malgrat que també a *Slug* hi ha una seqüència rica en serines, no hi ha cap seqüència rica en leucines similars a una *NES* com la què és present en l'*Snail* de mamífers, i això suggereix que el mecanisme d'export és exclusiu d'*Snail* i no d'altres membres de la família. Aquesta observació té algunes conseqüències conceptuals que són exposades en la *Discussió*.

El domini ric en serines adjacent a la seqüència d'export nuclear en modula l'activitat

Què fa modulable l'export nuclear d'*mSnail*? En un mateix grup cel·lular, la distribució subcel·lular de la proteïna és variable, i en alguns tipus cel·lulars la localització citosòlica és la predominant. Per tant, cal invocar algun sistema de modulació de l'export.

En l'anàlisi de seqüència mostrat a la ***Fig Rs-18*** el senyal d'export és inclòs dins la regió més conservada de la meitat N-terminal. Però en aquesta regió la part més important és el *Domini Ric en Serines*. La seva conservació en seqüència és variable segons els homòlegs (***Fig Rs-21A***), però en tots els casos té una arquitectura similar on predominen els residus *Serines* (la majoria de les serines d'*Snail* es concentren en aquesta regió) alternant amb algunes *Prolines* o d'altres aminoàcids. La deleció del domini ric en serines de la proteïna sencera (*mSnail Δ90-120*) comporta el bloqueig de l'export nuclear d'*Snail*, o d'altra banda, la seva retenció nuclear (***Fig Rs-21B***). No obstant, la fusió d'aquest domini aïllat a *eGFP* no en causa l'exclusió del nucli, i això suggereix que dins d'aquest domini no hi ha cap mena de senyal d'export complementària (***Fig Rs-21C***) [NP53]. L'efecte del domini ric en serines sobre l'eficiència del sistema d'export no sembla doncs deguda a la truncació del senyal d'export, que ha estat específicament delimitat. Per exemple, l'eliminació del mateix domini ric en serines de la porció N-terminal d'*Snail* no té un efecte rellevant en la seva distribució subcel·lular, com es mostra a la ***Fig Rs-21B***. La majoria de les serines presents en aquest domini són possibles dianes de fosforilació per diverses quinases conegudes -i probablement per d'altres no conegudes. La predicció per l'anàlisi de seqüència de diferents predictors (*NetPhos 2.0, MotifScan*) presents a la Web així ho indiquen (***Fig Rs-22***). Hi ha diversos exemples de modulació de l'activitat de *NLS* i *NES*s mitjançant la fosforilació d'aminoàcids adjacents als senyals, usualment serines, i es creu que és un mecanisme força estès entre les proteïnes que viatgen dins i fora del nucli, com és el cas de *p53* o $p27^{Kip1}$ (*Zhang Y i Xiong Y, Science 2001; Ishida N et al, J Biol Chem 2002*). Aquest model doncs, encaixa correctament amb l'efecte del domini ric en serines sobre la funcionalitat de la NES.

La localització subcel·lular d'Snail és modulada per fosforilació

Snail és fosforilat "in vivo" i principalment en el domini ric en serines

Per avaluar l'adequació de la hipòtesi anterior vàrem analitzar si *Snail* era fosforilat "in vivo". L'*mSnail* expressat de forma transitòria en *NIH-3T3*, *RWP1* i *MCF-7* fou immunoprecipitat específicament mitjançant la seva etiqueta d'hemaglutinina (HA), després d'incubar les cèl·lules transfectades amb ortofosfat marcat radioactivament (^{32}P ortofosfat). D'acord amb els resultats d'aquest assaig, *mSnail* és fosforilat "in

[53] Curiosament, i igual que amb el fragment C-terminal sol, la distribució d'aquest mutant dins el nucli és difosa, i no pas en "*speckles*" com ocorre amb la proteïna sencera.

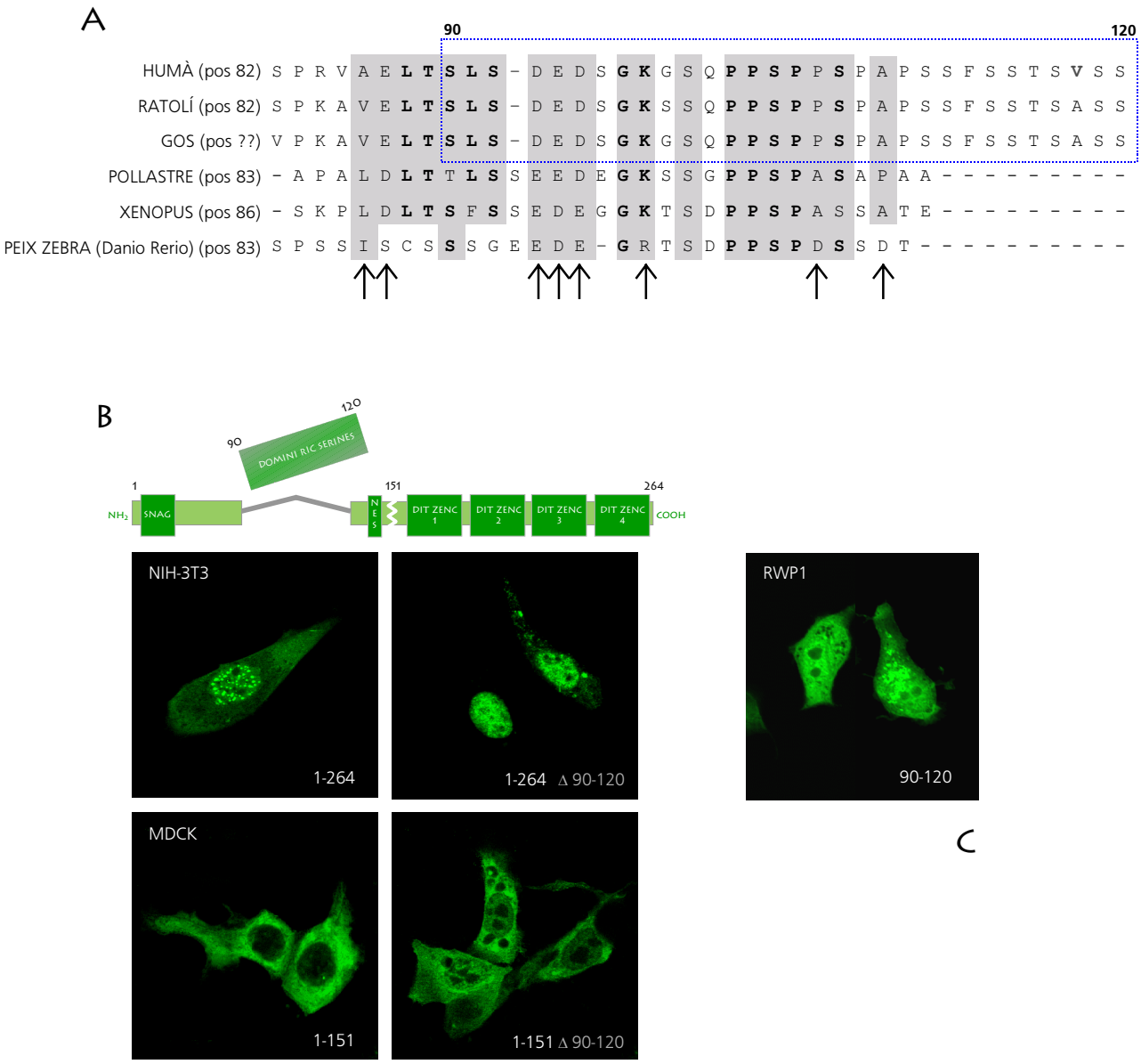


FIGURA RS-21 : EL DOMINI RIC EN SERINES D'SNAIL TÉ RELLEVÀNCIA FUNCIONAL, I MODULA L'EFICIÈNCIA DEL SISTEMA D'EXPORT NUCLEAR DE LA PROTEÏNA

(A) Alineament de seqüència entre els diferents homòlegs d'Snail en vertebrats, centrat en la regió corresponent al domini ric en serines. Els residus conservats són ombrejats en gris. Les fletxes assenyalen posicions amb canvis conservatius, per aminoàcids amb similars característiques químiques. El domini ric en serines definit pels predictors de motius protèics (MotifScan, ScanProSite), és enquadrat per una línia blava discontínua. (B) Canvis en la distribució subcel·lular d'mSnail condicionats per la delecció del domini ric en Serines (90-120). L'efecte es fa patent en la proteïna sencera. (C) Localització de la fusió d'eGFP amb el domini ric en Serines. Per si sol, no causa canvis significatius en la distribució usual d'eGFP (si cap, un lleu increment de la localització nuclear en algunes cèl·lules, aquí no mostrades). En totes les imatges, és indicada la línia cel·lular. Confocal, 63X i zoom x2.

vivo" (***Fig Rs-23***) i de forma consistent (el mateix resultat fou obtingut en diversos assaigs). La incapacitat tècnica per immunoprecipitar l'*Snail* endogen no ens ha permès confirmar que també aquest és fosforilat "in vivo". Tanmateix, com mostra la ***Fig Rs-23BC***, l'*mSnail-HA* expressat de forma estable en cèl·lules MDCK i resolt en un gel d'elevat percentatge (15%), es visualitza com una doble banda, fet que suggereix que en aquestes cèl·lules hi ha dues formes d'*mSnail*, una d'elles possiblement fosforilada (si més no modificada) que apareix com lleugerament més retardada en

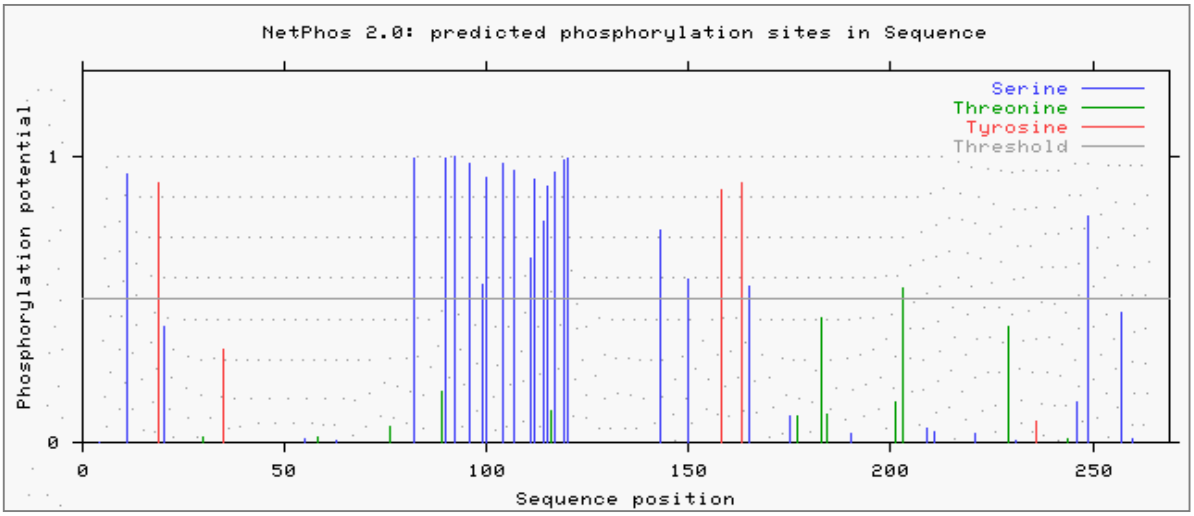


FIGURA RS-22 : DISTRIBUCIÓ DELS CONSENS DE FOSFORILACIÓ EN LA SEQÜÈNCIA AMINOACÍDICA D'MSNAIL
Representació gràfica del resultat de les prediccions de consens de fosforilació a mSnail, realitzades amb la utilitat NetPhos 2.0 (EMBL, Heidelberg). Els residus Serina són marcats en blau, i les dianes amb probabilitats estadísticament significatives són indicades amb línies verticals per sobre del límit de 0.5 (línia grisa, "threshold" o dintell de significació). Noteu com la majoria de residus Serina fosforilables es concentren en una petita regió situada entre les posicions 90-120, que gairebé coincideix en la seva totalitat amb el domini ric en Serines. Aquesta dada contrasta clarament amb la relativa absència de residus fosforilables a la resta de la proteïna.

el gel. L'exclusivitat d'aquesta segona banda indica que *mSnail* oscil·la entre 2 possibles estats alternatius -fosforilat i no fosforilat-, i mostra que ambdues es troben en abundància relativa similar, fet que encara dóna més rellevància a aquest tipus de modificació de la proteïna. El tractament amb fosfatases (CIAP, *New England Biolabs*) dels extractes, fa desaparéixer la banda de migració més lenta confirmant la seva correspondència amb formes fosforilades d´Snail [NP54].

La fosforilació d'*Snail* depen de forma gairebé exclusiva de la integritat del domini ric en serines, car en la seva absència la molècula no és fosforilada (***Fig Rs-23A***). L'alta concentració de residus Serina en aquest domini, alhora dianes putatives de diverses quinases, ens va fer suposar que potser podria funcionar com un "acumulador" de càrrega, de forma que la fosforilació successiva de residus propers en podria ser la funció. Donat que en tots els homòlegs d'*Snail* i d'altres membres de la família com *Slug* es preserva l'existència d'un domini d'arquitectura similar, malgrat no hi hagi una conservació estricta de la seqüència ni dels consensos de fosforilació, aquesta possibilitat ens va semblar la més escaient

Per verificar aquesta última dada, vàrem substituir el domini ric en serines d'*mSnail* per dominis sintètics on la totalitat dels residus *Serina* (14 en l'*Snail* de ratolí) havien estat mutats a *Alanina* (mutant *S/A*, abolint així la possible fosforilació del domini) o a *Aspartat* (mutant *S/D*, simulant la fosforilació de tots i cada un dels residus fosforilables) (vegeu *Materials i Mètodes*) [NP55].

Com mostra la ***fig Rs-23A***, aquestes mutacions abolien totalment la fosforilació in vivo d'*Snail*, i per tant, confirmaven que les serines fosforilables es trobaven incloses entre les què havien estat mutades, totes dins els domini ric en serines.

[54] Experiments realitzat per Ariadna Virgós i Bàrbara Montserrat.

[55] Donada l'estructura molecular de les *Serines*, aquestes mutacions són les més idònies i usualment escollides pels diversos autors. La mutació a *Aspartat* podria també ser substituïda per mutació a *Glutamat*, que també és acídic i aporta una càrrega similar a la dels fosfats, però l'escollida fou la primera per la major semblança a l'estructura molecular de les *Serines*.

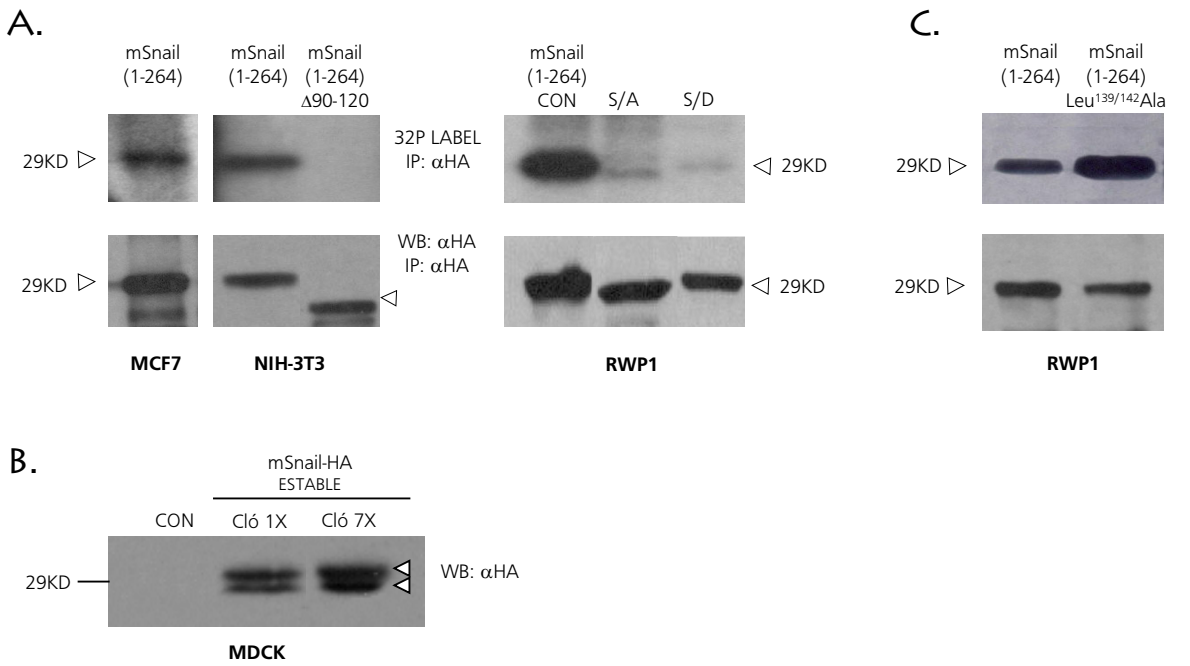


FIG RS-23 : SNAIL ÉS FOSFORILAT IN VIVO EN CÈL·LULES EPITELIALS I MESENQUIMALS, ESSENCIALMENT EN ELS RESIDUS SERINA CONCENTRATS AL DOMINI RIC EN SERINES

(A)Assaig de marcatge amb P^{32} de cèl·lules en cultiu i posterior immunoprecipitació de l'mSnail exògen expressat transitòriament. La fosforilació pot ésser detectada en línies epitelials com les MCF7 o RWP1, i també en fibroblasts (NIH-3T3). Per a cada cas, són mostrats també els controls de la immunoprecipitació, per a confirmar la natura de la proteïna fosforilada detectada en els immunoprecipitats. *Panell esquerre*, la delecció del domini ric en Serines (90-120) evita selectivament la fosforilació de la proteïna en NIH-3T3. El control confirma la presència d'mSnail (Δ90-120) en l'immunoprecipitat (triangle blanc). *Panell dret*, la mutació selectiva de les 14 serines incloses al domini present a mSnail, evita també la fosforilació de la proteïna, confirmant així que entre aquestes es troben les dianes fosforilades. (B) Electroforesi en gel del 15% d'extractes protèïcs totals de cèl·lules MDCK que expressen de forma estable mSnail, i immunoblot per detectar l'HA fusionat a la proteïna. Com és assenyalat pels triangles blancs, aquesta resolució permet evidenciar l'existència d'un doblet de bandes, suggestiu de correspondre a les formes no fosforilada i fosforilada d'Snail, i suggereix la distribució alternativa de la proteïna entre aquests dos "pools". (C) Assaig de marcatge amb P^{32}. Diferències en els nivells de fosforilació de la forma usual d'mSnail i el mutant Leu 139/142 Ala, de distribució exclusivament nuclear. Aquest assaig és el més evident d'un total de 3 assaigs, en els que les diferències són malauradament variables.

Desconeixem fins al moment si totes les serines són fosforilades, només algunes, o quines ho són.

L'estat de fosforilació del domini ric en serines determina la localització subcel·lular d'Snail

L'Snail fosforilat és exportat

La modificació de l'estat de fosforilació del domini ric en serines condiciona directament la localització subcel·lular d'*Snail* (***Fig Rs-24***). La distribució del mutant *S/D* fusionat a *eGFP* és certament oposada a la distribució del mutant *S/A*. Així, la fosforilació del domini ric en serines provoca l'export nuclear d'*Snail* de forma molt eficient, mentre que en absència de fosforilació, *Snail* és retingut al nucli. La distribució citosòlica del mutant *S/D* que simula la fosforilació del domini és deguda en essència a una elevada activitat d'export nuclear, ja que un tractament curt amb *LMB* (***Fig Rs-24***) és suficient per a re-localitzar la proteïna al nucli. És curiós que la distribució nuclear del mutant *S/D* després del tractament amb *LMB* sigui en "punts nuclears" similars als presents en la proteïna sencera, mentre que la del mutant *S/A* sigui difosa, com ocorre en la proteïna sense el domini ric en serines (*Δ90-120*) (vegeu en punts successius). Tot això suggereix que per tant és possible modular la distribució subcel·lular d'*Snail* modificant l'estat de fosforilació del domini ric en serines, és a dir, per una modificació post-traduccional. Tanmateix, i vist el què ocorre amb el mutant *S/D* però també amb la meitat *N-*

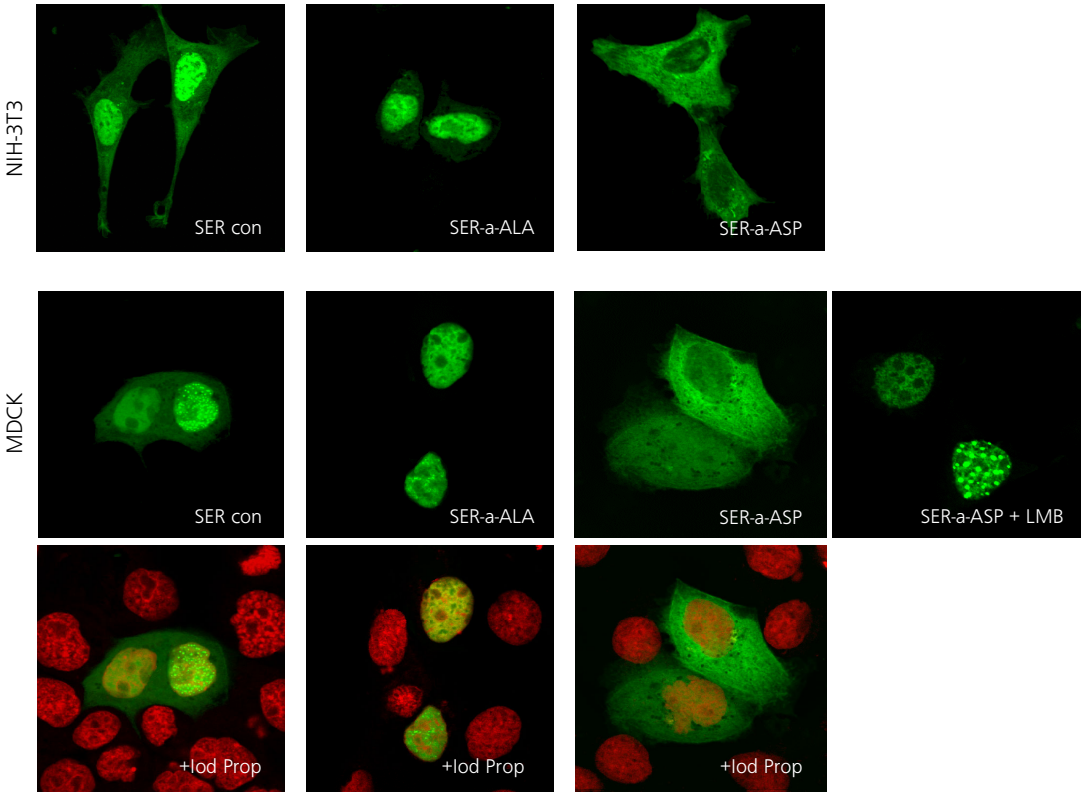


FIG RS-24 : L'ESTAT DE FOSFORILACIÓ DEL DOMINI RIC EN SERINES CONDICIONA LA DISTRIBUCIÓ SUBCEL·LULAR DE LA PROTEÏNA
Localització subcel·lular de les proteïnes de fusió d'eGFP amb els mutants Ser/Ala (no fosforilat) i Ser/Asp (fosforilat) d'mSnail(1-264), testats en cèl·lules epitelials i mesenquimals. Ambdós mutants tenen una localització oposada i complementària. La localització essencialment citosòlica del mutant Ser/Asp (S/D) és revertida després d'un tractament curt amb Leptomicina B (LMB, 5ng/ml, 2H), *panell central, imatge dreta*. Els nuclis són contratenyits amb iodur de Propidi, pel qual la co-localització en la distribució nuclear dels mutants dóna lloc a un color groc. Confocal 63X, zoom x2.

terminal, els resultats suggereixen que *Snail* entra de forma constitutiva al nucli (possiblement per algun tipus de senyal de localització o similar), i que en funció de la possibilitat de ser exportat, és redistribuït al citosol amb més o menys eficiència depenent de l'accessibilitat al sistema d'export. Aquest últim punt és condicionat per l'estat de fosforilació del domini ric en serines.

La fosforilació d'Snail pot ocórrer al nucli

Si bé és possible que *Snail* sigui per defecte nuclear, i que tanmateix la fosforilació sigui capaç de fer que *Snail* sigui exportat de forma eficient fora del nucli, hom pot pensar que és molt possible que la fosforilació d'*Snail* ocorri sobretot dins el nucli. D'acord amb això, el mutant *Leu 139/142 Ala* que no pot ésser exportat per tenir mutada la *NES*, és aparentment fosforilat amb més eficiència que no pas l'*Snail* no modificat (***Fig Rs-23C***). Idealment, un mutant d'*Snail* que fora incapaç d'accedir al nucli no hauria de ser fosforilat, però no ens ha estat possible identificar mutants en què s'abolís l'entrada nuclear.

Un canvi conformacional d'Snail condiciona l'efecte modulador de la fosforilació sobre la seva localització subcel·lular

L'extrem C terminal d'Snail també condiciona l'export nuclear d'Snail

Per a entendre com l'estat de fosforilació del domini ric en serines condicionava l'export nuclear d'*Snail* vàrem revisar diverses dades experimentals i bibliogràfiques: (i) Segons l'arxiu de motius

proteics de de dades ***ProSite*** (*Servidor proteòmic ExPASY, Institut Suïs d'Informàtica (SIB)*, i *Falquet L et al, Nucleic Acids Res 2002*) els dominis enriquits en un tipus especial d'aminoàcids, com el domini ric en serines, són regions de baixa complexitat estructural. En algunes proteïnes, dominis similars fan funcions de "frontissa" entre dues regions separades de la proteïna. (ii) L'eliminació del domini ric en serines només afecta l'export nuclear de la proteïna sencera, no pas de la meitat N-terminal. Això fa pensar que l'element que falta en aquesta última (la meitat C-terminal) té algun rol funcional en l'efecte que el domini ric en serines exerceix en el mecanisme d'export (***Fig Rs-21B,C***). (iii) La fusió d'*mSnail* a *eGFP* té un patró de distribució sensiblement diferent depenent de si *eGFP* és a l'extrem amino o carboxi-terminal d'*Snail*. *mSnail-eGFP* és amb elevada freqüència només nuclear, mentre que *eGFP-mSnail* es distribueix en tots els patrons ja descrits. No obstant, *mSnail-eGFP* es distribueix en algunes cèl·lules amb un patró també citosòlic. Per alguna raó estructural, la presència d'*eGFP* a l'extrem més carboxi-terminal d'*Snail* és suficient com per condicionar-ne la distribució o l'export nuclear.

Atenent a les dades esmentades, vàrem avaluar el rol que la regió C-terminal d'*Snail* tenia en el mecanisme d'export nuclear i/o la distribució subcel·lular de la proteïna. La primera aproximació fou delecionar l'*últim* dit de zenc (*Δ237-264*), donat que per una banda es tracta d'un dit de zenc atípic, un pèl allunyat del consens conservat en els altres 3 (***Fig Rs-25A***); i d'altra banda, és el més distal i per tant seria el més directament afectat des del punt de vista estructural per la presència de *eGFP* a la cua d'*Snail*. L'absència de l'últim dit de zenc fa que *Snail* sigui exclòs del nucli (***Fig Rs-25B***) en més del 80% de les cèl·lules transfectades. La redistribució d'*mSnail* (*1-236*) cap al citosol és abolida en presència de *LMB* al medi de cultiu, i això permet confirmar que l'exclusió nuclear causada per l'absència de l'últim dit de zenc, deriva d'un augment en l'eficiència dels mecanismes d'export nuclear. Això ocorre en la proteïna sencera i en els mutants on és conservat el domini ric en serines. En canvi, l'efecte d'aquesta deleció deixa de ser apreciable quan falta el domini ric en serines (mutant *1-236 (Δ90-120*), o la totalitat de la porció N-terminal - fragment *152-236,* que només té els 3 primers dits de zenc (***Fig Rs-25B***). D'això últim hom pot concloure que l'efecte de l'últim dit de zenc sobre el mecanisme d'export és necessàriament lligat al domini ric en serines present a la meitat N-terminal, i per tant suggereix que ambdues regions de la proteïna formen part del mateix sistema de regulació[NP56].

Les cues N i C terminals d'Snail interaccionen entre elles

Els dits de zenc foren originalment descrits com dominis d'unió a l'ADN. En molts casos però, aquests dominis estructurats són utilitzats per mediar la interacció entre proteïnes (homo o heterodímers, per exemple) o la interacció amb l'ARN (*Mackay JP i Crossley M, Trends Biochem Sci 1998*), també en el cas dels dits de zenc del tipus C_2H_2 que és el més estès en el proteoma. Vàrem considerar plausible que la relació funcional entre el domini ric en serines i l'últim dit de zenc fos deguda a la interacció física entre ambdues regions: el senyal d'export nuclear queda situat entre ambdós dominis, i fora per

[56] Les últimes dades experimentals que hem pogut obtenir i incloure a la tesi suggereixen que possiblement només l'extrem terminal de l'últim dit de zenc és l'implicat en aquest efecte. La delecció dels últims 5 aminoàcids d'*Snail*, conservats relativament en tots els amniotes (aus i mamífers, consens $\underline{SG}X_{(1-2)}\underline{R}$) sembla prou per a forçar un augment en l'export nuclear d'*Snail* (vegeu *Discussió*, ***Fig Dc-3***). Aquests aminoàcids són eliminats en la delecció *237-264* que treu l'últim dit de zenc.

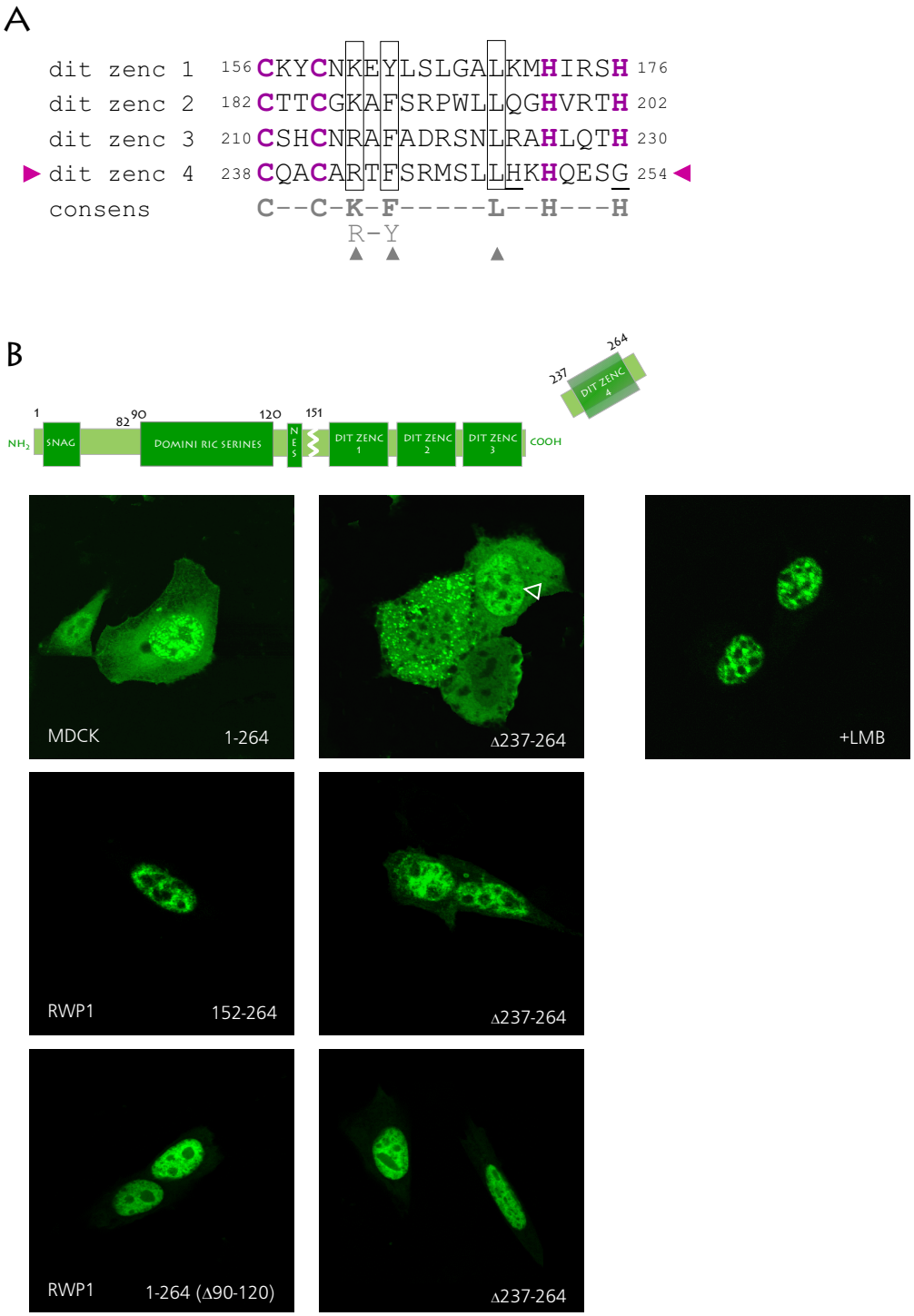


FIG RS-25 : LA DELECCIÓ DE L'ÚLTIM DIT DE ZENC (237-264) CONDICIONA LA DISTRIBUCIÓ SUBCEL·LULAR D'SNAIL

(A)Alineament de seqüència entre els 4 dits de zenc d'mSnail. El consens característic (assenyalat en gris en la línia inferior) és conservat en els dits 1,2 i 3, però el quart dit de zenc (fletxes lile) no el manté en disposar els residus Histidina (H) fora de la pauta esperada. Hom es refereix a aquest quart dit com a "*atípic*". Les Cisteïnes i Histidines característiques dels dits de zenc del tipus C_2H_2 són resaltades en lila. Els residus polars-hidrofòbics en posicions conservades del consens són enquadrats. (B) La delecció del segment que inclou aquest últim dit de zenc (237-264) té diferent efecte en la localització subcel·lular d'Snail depenent de la integritat del domini N-terminal. Observeu que la conservació del *domini ric en Serines* (90-120) és essencial per que la delecció del dit de zenc pugui relocalitzar, si més no parcialment, Snail al citosol. No obstant, en algunes cèl·lules l'exclusió nuclear no és pas total (triangles blancs).

Confocal 63X i zoom x2. Les línies cel·lulars utilitzades són indicades a les imatges.

tant possible que aquesta interacció condicionés la seva accessibilitat.

En assaigs de *pulldown* amb les meitats N- i C-terminal d'*mSnail* vàrem poder confirmar que ambdues parts de la proteïna interaccionaven entre elles directament (***Fig Rs-26A***). Això suposava que en algunes condicions, la proteïna devia ésser plegada. La interacció depenia de la presència del domini ric en serines, car si era eliminat de la meitat N-terminal (fragment *1-90*), la cua C-terminal no hi interaccionava. Aquest fet suporta la presumpta relació funcional (ara estructural) entre ambdós dominis. La regió d'interacció en la meitat N-terminal ha de trobar-se entre els aminoàcids *90 i 151*, i per tant, no només hi és candidat el domini ric en serines, sinó també una petita seqüència de 15 aminoàcids situada entre aquest domini i la *NES* (vegeu alineament, ***Fig Rs-26B***). En aquests 15 aminoàcids la conservació de seqüència és força elevada, fins i tot entre *Snail* i *Slug,* i correspon al què fora el primer dit de zenc en *l'Snail* d'aus, amfibis i al mateix *Slug*, i què s'ha perdut en mamífers. Donat que la deleció del domini ric en Serines (*90-120*) fa romandre *Snail* dins el nucli, en conformació que sospitem és plegada per no exposar la NES, el més factible és que la regió del fragment N-terminal que contacti amb la meitat C-terminal es localitzi en el segment *121-151*, sense poder excloure la mateixa NES.

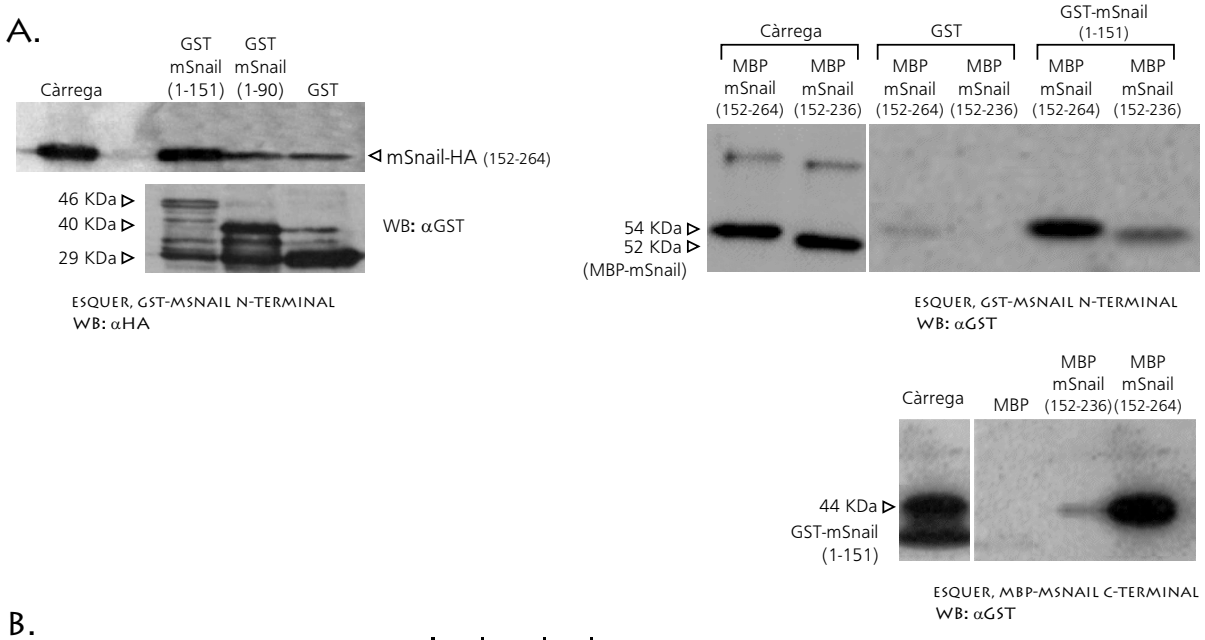
L'últim dit de zenc (*237-264*) condiciona la interacció entre ambdues meitats, com pot extreure's dels experiments de *pulldown* (***Fig Rs-26A***). El fragment 152-236 interacciona amb la meitat N-terminal amb molta menys avidesa que la meitat C-terminal sencera. Aquest resultat és coincident amb l'observat en l'estudi de distribució de les truncacions d'*eGFP-mSnail*. La deleció d'aquest dit de zenc en la proteïna sencera comporta una major tendència a la localització citosòlica [mutant eGFP-mSnail(1-236) ***Fig Rs-25B***], i presumiblement un increment en l'eficiència del mecanisme d'export. La forma en què afecta l'export pot raure en algun tipus de condicionament estructural en la cua C (vegeu *Discussió,* ***Box Dc-1***), com a alternativa a la possibilitat de que mediï directament la interacció de la cua C-terminal amb la meitat N-terminal. És pertinent destacar el fet que aquest últim dit de zenc se'l considera atípic per no mantenir de forma estricta el consens per a dits de zenc del tipus C_2H_2 (vegeu ***Fig Rs-25A***).

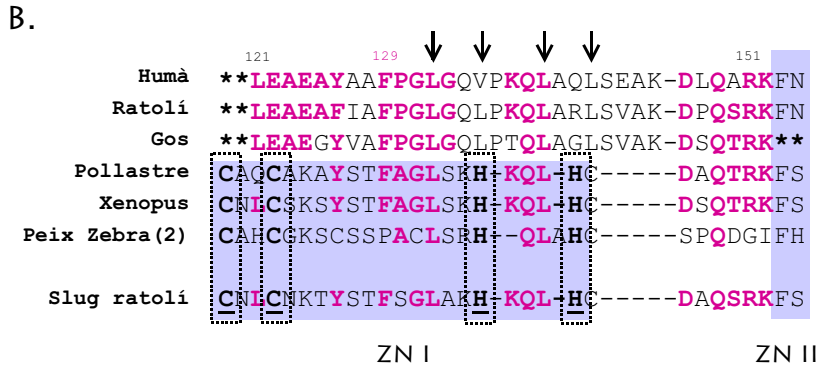
La presència de la meitat C-terminal permet la relocalització de la meitat N-terminal dins el nucli

Aquest efecte d'emmascarament que possiblement exerceix la cua C-terminal sobre la *NES* d'*mSnail* és esbossat en l'experiment de la ***Fig Rs-26C***. Si bé la distribució d'e*GFP-mSnail N-terminal* és estrictament citosòlica, la co-expressió de la proteïna de fusió *RFP-mSnail C-terminal* (*RFP, Red Fluorescent Protein*) en la mateixa cèl·lula aconsegueix retenir parcialment algunes molècules de la meitat N-terminal al nucli, on co-localitzen amb les de la meitat C-terminal. La co-localització no és pas signe inequívoc de la interacció NxC (fet més fidelment confirmat en els assaigs de *pull-down*), però és signe indicatiu del bloqueig exercit pels dits de zenc en l'export nuclear del fragment N-terminal. Del què es pot extreure que "in vivo", la interacció NxC té un rol elemental en la modulabilitat del mecanisme d'export. Això afegeix solidesa a les troballes experimentals abans exposades.

La interacció NxC és modulable per la presència i fosforilació del domini ric en serines

La interacció NxC que possiblement manté *mSnail* plegat sobre ell mateix en algunes condicions, és modulable per l'estat de fosforilació del domini ric





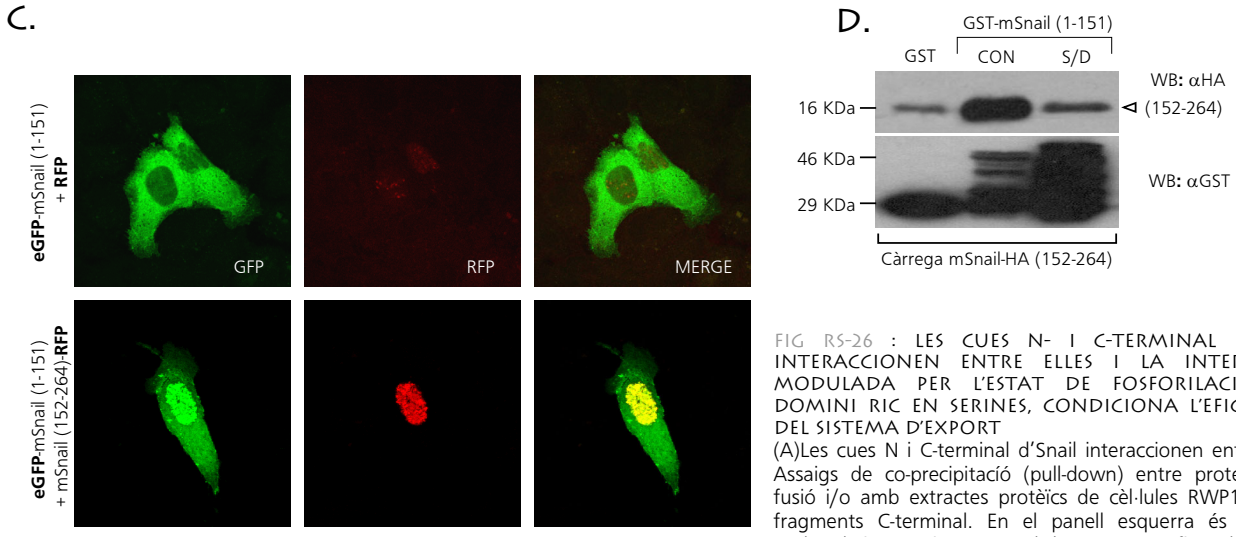


FIG RS-26 : LES CUES N- I C-TERMINAL D'SNAIL INTERACCIONEN ENTRE ELLES I LA INTERACCIÓ, MODULADA PER L'ESTAT DE FOSFORILACIÓ DEL DOMINI RIC EN SERINES, CONDICIONA L'EFICIÈNCIA DEL SISTEMA D'EXPORT

(A)Les cues N i C-terminal d'Snail interaccionen entre elles. Assaigs de co-precipitació (pull-down) entre proteïnes de fusió i/o amb extractes protèics de cèl·lules RWP1 rics en fragments C-terminal. En el panell esquerra és possible avaluar la interacció entre ambdues cues, confirmada també en el panell de la dreta. La delecció del segment que conté el domini ric en Serines (90-151) i zones adjacents reverteix la interacció. Ocorre el mateix amb la delecció de l'últim dit de zenc (panell dret) que condiciona en bona mesura aquesta interacció. Això és en concordància amb les dades obtingudes d'estudiar la distribució subcel·lular dels mutants (part dels resultats obtinguts per Montse Porta). (B)Alguns residus del primer dit de zenc en homòlegs no vertebrats són conservats en la regió 121-151 de mamífers, on és inclosa la NES present en aquests últims. Alineament manual de seqüència en la regió de transició entre el domini ric en Serines i el primer dit de Zenc en mamífers (121-151), que correspon a la zona ocupada pel primer dit de zenc en els altres homòlegs (ZNI). Els residus conservat són resaltats en color. Les Cisteïnes i Histidines del consens del dit de zenc són enquadrades. Dues de les Leucines conservades en la seqüència del Dit de Zenc I participen de la nova Senyal d'Export Nuclear (NES, residus definitoris assenyalats amb fletxes). L'ombrejat blau assenyala els límits de cadascun dels dits de zenc, numerats d'acord amb l'ordre present en els homòlegs no mamífers. Slug té un consens similar a l'Snail de no mamífers. (C) La coexpressió del fragment C-terminal (152-264) aconsegueix relocalitzar el fragment N-terminal (1-151) al nucli. Co-transfecció dels constructes de fusió eGFP-mSnail (1-151) i mSnail(152-264)-dsRed en cèl·lules RWP1, i expressió durant 16H. Les cèl·lules foren després fixades amb PFA, 4%. La colocalització dels fragments N i C terminal en el nucli suggereix un impediment en la disponibilitat de la senyal d'export quan ambdues meitats són co-expressades. Confocal 63X, zoom x2. (D) Assaig de co-precipitació (pull-down). L'estat de fosforilació del domini ric en Serines condiciona la interacció NxC in vitro. El volum d'mSnail (152-264) co-precipitat amb la cua N-terminal és clarament major al co-precipitat quan hi ha la mutació S/D en el domini ric en Serines.

en serines. Així, la simulació de fosforilació del domini amb la mutació *S/D* fa que la meitat N-terminal no pugui interaccionar amb l'extrem C-terminal -o ho faci molt deficientment (***Fig Rs-26D***). Pel contrari, en impedir la fosforilació del domini (mutant *S/A*, o la proteïna de fusió *GST-mSnail Nterminal* sense modificar, que per ser obtinguda en bacteris, no és fosforilada), es facilita la interacció en comparació al què ocorre amb el domini fosforilat. En aquest punt podem afirmar que, d'acord amb la distribució subcel·lular d'e*GFP-mSnail S/A* i *S/D (**Fig Rs-24**)* , la interacció NxC aboleix l'export nuclear d'*Snail*, i això ocorre possiblement per un fenomen d'emmascarament del senyal d'export (*NES*) que és ubicat en la frontissa entre ambdós dominis. Quan *Snail* es "desplega" pot ser fàcilment exportat, molt probablement perquè la *NES* queda exposada i accessible al transportador *CRM1*; fenomen que pot ésser bloquejat amb Leptomicina (*LMB*).

L'estat de fosforilació del domini ric en serines modularia aquesta unió, possiblement per condicionar l'estructura o plegament de la zona d'interacció de la meitat N-terminal, en ser-hi adjacent, o bé per repel·lir la cua C-terminal per un efecte de "càrrega" més que no per impediment estèric. Per bé que aquest efecte sobre l'estructura o plegament de la regió ha de ser també necessari per tal que la *NES* prengui una conformació funcional. Així, la deleció del domini ric en serines SEMPRE condiciona l'export, però no és aparentment per contenir elements de la *NES*, com suggereixen els resultats amb el fragment N-terminal mostrats a la ***Fig Rs-21C***, i sembla que tampoc és només per condicionar la interacció NxC en ésser o no fosforilat.

L'export nuclear d'*mSnail* és modulable doncs, per fenòmens de fosforilació que en condicionen la seva estructura tridimensional, i comporten l'emmascarament o exposició del senyal d'export nuclear (NES) present en la zona central de la proteïna.

La modulació de la localització subcel·lular d'Snail condiciona el seu efecte transcripcional

Quan Snail és fora del nucli té un escàs efecte transcripcional

La primera conseqüència òbvia de poder modular la localització subcel·lular d'*Snail* és la d'afectar la seva activitat transcripcional. Donat que la permanència dels factors de transcripció al nucli és un fet essencial per a la seva eficiència (*Hogan PG i Rao A, Nature 1999*), hom pot predir que quan *mSnail* és citosòlic, és incapaç d'actuar com a repressor transcripcional.

Per tal de comprovar aquest fet, vàrem realitzar assaigs reporter avaluant l'efecte transcripcional d'*mSnail* (no modificat o bé els mutants amb una localització subcel·lular restringida) sobre un fragment proximal del promotor del gen humà d'*E-cadherina* (porció *-178/+92*, ja referenciada per *Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000*) fusionat al gen reporter de la luciferasa. Aquest fragment del promotor inclou les 3 *Ebox* amb consens per *mSnail*, com ha estat definit prèviament, i la seva activitat és eficientment reprimida per la forma no modificada d'*mSnail* (*Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000*; *Hajra KM et al, Cancer Res. 2002; i **Fig Rs-27**).*

Treballant amb petites quantitats de plàsmids [NP57] (25 ng del constructe reporter amb el promotor

[57] Els assaigs reporter són aproximacions experimentals grolleres a la regulació transcripcional de promotors. Alguns autors consideren que cal treballar amb petites quantitats d'ADN, car en excès la relació entre els efectors i els promotors diana és desvirtuada per la fàcil accessibilitat d'uns als altres, i pel fet que el promotor problema no és integrat en un context nuclear semblant a l'endogen. Per això alguns autors integren de forma estable els constructes reporter.

En el nostre cas va ser necessari ajustar les condicions de treball de forma estricta. En un excès del constructe reporter (els primers assaigs es varen fer amb 250ng de plàsmid), el mutant *S/D* reprimia gairebé com l'*mSnail* no modificat el promotor de l'*E-cadherina*. Això ens va fer

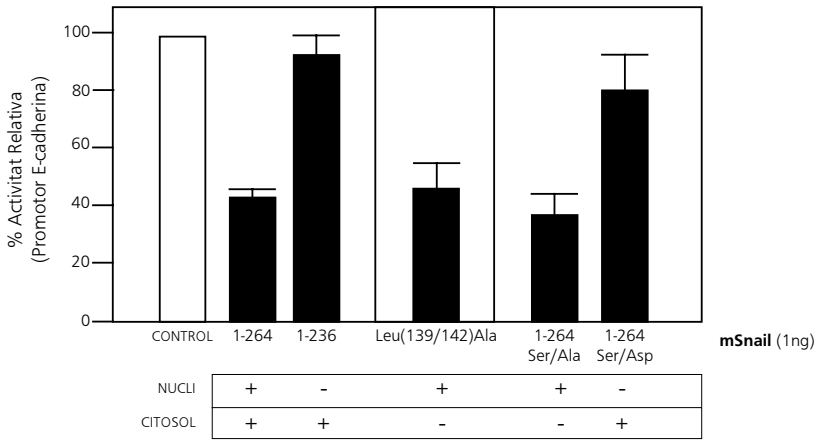


FIG RS-27 : CANVIS EN L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL D'mSNAIL CONDICIONATS PER LA SEVA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR
Assaig reporter sobre cèl·lules RWP1, en transfecció transitòria. L'activitat fou avaluada a les 48H d'expressió. En l'assaig es varen co-transfectar 25ng del constructe reporter amb el promotor d'E-cadherina, i 1 ng del constructe amb els diversos mutants d'mSnail. Els resultats exposats corresponen a la mitja de 4 experiments aïllats realitzats per triplicat en cada punt. Les barres assenyalen el rang de valors.
El panell inferior indica la localització subcel·lular dels constructes transfectats.

d'E-cadherina, 1 ng del constructe amb *mSnail*) hem pogut verificar que les formes de distribució estrictament citosòlica -mutant *S/D*, mutant *1-236 (*sense l'últim dit de zenc) són gairebé incapaces de reprimir l'activitat del promotor d'E-cadherina. Pel contrari, els mutants amb distribució estrictament nuclear, amb l'export nuclear abolit - mutant *S/A*, mutant *Leu(139-142)Ala*, reprimeixen tant o més efectivament que l'*mSnail* no modificat el mateix promotor (***Fig Rs-27***). És per tant presumible que l'exclusió citosòlica d'*mSnail* faci que sigui incapaç de regular a la baixa els nivells d'*E-cadherina*.

Quan *mSnail* és exclòs del nucli és incapaç de regular a la baixa el promotor d'E-cadherina. La rellevància biològica d'aquesta observació ve donada pel fet que, en algunes línies cel·lulars epitelials com les *MCF-7*, *mSnail* és exclòs selectivament del nucli i això es correspon amb la co-expressió d'ambdues proteïnes. En aquestes condicions doncs, l'*Snail* expressat és incapaç de reprimir eficientment l'expressió d'E-cadherina i ambdues proteïnes conviuen en el mateix tipus cel·lular.

La fosforilació d'Snail però, no en modula l'afinitat per l'ADN

Els experiments reporters amb el promotor d'E-cadherina plantegen el fet que, tot i que *mSnail* sigui modificat en la seva estructura per a poder ésser exportat eficientment del nucli, això no en modifica aparentment l'afinitat per l'ADN. Així, en l'establiment de les condicions experimentals idònies per a l'assaig reporter informatiu, el mutant *S/D* podia arribar a reprimir eficientment l'activitat del promotor d'E-cadherina (vegeu de nou *Nota al Peu 57*). La modificació més efectiva sobre *mSnail* sembla no obstant l'eliminació de l'últim dit de zenc (vegeu ***Fig Rs-27***), si bé manté cert nivell de repressió. Per a confirmar aquestes observacions, vàrem avaluar l'afinitat dels diferents mutants d'*mSnail* per l'ADN en *un Assaig de Precipitació amb Oligonucleòtids Biotinil·lats* (*BOPA*), i mitjançant estudis de Canvi

dubtar de l'adequabilitat experimental, i va fer pensar que potser les creixents quantitats de constructe reporter "segrestaven" els mutants *S/D* que sempre passen pel nucli abans de ser exportats (així ho demostra el tractament amb *LMB*). Fet aquest ajust, l' assaig va ésser finalment demostratiu, i és exposat a la ***Fig Rs-27***.

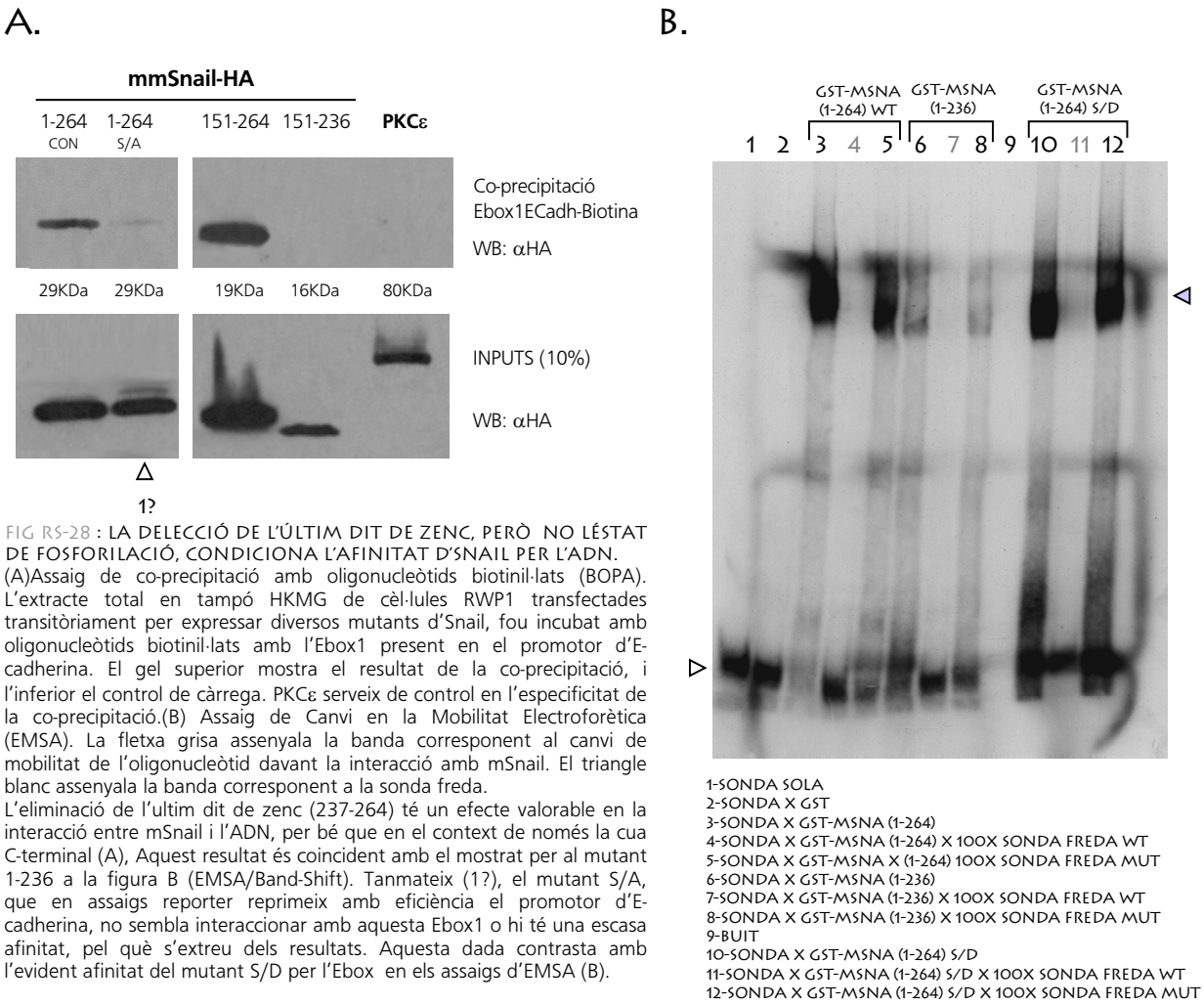


FIG RS-28 : LA DELECCIÓ DE L'ÚLTIM DIT DE ZENC, PERÒ NO LÉSTAT DE FOSFORILACIÓ, CONDICIONA L'AFINITAT D'SNAIL PER L'ADN.
(A)Assaig de co-precipitació amb oligonucleòtids biotinil·lats (BOPA). L'extracte total en tampó HKMG de cèl·lules RWP1 transfectades transitòriament per expressar diversos mutants d'Snail, fou incubat amb oligonucleòtids biotinil·lats amb l'Ebox1 present en el promotor d'E-cadherina. El gel superior mostra el resultat de la co-precipitació, i l'inferior el control de càrrega. PKCε serveix de control en l'especificitat de la co-precipitació.(B) Assaig de Canvi en la Mobilitat Electroforètica (EMSA). La fletxa grisa assenyala la banda corresponent al canvi de mobilitat de l'oligonucleòtid davant la interacció amb mSnail. El triangle blanc assenyala la banda corresponent a la sonda freda.
L'eliminació de l'ultim dit de zenc (237-264) té un efecte valorable en la interacció entre mSnail i l'ADN, per bé que en el context de només la cua C-terminal (A), Aquest resultat és coincident amb el mostrat per al mutant 1-236 a la figura B (EMSA/Band-Shift). Tanmateix (1?), el mutant S/A, que en assaigs reporter reprimeix amb eficiència el promotor d'E-cadherina, no sembla interaccionar amb aquesta Ebox1 o hi té una escasa afinitat, pel què s'extreu dels resultats. Aquesta dada contrasta amb l'evident afinitat del mutant S/D per l'Ebox en els assaigs d'EMSA (B).

en la Mobilitat Electroforètica d'oligonucleòtids marcats (*EMSA*, vegeu *Materials i Mètodes*). El resultat d'aquests assaigs indica que la deleció de l'últim dit de zenc condiciona una evident pèrdua en l'afinitat d'*mSnail* i de tota la cua C-terminal per l'oligonucleòtid (***Fig Rs-28***). Donat que la conservació de la resta de dits de zenc no sembla poder acomplir la interacció, podem apuntar que l'efecte d'aquesta deleció en la conformació de la regió de dits de Zenc és desestructurador i determinant per la funcionalitat de tot el domini [NP58]. La funció de l'últim dit de zenc en la proteïna sembla que podria ésser essencialment reguladora.

Dels resultats també es pot extreure que la simulació de fosforilació en el domini ric en Serines (constructe S/D) no sembla afectar l'afinitat d'*mSnail* per l'*Ebox1* del promotor d'E-cadherina, fet suggerit en els assaigs reporter. La localització citosòlica d'aquest mutant és doncs la responsable de la seva ineficiència transcripcional. Crida però l'atenció que la mutació S/A en l'assaig de *BOPA* sembla comportar una pèrdua en l'afinitat per l'oligonuclèotid, en contrast al què ocorre amb el mutant S/D. Si bé aquest resultat pot encaixar en les observacions fetes amb el *mutant sobre el promotor de MUC-1*

[58] Diversos estudis (citats a *Hemavathy K et al, Gene 2000*) assenyalen que, d'acord amb les observacions en els diferents homòlegs d'*Snail*, caldria probablement un mínim de 4 dits de zenc per a que la proteïna fos funcional.

(*vegeu a la Discussió* i *Nota al Peu 70*), no deixa de ser paradoxal i a falta de la corroboració per EMSA, ha d'ésser interpretat amb cautela.

SIGNIFICAT BIOLÒGIC DELS MECANISMES DE REGULACIÓ NO TRANSCRIPCIONAL (I)

SNAIL DINS EL NUCLI PER FER QUELCOM MÉS QUE UN EFECTE TRANSCRIPCIONAL?

Els factors de transcripció de la família *Snail* (Snail,Slug) es distribueixen de forma característica i diferencial en petits subdominis nuclears. Si més no per a *Snail*, la distribució en aquests dominis és depenent de diferents parts de la proteïna, i precisa de la fosforilació del domini Ric en Serines. Aquests subdominis nuclears són situats en els espais intercromatínics, i les seves característiques suggereixen que corresponen a "speckles" nuclears, o llocs de col·lecció de factors implicats en el processament dels ARNm (*splicing*). *Snail* co-localitza en aquestes circumstàncies amb el factor de processament *U2AF65*, implicat entre d'altres processos amb els mecanismes d'export nuclear dels ARNm processats.

Quan Snail és al nucli es localitza en petits subdominis, preferentment en les formes que poden ser exportades

eGFPSnail i mmSnail+IF es disposen en subdominis nuclears puntiformes i mòbils de petita mida, situats als espais intercromatínics

El bloqueig de l'export d'*mSnail* amb *LMB* porta a la seva acumulació dins el nucli. En aquest compartiment cel·lular, *mSnail* té una elevada tendència a disposar-se en petits cúmuls distribuïts pel nucleoplasma. Aquest fenomen no és pas atribuïble a la presència d'*eGFP* en les proteïnes de fusió, ja que també és reproduït per la proteïna amb l'*etiqueta* d'*Hemaglutinina*. Aquests petits cúmuls són en nombre variable, entre 20 i 50 depenent de la cèl·lula, i són l'única localització d'*Snail* dins el nucli, o bé coexisteixen amb un patró de distribució difós (***Fig Rs-29***). En qualsevol cas, *mSnail* mai és trobat en el sí dels nuclèols ni hi co-localitza, fet d'altra banda equivalent al què s'observa amb d'altres factors de transcripció.

Els petits subdominis on es distribueix *mSnail* formen part dels anomenats *espais (o grànuls) intercromatínics* (*Spector D, J Cell Sci 2001;* i ***Fig Rs-29***). Les tincions per ADN (*iodur de propidi , TOP-RO*) no co-localitzen amb aquestes estructures, que es disposen en les regions on l'ADN és absent o no detectable. Aquesta observació és un fet consistent i reproduïble en les diverses línies cel·lulars avaluades.

Els subdominis nuclears on es distribueix Snail són possiblement "speckles"

El nucli de les cèl·lules eucariotes és una estructura altament compartimentada, fet que sembla essencial per a la seva funció (*Spector D, J Cell Sci 2001; Misteli T, Science 2001*). En el cas dels mamífers, la complexitat és molt elevada. Aquests compartiments nuclears són extraordinàriament dinàmics, s'auto-organitzen responent a les necessitats funcionals i en el seu interior hi tenen lloc processos específics. És possible identificar proteïnes característiques de cadascun, i d'altres que fluctuen entre compartiments diversos. La transcripció i el processament dels pre-ARNm condicionen tanmateix la seva organització.

La distribució i aspecte morfològic dels diversos compartiments nuclears al microscopi permet identificar-los amb certa fiabilitat (*Spector D, J Cell Sci 2001; i "Nuclear Protein-Domain Database",npd.hgu.mrc.ac.uk/compartments.html*). La distribució d'*Snail* recorda a la dels anomenats "*speckles*" nuclears ("*punts*" *nuclears*), o bé a la dels cossos *PML* (*cossos nuclears de la leucèmia pro-mielocítica*). En ambdós casos la distribució exclou els nuclèols i la cromatina. Tanmateix, l'abundància numèrica és més coincident amb els "*speckles*".

La majoria de proteïnes que s'associen a l'ADN, com els factors de transcripció, tenen una distribució difusa en el nucleoplasma que

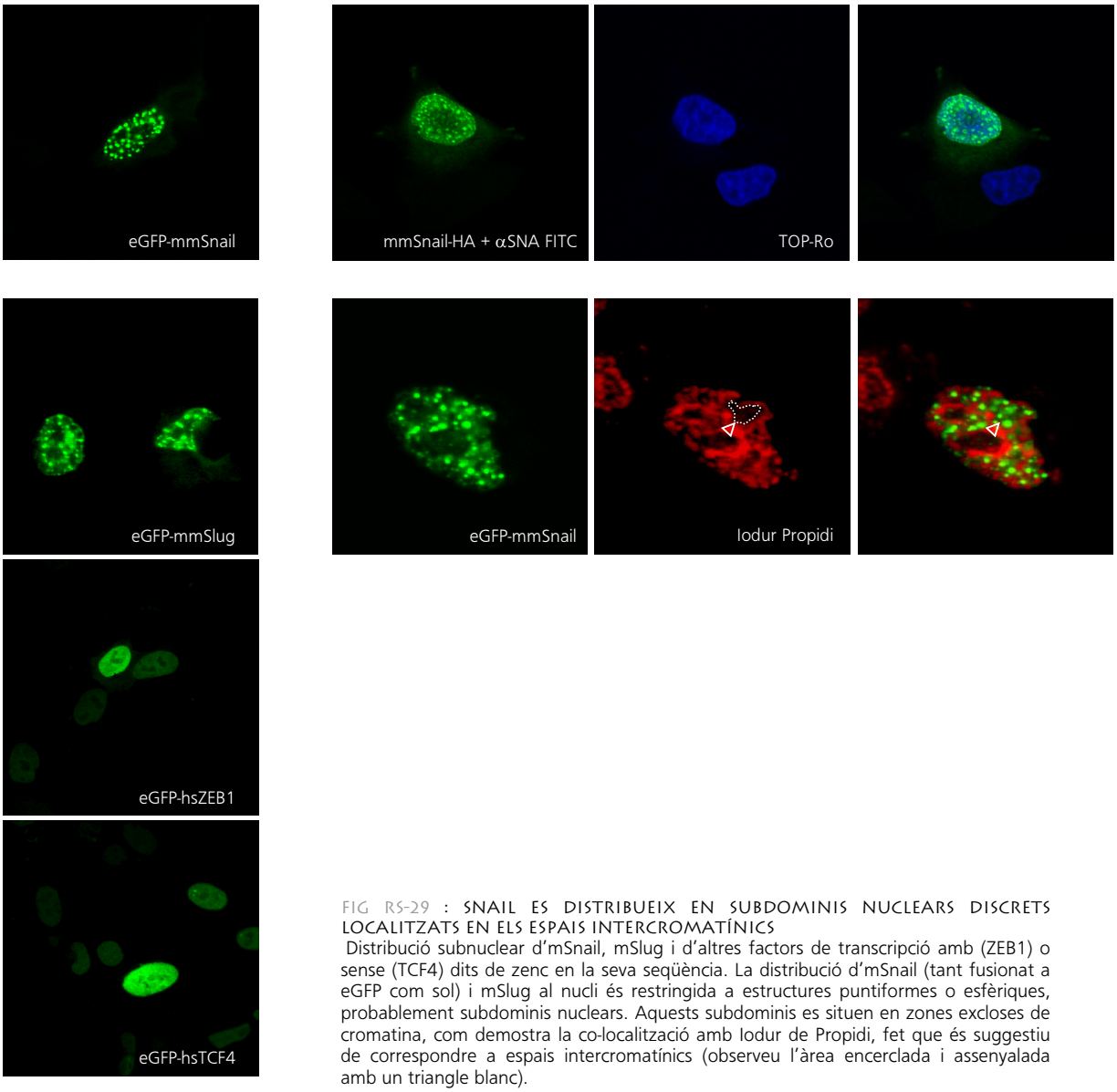


FIG RS-29 : SNAIL ES DISTRIBUEIX EN SUBDOMINIS NUCLEARS DISCRETS LOCALITZATS EN ELS ESPAIS INTERCROMATÍNICS
Distribució subnuclear d'mSnail, mSlug i d'altres factors de transcripció amb (ZEB1) o sense (TCF4) dits de zenc en la seva seqüència. La distribució d'mSnail (tant fusionat a eGFP com sol) i mSlug al nucli és restringida a estructures puntiformes o esfèriques, probablement subdominis nuclears. Aquests subdominis es situen en zones excloses de cromatina, com demostra la co-localització amb Iodur de Propidi, fet que és suggestiu de correspondre a espais intercromatínics (observeu l'àrea encerclada i assenyalada amb un triangle blanc).

usualment exclou els nuclèols. Més de la meitat de les proteïnes nuclears tenen aquesta distribució, que és la què adopten de forma característica els factors de transcripció amb dits de zenc del tipus *C2H2*, el més abundants (*Sutherland HG et al, Hum Mol Genet 2001*). És el cas de *ZEB-1*, que disposa de diversos dits de zenc (vegeu ***Fig Rs-29***). Això no és així, però, per *mSnail* i *mSlug* (*Hemavathy K et al, Mol Cell Biol 2000*).

mSlug té un patró de distribució nuclear similar al d'*mSnail* (***Fig Rs-29 i 20C***). Hemavathy i col·laboradors han definit que *hsSlug* es distribueix en "*speckles*" i no pas en cossos *PML*, i probablement doncs, això deu ocórrer amb *mSnail* (descarto així en part la possibilitat dels cossos *PML*, i em quedo amb la hipòtesi dels "*speckles*" per *mSnail*). Aquests autors consideren que aquesta distribució depèn de la seva associació a llocs de transcripció activa (*Hemavathy K et al, Mol Cell Biol 2000*).

Hem avaluat la distribució en *speckles* en funció de l'activitat transcripcional, mitjançant una aproximació simple. L'*Actinomicina D* es considera un efectiu inhibidor transcripcional, en bloquejar la síntesi de l'ARNm. El tractament amb

Actinomicina D de cèl·lules HeLa que expressaven transitòriament *eGFP-mSnail* no va causar cap mena de pertorbació en la distribució subnuclear d'*mSnail*, si més no de forma evident. Hom esperaria que, de tractar-se de llocs de transcripció activa, els petits subdominis rics en *mSnail* es dissolguessin o reorganitzessin, però no és el cas. Donat que els *speckles nuclears* són llocs d'acumulació de factors d'splicing-processament de l'ARNm, però no llocs de transcripció (vegeu més endavant), aquesta dada reforça en major grau la idea que *mSnail* s'acumula en aquest tipus d'estructures.

La distribució nuclear en "*speckles*" d'*mSnail, mSlug* i *hsSlug* no la comparteix *mScratch*, l'altre membre de la *superfamília Snail* en vertebrats[NP59], el qual té una distribució nuclear difusa (*Nakakura EK et al, Proc Natl Acad Sci 2001*). Sembla doncs que la distribució "puntejada" és només característica de la *família Snail* en vertebrats. Tanmateix se'n desconeix el sentit biològic i funcional [NP60].

La localització en speckles precisa que Snail sigui desplegat (o fosforilat), del domini ric en serines i dels 3 primers dits de zenc

L'estudi de la distribució nuclear dels diferents mutants d'*mSnail* fusionats a *eGFP* ens orienta a pensar que la localització en "*speckles*" depèn de diverses regions de la proteïna. Per tant, només en alguna conformació espacial *mSnail* és capaç de distribuir-se en aquests compartiments. D'altra manera, roman difós per nucleoplasma.

Re-localitzar *mSnail* al nucli des del citosol no és suficient per a què aquest es disposi en "*speckles*". Com mostra la ***Fig Rs-30***, *LMB* només és capaç de fer-ho quan la molècula és íntegra, per bé que els dits de zenc per ells sols, no són tampoc suficients. Calen ambdues meitats, doncs. D'acord amb això, el mutant *Leu(139/142)Ala*, que no pot ésser exportat però és íntegre, es disposa en aquests petits compartiments de forma predominant.

L'eliminació del domini ric en serines (*mSnail (Δ90-120)*) re-localitza *mSnail* al nucli. La distribució és però difosa i això indica que aquest domini és implicat en la distribució d'*mSnail* als "*speckles*" (***Fig Rs-30***). Per ell sol no és però suficient, perquè una proteïna de fusió entre *eGFP* i el domini ric en serines (*eGFP-mSnail (90-120)*) malgrat trobar-se parcialment al nucli (amb més avidesa que *eGFP* sola?), no és localitzada en "*speckles*" (***Fig Rs-30***).

D'acord amb els resultats, és condició necessària que estigui fosforilat, ja que només el mutant *S/D* (no l'*S/A*) es distribueix en aquests compartiments quan és forçat a entrar al nucli amb *LMB*. Això ens exhorta a pensar que només quan l'*mSnail* és desplegat i en condicions d'ésser exportat fora del nucli (essencialment fosforilat en el domini ric en serines), es localitza en "*speckles*". D'acord amb això, l'eliminació de l'últim dit de zenc d'*Snail* (*eGFP-mSnail (1-236)*), no canvia la seva re-localització als "*speckles*" després de bloquejar-ne la sortida del nucli amb *LMB*. (***Fig Rs-30***). Aquesta deleció permet l'export d'*mSnail*, però conserva el domini ric en serines. L'eliminació d'aquest domini en el mateix mutant (així doncs,

[59] *Scratch* manté una certa homologia en la seva meitat C-terminal amb *Snail* i *Slug* a vertebrats, i amb *Worniu*, *Snail* i *Escargot* a *Drosophila*. Es creu que malgrat provenir d'ancestres comuns, *Scratch* ha seguit una evolució diferent, ja que no conserva l'homologia esperada en els dits de zenc que defineixen la família *Snail* integrada per *Snail* i *Slug* en vertebrats. Així, és possible definir-ne homòlegs perquè aquests dits de zenc diferents, i una regió de la meitat N-terminal, només són presents a *Scratch* en les diferents espècies on s'ha pogut aïllar (*Manzanares M et al, Trends Gen 2001; Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*)

[60] Els *speckles* són estructures dinàmiques, i així ocorre amb els què fa *Snail*. En assaigs de "time-lapse" o "microscopia confocal en temps real", hem pogut observar la seva mobilitat dins el nucli. Es desplacen petites distàncies, oscil·len i es combinen o canvien de plà a relativa velocitat.

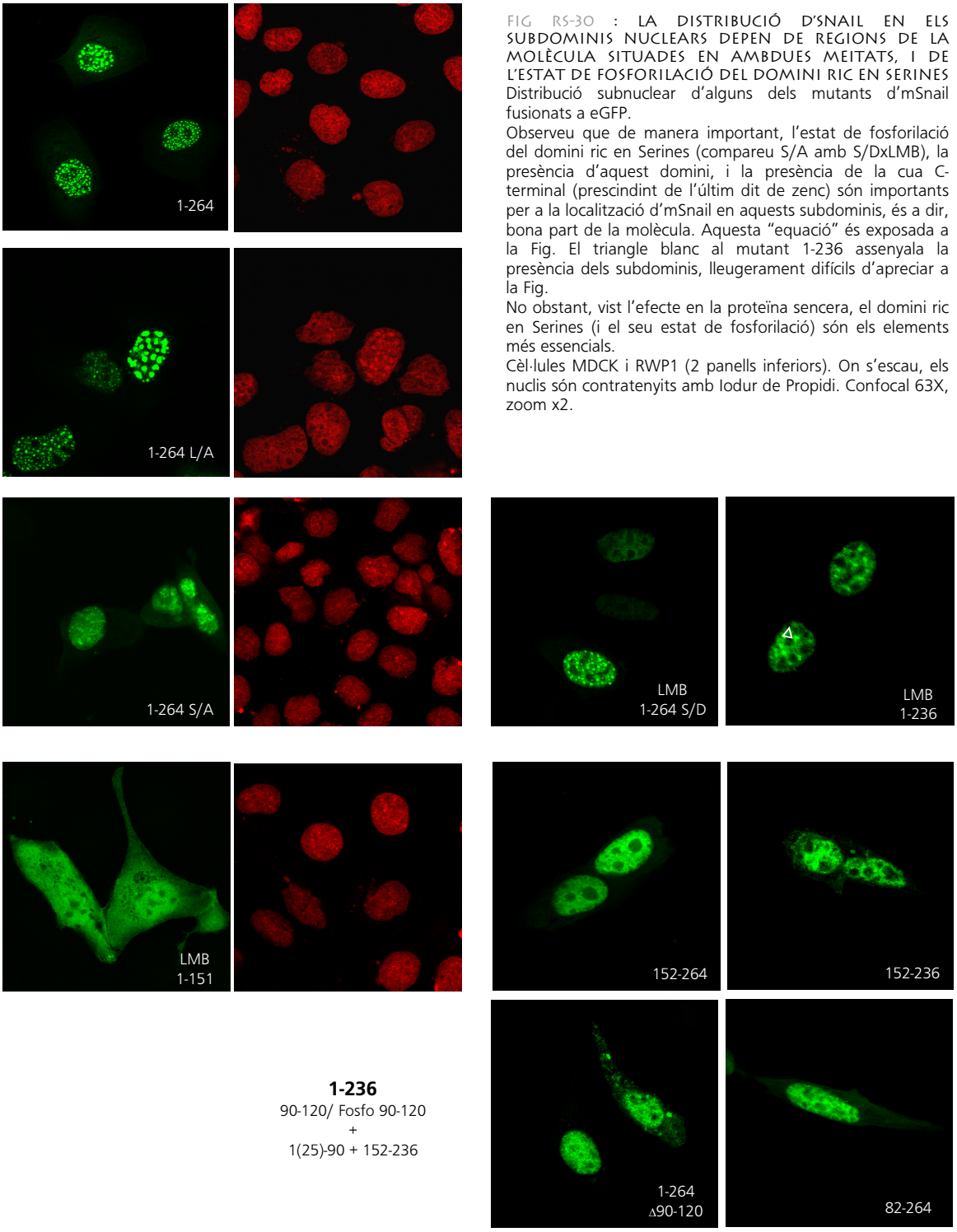


FIG RS-30 : LA DISTRIBUCIÓ D'SNAIL EN ELS SUBDOMINIS NUCLEARS DEPEN DE REGIONS DE LA MOLÈCULA SITUADES EN AMBDUES MEITATS, I DE L'ESTAT DE FOSFORILACIÓ DEL DOMINI RIC EN SERINES
Distribució subnuclear d'alguns dels mutants d'mSnail fusionats a eGFP.
Observeu que de manera important, l'estat de fosforilació del domini ric en Serines (compareu S/A amb S/DxLMB), la presència d'aquest domini, i la presència de la cua C-terminal (prescindint de l'últim dit de zenc) són importants per a la localització d'mSnail en aquests subdominis, és a dir, bona part de la molècula. Aquesta "equació" és exposada a la Fig. El triangle blanc al mutant 1-236 assenyala la presència dels subdominis, lleugerament difícils d'apreciar a la Fig.
No obstant, vist l'efecte en la proteïna sencera, el domini ric en Serines (i el seu estat de fosforilació) són els elements més essencials.
Cèl·lules MDCK i RWP1 (2 panells inferiors). On s'escau, els nuclis són contratenyits amb Iodur de Propidi. Confocal 63X, zoom x2.

eGFP-mSnail (1-236,Δ90-120)) fa que *mSnail* torni a ésser reubicat al nucli, però no en *speckles*.

L'Snail exportable es distribueix en speckles

En la proteïna sencera, la redistribució en "*speckles*" nuclears és progressiva, i no ocorre només amb el bloqueig de l'export nuclear, ni tampoc és immediata. La distribució inicial d'*mSnail* en entrar al nucli és difosa pel nucleoplasma. En poc temps, però (20' després del bloqueig amb *LMB*, vegeu ***fig Rs-31***), la proteïna és reubicada en aquests compartiments.

A tenor de les distribucions subnuclears dels diferents mutants i de les dades derivades del seguiment en el temps de la distribució nuclear, proposem que els "*speckles*" són compartiments pre-export, o millor, que l'*mSnail* localitzat en aquests subdominis, és proper a ésser exportat fora del nucli. De fet, la conformació espaial de la proteïna necessària en ambdues situacions és la mateixa.

En els speckles, Snail co-localitza amb alguns factors d'splicing de l'ARN i no amb l'ADN

La majoria de components dels *speckles* són factors de processament o "*splicing*" del pre-ARNm i snRNPs (Ribonucleoproteïnes petites). S'associen estructuralment als espais intercromatínics i amb les zones de transcripció activa i els ARNm naixents. De fet, hi ha un acoblament força eficient i específic entre els *speckles* i els llocs de transcripció activa. Així, és demostrat que els factors d'splicing són reclutats des dels *speckles* cap als llocs de transcripció, que poden o no estar propers físicament als primers (*Misteli T, J Cell Sci 2000 i cites allí referenciades*). En gens amb alta activitat transcripcional, el focus de transcripció activa és adjacent o inclòs a l'*speckle*. Els factors de processament reclutats des dels *speckles* es traslladen als focus de transcripció i participen allí del processament dels pre-ARNm.

Els *speckles* són compartiments molt dinàmics, de composició fluctuant, en els quals s'hi poden trobar fins a 150 proteïnes diferents, entre elles factors per al processament 3' de l'ARNm, proteïnes ribosomals, i factors de transcripció. Aquest últim grup és possiblement els menys abundant, i no hi ha gaires dades al respecte (*Misteli T, J Cell Sci 2000*). El fet que trobo més rellevant és que els 2 casos més ben documentats, *WT1* (*Larsson S et al, Cell 1995*) i *ZNF74* (*Grondin B et al, J Biol Chem 1996; i Cote F et al, DNA Cell Biol 2001*), són factors de transcripció amb dits de Zenc *C2H2*, que tenen una funció dual de regulació transcripcional i en el processament dels

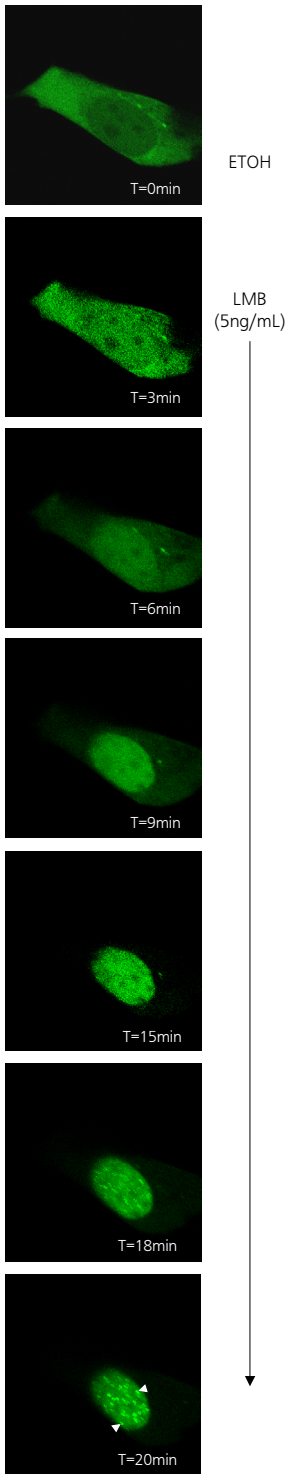


FIG R5-31 : LA LOCALITZACIÓ EN SUBDOMINIS NUCLEARS NO ÉS IMMEDIATA I OCORRE AL CAP DE CERT TEMPS D'ESTAR SNAIL AL NUCLI

Imatges seqüencials obtingudes en un seguiment en temps real (time-lapse) d'una cèl·lula RWP1, transfectada amb eGFP-mSnail i tractada amb LMB (5ng/ml) i Cicloheximida per inhibir la síntesi de novo. Els temps als quals foren preses les imatges són indicats en cada fotograma.

Observeu que fins al cap de 10 minuts d'ésser Snail essencialment nuclear, no comença a organitzar-se en subdominis nuclears (assenyalats amb triangles blancs). Aquest procés no sembla però dependre de síntesi de noves proteïnes i és possiblement associat a la mateixa molècula. Tanmateix suggereix que el procés que el permet re-localitzar-se en aquests subdominis (fosforilació?) deu tenir lloc al nucli.

Confocal 63X i x2.5zoom, time-lapse.

ARNm[P61]. Els dits de zenc participen d'ambdues funcions.

Snail co-localitza amb U2AF65

Per a verificar que, per la distribució subnuclear, *mSnail* era associat a compartiments on es trobaven també factors d'splicing, vàrem avaluar el grau de co-localització entre ambdós factors. L'ADNc codificant pels factors d'splicing *SC35* i *U2AF65*, amplificat amb oligonucleòtids específics basat en les seqüències publicades al GenBank (vegeu *Material i Mètodes*), fou clonat en un vector que conté la proteïna vermella fluorescent (*RFP*) per a generar proteïnes de fusió vermelles. Aquests constructes foren co-transfectats amb *eGFP-mSnail* i la co-localització d'ambdós en els *speckles* avaluada amb microscòpia confocal (***Fig Rs-32***). L'elecció d'aquestes dues proteïnes fou realitzada en base a la literatura publicada prèviament. *SC35* és una proteïna de la família *SR* [NP62] i s'utilitza de forma assídua com a marcador d'*speckles*, i tanmateix era conegut que co-localitzava amb *mSlug* al nucli (*Hemavathy K et al, Mol Cell Biol 2000*). *U2AF65* és descrit que interacciona físicament i co-localitza amb *WT1* al *speckles (Davies RC et al, Genes Dev 1998)*, i aquesta raó ens va semblar suggerent, donades les similituds que, des del punt de vista biològic (vegeu en la *Discussió*), comparteix amb *Snail*.

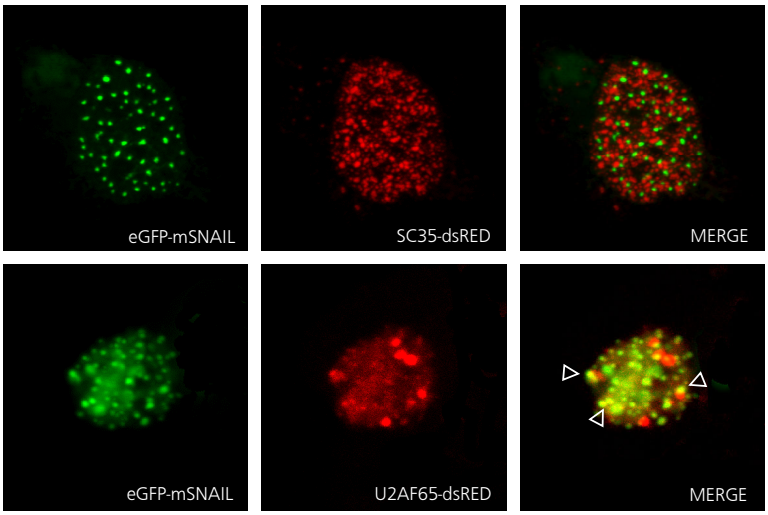


FIG RS-32 : SNAIL ES DISTRIBUEIX EN COMPARTIMENTS OCUPATS PER FACTORS DE PROCESSAMENT DE L'ARNm (SPECKLES)
Estudis de co-localització ente eGFP-mSnail i els factors de processament de l'ARNm SC35 i U2AF65 de ratolí, fusionats a dsRed (proteïna vermella fluorescent), en cèl·lules NIH-3T3. Els focus que co-localitzen apareixen en color groc. Si bé la co-localització amb SC35 és nul·la, la co-localització amb el factor U2AF65 és força evident (i observeu fletxes).
Confocal 63X i x3zoom. Les imatges mostrades són representatives de més del 70% dels nuclis transfectats en l'assaig, que fou repetit per duplicat.

Si bé la correspondència entre *SC35* i *mSnail* és escassa, hi ha un acceptable grau de co-localització amb el factor *U2AF65* a vàries línies cel·lulars (HeLa, NIH-3T3, MDCK). No obstant, no té lloc en tots els *speckles*, fet possiblement explicable pel flux constant de components que ocorre en aquests compartiments (***Fig Rs-32***). Cap també la possibilitat que aquesta co-localització parcial correspongui a la coincidència espaial entre els "speckles" reals i focus d'activitat transcripcional on es trobaria *Snail*. Tanmateix

[61] *WT-1* és associat a la *Síndrome de Denys-Drash*, la *Síndrome de Frasier* (dues malalties congènites amb anomalies urogenitals) i el *tumor* pediatric *de Wilms* quan és mutat o translocat, i participa en el desenvolupament embrionari del ronyó i les gònades. *ZNF74* és associat a la *Síndrome de DiGeorge* i al desenvolupament d'algunes estructures derivades de la cresta neural, associades a l'aparell cardiovascular.
La decisió sobre la participació en un o altre procés sembla ser mediada pel processament diferencial de l'ARNm que codifica per ambdós factors.

[62] *SR* o *Riques en Serina(S)-Arginina(R)*, per tenir tàndems de seqüències riques en aquests dos aminoàcids que participen de la localització subnuclear d'aquests factors, i modulen el seu fluxe entre els *speckles* i els llocs de transcripció o el citosol per fosforilació (*Misteli T, J Cell Sci 2000; i Cáceres JF et al, J Cell Biol 1997*).

(vegeu en pàgines anterior, *Fig. 30*), els mutants que perden la capacitat de situar-se en aquests compartiments - com el mutant sense el domini ric en serines (Δ90-120) o el mutant S/D hiperfosforilat, no perden la seva activitat transcripcional o la seva afinitat per l'ADN (respectivament), i en conseqüència indiquen que l'activitat com a repressor associada a *Snail* no depén directament de la seva distribució als "speckles". Això fa més rellevant la co-localització amb factors com *U2AF65* en aquests subdominis nuclears.

U2AF65 (*Gama-Carvalho M et al, J Cell Biol 1997*) és un factor d'splicing implicat en el processament 3' dels ARN, i tanmateix en el processament depenent de seqüències amplificadores o "enhancers" (*Graveley BR et al, RNA 2001*). També és implicat en els mecanismes d'export nuclear dels ARNm processats, i de fet, la seva absència comporta en bona part el bloqueig d'aquest (*Zolokhutin AS et al, J Biol Chem 2002*). Val a dir que *WT1* tampoc co-localitza amb *SC35* (*Englert C et al. PNAS 1995*).

La co-localització entre *mSnail* i el factor d'splicing *U2AF65* en els *speckles*, planteja l'atractiva possibilitat que *mSnail* pugui ésser relacionat amb la modulació del processament de l'ARNm al nucli.

RESULTATS

SIGNIFICAT BIOLÒGIC DELS MECANISMES DE REGULACIÓ NO TRANSCRIPCIONAL (II)

QUÈ FA *SNAIL* FORA DEL NUCLI, I QUÈ TE A VEURE AIXÒ AMB LA SEVA REGULACIÓ

La conformació que permet *Snail* ésser exportat fora del nucli facilita la seva interacció amb la xarxa de microtúbuls i els centrosomes. *Snail* s'associa preferentment als microtúbuls polimeritzats. El domini d'interacció és situat a la meitat C-terminal i implica possiblement a algun/s dels 3 primers dits de zenc. Aquesta associació afecta de forma important el dinamisme microtubular, i així l'efecte d'*Snail* és essencialment orientat a estabilitzar la xarxa microtubular. L'activació de la GTPasa petita *RhoA* podria ésser el vincle entre l'associació als microtúbuls i la seva estabilització (vegeu a la *Discussió*).

Aquesta estabilització dóna lloc a canvis post-traduccionals en els microtúbuls que són basats en la detirosinació de l'*α-tubulina*. Això últim és descrit que permet el reclutament de quinesines a la xarxa, la polarització de la cèl·lula, i la reorganització del citosquelet de filaments intermediaris de vimentina; comportant un canvi en la forma cel·lular, i és possible que la inducció de la motilitat.

Quan Snail és fora del nucli, té avidesa pel citosquelet

En la majoria de cèl·lules de cada línia epitelial i també mesenquimal (NIH-3T3) estudiades, *mSnail* té una distribució mixta, entre nucli i citosol. Els patrons purs nuclears o citosòlics són en aquests casos els de menor freqüència (vegeu ***Fig 20-B***). En aquesta cohabitació, l'*mSnail* nuclear és preferentment distribuït en "*speckles*". No obstant, tant específic com el patró nuclear és el patró citosòlic.

Snail decora el citosquelet de les cèl·lules on és expressat

La visualització amb detall de la distribució citosòlica d'*mSnail-HA* i *eGFP-mSnail* en les cèl·lules mostra que el patró, lluny de ser difós i inespecífic com el d'e*GFP* sola, és extraordinàriament ric. Així, *mSnail* dibuixa amb precisió una xarxa d'estructures filamentoses força florida (***Fig Rs-33***), que en algunes línies cel·lulars com les MCF-7 o les Caco-2 és predominant. Aquest patró recorda clarament el què genera el citosquelet cel·lular, i indica que la distribució d'*mSnail* fora del nucli és selectiva i específica, sigui com a reservori o com a element funcional.

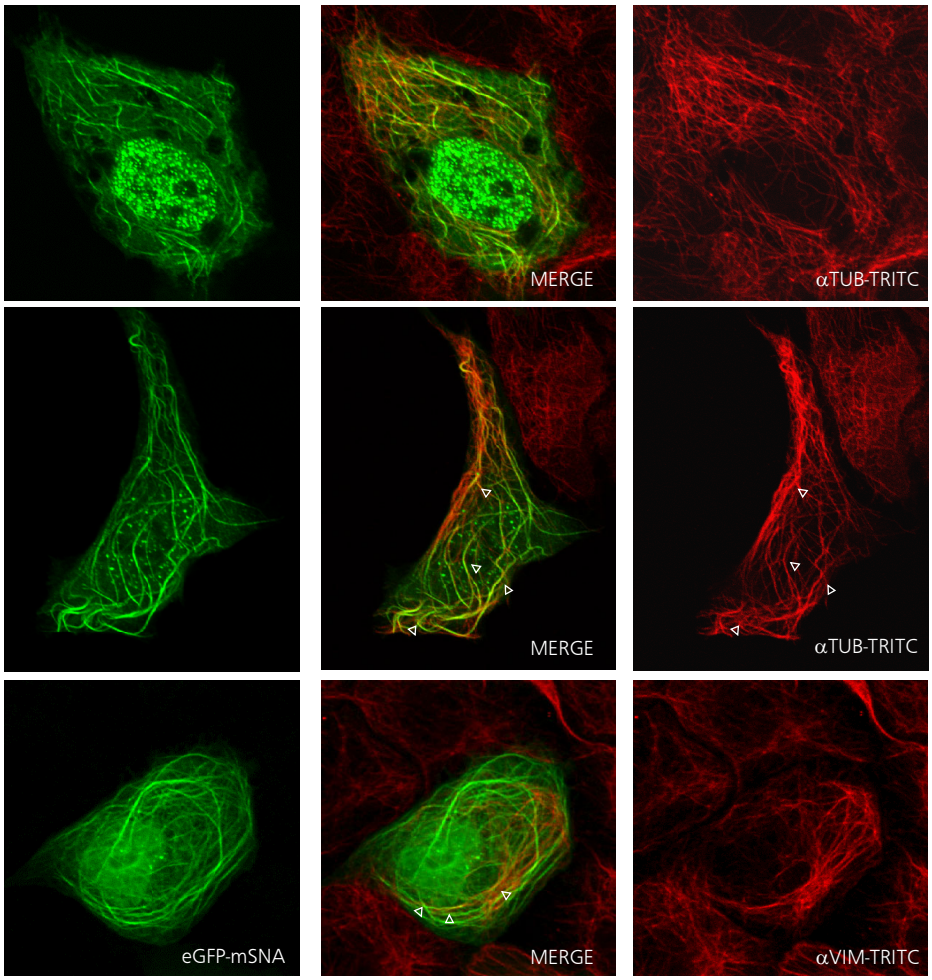
Un sistema de regulació que juga amb la localització subcel·lular

Aquesta última part experimental és dedicada a l'estudi de la distribució citosòlica d'mSnail, de la seva rellevància funcional -si és que existeix-, i del seu significat. D'acord amb els resultats mostrats fins aquí, aquesta és la peculiaritat més destacada d'mSnail respecte d'altres membres de la família com Slug, o d'altres factors de transcripció. Pel què hem demostrat, les cèl·lules disposen d'un mecanisme complex que determina de forma eficient la localització subcel·lular de la proteïna, i això dóna a la localització citosòlica, en el meu parer, una major importància biològica.

Algunes dades recolzen un efecte no transcripcional d'Snail i excloent de la localització nuclear

Moltes de les funcions atribuïdes a *Snail* i la família gènica de la què forma part no poden ser del tot explicades, pel moment, per la seva activitat transcripcional (*Ip YT i Gridley T, Curr Opin Gen Dev 2002, Hemavathy K et al, Gene 2000; Cai Y et al, EMBO J 2001; Groβhans J i Wieschaus E, Cell 2000; Ashraf SI i Ip YT, Development 2001*). Aquests processos són essencialment l'efecte que *Snail* té sobre divisió cel·lular i progressió del cicle (control de la divisió asimètrica dels neuroblastes a *Drosophila*, parada

A.



B.

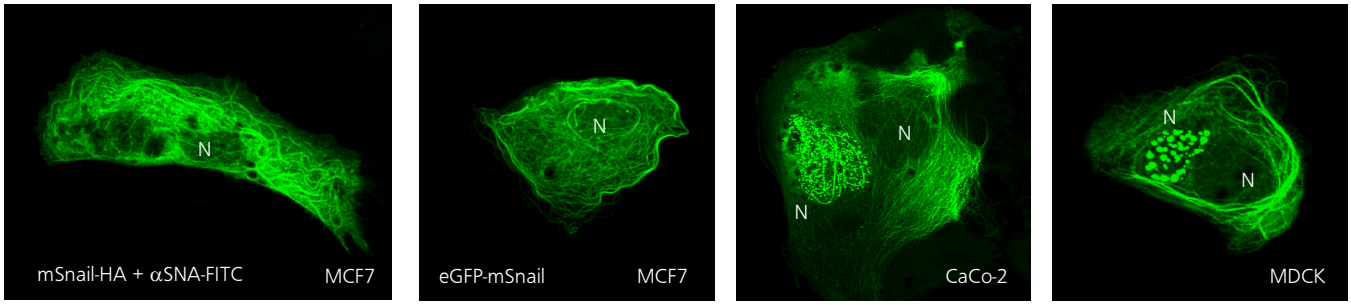
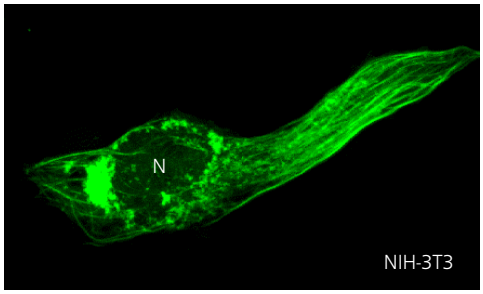


FIG RS-33 : L'SNAIL CITOSÒLIC TÉ AVIDESA PEL CITOSQUELET, ON CO-LOCALITZA EXCLUSIVAMENT AMB LA XARXA DE MICROTÚBULS
(A)Estudis de co-localització entre eGFP-mSnail i els diversos tipus d'estructures del citosquelet (microtúbuls, filaments intermediaris i actina). Snail co-localitza exclusivament amb els microtúbuls (files primera i segona), que decora en tota la seva longitud. Les fletxes assenyalen franques co-localitzacions, que apareixen en color groc. Malgrat que la co-localització amb Vimentina és escasa, s'estableix certa relació en la orientació espaial (vegeu les fletxes en la imatge), dada que és revisada en detall a la *Discussió* i la *Fig Rs-43*. La co-localització amb les citoqueratines de baix pes i els filaments d'actina era nul·la, i no són aquí mostrades. L'α-tubulina i vimentina són detectades per immunofluorescència indirecta amb anticossos específics i secundaris conjugats a Alexa 594 (fluorescència vermella)(B) La distribució microtubular és evident en totes les línies cel·lulars testades, incloses les mesenquimals (NIH-3T3), i ocorre tant amb la fusió a eGFP com amb la proteïna nua, detectada per immunofluorescència. De forma cridanera, en algunes línies cel·lulars (vegeu MCF-7, CaCo2) aquesta localització és practicament exclusiva i la localització nuclear és escasa o absent (N, regió nuclear o nucli).



de cicle cel·lular pre-gastrulació, inhibició dels cicles d'endoreduplicació), i sobre la motilitat cel·lular. Alguns autors han suggerit mecanismes transcripcionals directes o indirectes per explicar alguns d'aquests efectes (*Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002; Ashraf SI i Ip YT, Development 2001*). Aquesta explicació té l'inconvenient de que cal invocar alguns gens diana d'*Snail* que encara no han estat mai descrits. D'altres autors però, han descartat aquesta possibilitat (*Cai Y et al, EMBO J 2001, Groβhans J i Wieschaus E, Cell 2000*) i han suggerit un possible efecte post-transcripcional, difícil de justificar si *Snail* és estrictament nuclear. Les nostres observacions, però aporten l'evidència que *Snail* no és només al nucli, sinó també al citosol. I malgrat aquesta distribució pot ser purament atzarosa -si el citosol s'utilitzés com espai de retenció, els possibles efectes no transcripcionals d'*Snail* podrien tenir aquesta localització subcel·lular com a substrat.

Snail s'uneix als microtúbuls de les cèl·lules epitelials i mesenquimals

mSnail co-localitza amb la xarxa microtubular i no altre

La possibilitat que *mSnail* es trobés associat al citosquelet cel·lular (vegeu ***Fig Rs-33***) ens va portar a determinar amb exactitud amb quina de les estructures del citosquelet ho feia.

L'aproximació més immediata fou avaluar el grau de co-localització entre les estructures filamentoses on s'associa *eGFP-mSnail* i els diferents tipus de filaments intermediaris i/o els microtúbuls. Després d'expressar transitòriament *eGFP-mSnail*, les cèl·lules foren fixades i es varen realitzar deteccions per immunofluorescència dels filaments intermediaris de *vimentina*, *actina*, *citoqueratines* i dels microtúbuls (*alfa-tubulina*). En totes les línies cel·lulars avaluades (RWP1, MDCK, NIH-3T3), els resultats obtinguts foren equivalents.

Com mostra la ***Fig Rs-33***, *eGFP-mSnail* co-localitza estrictament amb la xarxa microtubular. No hi ha correspondència entre *mSnail* i la resta de filaments intermediaris testats (incloses les *citoqueratines* i *actina*), a excepció del què ocorre amb *vimentina*, que ocasionalment s'orienta al voltant dels microtúbuls decorats per *Snail* . Aquest últim fet és comentat més endavant i en la *Discussió* (i vegeu més endavant ***Fig Rs-43***). Si bé no tots els microtúbuls tenen *Snail* associat, totes les estructures filamentoses decorades per *mSnail* són microtúbuls. La proteïna nua, sense l'*eGFP*, presenta una distribució similar.

La unió a microtúbuls és preferent en algunes línies cel·lulars i és alternativa a la localització nuclear

La co-localització amb la xarxa de microtúbuls és la distribució preferida en alguns tipus cel·lulars com les MCF7. En aquestes, gairebé el 90-95% de les cèl·lules tenen *mSnail* en una distribució estrictament microtubular (***Fig Rs-33B***). Com ja havíem citat, en aquestes cèl·lules la distribució nuclear d'*mSnail* és minsa (fet molt més evident en l'estudi de l'*eGFP-mSnail* que no pas d'*mSnail*-HA, on fins un 20% de les cèl·lules tenen ocasionalment *mSnail* en *speckles nuclears*). Quelcom semblant s'aprecia en les cèl·lules Caco-2.

L'aspecte de la xarxa microtubular decorada per *mSnail* és sensiblement diferent en les cèl·lules epitelials que en els fibroblasts (NIH-3T3). En les primeres té tendència a orientar-se paral·lela a l'eix longitudinal de la cèl·lula (quan és allargada, o paral·lela al l'eix de migració) o bé constitueix una malla força rica i entreteixida (quan les cèl·lules són en el sí d'una colònia). Ocasionalment és possible observar 2 petites estructures puntiformes tenyides, d'on en casos és possible veure radiar alguns microtúbuls, i que

hom pot interpretar com centrosomes. En el cas dels fibroblasts, aquestes estructures puntiformes són força més fàcils d'observar, i la xarxa microtubular on s'hi associa *mSnail* en radia en la seva totalitat, fet que encara suggereix amb més pes que es tracti de centriols-centrosomes (***Fig Rs-34***). Certament, els assaigs de co-localització amb *gamma-tubulina* -que és un tipus de tubulina bàsicament associada als centrosomes (i implicada en la seva nucleació)- confirmen que *mSnail* també és associat específicament a aquestes estructures (***Fig Rs-34***). Cal esmentar que la presència de dos cossos centriolars suggereix que el centrosoma ha estat duplicat i per tant, que les cèl·lules on és evident aquesta imatge són per definició en fase S o G2 del cicle. La relació d'*Snail* amb el cicle cel·lular, que no forma part d'aquest treball, és actualment objecte d'estudi al nostre grup.

Les diferències entre les xarxes observades en cèl·lules epitelials o fibroblasts només reflecteixen el fet que la xarxa microtubular d'aquestes dues estirps cel·lulars és diferent. Així, en les cèl·lules epitelials els microtúbuls es distribueixen en dues poblacions diferents: una associada als centrosomes (l'única què és present en els fibroblasts), i una altra desvinculada d'aquests, i depenent dels processos de polarització epitelial i l'establiment de les unions adherents, i en els quals juga un rol fonamental (*Chausovsky A et al, Nat Cell Biol 2000; Ligon LA et al, Nat Cell Biol 2001*). *mSnail* sembla associar-se a ambdós tipus de microtúbuls.

Snail afecta la dinàmica microtubular com ho fan les proteïnes motores associades a microtúbuls

Si bé és ocasionalment discontínua i en petits cúmuls, la distribució usual d'*mSnail* als microtúbuls és homogènia, de forma que els decora en tota la seva longitud, fins i tot en el centrosoma (vegeu ***Fig Rs-33 i 34***). Aquest

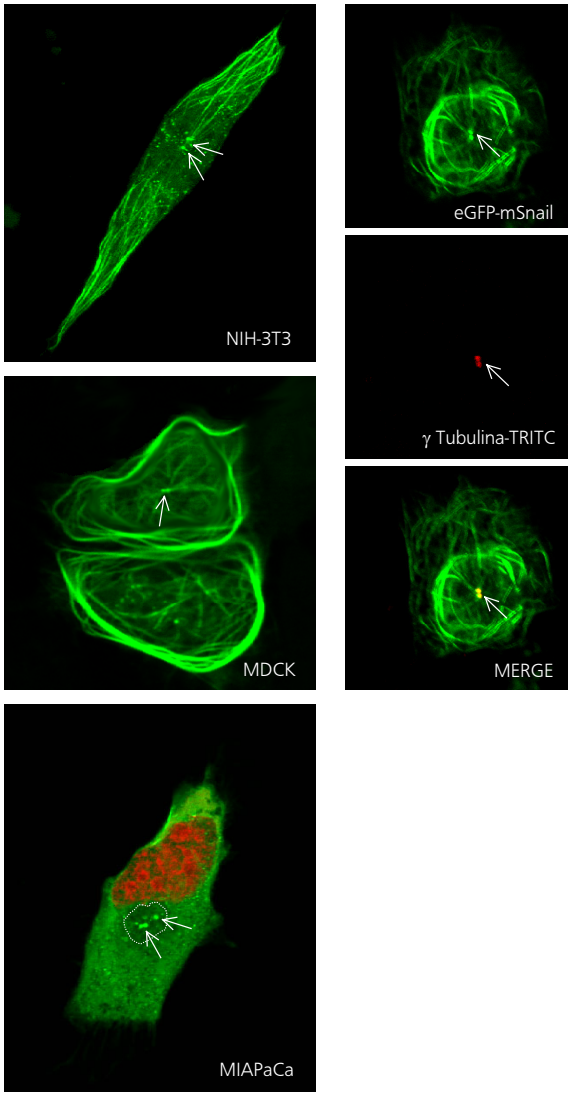


FIG RS-34 : SNAIL CO-LOCALITZA AMB GAMMA-TUBULINA AL CENTROSOMA
Imatges de la distribució subcel·lular de la fusió eGFP-mSnail en diverses línies cel·lulars.
Amb freqüència és possible distingir la localització d'Snail en estructures puntiformes parells i paranuclears (fletxes i cercle demarcant l'espai del centrosoma), de les quals és possible veure radiar la xarxa microtubular en ocasions. Aquestes estructures són centriols, fet confirmat per la presència de gamma-tubulina en el seu sí, i amb la qual mSnail co-localitza (columna dreta i fletxes, NIH-3T3). En la imatge de les MIAPaCa, el nucli és contratenyit amb Iodur de Propidi.
Confocal, 63X i x2zoom.
Gamma-tubulina és detectada amb un anticós primari específic (Sigma, 1:500) i un secundari associat a Rhodamina (TRITC).

arranjament subcel·lular és compartit per altres proteïnes amb funcions essencials per a la dinàmica microtubular, com són les proteïnes motores que s'hi associen (*quinesines, dineïna*), les "*proteïnes acobladores citoplasmàtiques*"

(*CLIP*, *Hoogenraad CC et al, J Cell Sci 2000; Fukata M et al, Cell 2002*) i com és el cas d'*EB-1* (*Berrueta L et al, Proc Natl Acad Sci 1998*). La co-localització amb els microtúbuls en tota la seva longitud i alhora amb els centrosomes es considera pròpia de les proteïnes associades a microtúbuls, als què s'uneixen amb elevada afinitat (*Bienz M, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*), i suggereix que es correspon amb funcions associades a la polimerització i nucleació d'aquestes estructures, així com a la seva estabilització. En aquest sentit, hom esperaria que com en el cas d'*EB-1*, *mSnail* podria ésser també associat al *fus mitòtic* durant la divisió cel·lular, però potser per problemes experimentals, o potser per l'efecte d'*mSnail*, no ens ha estat possible observar cap imatge de mitosi en les cèl·lules que expressaven transitòriament la proteïna de fusió *eGFP-mSnail*.

Fasciculació de microtúbuls i pas de xarxa a feixos-fibres circulars quan és sobrexpressat

Com en el cas de les proteïnes *CLIP-115* i *CLIP-170* [NP63] (vegeu *Hoogenraad CC, J Cell Sci 2000*), la distribució microtubular d'*mSnail* és també variable depenent dels nivells d'expressió de la proteïna (*eGFP-mSnail*). Quan els nivells d'expressió són moderats o molt elevats, és molt possible detectar imatges que suggereixen l'empaquetament dels microtúbuls en feixos que prenen configuracions aberrants, i així ressegueixen el contorn cel·lular o formen manats longitudinals o circulars, de vegades perinuclears. En aquests casos, la morfologia cel·lular canvia sensiblement, condicionada per la forma anòmala del citosquelet. (***Fig Rs-35***).

Aquestes semblances entre *EB-1* o *CLIP-170/115* i *Snail* ens varen suggerir que fora possible que *Snail* s'associes en condicions normals als extrems creixents dels microtúbuls, com ha estat descrit per aquestes proteïnes. Originalment, l'estudi d'aquest tipus d'associació demana de nivells d'expressió propers als endògens, car la sobreexpressió, com hem esmentat, dóna lloc a imatges de decoració completa de la xarxa microtubular. En el cas de l'homòleg d'*EB-1* en llevats, *BIM-1*, es va fer una aproximació experimental consistent en expressar la proteïna fusionada a *GFP* sota el control del promotor endogen de la mateixa proteïna. Això proporcionava nivells de proteïna propers a la normalitat, i va permetre verificar la localització selectiva de *BIM-1* en els extrems creixents dels microtúbuls (*Berrueta L et al, Proc Natl Acad Sci 1998*).

Hem fet una aproximació experimental equivalent amb *eGFP-mSnail*, dirigint-ne l'expressió amb el fragment *-888/+42* del promotor humà (vegeu *Material i Mètodes*), en línies epitelials humanes com RWP1 i en fibroblasts de ratolí NIH-3T3. En cap cas hem pogut evidenciar distribucions diferents a la decoració total dels microtúbuls en tota la seva longitud. És possible que el temps d'expressió emprat (24H) o d'altres fets experimentals no hagin permès fer observacions més precises.

---

[63] Les *CLIP* (*Cytoplasmic Linker Proteins*) són una família de proteïnes implicades en l'acoblament dels microtúbuls a d'altres estructures com els filaments d'actina o organel·les. *CLIP 115* i *CLIP 170* són les més conegudes. *CLIP 170* es creu implicada en l'orientació dels microtúbuls cap als fronts d'avanç de les cèl·lules motils, possiblement reconeixent els canvis moleculars que tenen lloc en aquest punt de la membrana cel·lular. *CLIP 115* és el gen possiblement perdut en la delecció cromosòmica que causa la Síndrome de Williams (*Hoogenraad CC et al, Nat Genet 2002*). També té una funció similar a la de *CLIP 170*, potser en altres sistemes cel·lulars.

EB-1 (End-Binding protein 1) es va descobrir en cercar proteïnes que s'associessin a *APC*. Com les *CLIP*, s'uneix als extrems creixents dels microtúbuls i la seva interacció amb *APC* sembla essencial per al dinamisme microtubular. Aquest complexe, així, és important en el procés de polarització cel·lular però també en la divisió mitòtica, car és capaç de mediar la captura al còrtex cel·lular dels microtúbuls o el mateix procés al quinetocor en mitosi (*Bienz M, Nat Rev Moll Cell Biol 2002*)

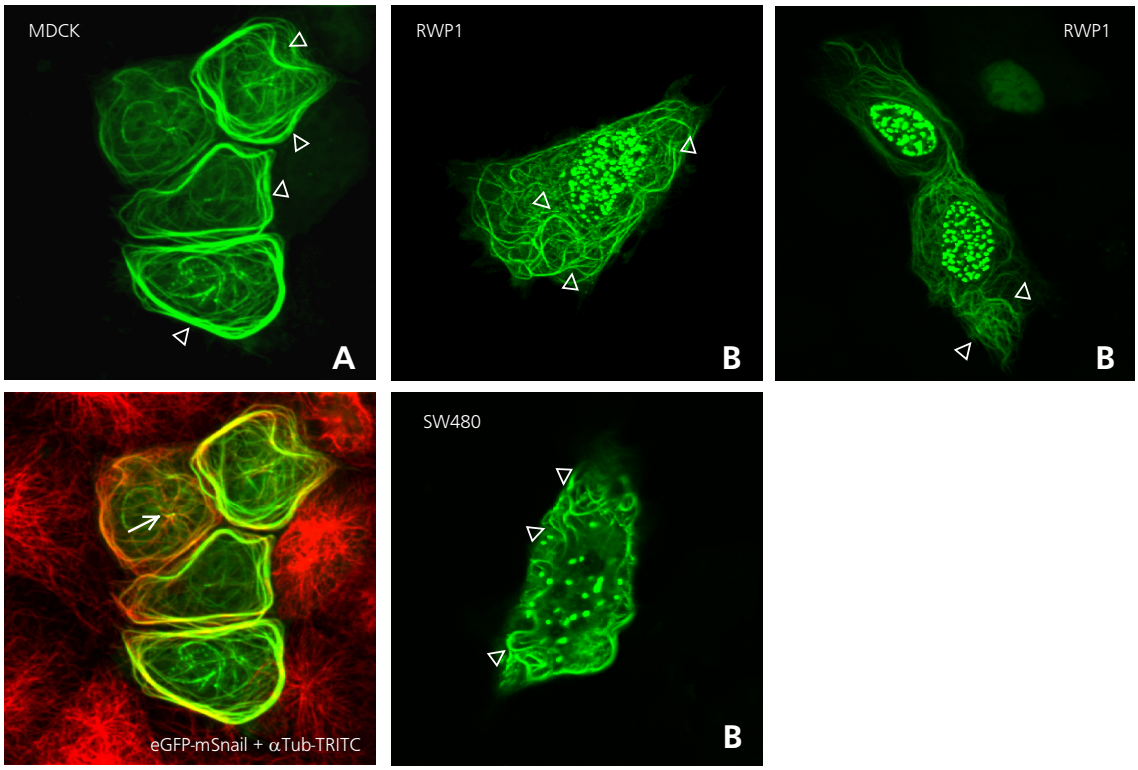


FIG RS-35 : LA UNIÓ D'SNAIL ALS MICROTÚBULS EN CONDICIONA FORMA I DISTRIBUCIÓ, I SUGGEREIX L'EXISTÈNCIA D'UN PROCÉS D'ESTABILITZACIÓ DE LA XARXA MICROTUBULAR.
La presència d'mSnail als microtúbuls provoca diversos canvis suggestius de l'afectació de la dinàmica microtubular normal. (A) Feixos organitzats de microtúbuls en la periferia (i co-localització amb α-tubulina). Les fletxes assenyalen feixos de gruix inusual, que corresponen a acumulacions de microtubuls individuals en fascicles. Aquest fenomen és predominant en cèl·lules epitelials, sobretot en la seva periferia. La fletxa amb cua de la co-localització amb tubulina assenyala la localització dels centriols. (B) L'altre fenomen causat per Snail és l'elongació i ondulació marcada (fletxes) dels microtúbuls, signe indicatiu de la ocurrència de fenòmens d'estabilització i parada del procés d'inestabilitat dinàmica característic dels microtúbuls. L'estabilització permet l'elongació continuada del microtúbuls, que en conseqüència han d'ondular-se per tal d'ocupar la mateixa longitud que en condicions normals. Aquesta dada és observable en totes les línies cel·lulars testades.
Confocal 63X i zoom. Observeu l'evident distribució en speckles d'mSnail en els nuclis de les cèl·lules on co-localitza amb la xarxa microtubular.

Microtúbuls i nucli només coexisteixen si al nucli Snail és en "speckles"

Depenent de la línia cel·lular estudiada, la localització d'*mSnail* als microtúbuls acostuma a ésser associada a la seva exclusió del nucli, o en d'altres, a la presència d'*speckles nuclears*, però no més d'un 1% de les cèl·lules amb la xarxa microtubular decorada tenen *mSnail* en localització nuclear difusa. En línies com les RWP1 o MDCK, la coexistència d'*speckles* i distribució microtubular és la més freqüent de totes les possibles distribucions. En línies com les MCF7 o les Caco-2, el nucli és usualment exclòs. En fibroblasts no és infreqüent trobar patrons microtubulars purs. (vegeu ***figures Rs-33 a 35***). Donat que la distribució en *speckles* sembla estar relacionada amb les formes d'*mSnail* que són exportables fora del nucli (vegeu en punts anteriors), no és doncs inesperat que coexisteixi amb la localització microtubular, que d'altra banda és possible que sigui conformada per les formes d'*mSnail* que han estat exportades (i fosforilades?)

La unió d'Snail als microtúbuls és irreversible.

El flux d'*Snail* entre ambdós compartiments (nucli i citosol), sembla unidireccional. El tractament

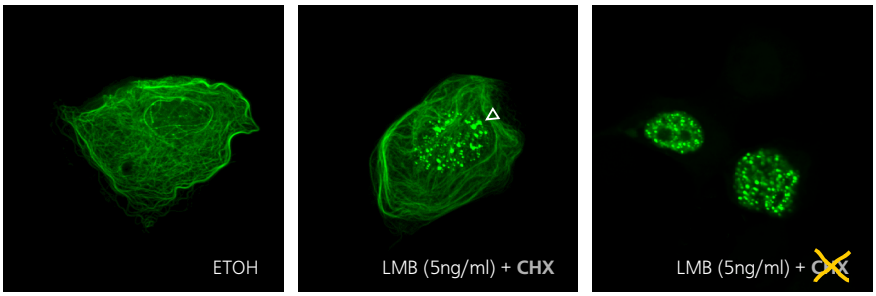


FIG RS-36 : EL BLOQUEIG DE L'EXPORT NUCLEAR NO ÉS CAPAÇ DE RE-LOCALITZAR L'SNAIL ASSOCIAT ALS MICROTÚBULS DE NOU AL NUCLI
Transfecció i expressió transitòria d'eGFP-mSnail (1-264) en cèl·lules MCF7. Després del tractament amb Leptomicina B (LMB, 5ng/ml) durant 3H en presència de Cicloheximida (CHX, 25 µg/ml), bona part de l'Snail associat als microtúbuls es manté en aquesta localització, i únicament una petita part és re-localitzat al nucli, en forma d'"speckles" (fletxa). Aquest efecte no es fa patent quan la cicloheximida és eliminada del medi (*Fig de la dreta*). Això suggereix que en aquesta última situació, l'Snail sintetitzat *de novo* pot ésser eficaçment re-localitzat, i que l'associat a microtúbuls és possiblement degradat.
Confocal 63X, x2 zoom.

amb *LMB* en temps curts (2H) permet abolir en la seva totalitat la localització citosòlica, però l'afegitó de *cicloheximida* (50µg/ml) durant el tractament amb *LMB,* per a restringir l'observació a la proteïna ja sintetitzada, permet advertir que en aquelles cèl·lules on *Snail* és predominantment associat als microtúbuls, la distribució no canvia després de bloquejar l'export nuclear (vegeu ***Fig Rs-36***). Això indica que un cop als microtúbuls, *Snail* no retorna al nucli -on poder ser bloquejat per *LMB*-. En absència de *cicloheximida*, el tractament amb *LMB* aconsegueix repescar la proteïna al nucli en la seva totalitat, possiblement perquè la proteïna sintetitzada de nou durant el tractament hi és retinguda. L'absència de marcatge microtubular associat en aquest cas potser voldria dir que un cop fora, *Snail* acabarà essent degradat. No hem avaluat però, la vida mitja dels diferents mutants, i si bé de forma intuïtiva hom pot apreciar que les formes exclusivament citosòliques com la meitat 1-151 o el mutant S/D donen nivells d'expressió menors a la forma sencera o la meitat 152-264 (fusionats a *eGFP* o en extractes cel·lulars després d'una expressió transitòria), no tenim dades fiables per a suportar aquesta última apreciació.

Snail co-sedimenta "in vitro" amb els microtúbuls

Per a confirmar les observacions "in vivo", i assegurar que *mSnail* és capaç d'associar-se als microtúbuls, vàrem realitzar *assaigs de co-sedimentació de microtúbuls*, amb un procediment lleugerament modificat dels què són citats a la literatura (vegeu *Materials i Mètodes*). En aquest tipus d'assaig, es promou la polimerització in vitro de nous microtúbuls a partir de tubulina purificada o, com en el nostre cas, d'extractes citosòlics enriquits en tubulina, car previ a la lisi de les cèl·lules es promou la despolimerització dels microtúbuls mantenint les cèl·lules 30 minuts en gel.

La tubulina polimeritza a 37ºC, i la presència de *Taxol* en el tub de reacció permet que els microtúbuls neoformats siguin estabilitzats, de forma que s'allarguen sense disgregar-se (els microtúbuls són intrínsecament inestables) [NP64]. La

[64] Els microtúbuls tenen una vida mitja no superior als 5-10 minuts, de forma que constantment es regeneren i desfan. Aquesta propietat és coneguda com "*inestabilitat dinàmica*", és intrínseca als microtúbuls, i essencial per moltes de les seves funcions com en el fus mitòtic (*Gundersen GG, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*). Depèn del balanç entre la incorporació i pèrdua de dímers de *tubulina* que un microtúbul creixi o es desfaci. Així, en un tub d'assaig seriem incapaços d'obtenir microtúbuls en quantitat suficient per a ser analitzats. El *Taxol* (una substància química derivada de plantes i usada com agent quimioteràpic) és capaç de fer que els microtúbuls creixin establement,

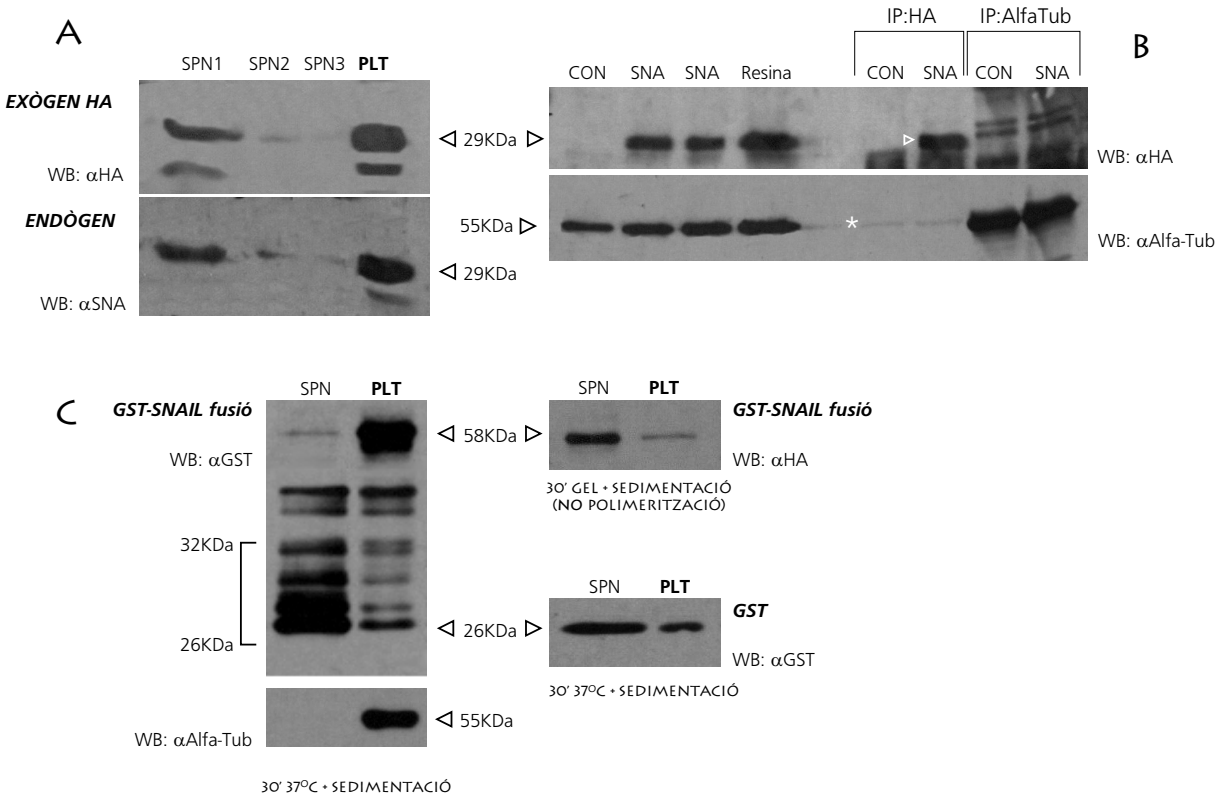


FIG RS-37 : SNAIL S'UNEIX INDIRECTAMENT I CO-SEDIMENTA AMB ELS MICROTÚBULS.
(A) Assaig de polimerització "in vitro" i sedimentació de microtúbuls. *Panell superior*, assaig fet amb l'extracte citosòlic de cèl·lules RWP1 que expressaven transitòriament mSnail-HA. Panell inferior, amb l'extracte citosòlic de fibroblasts NIH-3T3 de ratolí (aproximadament, 1mg d'extracte total). L'mSnail endògen i l'exògen es mantenen en el sediment microtubular després de 3 cicles de polimerització i despolimerització. És destacable el fet que en l'extracte citosòlic de fibroblasts apareixi mSnail, fet que confirma que mSnail en condicions natives és també al citosol. (B) Immunoprecipitació d'mSnail-HA o α-Tubulina en NIH-3T3 transfectats transitòriament amb el constructe mSnail-HA. La fletxa en el panell superior assenyala l'mSnail immunoprecipitat. L'asterisc al panell inferior assenyala una discreta banda, present també en la immunoprecipitació control, que correspondria a α-tubulina. D'aquests resultats es conclou que l'associació entre mSnail i α-tubulina no és directa, i precisa possiblement del procés de polimerització dels microtúbuls. Els 4 carrils de l'esquerra corresponen als controls de càrrega, i la proteïna unida inespecíficament a la resina després de la pre-absorció. (C) Assaig de polimerització "in vitro" i sedimentació en extractes de cèl·lules RWP1 no transfectades, afegint a la reacció proteïna de fusió GST-mSnail o GST com a control. L'immunoblot per α-tubulina mostra l'enriquiment en tubulina que hi ha al sediment, fet que confirma una polimerització efectiva. En el *panell esquerra* és apreciable que no totes les bandes de degradació de la proteïna de fusió co-sedimenten amb els microtúbuls, i suggereix que un fragment d'aproximadament 8 kDa de l'extrem C-terminal (car conserva la GST de l'extrem N-terminal que en permet la detecció per immunoblot específic) o major, és important per l'eficiència de la unió entre mSnail i els microtúbuls. Això es correspon amb la regió amb dits de Zenc (aproximadament, 2on a 4rt dits de zenc). *Panells drets, superior*: En absència de polimerització, Snail roman al sobrenedant, fet que confirma l'associació als microtúbuls polimeritzats. *Inferior*, GST per si sol roman predominantment al sobrenedant després de la polimerització i sedimentació, i per tant, no és el responsable de la unió específica d'mSnail als microtúbuls en la proteïna de fusió. (SPN, sobrenedant; PLT, pellet)

repetició dels cicles de polimerització i despolimerització fins a 3 cops permet eliminar les possibles unions inespecífiques de la proteïna problema al "sediment".

Snail endogen en 3T3 co-sedimenta amb els microtúbuls

Com és mostrat a la ***Fig Rs-37A***, tant l'*mSnail* endogen que es troba en fibroblasts NIH-3T3, com l'*mSnail* exogen expressat transitòriament en cèl·lules RWP1, co-sedimenten amb els microtúbuls amb gran afinitat. La proporció d'*mSnail* en el sobrenedant no associat a microtúbuls és escassa, i pràcticament la totalitat de l'*mSnail* present en els extractes citosòlics s'associa als microtúbuls neoformats. És pertinent destacar que l'*mSnail* endogen és també present

de manera que s'allarguen de forma constant en permetre l'entrada de nous dímers de tubulina i evitar-ne la pèrdua.

en els extractes citosòlics "nets", elaborats amb xoc hipotònic sense detergent, fet que es correspon amb les dades obtingudes dels estudis de localització subcel·lular de la proteïna exògena.

La presència predominant d'*alfa-tubulina* en el sediment respecte la present en el sobrenedant, ens permet confirmar l'eficiència del procés de polimerització (vegeu ***Fig Rs-37A***)

L'associació d'*mSnail* als microtúbuls generats in vitro no és depenent del procés de polimerització. Així, si la proteïna de fusió *GST-mSnail* és afegida al tub després que s'ha permès avançar la polimerització durant un temps suficient per a obtenir microtúbuls viables (20 minuts a 37ºC), continua essent co-sedimentada amb el "sediment" microtubular. Aquesta dada suggereix que *mSnail* s'uneix preferentment als microtúbuls polimeritzats, i fa pensar que potser la unió no ocorre directament a la tubulina abans o durant el procés de polimerització.

Per a verificar aquesta última idea, vàrem immunoprecipitar l'*mSnail-HA* exogen a través de la seva "*etiqueta*", o bé l'*alfa-tubulina* amb anticossos específics, d'extractes de cèl·lules RWP1. En cap dels dos casos vàrem aconseguir co-immunoprecipitar l'altra proteïna (***fig Rs-37B***). Aquesta dada refermava la idea que la unió d'*Snail* als microtúbuls no és mediada directament per la *tubulina* (si més no, *alfa-tubulina*). Resultats similars i coherents amb aquesta idea foren obtinguts d'assaigs de pull-down entre la proteïna de fusió *GST-mSnail* lligada a Glutatió-Sefarosa, i extractes citosòlics.

Amb tots aquests resultats, el més probable és que l'unió d'*mSnail* a la xarxa microtubular ocorri per alguna proteïna "pont" encara no identificada, possiblement sobre microtúbuls ja preexistents en la cèl·lula.

La unió d'Snail als microtúbuls és mediada per la cua C-terminal, i és complementària al procés d'export nuclear

Difícil predicció del domini d'interacció amb els microtúbuls

S'han descrit diversos dominis que medien l'unió als microtúbuls de proteïnes diverses. Alguns d'ells són compartits per diverses proteïnes (per exemple, el domini d'unió a microtúbuls de les proteïnes *CLIP* és present en diverses proteïnes). En el grup de proteïnes motores, que s'uneixen directament a la tubulina, també hi ha cert consens. D'altres proteïnes com *APC, EB1* o *p53*, que no formen part d'aquests grups, tenen regions d'unió als microtúbuls força diferents de les conegudes, i no compartides entre elles (*Bienz M, Nat Rev Mol Cell Biol 2002; Giannakakou P et al, Nat Cell Biol 2000*). *APC* i *p53* semblen associar-se als microtúbuls de forma indirecta, a través de proteïnes motores com *dineïna* (és el cas de *p53*, *Giannakakou et al, Nat Cell Biol 2000*), i potser aquests dominis d'unió ho són a les proteïnes motores. Tot això indica que no existeix un consens clar de seqüència. En trets generals, es considera que els dominis són regions bàsiques, amb predomini de residus tipus *Valina, Histidina, Prolina o Glicina*. Tanmateix, això no ocorre en tots els casos [NP65].

Hem fet alineaments diversos entre *mSnail* i alguns dels dominis d'unió a microtúbuls coneguts. Per exemple, l'alineament amb els dominis presents a *p53* (regió N-terminal, residus *1-25*) o amb *APC* (residus *2219-2580*, regió C-terminal) mostren alineaments parcials, amb conservació no superior al 30%, entre aquests i el domini ric en serines d'*mSnail.*

[65] Dades extretes de (*The Microtubule Interaction Site, Brandt Lab: server.nbio.uni-heidelberg.de/Groups/WWW_Brandt/MT.htm*)

Hi ha un parell de referències descrivint 2 proteïnes amb dits de zenc, *MIZ-1* (*Ziegelbauer J et al, Mol Cell 2001*) i *MURF* (*Spencer JA et al, J Cell Biol 2000*) capaces d'interaccionar amb els microtúbuls mitjançant aquests dominis [NP66]. Els dits de zenc *C2H2* implicats en la unió a microtúbuls del factor de transcripció *MIZ-1* alineen parcialment amb els dits de zenc d'*mSnail* (dits 1 a 3, no així el quart), essent la regió més conservada la què es troba entre el segon i tercer dits d'*mSnail* (***Box 3***), present en tots els homòlegs. No és pas descartable que l'alineament sigui circumstancial i no tingui significat biològic.

Si bé el domini ric en serines o bé els dits de zenc podrien formar part del pronòstic d'acord amb els alineaments obtinguts, no hi ha dades prou consistents com per a fer una predicció certera de quin o quins dominis d'*mSnail* poden ésser implicats en la unió a microtúbuls.

L'absència de dominis candidats a mediar la unió suggereix el mapeig per deleció

El següent pas fou identificar experimentalment el domini o dominis d'*Snail* responsables de la seva unió als microtúbuls. Per a fer-ho, vàrem combinar els estudis de co-localització entre els microtúbuls i les truncacions o deleccions d'*mSnail* associades a *eGFP*, amb els assaigs de co-sedimentació de microtúbuls amb les mateixes construccions fusionades a *GST* i purificades a partir de cultius bacterians.

La deleció de la cua C-terminal d'Snail n'evita la unió a microtúbuls

La meitat N-terminal d'*mSnail* (*1-151*), malgrat tenir una distribució subcel·lular estrictament citosòlica, no co-localitza amb la xarxa microtubular i es disposa de forma difosa. En els co-sediments els resultats semblen confirmar aquesta dada (***Fig Rs-38***).

Pel contrari, la meitat C-terminal (*151-264*) tot i ésser essencialment nuclear, co-sedimenta

```
                                DIT 1                          DIT 2 (67%)
mouse_snail(153-258) IFNCKYCNKEYLSLGALKMHIRSHT--LPCVCTTCGKAFSRPWLLQGHVRTHTGE
                      .|  |....   |||. |.| ||   || |  |||||...  | .||| ||||
     MIZ dits 7-11 PYVCIHCQRQFADPGALQRHVRIHTGEKPCQCVMCGKAFTQASSLIAHVRQHTGE

       mouse_snail KPFSCSHCNRAFADRSNLRAHLQTHSDVKRYQCQACARTFSRMSLLHKHQ--ESG
                   ||. | .| . | . |.|  |.. | ...  .|  |...|  .. | ||   .|
     MIZ dits 7-11 KPYVCERCGKRFVQSSQLANHIRHHDNIRPHKCSVCSKAFVNVGDLSKHIIIHTG
                                DIT 3                          DIT 4

Percentatge ID = 37%
Percentatge SIM= 72%
```

BOX-3 : ALINEAMENT DE SEQÜÈNCIA ENTRE EL DOMINI D'UNIÓ A MICROTÚBULS DEL FACTOR MIZ1, I SNAIL.
El factor MIZ1 té un domini amb diversos dits de Zenc, posats en tàndem. Els dits 7 a 11 s'ha descrit que medien la interacció de MIZ1 amb els microtúbuls. L'alineament de la seqüència de MIZ1 (homòleg en ratolí) i mSnail mostra que el segon dit de Zenc d'Snail i els residus circumdants alineen amb un elevat grau de conservació (67%) de seqüència amb el dit 8 de MIZ1 (s'han tingut en compte els canvis conservatius). El grau de conservació en els altres dits de zenc és menor.
Els percentatges d'identitat i similitud són calculats i mostrats a la Fig. Alineament fet amb la utilitat CLUSTALW.

[66] *MIZ-1* (*Myc Interacting Zinc finger-1*) és un factor de transcripció implicat en la regulació de diversos gens, entre ells p15 i p21 (associats a arrest del cicle cel·lular), als quals activa excepte en presència de *c-Myc*. Té nombrosos (13) dits de zenc C-terminals del tipus *C2H2*, i és demostrat que els dits 7-11 són implicats en la unió de la proteïna als microtúbuls. *MURF* (*Muscle striated Ring Finger-1*) és una proteïna amb dits de zenc *C3HC4* (tipus *RING*) implicada en la diferenciació de les cèl·lules musculars esquelètiques, i exerceix en part la seva funció per unir-se als microtúbuls a través del domini *RING*. Els efectes sobre la xarxa microtubular coincideixen amb els causats per *Snail*.

eficientment amb els microtúbuls "in vitro" (***Fig Rs-38***). Això és coherent amb la distribució del fragment N-terminal, i suggereix que els dits de zenc són implicats en la unió a microtúbuls. En consonància, en algunes cèl·lules que expressen transitòriament la proteïna de fusió *eGFP-mmSnail* (*151-264*), és possible observar com tenyeix ocasionalment la xarxa microtubular, sense però ésser tan eficient com la proteïna sencera. La "fuga citosòlica" del constructe deu ser explicable pels nivells de sobreexpressió assolits.

El domini ric en serines present en la meitat N-terminal no sembla intervenir, si més no de forma determinant, en la unió d'*mSnail* als microtúbuls. Així, la seva deleció (*mSnail (Δ90-120)*) no n'evita pas la co-sedimentació amb el sediment microtubular (***Fig Rs-38***). Malgrat abolir eficientment l'export nuclear, la deleció d'aquest domini no sembla causar canvis conformacionals que afectin l'associació al citosquelet microtubular. En algunes cèl·lules i com ocasionalment ocorre en la fusió *eGFP-mSnail* (*151-264*), aquest mutant tenyeix també alguns microtúbuls.

L'absència de l'últim dit de zenc, però no dels últims cinc aminoàcids d'Snail, aboleix la co-localització d'Snail amb els microtúbuls

Els resultats anteriors indiquen que possiblement els dits de zenc participin de la unió a microtúbuls. La deleció de l'últim dit de zenc (*237-259*) i aminoàcids adjacents (*260-264*, fragment *237-264*) comporta un augment en l'export nuclear d'*mSnail* (vegeu punts anteriors). No obstant, aquest mutant no decora la xarxa microtubular com ho fa la proteïna sencera (***Fig Rs-39***), i tampoc co-localitza amb el senyal d'*alfa-tubulina* en els estudis en microscòpia confocal. La fusió *eGFP-mmSnail* (*1-236*) es distribueix en

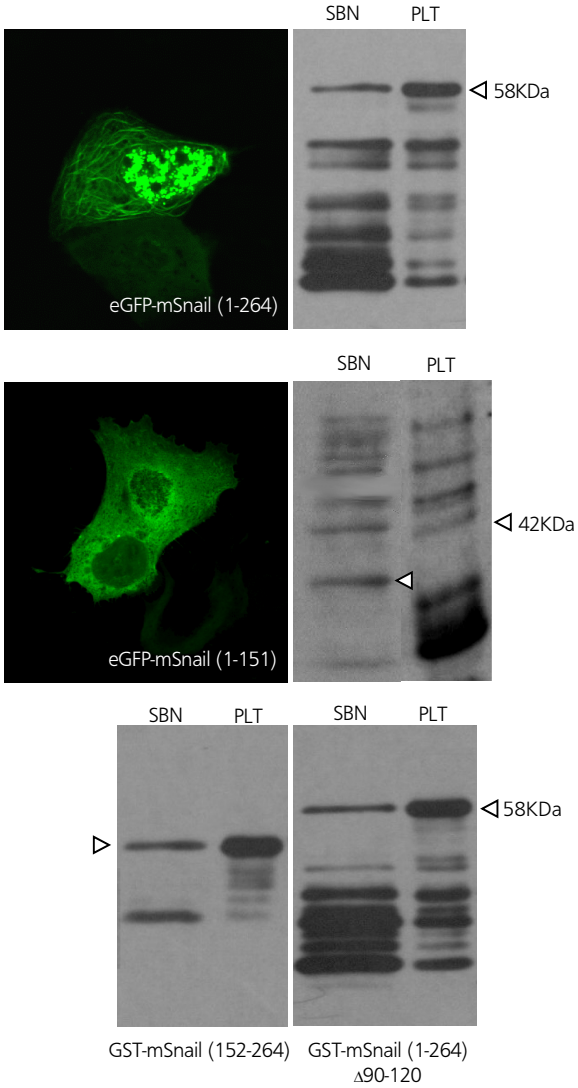


FIG RS-38 : CORRESPONDÈNCIA ENTRE CO-LOCALITZACIÓ I CO-SEDIMENTACIÓ ENTRE SNAIL I LA XARXA MICROTUBULAR, I DEFINICIÓ DE LA MEITAT C-TERMINAL COM LA REGIÓ CANDIDATA D'UNIÓ A MICROTÚBULS

Comparació entre la distribució subcel·lular de diverses deleccions o truncacions de la fusió eGFP-mSnail, i la seva capacitat per co-sedimentar amb els microtúbuls polimeritzats "in vitro". Val a destacar que la meitat N-terminal (1-151), que té una distribució difusa pel citosol i no co-localitza amb els microtúbuls, dóna uns resultats no del tot concloents al cosediment: les fletxes blanques al *panell central* assenyalen les 2 bandes majoritàries que aquesta proteïna de fusió dóna en resoldre-la per electroforesi. La banda de pes inferior, clarament no co-sedimenta. La de 42KDa, roman predominantment al sobrenedant, si bé se n'aprecien traces al sediment. La rellevancia d'aquest resultat ha de ser comparada amb l'obtingut amb els altres constructes mostrats.

El *Panell inferior* només mostra imatges dels assaigs de polimerització i co-sedimentació. Les dades de microscopia exposades al text no són mostrades en imatges. Els resultats en conjunt suggereixen que la cua C-terminal és essencial en la unió a microtúbuls, i que la meitat N-terminal és relativament prescindible. Aquest resultat és en acord amb el mostrat a la Fig anterior.

Confocal, 63X i x2 zoom. Cèl·lules MDCK. Polimerització i co-sediments amb extractes citosòlics d'RWP1 i proteïnes de fusió d'mSnail amb GST. Les fletxes blanques en els co-sediments assenyalen la proteïna de fusió en tota la seva longitud, sense degradació parcial.

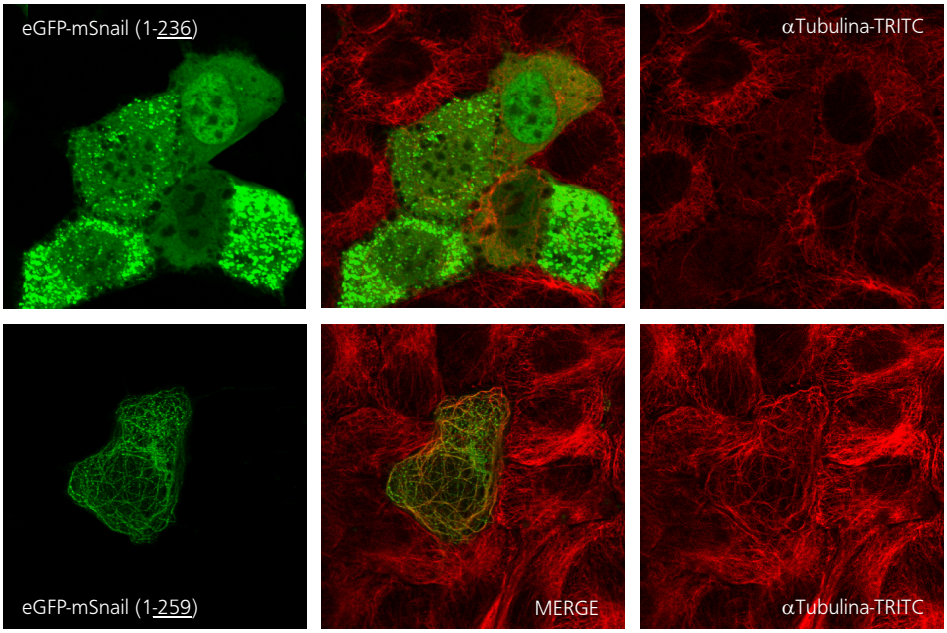


FIG RS-39 : LA DELECCIÓ DE L'ÚLTIM DIT DE ZENC PERÒ NO DELS ÚLTIMS 5 AMINOÀCIDS AFECTA LA CAPACITAT D'SNAIL DE CO-LOCALITZAR AMB ELS MICROTÚBULS
Cèl·lules MDCK. Transfecció i expressió transitòria d'eGFP-mSnail amb la delecció de l'últim dit de zenc (237-264, que inclou també els últims 5 aminoàcids) o bé els últims 5 aminoàcids (260-264), fora del dit de zenc. Les imatges mostren la co-localització amb α-tubulina, detectada per immunofluorescència i amb un anticós secundari conjugat a Rhodamina (TRITC). El patró de distribució citosòlic és certament diferent entre ambdós mutants. La co-localització amb els microtúbuls és només evident amb el mutant 1-259. La presència d'aquest mutant als microtúbuls en canvia la configuració, fet visible en la comparació amb les cèl·lules circumdants a la tinció per tubulina.
Confocal 63X, x2 zoom.

petits cúmuls o punts per tot el citoplasma, no alineats amb la xarxa microtubular.Aquest fet suggereix que la deleció de l'últim dit de zenc aboleix o si més no dificulta en gran mesura la unió a microtúbuls. No disposem però de dades definitives sobre el comportament d'aquest mutant en assaigs de co-sedimentació de microtúbuls "in vitro" que permetin confirmar l'esmentada observació. Curiosament, aquesta regió és també implicada en el manteniment de la conformació espacial de la proteïna i el control de l'export nuclear.

Per altra banda, l'eliminació dels últims 5 aminoàcids (*260-264*) de la proteïna sencera no sembla pas afectar la unió als microtúbuls (***Fig Rs- 39***). En tot cas, donat que aquesta deleció té un efecte positiu en l'eficiència del sistema d'export nuclear (vegeu en punts anteriors i *Discussió*), la decoració de la xarxa microtubular és potser encara més evident en aquest mutant.

Les formes fosforilades d'mSnail s'uneixen de forma preferent als microtúbuls, mentre que les no-fosforilades no ho fan

Quan *mSnail* és fosforilat en el domini ric en serines, la seva distribució subcel·lular esdevé eminentment citosòlica per ésser exportat de forma molt eficient, gairebé constitutiva, fora del nucli. En el citosol, el mutant *eGFP-mSnail (S/D)* co-localitza *bona-fide* amb la xarxa microtubular. Usualment decora els microtúbuls com la proteïna sense modificar, però no és infreqüent trobar cèl·lules en què adopta un patró puntejat que, tanmateix, s'ordena de tal manera que s'alinea amb els microtúbuls (***Fig Rs-40***). Aquest patró és també distingible en la proteïna no modificada,

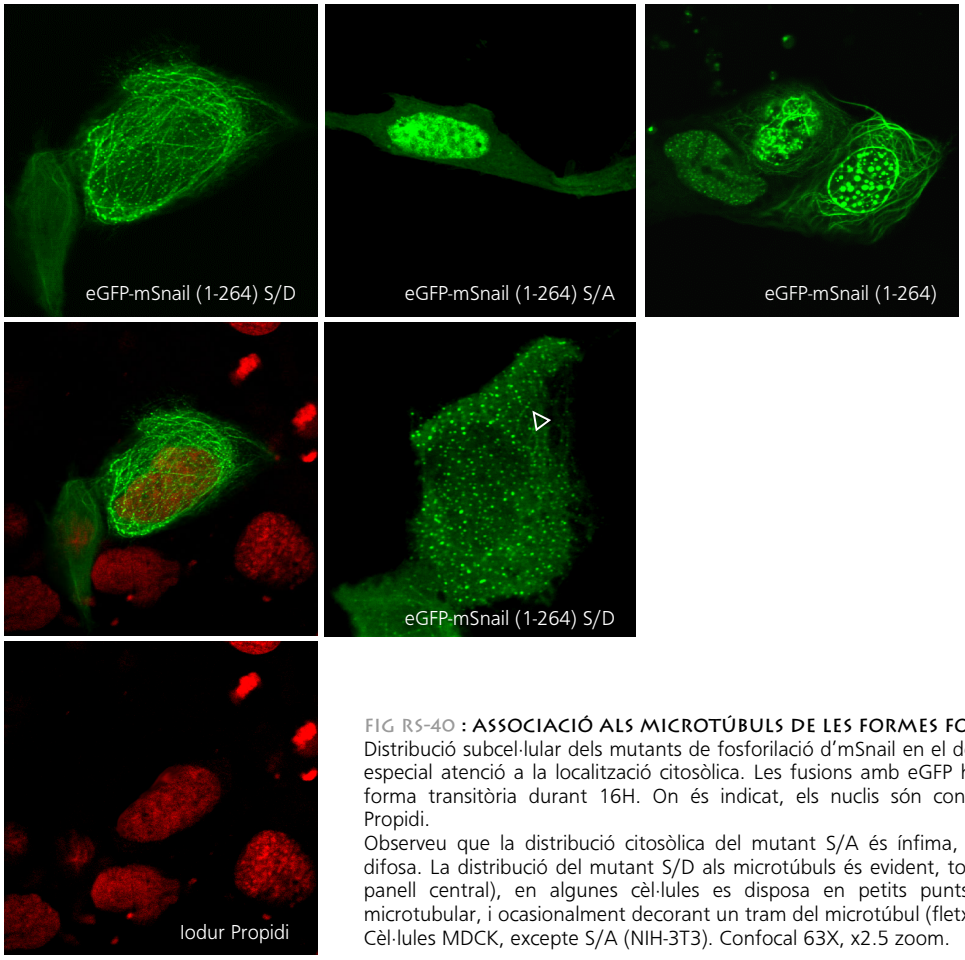


FIG RS-40 : ASSOCIACIÓ ALS MICROTÚBULS DE LES FORMES FOSFORILADES D'SNAIL
Distribució subcel·lular dels mutants de fosforilació d'mSnail en el domini ric en Serines, amb especial atenció a la localització citosòlica. Les fusions amb eGFP han estat expressades de forma transitòria durant 16H. On és indicat, els nuclis són contratenyits amb Iodur de Propidi.
Observeu que la distribució citosòlica del mutant S/A és ínfima, i quan és apreciable, és difosa. La distribució del mutant S/D als microtúbuls és evident, tot i que (imatge dreta del panell central), en algunes cèl·lules es disposa en petits punts alineats amb la xarxa microtubular, i ocasionalment decorant un tram del microtúbul (fletxa).
Cèl·lules MDCK, excepte S/A (NIH-3T3). Confocal 63X, x2.5 zoom.

com havíem citat. Pel contrari, el mutant no fosforilable (*eGFP-mSnail (S/A)*), que és quasi totalment nuclear, quan és trobat al citosol normalment derivat de la sobreexpressió de la proteïna de fusió amb *eGFP*, es disposa de manera difosa (***Fig Rs-40***). Això fa pensar que l'estat de fosforilació de la molècula és rellevant per a la co-localització amb els microtúbuls, com de fet ho és per a la distribució subcel·lular. Per tant, fora lícit pensar que les molècules d'*mSnail* que decoren els microtúbuls al microscopi, són fosforilades.

Snail estabilitza la xarxa microtubular

Per a alguns factors de transcripció com les *SMADs,* que participen de la ruta de transducció de *TGFbeta* (*Dong C et al, Mol Cell 2000*), hom ha proposat que la unió als microtúbuls actua de reservori o tamponament. Quelcom similar s'ha proposat per a *p53*, per bé que els microtúbuls semblen també essencials per a la seva entrada al nucli (*Giannakakou et al, Nat Cell Biol 2000*). En aquests casos i d'altres descrits a la literatura, l'associació amb els microtúbuls sembla tenir un significat circumstancial, de forma que la presència d'aquestes proteïnes no sembla afectar la funcionalitat d'aquestes estructures, i més aviat són els factors de transcripció els que "gaudeixen" de les propietats funcionals dels microtúbuls.

Snail fa elongar persistentment i deforma els microtúbuls on es fixa

El cas d'*mSnail* sembla diferent. Els microtúbuls on *mSnail* és associat presenten alteracions en la

seva morfologia i organització, principalment quan s'assoleixen nivells alts d'expressió de la proteïna. Els efectes més evidents són: (i) la formació de microtúbuls llargs i ondulats, (ii) la formació de feixos de microtúbuls ("*bundling*"), i (iii), la disposició d'aquests feixos en estructures aberrants (vegeu ***Fig Rs-35***). L'efecte és força més evident en cèl·lules epitelials, potser per l'existència d'una xarxa microtubular no centrosoma-depenent.

Els microtúbuls ondulats creiem que no són més que el producte de l'adaptació espacial de microtúbuls extremadament llargs, que han de replegar-se per ocupar l'espai que tenen assignat. L'aparició d'organitzacions aberrants possiblement és secundària a aquest fet. Tal elongació extrema dels microtúbuls suggereix que els mecanismes d'inestabilitat dinàmica que controlen la longitud dels microtúbuls dins la cèl·lula són afectats. Un efecte tal es pot aconseguir "in vitro" amb el *taxol*. Això ens va fer pensar en què aquests microtúbuls podrien estar anòmalament *estabilitzats*, o sobre-estabilitzats.

La formació de feixos de microtúbuls ("*bundling*") és també un fenomen derivat de l'estabilització dels microtúbuls, i de l'existència d'enllaços creuats entre microtúbuls veïns. Aquest fenomen sembla essencial en processos com la formació del fus mitòtic, i possiblement en l'establiment de la polaritat cel·lular durant els fenòmens de migració. La gènesi de feixos microtubulars és una propietat essencial de les proteïnes motores associades als microtúbuls (*Walczak CE et al. Curr Biol 1998*). Proteïnes de les quals he parlat, com *CLIP170*, tenen les mateixes propietats que *mSnail* i expressades a nivells elevats, indueixen en els microtúbuls els mateixos canvis (*Hoogenraad CC et al, J Cell Sci 2000*). L'estabilització i la formació de feixos són signes indirectes de la implicació d'aquestes proteïnes en el dinamisme microtubular.

D'acord amb tot això, l'explicació més plausible per als canvis morfològics induïts per *mSnail* als microtúbuls fora que n'induís l'estabilització.

Snail evita la despolimerització de la xarxa de microtúbuls

En els assaigs "in vitro" de co-sedimentació de microtúbuls és precís afegir *taxol* per tal d'estabilitzar els microtúbuls neoformats, de manera que se'n permet l'elongació i polimerització eficient. Per a verificar el rol "estabilitzador" d'*mSnail* vàrem realitzar el mateix assaig, però substituint el *Taxol* per *mSnail*, de manera que fos l'únic possible element estabilitzador en la reacció. Com és mostrat a la ***Fig Rs-41B***, *mSnail* sembla suficient per a estabilitzar els microtúbuls neoformats, doncs en la seva presència s'obté un sediment microtubular acceptable (mesurat pel contingut en *alfa-tubulina* per WB), major a l'obtingut en absència de *Taxol* i *mSnail*.

Per a confirmar "in vivo" aquesta evidència, vàrem recórrer a l'ús d'agents despolimeritzadors dels microtúbuls. El *Nocodazol* és capaç de despolimeritzar els microtúbuls en curt temps (des de 45 minuts). Ho fa incorporant-se a l'extrem de creixement dels microtúbuls, de forma que bloqueja l'entrada de nous dímers de tubulina. El seu efecte despolimeritzador es completa pels fenòmens d'inestabilitat dinàmica dels microtúbuls, de forma que la incapacitat d'afegir nova tubulina al polímer fa que el microtúbul s'escurci progressivament cap als extrems "minus". En un microtúbul estable, no hi ha incorporació neta de dímers de tubulina (sí ocorre, però a un ritme extremadament lent), i per tant el *Nocodazol*e no és incorporat al

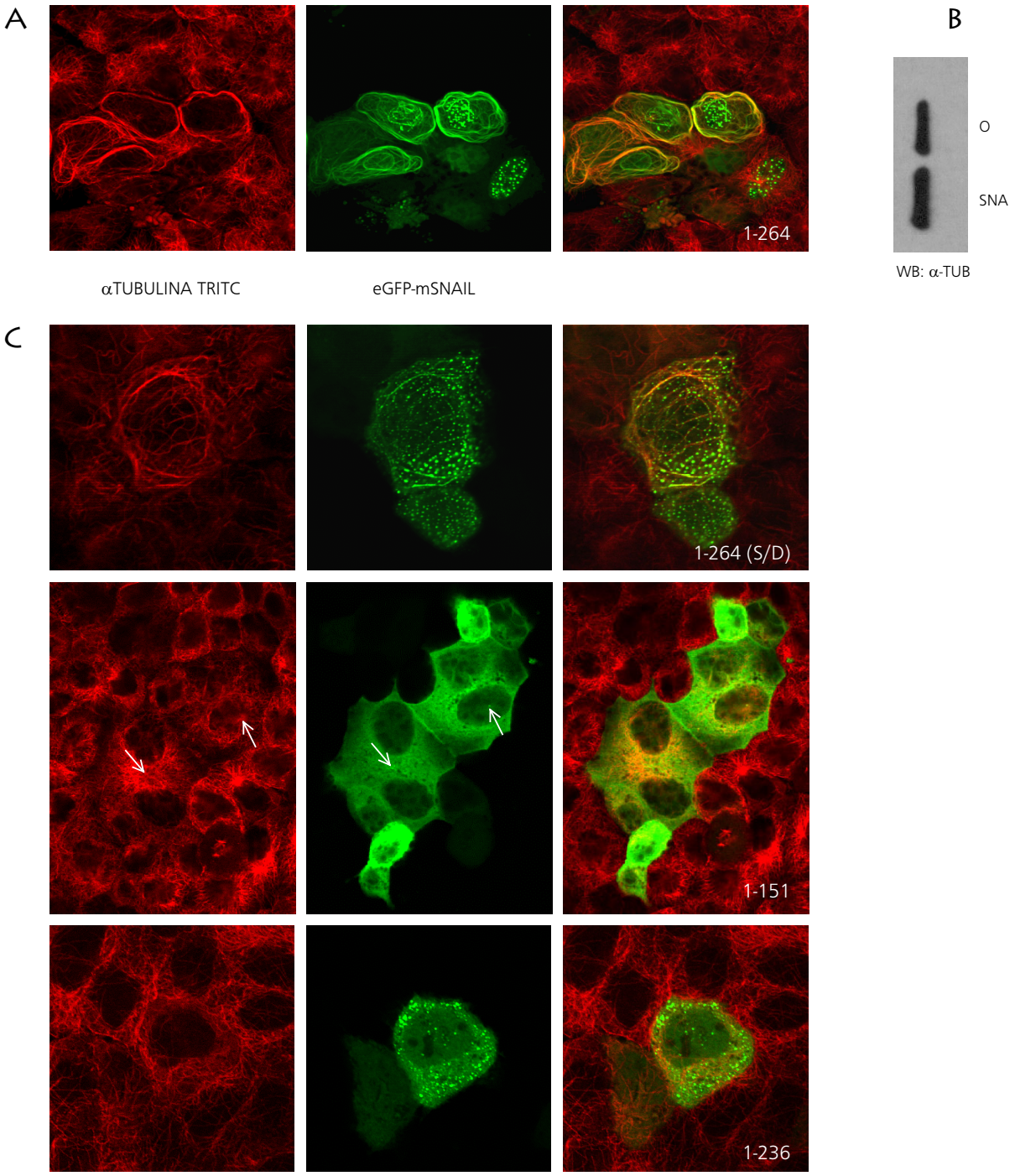


FIG RS-41 : LES FORMES D'SNAIL QUE CO-LOCALITZEN ELS MICROTÚBULS ELS ESTABILITZEN SELECTIVAMENT
En tots els casos,cèl·lules MDCK transfectades transitòriament amb eGFP-mSnail (sencer i truncacions o mutant), després de 16H d'expressió, foren tractades amb Nocodazol 10μM durant 45 minuts. El tractament amb Nocodazol en aquestes condicions despolimeritza els microtúbuls en bona mesura, de forma que únicament romanen asters radiant des del centrosoma. (A) Quan l'Snail sencer és associat als microtúbuls, les cèl·lules són resistents a la despolimeritxació. Compareu les cèl·lules que expressen eGFP-mSnail amb les veïnes que no ho fan. La co-localització entre eGFP-mSnail i α-tubulina apareix en groc. (B) Assaig de polimerització "in vitro" de microtúbuls en extractes citosòlics de cèl·lules RWP1. La presència d'Snail (GST-mSnail) en la reacció de polimerització millora lleugerament la quantitat de tubulina sedimentada, i per extensió, augmenta l'eficiència de la reacció de polimerització possiblement per estabilitzar els microtúbuls. (C) Resistència a la despolimerització per Nocodazol de les cèl·lules transfectades transitòriament amb diverses deleccions o mutants d'Snail. Només les formes que s'uneixen i co-localitzen amb els microtúbuls (S/D, vegeu Fig anterior), són capaces d'evitar la despolimerització. Les fletxes del panell central assenyalen petits senyals puntiformes que molt possiblement corresponen a centriols,amb els què Snail co-localitza.
Confocal 63X i zoom variable. La immunofluorescència per α-tubulina es va revel·lar amb un secundari conjugat a Rhodamina (TRITC). Les cèl·lules foren immediatament fixades amb PFA 4% un cop complert el temps del tractament amb Nocodazol.

microtúbul, i el seu efecte despolimeritzador esdevé pràcticament nul.

D'acord amb això, l'afegitó de *Nocodazol* al medi de cultiu en temps curts (30 min o fins a 2h) causava la despolimerització generalitzada de tota la xarxa microtubular de les cèl·lules que no expressaven *mSnail*, o que no el tenien associat als microtúbuls. Pel contrari, en les cèl·lules on *mSnail* decorava la xarxa microtubular, aquesta es mantenia intacta, revelant la resistència d'aquests microtúbuls a la despolimerització, i per tant, confirmant la seva extremada estabilitat (***Fig Rs-41A***).

L'efecte d'estabilització és només exercit pels mutants capaços de co-localitzar amb els microtúbuls, no pas de tots els citosòlics

La resistència al *Nocodazol* només era evident en els microtúbuls on *mSnail* era associat. Així, l'expressió transitòria de la proteïna de fusió *eGFP-mSnail (1-151)* o *eGFP-mSnail (1-236)*, que no co-localitzen amb els microtúbuls, no evitava la catàstrofe de la xarxa (***Fig Rs-41A***). L'heterogeneïtat de distribució d'*mSnail* sencer en un mateix grup cel·lular permet aportar consistència a aquest resultat, ja que en les cèl·lules on *mSnail* és només nuclear, el *Nocodazol* és certament efectiu.

L'estabilització permanent dels microtúbuls induïda per mSnail desencadena la detirosinació de la tubulina

L'estabilització dels microtúbuls desencadena processos de modificació post-traduccional de la tubulina. Aquests fenòmens (fins a 7), consisteixen en modificacions -acetilació, fosforilació, poliglutamilació, ...- de la proteïna un cop és associada al microtúbul. Per tant, el microtúbul és primer estabilitzat, i després modificat. (*Gundersen GG, Nat Rev Mol CellBiol 2002*). El més conegut i amb significat funcional més clar i potser suggerent és el procés de *detirosinació*. En aquest, l'últim aminoàcid de l'*alfa-tubulina* (una Tirosina) és eliminat per una carboxipeptidasa. Els microtúbuls derivats es diu que són "detirosinats" (o "*Glu microtubules*", per ésser una Glutamina el residu ara exposat a l'extrem carboxi-terminal). Aquestes modificacions suposen un canvi funcional per als microtúbuls, i es considera que la seva aparició causa una reorganització estructural/arquitectural de la cèl·lula, i contribueix per exemple a la polarització de diversos tipus cel·lulars (*Gundersen GG, a la seva pàgina Web* i a *Cook TA et al, J Cell Biol 1998*). La *detirosinació* recluta la proteïna motora *quinesina,* que pot començar a desplaçar-se pel microtúbul, i aquest fenomen és essencial per al transport d'organel·les cel·lulars i el reclutament dels filaments intermediaris del citosquelet com vimentina cap als microtúbuls (*Lin SX et al. Mol Biol Cell 2002; Gundersen GG, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*).

eGFP-Snail co-localitza amb microtúbuls detirosinats i n'augmenta el nombre

Selectivament, els microtúbuls decorats per *mSnail* són microtúbuls *detirosinats* (***Fig Rs-42***). En assaigs d'expressió transitòria *d'eGFP-mSnail* en cèl·lules MDCK, *mSnail* co-localitza amb els microtúbuls detirosinats, detectats amb un anticòs específic (*Gundersen GG*, vegeu *Materials i Mètodes*). Caben dues possibilitats: bé que *mSnail* s'associï a aquest tipus de microtúbuls; o bé que n'indueixi la formació per modificació de microtúbuls que hauria estabilitzat.

La segona hipòtesi sembla més acceptable: en el mateix grup cel·lular, sotmès a les mateixes condicions, la quantitat de microtúbuls detirosinats supera amb escreix la que és detectable a les cèl·lules que no presenten *mSnail*

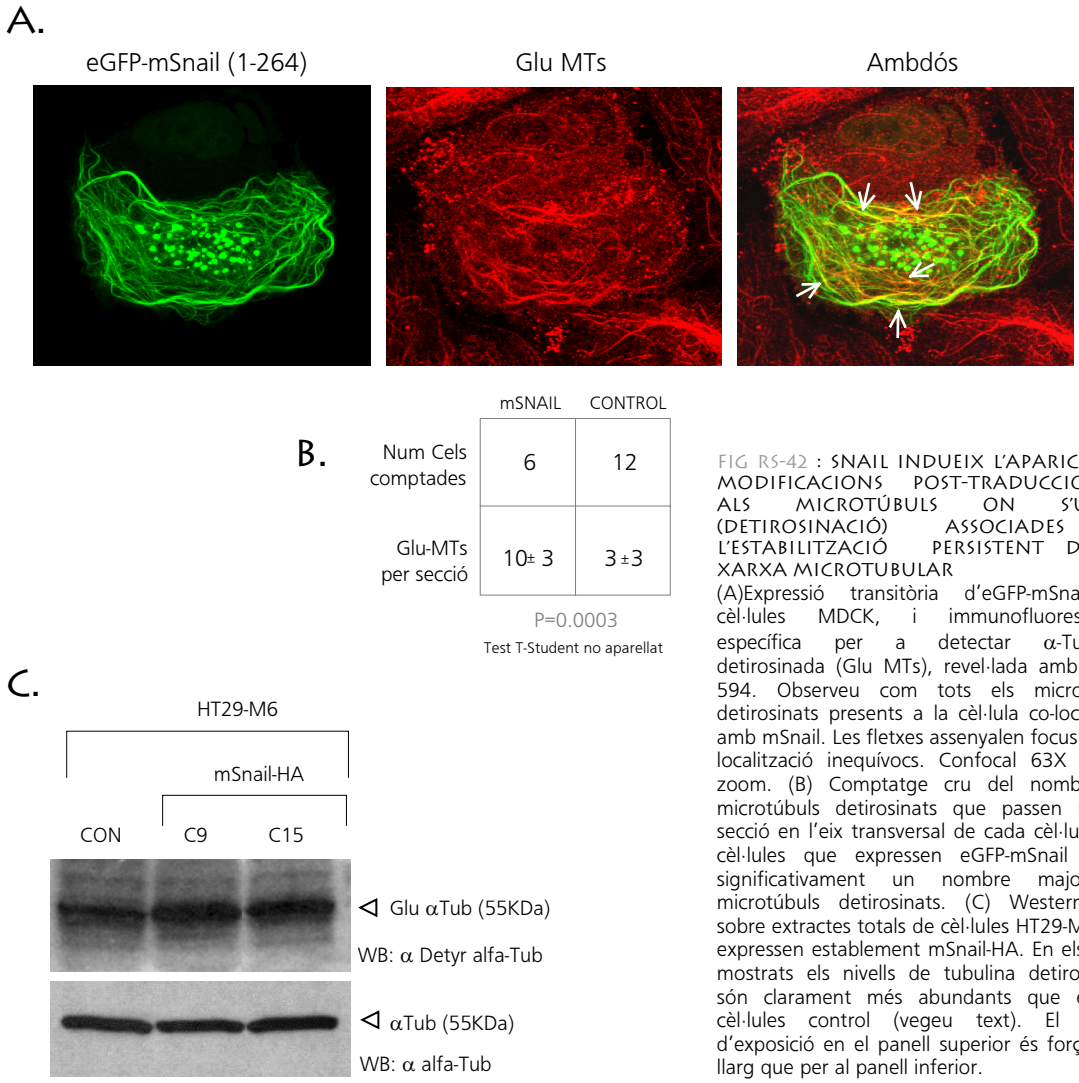


FIG RS-42 : SNAIL INDUEIX L'APARICIÓ DE MODIFICACIONS POST-TRADUCCIONALS ALS MICROTÚBULS ON S'UNEIX (DETIROSINACIÓ) ASSOCIADES A L'ESTABILITZACIÓ PERSISTENT DE LA XARXA MICROTUBULAR
(A)Expressió transitòria d'eGFP-mSnail en cèl·lules MDCK, i immunofluorescència específica per a detectar α-Tubulina detirosinada (Glu MTs), revel·lada amb Alexa 594. Observeu com tots els microtúbuls detirosinats presents a la cèl·lula co-localitzen amb mSnail. Les fletxes assenyalen focus de co-localització inequívocs. Confocal 63X i x2.5 zoom. (B) Comptatge cru del nombre de microtúbuls detirosinats que passen per la secció en l'eix transversal de cada cèl·lula. Les cèl·lules que expressen eGFP-mSnail tenen significativament un nombre major de microtúbuls detirosinats. (C) Western Blot sobre extractes totals de cèl·lules HT29-M6 que expressen establement mSnail-HA. En els clons mostrats els nivells de tubulina detirosinada són clarament més abundants que en les cèl·lules control (vegeu text). El temps d'exposició en el panell superior és força més llarg que per al panell inferior.

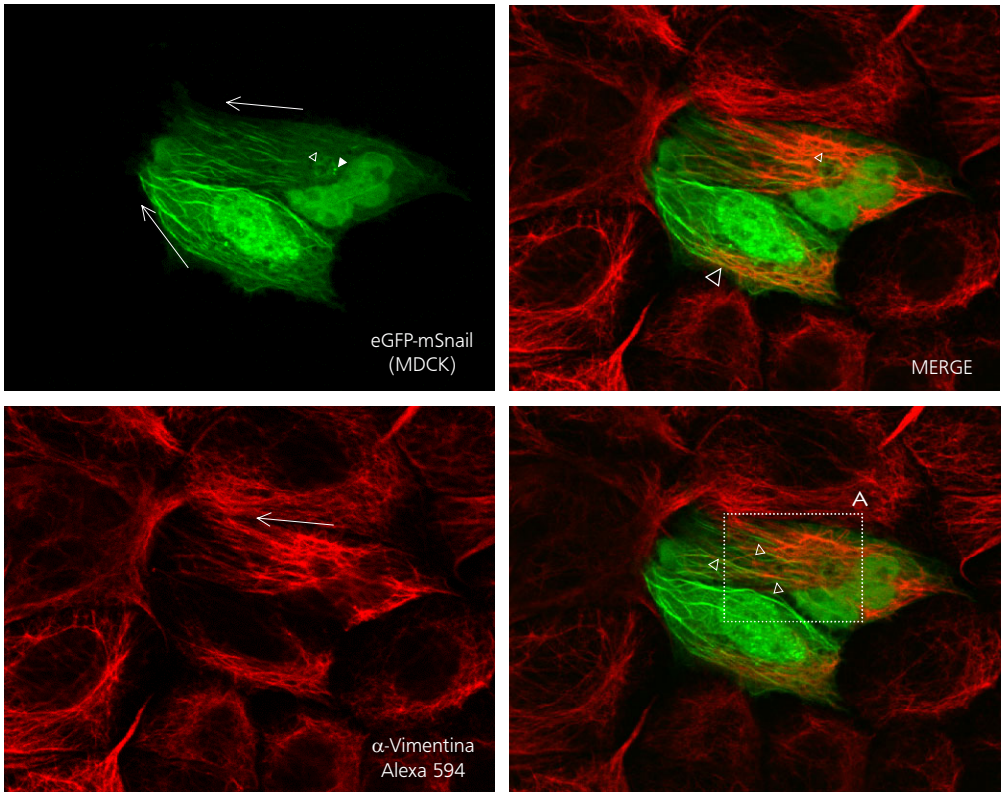
als microtúbuls (***Fig Rs-42B***). Per a verificar aquesta hipòtesi vàrem avaluar per Western Blot l'abundància de tubulina detirosinada en extractes totals de cèl·lules HT29-M6 que expressen establement *mSnail (*vegeu *Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000)* . Així, en la majoria dels clons estables per *mSnail* la quantitat total d'alfa-tubulina detirosinada detectable era clarament major a la present a les cèl·lules control (***Fig Rs-42C***), respecte a un volum total d'*alfa-tubulina* equivalent, dada atribuïble a un procés d'estabilització perllongat de la xarxa microtubular per efecte d'mSnail.

Els filaments de vimentina es reorienten al voltant dels microtúbuls decorats per Snail

L'estabilització i detirosinació de la xarxa microtubular permet que la proteïna motora quinesina s'associï als microtúbuls. Això, com ha estat esmentat anteriorment, provoca canvis en la polaritat i la dinàmica dels components intracel·lulars. Una de les conseqüències és la reorganització dels filaments intermediaris de *vimentina* (*Gurland G i Gundersen GG, J Cell Biol 1995*). Els filaments intermediaris de vimentina composen una xarxa dinàmica, amb propietats motils que són directament lligades als microtúbuls. En els fronts d'avanç de les cèl·lules motils, els filaments de *vimentina* s'alineen en

paral·lel amb aquests últims, gràcies al transport actiu que la proteïna motora quinesina fa dels filaments en creixement cap a l'extrem membranal dels microtúbuls (revisat a *Clarke EJ i Allan V, Curr Biol 2002*). La proteïna motora *dineïna* també és essencial en el procés. Es desconeix amb certesa el sentit biològic d'aquest fenòmen, però es creu que en alguns tipus cel·lulars permet reorganitzar els components intracel·lulars i el citosol, coincidint amb el canvi de forma i polaritat cel·lular induït per l'estabilització de la xarxa microtubular.

Donat que *quinesina* s'associa de forma exclusiva amb els microtúbuls detirosinats, aquest efecte sobre la *vimentina* és només apreciable en presència d'aquests. Amb aquesta premissa, i donat que *Snail* un cop associat als microtúbuls els estabilitza i porta a la seva detirosinació, vàrem avaluar la distribució de la xarxa de *vimentina* en relació a la xarxa microtubular decorada per Snail (***Fig Rs-43***). En cèl·lules epitelials, la presència d'*Snail* és capaç d'induir la reorganització dels filaments intermediaris de *vimentina*, que creixen orientant-se en paral·lel als



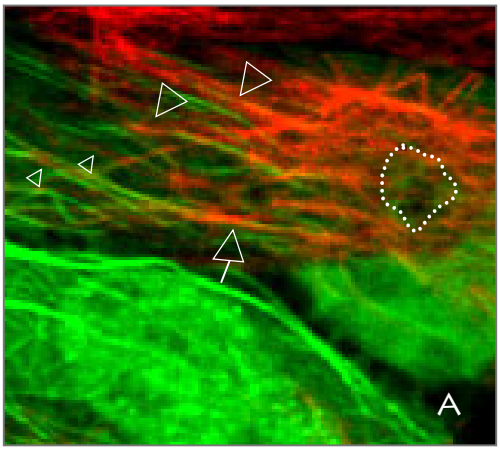


FIGURA RS-43 REORIENTACIÓ DELS FILAMENTS DE VIMENTINA AL VOLTANT DELS MICROTÚBULS ESTABILITZATS PER SNAIL
Transfecció transitòria i expressió d'eGFP-mSnail en cèl·lules MDCK pre-confluents, i immunofluorescència per Vimentina revel·lada amb un anticós secundari conjugat a Alexa 594.
En les dues cèl·lules transfectades amb Snail, el citoesquelet és organitzat paral·lel a l'eix major, i el nucli és polaritzat a l'extrem contrari, mentre que el centrosoma (caps de fletxa en el panell superior, encerclat a la imatge inferior) és situat per davant del nucli. Aquesta disposició és característica de cèl·lules migratòries, en aquest cas avançant en la direcció marcada per les fletxes en la primera imatge i la corresponent tinció amb Vimentina.
Els filaments de Vimentina es disposen "pentinats" en una orientació paral·lela a la dels microtúbuls (observeu imatge dreta del segon panell, i ampliació (A)). Les fletxes assenyalen punts on és possible apreciar aquesta relació.
Confocal 63X, i zooms variables. La ampliació final ha estat realitzada digitalment (Photoshop).

microtúbuls decorats per *eGFP-mSnail*. En les cèl·lules no transfectades veïnes (vegeu figura), la xarxa de *vimentina* és preferentment perinuclear, fet que sembla concordar amb referències prèvies que suggereixen que en absència de *quinesina* associada als microtúbuls, el transport de vimentina mediat per la *dineïna* cap a l'extrem centrosòmic dels microtúbuls és predominant (*Clarke EJ i Allan V, Curr Biol 2002*). L'efecte és més evident en els extrems capdavanters de les cèl·lules.

En essència, *Snail* és capaç d'induir en el citosquelet canvis reorganitzatius importants, similars als descrits per a cèl·lules motils -estabilització i detirosinació microtubular, reorganització dels filaments de vimentina com a conseqüència-. Aquest fet pot aportar una explicació funcional raonable a la presència d'Snail al citosquelet cel·lular.

Un sistema complex per a un factor complex

La diversitat de funcions associades al factor de transcripció *Snail* i els seus homòlegs és possiblement reflex de la seva importància cabdal en el desenvolupament embrionari (vegeu les revisions a *Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002; Ip YT i Gridley T, Curr Opin Gen Dev 2002*; i *Hemavathy K et al, Gene 2000*), i no sabem encara si en el funcionament cel·lular normal. La rellevància dels efectes que genera en les cèl·lules on és expressat permet gairebé equiparar-lo amb d'altres factors i unes poques vies moleculars considerades biològicament essencials per als organismes, com les de *Notch* o *Wnt/Dsh/Beta-catenina* (*Barolo S i Posakony JW, Genes Dev 2002*). *Snail* coordina tot un seguit d'esdeveniments biològics orientats a la redefinició -possiblement transitòria- del fenotip cel·lular, concretats en bona part en el què es coneix com "*transició epiteli-mesènquima*" (*EMT*). Aquest bloc programàtic s'utilitza de forma indiferent en processos temporalment dispars com la invaginació del futur mesoderma i endoderma durant la gastrulació (si més no en *amniotes* com aus i mamífers), la gènesi-delaminació de la cresta neural, o el procés d'invasió-metàstasi dels tumors epitelials (*Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002* i cites allí referenciades). En el procés d'*EMT* encaixen els efectes d'*Snail* en motilitat cel·lular (*Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000; Cano A et al, Nat Cell Biol 2000*) i cicle cel·lular (*Groβhans J i Wieschaus E, Cell 2000*). La implicació d'*Snail* en altres processos -diferenciació de neuroblastes en el Sistema Nerviós Central (*Ashraf SI et al, EMBO J 1999*), divisió cel·lular asimètrica a *Drosophila* (*Cai Y et al, EMBO J 2001; Ashraf SI i Ip YT, Development 2001*) i establiment de l'asimetria corporal dreta-esquerra (*Isaac A et al. Science 1997; Lespinet O et al, Dev Genes Evol 2002*)- no sembla ésser associada als mecanismes d'*EMT*, però com discutirem més endavant, podrien encaixar amb els efectes no transcripcionals que proposem té *Snail* a les cèl·lules on és expressat.

Efectes no transcripcionals per a Snail?

L'activitat transcripcional d'*Snail* és una explicació insuficient per a tots els canvis fenotípics que ocorren derivats de la seva expressió. És possible que l'efecte fenotípic més ancestral per a tota la família gènica (*Snail/Slug*) sigui l'*EMT*, ja que és el fenomen que millor correlaciona amb la seva expressió en totes les espècies i processos on ha estat descrit, des de la migració de la cresta neural o la gastrulació, fins a la decondensació dels somites, formació dels coixinets endocardíacs (*Nieto MA et al, Nat Rev Mol Cell Biol 2002* i cites referenciades) o com hom suggereix, la fusió del paladar, que és també un exemple paradigmàtic d'*EMT (Hay Ed et al, Acta Anat 1995).* No obstant, l'*EMT* no pot ésser explicada per mecanismes de repressió transcripcional *(Hemavathy K et al, Development 1997; Ip YT i Gridley T, Curr Opin Gen Dev 2002)* perquè la repressió de les dianes transcripcionals conegudes per a aquest factor, no és suficient per generar tots els canvis associats a aquest procés. Una possibilitat fora que d'altres dianes encara no conegudes -però molt possiblement existents, fossin les més essencials; o bé que *Snail* fos capaç d'exercir un efecte activador secundari -per repressió de repressors, el què fins ara es considerava més plausible - o bé directe sobre alguns gens concrets (*Mauhin V et al, Nucleic*

Acids Res 1993; Ashraf SI i Ip YT, Development 2001).

Alguns autors han suggerit que l'efecte d'*Snail* en processos com per exemple la divisió asimètrica en el Sistema Nerviós de *Drosophila (Cai Y et al, EMBO J 2001)* , o la parada en *G2* del cicle cel·lular en l'embrió pre-gastrulació (*Groβhans J i Wieschaus E, Cell 2000)* hauria d'ésser post-transcripcional per a poder donar una explicació més comprensible a les observacions experimentals. En la divisió asimètrica de neuroblasts en el Sistema Nerviós Central de *Drosophila*, Cai i col·laboradors suggereixen que *Snail* és capaç de regular els nivells de la proteïna *Inscuteable*[NP67], element essencial en el procés, per algun mecanisme que precisa de les regions 5'/3' no transcrites de l'ARNm d'aquesta proteïna. Això, partint del supòsit que *Snail* és estrictament un factor transcripcional de localització nuclear, és difícil d'encaixar (*Cai Y et al, EMBO J 2001*). No obstant, d'altres autors han explicat aquests dos mateixos fenòmens per un possible efecte activador transcripcional d'*Snail* (*Ashraf SI i Ip YT, Development 2001*), que malgrat ésser repetidament sospitat i suggerit a la literatura, ningú ha confirmat ni aclarit mecanísticament.

En qualsevol cas, sembla evident que la repressió transcripcional no és un instrument suficient per a donar explicació coherent a tot el què fa *Snail*. Les nostres troballes plantegen l'existència de possibles efectes no transcripcionals derivats de la seva activitat.

En algunes cèl·lules com moltes de les epitelials que hem pogut estudiar, *Snail* no és restringit al nucli i es localitza en el citosquelet. Alhora, en el nucli s'associa amb freqüència als *speckles nuclears*, una distribució no usual per a un factor de transcripció amb dits de zenc. La distribució d'*Snail* en diferents compartiments cel·lulars, no directament relacionats amb la transcripció de gens, pot permetre a aquest factor coordinar diversos efectes biològics, coherents amb totes les funcions que li han estat atribuïdes -moltes d'elles determinants en el procés de transició epiteli-mesènquima (*EMT*). L'heterogeneïtat dels seus efectes serà reflectida probablement en la complexitat dels mecanismes moleculars que regulen l'activitat d'aquest factor de transcripció.

Snail és expressat a nivells basals en diverses línies de cèl·lules epitelials

En bona part de les línies cel·lulars avaluades en aquest treball hi ha nivells basals d'expressió d'*Snail* detectables per RT-PCR. Resultats similars han obtingut d'altres autors per RT-PCR o Northern Blot (*Hajra KM et al, Cancer Res 2002; Okubo T et al, Cancer Res 2001*), i en alguns casos la correlació amb el fenotip invasiu o la davallada en l'expressió d'*E-cadherina* no és l'esperada. Recentment però, s'ha suggerit que alguns d'aquests resultats corresponen a interpretacions errònies de l'expressió del retrogen humà d'*Snail*, situat al cromosoma 2 (*Locascio AM et al, J Biol Chem 2002*). No obstant, aquesta explicació no és acceptable per línies epitelials tumorals no humanes, com les *IEC-18* (ileon, rata) o les *EpH4* (mama, ratolí). En ambdós casos és possible detectar nivells d'*Snail* acceptables per RT-PCR que coexisteixen amb l'expressió d'*E-cadherina* i un fenotip epitelial evident (***Fig Dc-1***), àdhuc el fet que no es coneix cap retrogen de ratolí amb característiques similars a les descrites per l'humà. Malgrat possibles apreciacions i discussions al voltant d'aquesta discrepància en l'esperada correlació

[67] Ningú ha clonat cap homòleg d'*Inscuteable* en vertebrats o invertebrats fora de *Drosophila*. Recentment s'ha descrit la localització d'un possible homòleg humà d'Inscuteable al cr. 11, basats en seqüències genòmiques (*in silico*, *Katoh M i Katoh M, Int J Mol Med 2003; 11(1): 111-6*).

inversa *E-cadherina/Snail* i el fenotip (vegeu més endavant), és clar que en algunes línies epitelials tumorals -i potser normals d'acord amb altres dades referenciades (*Okubo et al, Cancer Res 2001*) hi ha un nivell basal detectable d'expressió d'*Snail.*

L'arquitectura del promotor en la zona proximal a l'inici de transcripció recorda a la dels promotors sense caixa *TATA*, amb caixes *Sp1* i una caixa *CAATT*. Aquesta organització és compatible amb la dels promotors de gens regulats per processos aasociats al desenvolupament embrionari, i a la dels gens "*housekeeping*". Aquests tipus de gens mantenen nivells basals de transcripció i són regulables per la interacció de la regió proximal rica en caixes *Sp1* i *CAATT* amb elements amplificadors o silenciadors (l'*Element d'Exclusió Epitelial*?) disposats a distància variable. En el cas d´Snail, aquest és també el segment exclusivament conservat en el petit promotor que sembla regir la transcripció basal del retrogen humà *SNAI1L* descrit per Locascio A i cols. (*J Biol Chem 2002*).

Perquè expressar Snail pot ser un procés de derepressió activa

Bona part de la regió promotora d'*Snail* sembla contenir elements suficients per a mediar una repressió relativament eficient de la seva expressió en cèl·lules epitelials. En la majoria de cèl·lules avaluades aquesta repressió és efectiva, però no suficient per a eliminar els nivells basals de transcripció. No hem pogut verificar de forma directa la potencialitat repressora d'aquests segments, fusionant-los per exemple a petits promotors constitutius com el de *citomegalovirus* (*CMV*). Tanmateix, les dades indirectes derivades de la seva deleció així ho suggereixen. Això voldria dir que, per activar *Snail* en part cal dereprimir-lo de forma activa. Desconeixem si

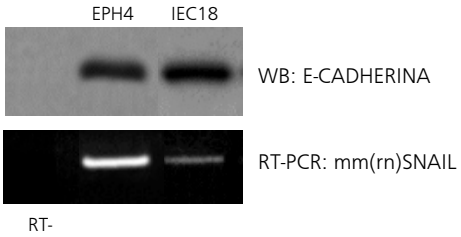


FIG DC-1 : SNAIL I E-CADHERINA SÓN CO-EXPRESSATS EN ALGUNES LÍNIES CEL·LULARS EPITELIALS NO HUMANES
Western-Blot per l'expressió d'E-cadherina en lisats totals de cèl·lules EpH4 (mama, ratolí) i IEC18 (budell, rata); i RT-PCR per l'ARNm d'Snail (35 cicles). Tot i que en quantitats variables, ambdues línies expressen alhora nivells apreciables d'Snail i E-cadherina, fet que és compartit per algunes línies epitelials humanes.
(Resultats de Sandra Guaita i Isabel Puig)

això fora suficient per assolir nivells d'expressió "acceptables" des del punt de vista biològic. Desconeixem també si en aquesta regió "*d'exclusió epitelial*" com l'hem anomenada, fora possible la unió de factors activadors. Les nostres dades es limiten a indicar que l'efecte activador sembla concentrat en la regió promotora mínima, i per tant plantejaria la possibilitat que l'expressió final d'*Snail* depengués del balanç de les activitats derivades d'ambdues regions del promotor. El promotor mínim (*-97/+42*) conté elements que són suficients per a mediar la seva activitat basal en qualsevol tipus cel·lular testat que, val a dir, en algunes línies epitelials com les *RWP1* és gairebé tant elevada com la del promotor mínim d'*E-cadherina*. Això encara dona més rellevància als *Elements d'Exclusió Epitelial* i indica que potser, l'absència de factors repressors faria que en cèl·lules mesenquimals com els fibroblasts els nivells basals d'*Snail* fossin ja de per sí elevats.

El promotor basal conté els elements de resposta a alguns activadors d'EMT coneguts

L'estreta relació existent entre el procés d'*EMT* i l'expressió d'*Snail* és explicada per l'augment d'expressió d'aquest factor de transcripció en alguns models experimentals (*Tan C et al, Oncogene 2001*) o "patològics" (*Blanco MJ et al,*

Oncogene 2002) d'*EMT*. Tot i que no disposem de dades concloents, en la regió promotora mínima d'*Snail* i regions adjacents hi ha possiblement els elements de resposta a alguns d'aquests factors inductors d'*EMT* com els *èsters de forbol* (*12-O tetradecanoyl- phorbol 13-myristate-acetate*, *TPA*) o traçats moleculars com el depenent d'*ILK* (*Integrin Linked Kinase*). Hem delimitat parcialment aquests elements de resposta: l'element de resposta a ILK es localitza en el segment *-213/-144;* l'element de resposta al *TPA*, en el segment *-97/+48.* No hem estat capaços de determinar les dianes específiques i tampoc els factors que directament medien la resposta. En l'element més ben establert, què és el de resposta als senyals d'*ILK*, el nombre possible de factors coneguts que hi podrien tenir diana és escàs, i gairebé queda restringit a *Sp1*, *NF-κB*, o elements que podrien unir-se a les *E-box*. Alguns resultats preliminars de membres del nostre grup suggereixen que d'altres factors capaços d'activar l'expressió d'*Snail* tindrien també dianes essencials en aquesta regió. El mateix ocorreria per possibles candidats activadors com *NF-κB* (vegeu més endavant). L'aparició d'*Snail* en el procés d'*EMT* sembla condicionada doncs, a un increment en la seva expressió, que té un substrat molecular i transcripcional evident.

I tanmateix, si com sembla l'activació de l'expressió en l'*EMT* depèn de l'activitat d'aquestes regions més properes a l'inici de transcripció, no sabem quin deu ésser el rol jugat per les regions compreses en l'*element d'exclusió epitelial*.

Regula Snail la seva pròpia transcripció?

Un element conservat entre el promotor humà i el de ratolí, i present en l'element de resposta a *ILK* és una *Ebox* amb una seqüència que curiosament encaixa amb el consens per a *Snail* (5' CACCTG 3'). Malgrat que no és inclosa en la *Regió Mínima Promotora,* cap la possibilitat que en algunes situacions tingui un efecte regulador.

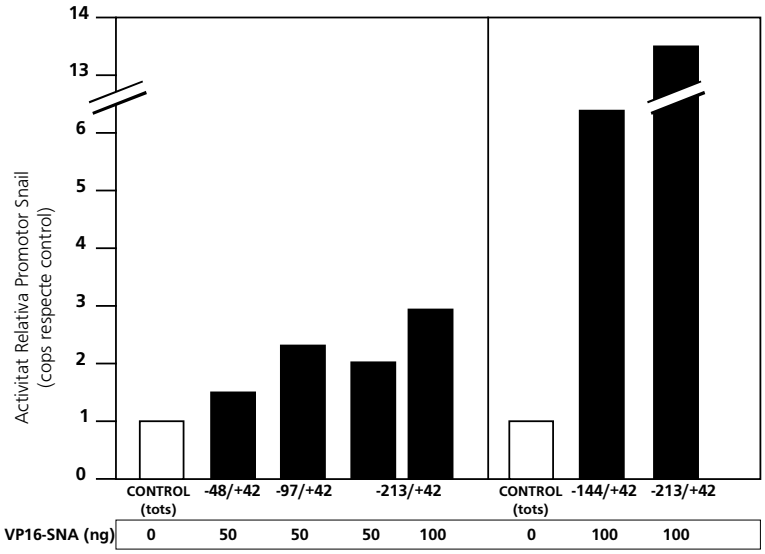
Mauhin i col·laboradors (*Nucleic Acids Res 1993*) varen descriure l'existència de seqüències consens per *Snail* en el sí del promotor de *Drosophila* que eren probablement funcionals, ja que els va ser possible verificar experimentalment l'associació directa d'*Snail* a diverses regions (precedents i distals a l'inici de transcripció) d'aquest. Almenys varen identificar 9 possibles dianes, d'acord amb els resultats dels assaigs de canvi en la mobilitat electroforètica. Posteriorment no s'han referenciat més dades al respecte, però en aquell treball els autors hipotetitzaven sobre un possible efecte autoregulador d'*Snail*, com ocorre amb d'altres gens implicats en desenvolupament.

En la regió 5' a l'*Ebox* consens descrita hi ha més de 4 possibles consens per a *Snail* addicionals, un d'ells canònic (5'CAGGTG3'), a 249 nucleòtids de l'anterior (*-414/-409),* la resta similars als descrits com de menor afinititat per Mauhin i cols. Recorda doncs el mateix què és descrit en el promotor de *Drosophila*. En el promotor de ratolí ocorre també quelcom similar.

Un constructe de fusió entre el domini d'unió a l'ADN d'*Snail* i el transactivador *VP16* [NP68] és capaç d'incrementar significativament l'activitat del constructe reporter amb el promotor, fet què suggereix que *Snail* pot possiblement unir-se al seu promotor. L'efecte és molt més patent en cèl·lules mesenquimals com els NIH-3T3 (vegeu ***Fig Dc-2***), on l'eliminació de l'*Ebox (-165/-160*) per deleció del segment *-213/-144* redueix l'efecte activador del constructe. Això no ocorre però en cèl·lules epitelials com les RWP1: en aquest tipus cel·lular, les truncacions successives de l'extrem 5' del promotor fins a segment *-48/+42* no condicionen en excès l'efecte d'*VP16-Snail,* que

[68] Aquest constructe és el mateix que l'utilitzat en els assaigs exposats a *Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000*

FIG DC-2 : EFECTE TRANSCRIPCIONAL DEL CONSTRUCTE DE FUSIÓ VP16-SNAIL SOBRE EL PROMOTOR HUMÀ D'SNAIL.
El domini d'unió a l'ADN d'Snail fou fusionat a l'ADNc del transactivador VP16 per tal de fer una quimera capaç de transactivar els promotors amb dianes específiques per Snail. En assaigs reporter, aquest constructe de fusió fou co-transfectat amb 250 ng de constructe reporter de luciferasa amb el promotor humà d'Snail i les diverses truncacions, en cèl·lules **RWP1** (*primer requadre*) o **NIH-3T3** (*segon requadre*). Els resultats corresponen a la mitjana de 2 experiments realitzats per triplicat en cada punt.



tanmateix és dosi-depenent. No hi ha però dianes putatives per Snail en aquest segment o l'anterior (*-97/-48*), i per tant, desconeixem com aquest transactivador quimèric exerceix el seu efecte.

Hem avaluat l'efecte directe d'*Snail* sobre el seu promotor, però els resultats no són prou reproduïbles. En 2 assaigs amb els controls pertinents i en cèl·lules RWP1, *Snail* és capaç de reprimir l'activitat del seu promotor en un 40%, per bé que l'efecte ocorre tot i l'absència de l'*Ebox (-165/-160)*. Aquesta observació és coincident amb la d'*VP16-Snail* en aquestes cèl·lules.

Una arquitectura conservada per a respondre al sistema Dorsal/ NF-κB

En *Drosophila* l'activació de l'expressió d'*Snail* prèvia a la gastrulació és dirigida pel factor de la família *Rel*, *Dorsal* (*Ip YT et al, Development 1992*). L'homòleg de *Dorsal* en vertebrats, *NF-κB*, sembla que no té un rol essencial en les fases primerenques del desenvolupament embrionari, a diferència del què ocorre en *Drosophila* (*Schmidt-Ullrich R et al, Development 1996*).

Malgrat aquesta última dada, l'existència d'una possible seqüència de dianes putatives per *NF-κB* en el promotor humà ens va semblar atractiva, car suggeria la conservació arquitectural del promotor respecte a *Drosophila*. Els resultats experimentals indiquen que la senyalització pels factors de la família *Rel/ NF-κB* podria activar l'expressió d'*Snail*. D'acord amb això, hi ha diverses referències que suporten un rol rellevant per *NF-κB* en la progressió dels tumors sòlids, sobretot en el procés invasiu i metastàsic (*Rayet B i Gelinas C, Oncogene 1999; Andela VB et al, Cancer Res 2000*), que és on també *Snail* seria expressat per les cèl·lules tumorals. Alhora, diversos factors capaços de posar en marxa el procés d'*EMT*, com els citats en aquest treball (els èsters de forbol-*TPA*-, i *ILK* -quinasa lligada a integrines-) són inductors de la senyalització per *NF-κB* (*Li X et al, J Biol Chem 1999; Dedhar S, Curr Opin Cell Biol 2000)* . Coincidentment, dins l'*Element de Resposta a ILK* en el promotor humà hi ha una de les caixes putatives de resposta a *NF-κB*. Quelcom similar ocorre amb la regió on sembla residir la resposta als senyals iniciats pels *èsters de forbol*, per bé que no és tan ben delimitada com l'anterior. També en els tumors és descrit un increment en la secreció d'*IL1*

(*interleucina 1*) i les vies de senyalització que en depenen. *IL1* és l'homòleg en vertebrats de *Toll (Tolloid)*, el lligand extracel·lular que durant el desenvolupament i procedent de la mare, posa en marxa l'activació de *Dorsal (NF-κB)*. Es creu que en els tumors *IL1* juga un paper fonamental en la rèplica creuada tumor/estroma que té lloc per exemple, en els fronts d'invasió (*Apte RN i Voronov E, Semin Cancer Biol 2002*). De fet, sempre s'ha suggerit una estreta relació entre els tumors i els teixits hoste, i la possibilitat que el comportament o progressió de les neoplàsies sigui força condicionat per aquests fenòmens (*Barker N i Clevers H, TRENDS Mol Med 2001*; *Brabletz T et al, Proc Natl Acad Sci 2001*).

És evident però que fora precís consolidar aquests resultats amb estudis d'interacció directa entre el promotor d'*Snail* i els factors de la família *Rel*, i que tanmateix caldria millorar les dades derivades de la mutagènesi selectiva de les caixes diana.

Un sistema robust per a distribuir Snail dins la cèl·lula, basat en la fosforilació

Snail és sotmès també a un sòlid sistema de regulació no transcripcional de la seva activitat, fonamentat en el control estricte de la seva localització subcel·lular. Aquest concepte és nou, car fins al moment únicament es coneixia -i sospitava- l'existència del control transcripcional de la seva activitat basat en la regulació dels nivells d'expressió. Aquest treball demostra que el mecanisme de regulació no transcripcional funciona de forma constitutiva i en tots els tipus cel·lulars que hem pogut analitzar. La robustesa del sistema suggereix que el control de la localització subcel·lular d'*Snail* hauria d'ésser determinant per a la seva funció.

Una NES per Snail sense NLS coneguda

La localització subcel·lular d'*Snail* es determina en el balanç entre la seva entrada o sortida del nucli. L'entrada sembla constitutiva, car tots els constructes testats hi passen: la meitat N-terminal, per exemple, que és exclusivament citosòlica, pot ésser retenida al nucli amb gran eficiència per efecte de la *Leptomicina B* (*LMB*). No obstant, ningú ha descrit cap *NLS* (senyal de localització nuclear) clara per a *Snail*. En la seqüència de ratolí és possible trobar una regió que podria complir el consens per a una *NLS* (*PSORT server*, accessible a la *Web*), i que es trobaria dins els primers 24 aminoàcids de la molècula, adjacent al domini *SNAG* (entre els aminoàcids 8 i 19 de la seqüència de ratolí, 5'***RK***PSDPRR***RK***PNY3', essent els aminoàcids bàsics en negreta aquells conservats o semiconservats en tots els homòlegs, i que en permeten la predicció). Tanmateix la predicció no és d'alta fiabilitat. El domini *SNAG* originalment descrit al repressor *Gfi-1* (*Grimes H et al, Mol Cell Biol 1996*) té 2 lisines (K) a les posicions 10-11, absents al domini *SNAG* dels homòlegs d'*Snail* en vertebrats. La mutació d'ambdues lisines a alanina(A) condiciona clarament l'entrada de *Gfi-1* al nucli, i per això, el domini *SNAG* a *Gfi-1* té una funció repressora i en media la localització nuclear de la proteïna (*Grimes H et al, Mol Cell Biol 1996*). Tanmateix, això només és cert quan hi ha la meitat C-terminal, on es troben els dits de zenc de *Gfi-1*, fet que va suggerir a *Grimes i col·laboradors* que l'entrada al nucli d'aquest factor depenia de la conformació espacial de la molècula, en implicar elements d'ambdues cues que participaven d'una possible estructura *NLS*. No és descartable que ocorri el mateix amb *Snail*.

És possible però que els dits de zenc per ells mateixos mediïn la localització nuclear d'*Snail*, car la meitat C-terminal és essencialment nuclear.

Quelcom similar ocorre amb *Scratch (Nakakura EK et al, Proc Natl Acad Sci 2001)* i potser amb *Gfi-1*. Però en cap dels casos és possible trobar seqüències similars a una *NLS* a, o entre els dits de zenc d'aquestes proteïnes. Òbviament, la localització nuclear d'*Snail* podria dependre d'altres seqüències no tipus *NLS*, però tampoc no han estat identificades.

L'export nuclear és també constitutiu, però la seva eficiència és variable depenent del tipus cel·lular i de cada cèl·lula. En aquest cas, hem identificat una seqüència d'export nuclear (*NES*) funcional abans no descrita. Presumiblement, l'export d'*Snail* depèn de la interacció entre aquesta seqüència i el transportador *CRM1*, i pot ésser certament bloquejat amb *LMB*. El fet més curiós és que la *NES* és només present i estrictament conservada en els homòlegs d'*Snail* en mamífers, i no en la resta d'homòlegs en vertebrats o invertebrats. Aquest fet és força excitant des del punt de vista filogenètic, i el comentem més endavant.

La fosforilació modula la localització d'Snail per el domini ric en serines

El substrat molecular de la regulació no transcripcional de l'activitat d'*Snail* recau en la modulació de l'activitat o disponibilitat de la NES. Això s'ha aconseguit mitjançant modificacions estructurals regulables de la proteïna.

La fosforilació, què és un mecanisme de modificació post-traduccional de les proteïnes força ràpid i efectiu, ha estat l'eina escollida. En tots els membres de la família *Snail* (*Snail* i *Slug*, i tots els seus homòlegs) és possible trobar un domini ric en serines precedint a certa distància la regió amb dits de zenc. Aquesta associació estructural no sembla ocórrer per atzar, ja que es troba amb més freqüència al proteoma d'allò que fora predictible per combinatòria simple. En una anàlisi relativament exhaustiva hem pogut trobar diverses proteïnes amb arquitectura similar, i són llistades a la ***Taula Dc-1***. Crida l'atenció que la gran majoria són factors relacionats amb processos importants per al desenvolupament embrionari (proteïnes *Gli, Ovo-1, Krueppel*, ...), i per alguna d'elles s'ha descrit també l'existència de distribucions subcel·lulars alternatives nucli/citosol que poden regular-ne l'activitat (és el cas de les proteïnes *Gli , Kogerman P et al, Nat Cell Biol 1999*).

El domini ric en serines d'*Snail* (i el d'*Slug*, i també el d'*Ovo-1* [NP69], p.e.) es troba a la regió central de la molècula. La *NES* és situada entre aquest i els dits de zenc. El fet que la pràctica totalitat dels residus serina que es troben a la seqüència aminoacídica d'*Snail* es concentressin en aquest petit domini ens va semblar força interessant. *Snail* és fosforilat "in vivo", i les dades experimentals confirmen que bona part -sinó tots - els residus fosforilats deuen trobar-se inclosos en el domini ric en serines. Concentrar la major part dels events de fosforilació en una petita regió fa possible que aquesta funcioni com un acumulador de càrrega. Això, afegit al fet que el mateix domini i les zones circumdants tenen una estructura secundària de baixa complexitat, força flexible i poc estable (segons predictors informàtics com *PredictProtein*, i l'*ScanProSite* de l'*EMBL*), podria encaixar amb la idea que tota aquesta zona de la proteïna es comportés com

[69] *Snail* i *mOvo1* comparteixen similituds en l'arquitectura, però també en una seqüència de 8 aminoàcids què hem anomenat "*domini Ovo*". Es troba entre els residus 15 i 22 de tots homòlegs d'*Snail* en vertebrats i *Slug*, amb la seqüència "(*R/K)KPNYSEL*", adjacent al domini *SNAG*. El domini a *mOvo1* té la seqüència *KRNWSEL*. No hi ha dades sobre el seu significat ni a *Ovo1*, ni a *Snail*: hem deleccionat aquesta seqüència amb el domini *SNAG (mSnail 25-264)*, i no sembla afectar la localització subcel·lular de la proteïna. Més curiós, en ambdós casos aquesta seqüència es troba a la mateixa distància de l'inici de la proteïna; i els 7 primers aminoàcids d'*Ovo1* (*MPRAFLVKK*) tenen una seqüència força similar al domini *SNAG* (*MPRSFLVKK*). En desconec el significat, però és molt suggerent..

ABREVIACIÓ	NOM	ESPÈCIE	INICI DOMINI RIC SERINES	INICI DITS ZENC	DADES BIOLÒGIQUES
SP1	Serotonin Promoter binding protein 1	Humà, Rata	271	628	Activació transcripcional de diversos promotors, molts d'ells TATA-less. S'uneix a regions GC.
CPBP (ZF9, KLF6)	Core-promoter element binding protein	Humà, Rata	82	202	Activador transcripcional, que s'uneix a caixes GC. Possiblement interacciona amb altres factors de transcripció. Implicat en desenvolupament de limfòcits B
EGR1,2,3,4	Early Growth Response factor	Humà i diverses (pollastre, ratolí, Xenopus)	156, 429	340	Similar a factors de la família Krüppel. Resposta immediata a factors com TPA
BTD	ButtonHead	Drosophila	100	335	Molt relacionat amb Sp1. Implicat en desenvolupament embrionari (gastrulació, segmentació, ...)
OPA	Odd-Paired pair-rule protein	Drosophila	293, 382	323	Factor nuclear, implicat en l'activació de Wingless en el procès de segmentació en la larva
OVO	Ovo/Shaven baby	Ratolí, Drosophila	524	876	Homòleg de la proteïna Svb (shaven-baby) a Drosophila. Implicat en processos de diferenciació dela línia germinal i el pèl
GLI 3,4	Glioma-associated oncogene homolog	Humà, Ratolí, Xenopus	276, 849	482	Implicades en establiment del patró organitzatiu de l'embrió, sobretot a extremitats i cervell. Relacionen les vies de Wnt i Shh. *Cubitus interruptus* a Drosophila n'és l'homòleg, i es transloca de citosol a nucli. Defectes en GLI causen malformacions craniofacials i polisindactilia, i neoplasia.
HUNB	Hunchback	Drosophila	655	707	Implicada en la segmentació de l'embrió (GAP class segmentation protein), amb especial rol en el desenvolupament del cap
KLF4	Krüppel-like factor 4	Humà	116	389	Molt expressat a budell, pot estar implicat en la diferenciació dels epitelis i possiblement l'esquelet. S'uneix a caixes CACCC.
SALM	Spalt-Major	Drosophila	1067	907, 1338	Gen homeòtic. Possiblement repressor transcripcional, possiblement de SHH. Implicat en la definició dels extrems més distals de cap i cua de l'embrió.
SIP1	Smad Interacting protein 1	Humà	778	213, 1001	Anomenat també ZEB2, ZFHX2.Ubiquu en cèl·lules epitelials. 2 regions amb dits de zenc i homeobox central. S'uneix a Ebox similars a les d'Snail i interacciona amb proteïnes SMAD activades
ZEP1,2	Zinc Finger protein 40 Alpha A- crystallin-binding protein I	Humà	1291	2076	Factor de transcripció que s'uneix específicament a la seqüència palindròmica 5'-GGGAAATCCC-3' que hi ha al promotor de la proteïna Alfa-A-cristal·lina, una xaperona implicada en el desenvolupament del cristal·lí
ZFH2	Zinc-Finger Homeodomain protein 2	Drosophila	2129	2236	Homòleg de ZEB

TAULA DC-1 : BREU LLISTAT DE PROTEÏNES CONEGUDES AMB L' ARQUITECTURA DOMINI RIC EN SERINES-DITS DE ZENC SIMILAR A LA TROBADA EN SNAIL

L'associació en la mateixa molècula de dominis rics en Serines i Dits de Zenc (C_2H_2) és molt més freqüent en la natura del què fora predit per simple atzar. Aquest llistat es centra només en aquelles en què el domini ric en Serines precedeix els Dits de Zenc. Moltes d'elles són factors amb funcions essencials en el desenvolupament, i en alguns d'ells es tenen dades de l'existència d'un flux alternatiu nucli-citosol en la seva distribució subcel·lular (és el cas de les proteïnes *GLI*). Les posicions numèriques mostrades a la taula corresponen a l'aminoàcid on s'inicia el domini esmentat. En el cas de diversos homòlegs, la posició es refereix a l'homòleg que és subratllat.

Les proteïnes de la família Snail s'han exclós del llistat. Dades obtingudes a través de l'NCBI (BLAST, LocusLink, i utilitats del sistema SwissProt de l'EMBL).

una regió "*frontissa*". Això permetria articular la proteïna pel centre, i podria apropar l'extrem N-terminal, d'estructura secundària poc definida, a la meitat C-terminal, molt estructurada i de plegament definit per ser integrada pels dits de zenc. Aquesta podria ésser l'explicació estructural a la interacció que existeix entre ambdues meitats de la proteïna. Aquesta interacció, en ésser regulada per l'estat de fosforilació del domini ric en serines, és dinàmica, i per tant, pot condicionar la conformació espacial de la proteïna. La conseqüència més directa és que el senyal d'export nuclear (*NES*), que justament quedaria en el centre d'aquesta interacció, sigui o no exposat a la superfície de la proteïna, i per tant, sigui o no accessible als sistemes moleculars d'export nuclear -*CRM1*, de fet.

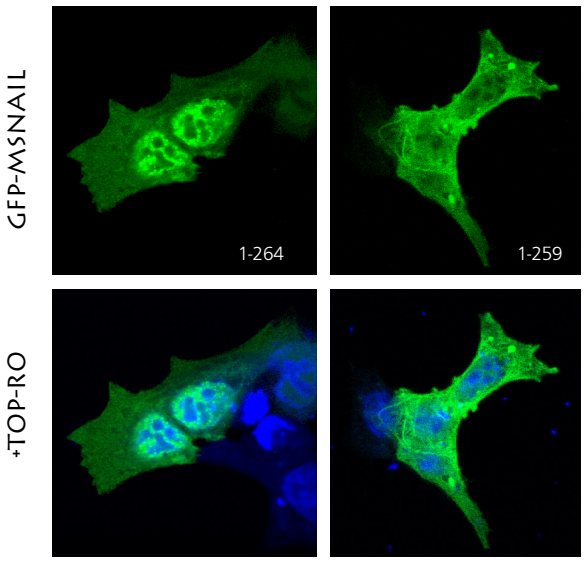
Hi ha alguns dubtes, que crec podran ésser resolts a curt plaç. El primer és la quantitat de residus que poden ser i han de ser fosforilats en el domini ric en serines. L'estequiometria del procés de fosforilació és encara desconeguda per nosaltres. Les reaccions de fosforilació in vitro amb *PKCalfa*, que pensem que no deu ser pas una de les quinases actives "in vivo" sobre el domini, suggerien que no més d'un residu es devia fosforilar en el procés. Però hi ha molts consensos de fosforilació dins aquesta regió, malgrat hem descartat bona part de les quinases candidates (si més no, "in vitro", amb les salvetats que això comporta).

L'altre dubte, referent a la conformació tridimensional que en realitat pren la molècula, serà resolta en cristal·litzar-la. El primer què haurà de confirmar serà què existeix aquest plegament proposat. I a continuació, haurà de permetre determinar quins aminoàcids són implicats, per a cada meitat d'*Snail*, en la interacció d'ambdues cues. Els resultats exposats indiquen que alguna regió entre els aminoàcids *121 i 151* de la meitat N-terminal deuen estar mediant la interacció amb la cua C-terminal. No podem descartar la *NES* (*132-143*) com a lloc d'interacció, més si tenim en compte que alguns dels residus i un triplet d'aminoàcids (*KQL,* residus *137-139*) inclòs en la *NES* són conservats en tots els homòlegs i *Slug,* com també es troba semiconservada una regió de 5 aminoàcids que inclou l'inici de la mateixa *NES (129-133)*. Ambdues regions són possiblement restes estructurals del primer dit de zenc (ZNI) original de la família *Snail*.

La fosforilació té com a efecte final causar un canvi conformacional a la molècula

Tampoc tenim prou dades per explicar com el domini ric en serines modula aquesta interacció entre les dues meitats d'*Snail*, per bé que ho fa. Si no és el lloc d'interacció de la meitat N-terminal - d'això en tenim prou dades moleculars, i l'efecte és associat a l'acumulació de càrregues, deu desplaçar la cua C-terminal de la seva interacció amb la N, tot i que no ho fa reclutant la primera sinó que possiblement desplega la proteïna. Potser la seva fosforilació fa que tota aquella regió prengui una conformació diferent que sigui incompatible amb la interacció que estableix amb l'extrem C-terminal (vegeu ***Box Dc-1***). Tot i que aquest model és el més creïble amb les dades que tenim, caldrà confirmar-lo.

La deleció de l'últim dit de zenc (237-264), o dels últims 5 aminoàcids, que mantenen un lleuger consens en els homòlegs de mamífer (*SGXPR*) però no a *Slug*, comporten un increment apreciable en la relocalització citosòlica d'Snail, malgrat no en reverteix del tot la localització nuclear (il·lustrat a la ***Fig Dc-3***). Aquesta observació podria suggerir que aquesta regió distal, o només els 5 aminoàcids finals, participin en part en la interacció entre les meitats N i C-terminals.



% NUCLEAR (% speckles)	84 (50)	42
% CITOSOL NOMÉS	16	58
% DECORA MICROTÚBULS	30	50
CÈLS. TOTAL	87	105

FIG DC-3 : LA DELECCIÓ DELS ÚLTIMS CINC AMINOÀCIDS (260-264) COMPORTA LA RELOCALITZACIÓ PREDOMINANT D'SNAIL AL CITOSOL
Localització subcel·lular de la forma sencera (1-264) i la forma truncada en els últims cinc aminoàcids (1-259) d'mSnail fusionat a eGFP, en cèl·lules RWP1. Els nuclis han estat contratenyits amb TOP-Ro. Si bé no és general per totes les cèl·lules, la delecció 260-265 causa un augment significatiu en la localització citosòlica d'Snail, i en conseqüència de la localització microtubular, com és reflexat en la taula. Curiosament, en les cèl·lules on aquesta truncació és nuclear, no s'aprecia una distribució nuclear en speckles, com fora esperat.

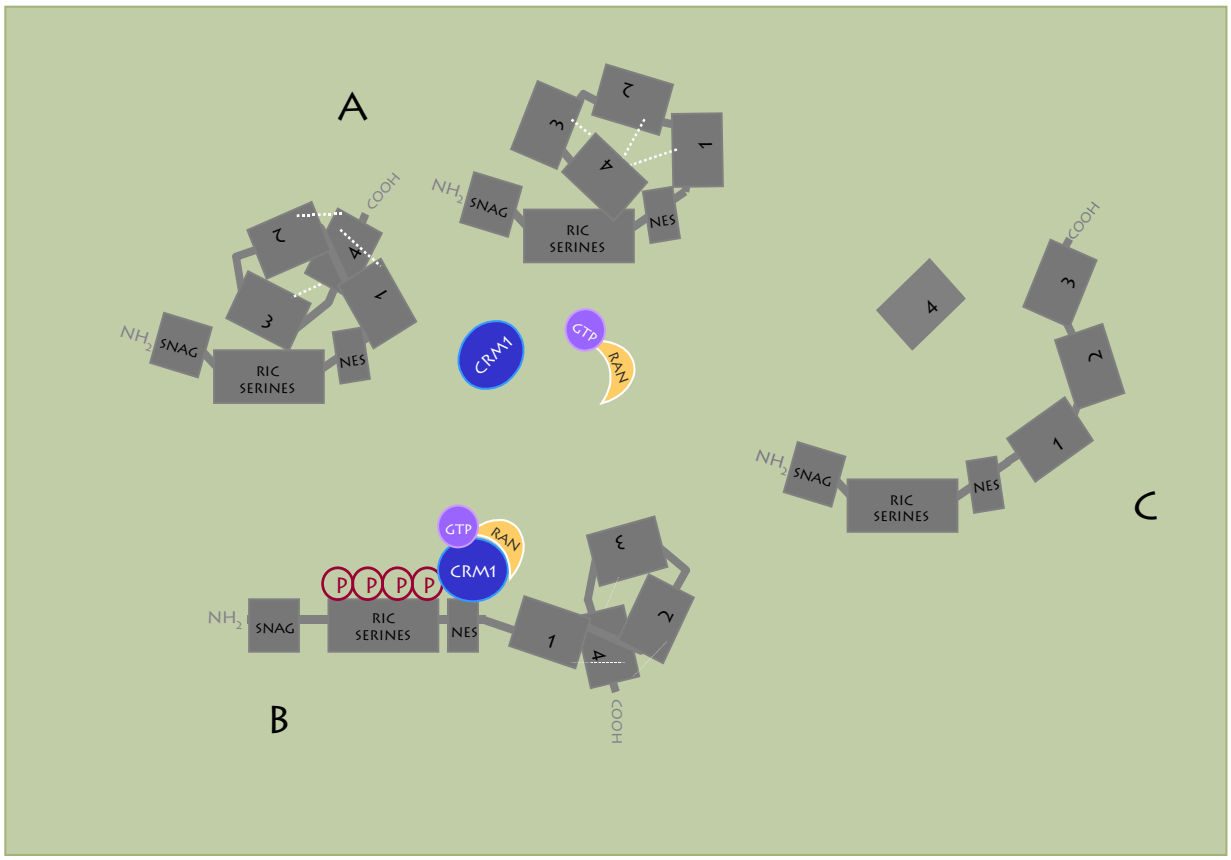
L'últim dit de zenc és conservat en tots els homòlegs i a *Slug*. Es considera que aquest dit de zenc i el segon (el primer de vertebrats, segon a *Drosophila*) són els més característics de la família *Snail*, en contraposició a *Scratch* (*Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*). El fet és, però que aquest últim dit de zenc no manté el consens C_2H_2 dels altres 3 dits. De fet, entre tots els homòlegs només es conserva una de les *histidines* típiques del consens, i on se'n troben dues (és el cas de l'*Snail* de ratolí) són separades per només un aminoàcid, fet inusual per al consens clàssic dels dits de zenc C_2H_2. Hom considera aquest dit de zenc atípic, però tanmateix, ha estat conservat en tota l'escala filogenètica. Cap la possibilitat que la seva permanència sigui indicativa de la conservació de la funció que realitzaria dins la molècula.

Els resultats dels assaigs de co-precipitació (PullDown) suggereixen que aquesta regió 237-264 de la cua C-terminal podria ser la que interacciona amb la meitat N-terminal, o que si més no condiciona aquesta interacció NxC. Això coincideix amb les observacions al microscopi de la distribució dels mutants fusionats a eGFP.

Cap la possibilitat doncs que aquesta porció de la molècula sigui la que directament media la interacció. Tanmateix, l'explicació que creiem més plausible és que aquesta regió terminal sigui important per a mantenir l'estructura espacial de la regió amb dits de zenc, i que en certa manera en coordini el plegament. Si bé la unió directa a la meitat N-terminal podria ésser exercida per un dels altres 3 dits de zenc, fet que "in vitro" seguiria essent apreciable en treballar amb les meitats aïllades, l'absència del fragment 237-264 en la molècula sencera seria suficient com per que "in vivo" el plegament coordinat de la molècula fos afectat. Una de les conseqüències derivades d'aquest fet fora l'emmascarament ineficient del senyal d'export (NES), amb el què es facilitaria la sortida d'Snail cap al citosol (vegeu ***Box Dc-1*** i seccions següents de la *Discussió*).

Arquitectura conservada en homòlegs allunyats, tot i no poder verificar el seu sentit funcional

Els assaigs d'interacció amb l'ADN que hem pogut realitzar semblen confirmar que, en la molècula sencera, la deleció de l'últim dit de zenc i els 5 aa. adjacents comporta una important pèrdua d'afinitat per les *Ebox* diana al promotor d'E-cadherina, si més no l'Ebox1. Això estaria en consonància amb el fet que, al contrari del què ocorre amb el mutant *S/D*, malgrat incrementar



BOX DC-1 : MODEL HIPOTÈTIC DELS CANVIS ESTRUCTURALS D'SNAIL EN RESPOSTA A LA FOSFORILACIÓ DEL DOMINI RIC EN SERINES O LA DELECCIÓ DE L'ÚLTIM DIT DE ZENC

(A)Hipotèticament, en condicions de no-fosforilació, Snail mantindria una conformació plegada, condicionada per la interacció entre les meitats N i C terminals, i l'estructura espaial ben definida que determinen els 4 dits de zenc C_2H_2. El rol de l'últim dit de zenc en aquesta estructura pot limitar-se a la coordinació del plegament de la zona de dits de Zenc, o potser també a mediar la interacció directa amb la meitat N-terminal (així s'observa a la figura). En aquesta conformació, el senyal d'export nuclear (NES) situat entre ambdues meitats seria cobert i per tant, no reconeixible pels mecanismes d'export. La fosforilació acumulativa del domini ric en Serines (B) comporta la desaparició de la interacció NxC, possiblement sense desestructurar la cua C-terminal, i en part modulant el plegament de la zona central de la proteïna i si cap la meitat N-terminal que, perduda la interacció NxC, i per la seva baixa complexitat estructural, romandria desplegada o sense conformació definida. Això permetria l'exposició del senyal d'export nuclear, amb el qual el complexe CRM1-RanGTP podria accedir-hi i excloure Snail fora del nucli. No es descartable que aquesta mateixa interacció permetés la formació de dímers d'Snail al citosol. Al nucli sembla que la unió als promotors es fa en monòmers (*Bolós V et al, J Cell Sci 2003*). (C) La delecció de l'últim dit de zenc comporta probablement la desestructuració parcial de la meitat C-terminal, potser perquè es manté certa coherència entre els 4 dits. Això provocaria un canvi conformacional capaç de fer més accessible el senyal d'export, o bé la fosforilació del domini ric en Serines. Tot i així, donat que aquesta deleció no la condiciona, la interacció NxC "in vitro" deu dependre dels altres dits de zenc, fet esquemàticament contemplat a la Fig A.

la quantitat de plàsmid transfectada, no aconsegueixi més que reprimir lleugerament (no més d'un 25%) el promotor d'E-cadherina en un assaig reporter, tot i passar pel nucli previ a ésser exportat.

Tanmateix torna a suggerir que la funció essencial d'aquest dit de zenc podria ser no associada a la interacció directa amb l'ADN. Suggerim doncs, que aquesta funció deu ser primerament la regulació de la conformació espacial de la proteïna a través la modulació del plegament de la cua C-terminal. Aquest juga un rol determinant en el plegament de la molècula sencera, i és el substrat molecular de l'efecte que la fosforilació té en determinar la localització d'Snail. Fora interessant, en aquest sentit, avaluar la possibilitat que *Slug,* l'altre membre de la família en vertebrats, i és clar d'altres homòlegs d'*Snail* en vertebrats, fossin fosforilats també "in vivo". La conservació dels tres elements que condicionen el plegament d'*Snail* en ratolí -la fosforilació del domini ric en serines, un consens en la regió 121-151 de la meitat N-terminal i l'últim dit de zenc- exhortarien a pensar en un

mecanisme conformacional conservat en tots els membres de la família gènica *Snail*. No obstant, el fet que la seqüència d'export nuclear només es trobi en mamífers suggereix que originalment, els canvis en la conformació espacial de la proteïna tenien un altre objectiu diferent al de cobrir o descobrir la NES, i que en principi desconeixem.

La localització nuclear en *speckles,* pel contrari, sembla característica de tota la família (l'*Slug* i l'*Snail* de ratolí la comparteixen), i donat que la fosforilació i el "desplegament" de la molècula semblen necessaris per a poder localitzar *Snail* en aquestes estructures, fora possible que els canvis conformacionals condicionessin originalment la distribució d'aquestes proteïnes dins el nucli, i potser el seu comportament en aquest compartiment. El sentit funcional del domini ric en serines doncs, no seria altra què el d'acumular càrregues fins un llindar crític, que permetés un canvi conformacional en la proteïna. La seqüència d'aquest domini no és gaire conservada entre els homòlegs, i això suggereix que el fet important recau en l'acumulació de dianes de fosforilació en una petita regió de la molècula (vegeu ***Fig Dc-4***). Així i tot, alguns dels consensos per quinases conegudes es conserven també en tots els homòlegs i *Slug,* i ho és també la distribució dels agrupaments de residus fosforilables.

A favor d'aquests arguments està el fet que *Scratch*, membre de la superfamília Snail per la similitud en alguns dels dits de zenc (però no pas l'últim) i el domini SNAG, no disposi d'un domini ric en serines clar, amb una concentració similar de consens de fosforilació al què és trobat a les famílies *Snail* i *Slug* (aquesta dada és d'acord amb les prediccions del servidor NetPhos 2.0): De 12 possibles Serines fosforilables, 4 són agrupades i en una zona més C-terminal a la què ocupa el domini ric en serines a aquestes dues proteïnes. Nakakura i cols. (*Proc Natl Acad Sci 2001*) varen estudiar la localització d'*Scratch* en cèl·lules on era expressat transitòriament: la distribució nuclear era difosa, sense apreciar-se cap "speckle" o subdomini nuclear preferent – respectant però els nuclèols-. És doncs força fascinant que l'absència dels dos dominis discutits –domini ric en serines, últim dit de zenc- en aquest factor *Scratch*, coincideixi amb l'absència d'speckles nuclears, que per tant podria ser predita en base a l'organització estructural de la proteïna.

Vist això, no seria inesperat que la relació domini ric en serines/dits de zenc fos també responsable de canvis conformacionals en alguna de les altres proteïnes que, com hem citat, presenten aquesta arquitectura (***Taula Dc-1***).

Abolir l'efecte transcripcional d'Snail, fi o circumstància

El mecanisme d'export nuclear que eficientment distribueix al citosol *Snail*, potser més actiu en cèl·lules epitelials, aconsegueix que les molècules exportades no puguin interaccionar amb promotors gènics diana com el d'E-cadherina. En un estat ideal, amb tot l'*Snail* fosforilat i exportat, nivells elevats d'expressió d'aquest factor de transcripció podrien coexistir amb nivells elevats d'expressió i transcripció d'*E-cadherina*, la diana més ben caracteritzada en cèl·lules epitelials (*Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000; Cano A et al, Nat Cell Biol 2000; Hajra KM et al, Cancer Res 2002*). Aquest és un dels sentits biològics que hem donat al mecanisme de regulació no transcripcional d'*Snail* [NP70]: La fosforilació i la

[70] Hi ha una excepció a la norma. Hem estudiat el comportament transcripcional dels mutants en un altre promotor diana, el del gen *MUC-1* (*Guaita S et al, J Biol Chem 2002*). La pràctica totalitat dels mutants es comporten com amb el promotor d'*E-cadherina*, però curiosament, el mutant *S/A* no reprimeix la seva transcripció basal. El resultat ha estat comprovat per 3 cops. Una possible explicació a aquesta "incoherència" inesperada fora que en alguns promotors, depenent de la configuració de les *Ebox* diana, *Snail* no es pogués unir directament a l'ADN, sinó depenent de "socis" moleculars. En ésser *Snail* mutat, no podrien interaccionar-hi i l'efecte transcripcional seria

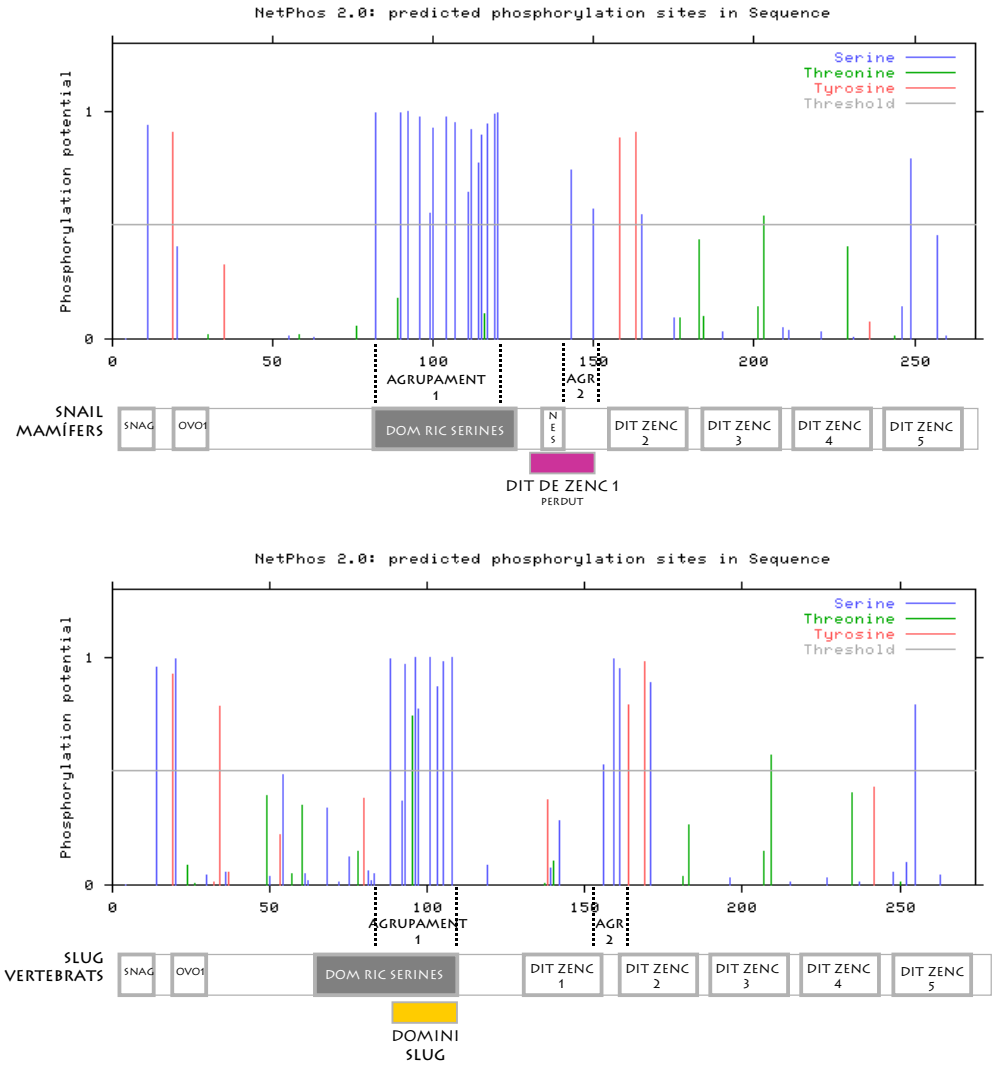


FIG DC-4 : COMPARACIÓ DEL MAPA PREDICITIU DE FOSFORILACIÓ D'MSNAIL I MSLUG
Prediccions de possibles consens de fosforilació per ambdues proteïnes d'acord amb la base de dades NetPhos. En ambdós casos, es possible observar una distribució similar dels punts de fosforilació, amb una acumulació predominant en la regió corresponent del domini Ric en Serines d'ambdues proteïnes. En el cas d'Slug, les dianes de fosforilació es concentren en la segona meitat del domini, que curiosament, és el què el grup de MA Nieto anomena "Domini Slug" (caixa groga), i que es troba altament conservat entre tots els homòlegs de la proteïna, fins al punt d'ésser utilitzat com a element definitori de la subfamília Slug (*Manzanares et al, Trends Gen Dev 2001*). En ambdues proteïnes hi ha un segon agrupament de 2-3 residus en la regió que correspondria l'espai entre el primer i segon dit de zenc de tots els membres de la família protèïca. En l'Snail de mamífers el primer dit (caixa lila) ha estat substituït per una regió que inclou, justament, la seqüència d'export nuclear (NES), i que precedeix aquest segon agrupament.

redistribució de factors de transcripció al citoplasma és un mecanisme relativament estès i eficient per a controlar els efectes transcripcionals d'aquest tipus de proteïnes. La fosforilació aporta un control força ràpid i eficient en el procés (*Whiteside ST i Goodbourn S. J Cell Sci 1993*).

Com hem discutit en punts anteriors, la possibilitat que la detecció d'*Snail* en algunes línies cel·lulars sigui deguda a l'expressió del *retrogen* humà (*SNAI1L*) i no a expressió veritable del gen endogen, és discutible en alguns casos, per bé que, coexisteixi un o altre amb l'*E-cadherina*, ambdós són capaços de reprimir-ne la

nul. Això potser passaria en l'*Ebox1* del promotor d'*E-cadherina*, on atenent als resultats de l'assaig de precipitació amb oligonucleòtids biotinil·lats, el mutant *S/A* no pot interaccionar directament. En els assaigs reporter, on es treballa amb el promotor que inclou les tres *Ebox*, l'efecte repressor seria evident probablement perquè el mutant podria interaccionar amb alguna de les altres dues *Ebox* restants.

transcripció (*Locascio A et al, J Biol Chem 2002*). Donat que en el producte del retrogen (*SNAIL-like*), tots els dominis implicats en la regulació no transcripcional de l'activitat d'*Snail* són també conservats (vegeu la seqüència aminoacídica exposada a *Locascio A et al, J Biol Chem 2002*), és gairebé segur que l'export nuclear jugarà un paper similar en el control de l'efecte transcripcional de la proteïna. Això dóna importància afegida al sistema d'export com a regulador de l'activitat d'*Snail* al nucli.

Malgrat ésser exportat i possiblement modificat en la seva conformació, *Snail* no perd l'afinititat per l'ADN quan és al citosol. En algunes condicions experimentals, els mutants citosòlics reprimeixen correctament l'expressió d'un gen reporter sota el control del promotor d'*E-cadherina*. Alhora, en assaigs d'EMSA, el mutant S/D demostra una afinitat per l'Ebox1 del promotor d'E-cadherina similar a la forma "silvestre" d'Snail. D'altra banda, en la majoria de les cèl·lules, la localització nuclear i citosòlica coexisteixen. Aquests fets suggereixen amb elevada probabilitat que el principal objectiu del mecanisme d'export no seria pas evitar l'efecte transcripcional d'*Snail*, sinó potser només mantenir el flux d'*Snail* del nucli cap al citosol. El sentit biològic cert d'aquesta observació el desconeixem, però exposo algunes idees més endavant.

La distribució nuclear dels factors de la família Snail suggereix un efecte no únicament associat a l'ADN i la regulació transcripcional

Les mateixes modificacions moleculars que semblen motivar l'export nuclear d'*Snail* són necessàries per a la localització de la proteïna en petites estructures nuclears, que considerem *speckles*. La co-localització amb factors de processament del pre-ARNm com *U2AF65*, l'escassa modificació dels compartiments després del tractament amb *Actinomicina D*, i la disposició de la majoria d'aquests punts nuclears en els espais intercromatínics suggereix amb força que aquests compartiments corresponen a *"speckles" nuclears*, com els descrits per a reservori de factors de processament del pre-ARNm (o factors d'"*splicing*"), i no pas llocs de transcripció activa, com s'havia proposat (*Hemavathy et al., Mol Cell Biol 2000*). La discussió detallada ha estat presentada en l'apartat de resultats.

No puc descartar del tot la possibilitat que el *speckles* derivin de l'excés d'expressió d'*Snail*. No he trobat però cap cita bibliogràfica que descrigui com a artefacte un fenomen similar, i tanmateix d'altres factors de transcripció fusionats a *eGFP* com *ZEB-1* o *TCF-4* no ho fan pas, malgrat ser sobreexpressats i/o tenir dits de zenc. Per tant, sembla específic de la família *Snail*, no pas artefactual.

Les formes exportables -essencialment fosforilades- d'*Snail* semblen passar pels "*speckles*" previ la seva sortida del nucli. Donat que en la majoria de cèl·lules estudiades, com és el cas de les MDCK, la distribució nuclear prioritària és aquesta, cap la possibilitat que el flux d'*Snail* un cop arribat al nucli sigui força ràpid. A favor d'això estaria el potent efecte de la *LMB*, que relocalitza tot l'*Snail* al nucli en pocs minuts.

Snail i ARN, o com Snail podria tenir un efecte post-transcripcional

La distribució nuclear en "*speckles* " sembla una propietat característica i conservada dels membres de la família *Snail* (si més no en vertebrats, *hsSlug* i *mSlug*, i *hsSnail* i *mSnail*). Per a ambdós factors (*Snail* i *Slug*) existeixen dades de co-localització amb factors de processament del pre-ARNm: *SC35* amb *Slug* (*Hemavathy K et al, Mol Cell Biol 2000*), *U2AF65* amb *Snail* (aquest

treball). Una disposició similar s'ha descrit per a un altre factor de transcripció, *WT1 (Wilms Tumor protein 1)*. *WT1* també té dits de zenc, es disposa en *speckles* i co-localitza amb el factor d'splicing *U2AF65,* amb què interacciona físicament. Totes aquestes característiques permeten possiblement a *WT1* participar del processament d'alguns pre-ARNm, malgrat no hi ha gaires dades i no en queda clar el mecanisme. Tanmateix, *WT1* és també capaç d'unir-se a l'ADN i actuar usualment com a repressor transcripcional.

En aquest sentit, vàrem hipotetitzar que *Snail* podria també tenir algun rol en el processament dels pre-ARNm. La proposta ens va semblar força atractiva, perquè alguns autors ja havien suggerit efectes post-transcripcionals per a *Snail* en alguns dels processos embriològics on sembla què intervé (divisió asimètrica a *Drosophila*, *Cai Y et al, EMBO J 2001*; parada de cicle cel·lular en gastrulació, *Groβhans i Weischaus, Cell 2000*). Amb aquesta idea i l'evidència de la co-localització amb factors de processament dels pre-ARNm, vàrem realitzar alguns experiments que no han estat inclosos en el capítol de resultats per ésser poc concloents i poc més que temptatius. El disseny de l'experiment era basat en un protocol d'amplificació inespecífica de ADNc que vaig trobar en una recerca bibliogràfica (*Wong KK et al, Nucleic Acids Res 1996)*. L'*mSnail-HA* expressat en cèl·lules RWP1 o bé en NIH-3T3 era immunoprecipitat en un tampó adequat per a la preservació de l'ARN, i dels immunoprecipitats s'extreia l' ARN co-immunoprecipitat per mètodes de purificació usuals. Aquest ARN era posteriorment amplificat (vegeu *Material i Mètodes*). Els ADNc definitivament obtinguts eren subclonats en vectors per a poder-ne tenir rèpliques i poder seqüenciar-los.

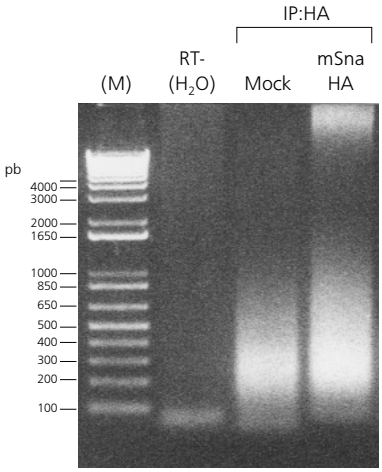


FIG DC-5 : ELECTROFORESI DELS PRODUCTES D'AMPLIFICACIO ALEATÒRIA D'ARN AMB HEXAMERS ETIQUETATS (TRHA), ASSOCIATS A SNAIL
Gel d'agarosa per resoldre el producte de l'amplificació inespecífica per RT-PCR amb hexàmers etiquetats, dels possibles ARNm co-immunoprecipitats amb mSnail-HA en cèl·lules NIH-3T3. El producte d'immunoprecipitació en les cèl·lules control arrossega en tots els assaigs algun tipus ARN què és amplificat aleatòriament. L'"smear" que apareix al carril amb Snail és lleugerament diferent del present al control. Els "smears" són esperats, donat que l'amplificació és de rang variable i per tant els productes poden ser de moltes longituds.
L'smear és purificat per mètodes usuals i subclonat en vectors acceptors (vegeu *Materials i Mètodes*).

Cap dels 3 assaigs realitzats varen donar resultats concloents. Aparentment vàrem co-immunoprecipitar ARN amb mSnail (vegeu ***Fig Dc-5***), i d'aquest "pool" vàrem aïllar possibles ARNs candidats, una petita llista dels quals és inclosa a la ***Taula Dc-2***, per bé que no hi havia coincidències entre els 3 assaigs, o freqüentment eren ARN ribosomals o mitocondrials possiblement contaminants, i per tant inespecífics[NP71]. És destacable el fet que la majoria

[71] Entre els possibles ARN co-immunoprecipitats amb *Snail*, val a destacar *Cullin-1*. Aquesta és una proteïna força conservada que forma part dels complexes *SCF* que medien la ubiqüitinació i per tant, posterior degradació de diversos factors. Entre aquests, es troben diverses proteïnes implicades en diverses fases del cicle cel·lular, l'especificitat per les quals és determinada per l'avidesa preferencial d'algunes de les proteïnes del complex *SCF* per a determinats substrats. El complex té implicacions funcionals en algunes de les transicions entre fases del cicle cel·lular, i en processos relacionats com l'endoreduplicació que ocorre en alguns teixits embrionaris de

NM016852	**WBP WW domain binding protein**	regió 5' UTR	Funció desconeguda. S'ha descrit que s'uneix a p73, situada a la via de p53. IQGAP, que participa dels processos de polarització cel·lular, migració i l'estabilitat de les unions adherents, té un domini WW.
AF136441 AF176910	**CUL1 Cullin-1**	regió 5'UTR	Forma part del sistema SCF de ubiquïtina lligases Recentment s'ha descrit com a part essencial del sistema de degradació de p27kip-1 en ésser induïda la seva expressió per c-Myc. Per tant, la seva activitat pot ésser important per a la regulació del cicle cel·lular.
NM012465	**Tolloid-like protein 2**	regió 5'UTR	Implicades en el sistema de degradació de la matriu extracel·lular – metaloproteases-
Gi: 927064	**eF1α1 Factor d'elongació de la traducció en eucariotes**	regió 5'UTR	Implicat en la maquinaria d'iniciació i elongació dels mRNA en eucariotes.
	RNA ribosomal 16S, 28S	vàries regions	

TAULA DC-2 : RELACIÓ DELS FACTORS CODIFICATS PELS ARNm CO-IMMUNOPRECIPITATS AMB SNAIL
Breu llistat, amb els números d'accés a la base de dades del GenBank, regió a la què correspon la seqüència aïllada associada a mSnail, i algunes dades funcionals dels factors codificats pels ARNm que es van identificar en els assaigs de co-immunoprecipitació d'ARN amb mSnail-HA. Aparentment no hi ha relació funcional entre ells, però alguns són associats a funcions o processos biològics que encaixen amb el fenotip cel·lular derivat de l'expressió d'Snail, com migració cel·lular (Tolloid-like), o modulació del cicle cel·lular (Cullin-1) (vegeu *Discussió*). Els RNA ribosomals foren els identificats amb més freqüència, i creiem corresponen a "soroll de fons".

de seqüències identificades, fora dels ARN ribosomals, corresponen a regions 5' no transcrites (5' UTR), a les quals clàssicament s'associen moltes de les proteïnes que uneixen ARNm i en modulen el destí.

Òbviament els assaigs dissenyats per a determinar la unió d'*Snail* a l'ARN no són pas els millors assaigs possibles per a resoldre la qüestió. Però tampoc tanquen el tema, perquè dels resultats no es pot descartar que cap ARN hagi estat co-immunoprecipitat amb *Snail*. Sense més evidències però, com per exemple la interacció directa amb *U2AF65*, amb el què co-localitza, aquesta hipòtesi és difícilment sostenible. I a priori, difícil d'encaixar en el model actual de funcionament d'*Snail*.

Snail als microtúbuls, o un vincle amb la seva funció ancestral

Snail es comporta com una proteïna motora

L'*Snail* què és exportat -i potser abans associat als *speckles* - s'uneix amb gran avidesa a la xarxa de microtúbuls de la cèl·lula on ha estat expressat. Molt possiblement doncs, l'*Snail* que s'hi associa és també fosforilat i per tant desplegat.

La interacció d'aquest factor de transcripció amb els microtúbuls n'altera el dinamisme, i això ho veiem en forma d'estabilització i promoció de la formació de feixos microtubulars. L'efecte és molt més evident com més elevat és el grau d'expressió de la proteïna exògena. Aquest comportament és el mateix que el què ha estat descrit per a les *MAP* (*proteïnes associades a microtúbuls*), les *proteïnes motores de microtúbuls* (és el cas de les *quinesines*), o proteïnes com *CLIP170* o *EB1*. En general, totes les proteïnes que provoquen en els microtúbuls canvis coincidents amb els què genera *Snail* són implicades directament amb el dinamisme microtubular[NP72]. Cal remarcar el fet que altres

Drosophila o en el trofoblast de ratolí. Curiosament, *Snail* ha estat implicat en ambdós fenòmens: cicle cel·lular i endoreduplicació.

[72] Hi ha diverses proteïnes capaces de generar efectes similars als d'*Snail* als microtúbuls. Un altre exemple és la proteïna *NuMA* (*Nuclear Mitotic Apparatus protein*),implicada en l'organització dels pols del fus mitòtic, i què també s'associa als microtúbuls i quan és sobreexpressada genera fenòmens d'estabilització i fasciculació

proteïnes com *MURF (Spencer JA et al, J Cell Biol 2000*), sense presentar una estructura protèïca típica de MAP, tenen efectes similars als d'*Snail* als microtúbuls, fet que suggereix que la regulació del dinamisme microtubular no és restringida només a un petit grup de proteïnes, sinó que és compartida per altres proteïnes amb rols importants en el desenvolupament.

CLIP170 i *EB1* es localitzen preferentment als extrems de creixement dels microtúbuls. Ambdues i també *Dinactina* han estat també anomenades *TMAPs* (*Tip-only Microtubule-Associated Proteins, Gundersen GG, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*). Les *TMAPs* se situen a l'extrem creixent dels microtúbuls i es creu que medien la interacció d'aquest amb punts d'ancoratge a la zona "cortical" de la cèl·lula, per exemple el marge d'avanç en un lamelipodi, o una unió adherent. L'ancoratge de les *TMAPs* amb aquests punts es fa a través d'altres proteïnes lligands, les *CMAPs* (*Cortical Microtubule Attachment Proteins*). *APC*, per exemple (que fa cúmuls -*clusters*- corticals en els fronts d'avanç cel·lular) podria ésser la *CMAP* d'*EB1* segons alguns autors, potser mitjançant *Beta-catenina* (*Mc Cartney BM et al, Nat Cell Biol 2001*).

mSnail sembla ésser funcionalment una *TMAP*. Participa del dinamisme microtubular com evidencien la capacitat que té d'estabilitzar els microtúbuls i organitzar-ne feixos. Estudiant la seva localització microtubular amb baixos nivells d'expressió, no hem pogut discernir si s'associa als extrems creixents dels microtúbuls. Co-localitza també amb *gamma-tubulina* en el centrosoma, com ocorre amb *EB1*. En aquest punt, tot i que molt més lentament, el microtúbul és també polimeritzat -i tanmateix estabilitzat. Amb un nivell elevat d'expressió, aquesta última capacitat podria justificar que *mSnail* decorés els microtúbuls en tota la seva longitud.

En tots els casos, les *TMAPs* tenen la funció d'estabilitzar els microtúbuls mitjançant el seu ancoratge al còrtex cel·lular. L'estabilització és essencial per a processos com la polarització cel·lular, la diferenciació o la motilitat-migració dirigida. Alhora, implica canvis moleculars importants en els microtúbuls -la *detirosinació* per exemple- que finalment comporten una reconstrucció del dinamisme microtubular - per exemple, l'accepció de *quinesines*- què és essencial per als processos basats en aquesta estabilització.

Essent així, quin seria el vincle d'*Snail* amb el còrtex cel·lular? Quina és la *CMAP* associada a *Snail*? Fins al moment no es coneix cap proteïna que interaccioni amb *Snail*, en cap dels compartiments cel·lulars, però creiem que és molt possible que *Snail* tingui "socis" no nuclears: si com s'extreu dels resultats comparatius entre els assaigs de co-sedimentació i co-immunoprecipitació amb tubulina, la unió als microtúbuls no és directa, podria ésser mediada per alguna altra proteïna intermediària d'entitat pel moment desconeguda.

Rho , gastrulació i cresta neural, metàstasi i com canviar la forma cel·lular

El procés d'ancoratge de les *TMAP* a les *CMAP* i posterior estabilització microtubular s'inicia amb l'activació de les *Rho GTPases*, principalment *Rho (Gundersen GG, Nat Rev Mol CellBiol 2002)*. *Rho(A)* seria capaç d'activar proteïnes de la família de les *formines*[NP73] com *mDia* (*Palazzo AF*

(formació de feixos, *Haren L i Merdes A. J CellSci 2002*). Per tant, sembla evident que aquests fenòmens són característics de proteïnes implicades en el dinamisme microtubular, en un o altra procés on sigui què intervinguin els microtúbuls.

[73] Les *formines* són elements essencials en la definició de la polaritat cel·lular (*Bear JE, Dev Cell 2002*), que és un procés determinant per a la diferenciació, migració i funció de totes les cèl·lules. S'activen per la unió de les formes actives de *Rho (Rho-GTP)*, i aquesta activació permet que la proteïna participi del procés de nucleació dels filaments

et al, Nat Cell Biol 2001), les quals actuarien com efectors i facilitarien la captura dels microtúbuls a través de la interacció *CMAP-TMAP*. Es desconeix quin o quins són els activadors de *Rho* en aquesta ruta. I es desconeix com les *formines* poden activar la interacció *CMAP-TMAP*.

Les *Rho GTPases* [NP74] tenen un rol essencial en el desenvolupament embrionari en ésser usades per diferents vies de senyalització implicades en diversos processos morfogènics. La seva activitat depèn possiblement de mecanismes relacionats amb la motilitat i definició de la forma cel·lular, i l'activitat que aquestes proteïnes tenen sobre els filaments d'actina, i potser els microtúbuls (*Barrett K et al, Cell 1997; Settleman J, Nat Cell Biol 2000)*. A *Drosophila*, el bloqueig de l'activitat de *Rho* comporta defectes severs en la forma cel·lular, que impedeixen la gastrulació de l'embrió. La delaminació de les cèl·lules de la cresta neural i la polaritat tissular són dos processos també estrictament lligats a aquesta família de proteïnes. En l'últim cas, les *Rho GTPases* han estat relacionades epistàticament amb la via de *Wnt/Dsh* -no depenent de *beta-catenina* (*Habas R et al, Cell 2001*). En aquesta via són implicades la proteïna *Dishevelled* (*Dvl*), que s'activa per *Wnt*, i l'activació d'una *formina (Daam1)*, que és capaç d'unir-se a *Dvl* i a *RhoA*[NP75]. En els altres dos casos, *Rho* ha estat implicada en el traçat molecular que depèn d'*Snail/Slug* (*Liu JP i Jessell TM, Development 1998; Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002; Hemavathy K et al, Gene 2000*). Les *Rho GTPases* són també determinants en el desenvolupament de les metàstasis. En línies cel·lulars de melanoma altament metastàsiques, els nivells de *RhoC* són molt elevats, i sembla que aquesta *Rho GTPasa* és suficient per a justificar el fenotip metastàsic d'aquestes cèl·lules (*Clark EA et al, Nature 2000; Ridley A, Nature 2000*). *Snail* sembla també un factor determinant en l'adquisició de propietats invasives i metastàsiques en tumors. Hi ha però una relativa divergència entre les isoformes de *Rho (A, C)* implicades en tots aquests processos, i de fet, les diferències funcionals entre les diverses isoformes de *Rho* són encara poc conegudes.

De tot això es pot extreure que *Snail* i *Rho* són relacionats amb processos biològics equivalents, però fins al moment, la relació mecanística entre ambdues proteïnes és desconeguda. Alguns treballs han demostrat que l'expressió d'*Slug* en la cresta neural de pollastre indueix un augment en l'expressió de *RhoB*, que es considera un marcador característic de la cresta neural migratòria i aparentment es troba per sota d'*Slug* en el traçat molecular (*del Barrio MG i Nieto MA, Development 2002*). En *Drosophila*, el paper determinant de *Rho* en gastrulació és necessàriament lligat a l'activitat d'*Snail* (*Morize P*

d'*actina*. El fet què algunes formines com *mDia* puguin interaccionar amb els microtúbuls, indica que són elements essencials en la coordinació dels diferents elements del citosquelet (*Ishizaki T et al, Nat Cell Biol 2000*), fet necessari per a la correcta polarització cel·lular.

[74] Les *Rho GTPases* (en mamífers *Cdc42*, *Rac* i *Rho*, tot i que de fet hi ha moltes isoformes de *Rac* i *Rho*) formen part de la família de GTPases associades a *Ras*. Són implicades en molts processos, des de proliferació cel·lular a adhesió i regulació de la forma cel·lular,i també activen la transcripció d'alguns gens. Són essencials en el desenvolupament i en la vida cel·lular adulta, i per això són altament conservades en l'evolució. Ciclen entre un estat activat (unides a *GTP*) o innactiu (unides a *GDP*), i aquesta alternància és regulada per l'activitat de *factors intercanviadors de guanina-nucleòtids* (dits *GEFs*), que són els nexes entre les *Rho GTPases* i les proteïnes que les activen. Donat que són capaces d'interaccionar amb diverses proteïnes diana i són implicades en molts processos i vies de senyalització, es creu que funcionen com a elements integradors o diversificadors, i mantenen les rèpliques entre les diferents vies de senyalització de les què participen (*Bar-Sagi D i Hall A, Cell 2000*).

[75] *Dvl (Dishevelled)* és capaç d'unir-se als microtúbuls (*Krylova O et al, J Cell Biol 2000*) i també s'associa als filaments d'actina (*Torres MA i Nelson WJ, J Cell Biol 2000*). El significat d'aquestes dues associacions el dóna possiblement el fet que pot interaccionar amb una *formina (Daam1)* i així amb *RhoA*, al qual activa possiblement perquè *Daam1* recluta un factor d'intercanvi de nucleòtids (*GEF*); i dóna una explicació mecanística al seu rol en polaritat cel·lular i en processos de migració crucials com l'*extensió convergent* (vegeu, al capítol d'*Introducció*, ***Box 1*** sobre les vies associades a *Wnt*).

et al, Development 1998). En aquest sistema el complex format per *Concertina* i *DRhoGEF2*, activa *Rho* depenent del senyal de la proteïna *Fog* (*folded gastrulation*)[NP76]. L'activació de *Rho* sembla mediar l'efecte de *Fog* i *Concertina* en el procés d'invaginació cel·lular que marca l'inici de la gastrulació (*Barrett K et al, Cell 1997*). No obstant, aquest efecte només ocorre en presència d'*Snail*, que d'altra banda no és capaç d'iniciar la invaginació del mesoderma si el sistema que depèn de *Fog* no funciona (*Morize P et al, Development 1998*). Aparentment, doncs, *Snail* usa el traçat *Fog-Concertina-dRhoGEF2-Rho* per a fer gastrular. Donat que els nivells d'aquests factors (*Fog i Concertina*) no depenen d'*Snail* (sinó de *Twist*, com també els nivells d'*Snail* depenen d'aquest factor i de *Dorsal)*, el més probable és que la relació entre ambdós sistemes no sigui pas transcripcional. Les dades exposades per *Morize P i col·laboradors* suggereixen que la relació funcional entre *Snail* i *Fog/Concertina* té lloc en nivells jeràrquics equivalents, car l'expressió d'un no és afectada per l'altre, i tanmateix, l'efecte desitjat en la invaginació del solc ventral de Drosophila només té lloc si ambdós traçats són presents i actius. Per tant, és improbable que el traçat de *Fog- Concertina* sigui genèticament per sota d'*Snail* (*Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*). Les observacions publicades per Häcker i Perrimon (*Häcker U i Perrimon N, Genes Dev 1998*) són coherents amb aquest raonament: si bé el traçat *Fog/Concertina* és capaç d'activar *Rho* via *dRhoGEF2*, aquest estímul no és el desencadenant dels fenòmens d'invaginació del mesoderma en gastrulació, i és possiblement algun factor zigòtic (*Snail*?) el què ho fa. D'ésser *Snail*, participaria també del traçat de *Fog.*

Rho GTPases i estabilització microtubular

El traçat molecular responsable de l'estabilització dels microtúbuls (*Gundersen GG, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*) és conservat amb gran cura en els diversos sistemes eucariotes, des de llevats fins a mamífers. L'estabilització és essencial per a molts processos com la polarització cel·lular o la mitosi, i es creu que per aquesta raó ha estat preservat en gran mesura.

El traçat el posa en marxa l'activació de les *Rho GTPases*, que actuarien com a interruptors per a activar o parar el sistema, el qual té com a finalitat estabilitzar els microtúbuls que de per sí es troben en un estat dinàmic, de constant creixement i destrucció. El procés culmina amb la captura dels microtúbuls en punts concrets de la cèl·lula, fet que bloqueja la inestabilitat. El descobriment de la implicació de les *Rho GTPases* en el dinamisme microtubular va permetre entendre com es podien coordinar la xarxa de microtúbuls i els filaments intermediaris en processos essencials com la migració, divisió cel·lular, o polarització (*Gundersen GG, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*).

RhoA és la isoforma de *Rho* més coneguda, i ha estat implicada directament en aquest procés d'estabilització dels microtúbuls (*Cook TA et al, J Cell Biol 1998; Palazzo AF et al, Nat Cell Biol 2001*).

L'estabilització dels microtúbuls per Snail activa el sistema de Rho GTPases, en concret RhoA

Havent confirmat que *mSnail* és capaç d'estabilitzar la xarxa microtubular, hem volgut testar la possibilitat que els microtúbuls fossin

[76] No hi ha homòlegs per a *Concertina* o *Fog* en vertebrats o d'altres organismes, però el sistema és similar al què funciona per *Rho*, *Daam1* i *Dishevelled* en la via de *Wnt/Fzl* o *mDia*, *Rho* i els microtúbuls: un complexe molecular amb una proteïna "adaptadora" com les *formines Daam1* o *mDia*, un factor donador de *GTP* com qualsevol *GEF*, i *Rho* que és allí reclutat i activat. *Dishevelled* o els microtúbuls o potser el possible receptor de *Fog* focalitzen l'activació de *Rho* en un o altre punt cel·lular, on s'ha rebut el senyal (*Wnt* o *Fog* o altre).

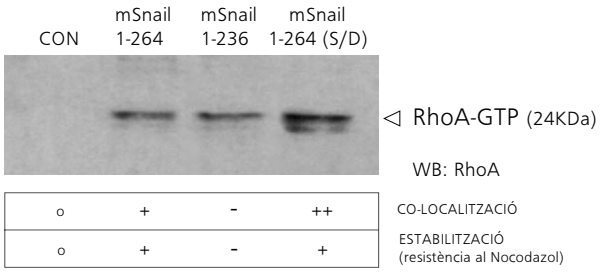


FIG DC-6 : L'EXPRESSIÓ D'SNAIL INCREMENTA ELS NIVELLS CEL·LULARS DE RHOA-GTP (ACTIU)
Assaig de co-precipitació de formes activades de RhoA (RhoA-GTP) en cèl·lules RWP1 (vegeu Materials i Mètodes). La imatge correspon a la immunodetecció de RhoA en el producte de la co-precipitació amb GST-RBD de l'extracte de cèl·lules RWP1 transfectades transitòriament amb vector buit, mSnail o els mutants exposats. mSnail (1-236) no estabilitza la xarxa microtubular, malgrat ésser en predomini citosòlic. Pel contrari, mSnail (1-264)S/D és estrictament citosòlic però co-localitza quasi exclusivament amb la xarxa microtubular, que estabilitza en major grau.

l'element molecular que permetés connectar *Snail* amb les *Rho GTPases*, associació coneguda, però mai resolta experimentalment.

Per a tal fi vàrem posar a punt un assaig de co-precipitació (*Pull-Down*) específic per a capturar els formes activades de *RhoA* (vegeu *Materials i Mètodes*). L'expressió transitòria d'*mSnail* en cèl·lules epitelials (RWP1) comporta una activació força acceptable de *RhoA* (vegeu ***Fig Dc-6***) que no té lloc en transfectar únicament el vector buit.

Només les formes que estabilitzen els microtúbuls poden activar RhoA

L'efecte d'*mSnail* sobre l'activació de *RhoA* és molt més evident en els mutants o truncacions capaços d'associar-se a la xarxa microtubular. D'acord amb els nivells de *RhoA* activat coprecipitats després de l'expressió transitòria dels diversos mutants, hom pot suggerir que aquells que no s'uneixen a microtúbuls activen *RhoA* de forma poc eficient. Aquest efecte correlaciona bé amb la capacitat d'uns o altres mutants d'estabilitzar la xarxa microtubular i evitar-ne la despolimerització per *nocodazol* (***Fig Dc-6***).

RhoA és doncs activat per la presència d'*mSnail* als microtúbuls, si bé no és pas descartable que la seva sola presència al citosol (vist el nivell d'activitat induït per *l'mSnail (1-236)* respecte el control amb vector buit), sigui ja estímul suficient per a aquesta activació. De fet, desconeixem si cap dels homòlegs d'*Snail* fora dels mamífers és capaç d'associar-se als microtúbuls (vegeu més endavant).

Com *mSnail* activaria *RhoA* és encara un fet desconegut, però fora possible que *Snail* reclutés algun complex molecular en el què hi fossin incloses una *formina* (com a adaptador), un intercanviador de nucleòtids-*GEF*, i possiblement *Rho*. Seria similar al què fa *Dishevelled (Dvl)*, i encaixaria amb el model proposat per *Drosophila* amb *dRhoA* i *DRhoGEF-2*. El reclutament d'un *GEF* és essencial en tot procés d'activació de *Rho*, i també en l'associat a l'estabilització microtubular (*Cook TA et al, J Cell Biol 1998*). No hi ha però dominis proteics a *Snail* que ens permetin predir la interacció directa amb cap d'aquests elements. En aquesta hipòtesi, *Rho* seria l'efector de l'activitat d'*Snail* en polarització i migració cel·lular, sense descartar-hi d'altres efectes fenotípics.

La primera evidència experimental a favor d'aquesta hipòtesi fora co-immunoprecipitar *Snail* i *Rho* en un complex multiproteic.

Com començar a explicar perquè Snail fa bellugar les cèl·lules i les polaritza

És possible que la funció més ancestral de la família protèïca *Snail* fos el control de la motilitat cel·lular (*Hemavathy K et al, Gene 2000*). La coordinació de l'*EMT* (*transició epiteli-mesènquima*) associa canvis fenotípics a aquest efecte en el moviment cel·lular, i hom ha defensat

que aquesta podria ser una de les funcions inicials d'aquestes proteïnes (*Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2000*). L'explicació mecanística a aquest efecte en mobilitat era relativament complexa partint del pressupòsit que *Snail* fos exclusivament un repressor transcripcional. Malgrat que la davallada d'*E-cadherina* sembla un pas força important per a l'adquisició de motilitat i característiques invasives en cèl·lules epitelials (*Vleminckx K et al, Cell 1991; Frixen UH et al, J Cell Biol 1991*) , no és un element suficient i requereix si més no i d'acord amb el què hi ha publicat, d'un substrat fenotípic -cal que les cèl·lules siguin tumorals. Alhora, la davallada d'*E-cadherina* no és determinant en totes les conseqüències fenotípiques derivades de l'expressió d'*Snail*.

L'associació d'*Snail* amb la xarxa microtubular, amb l'activació de *RhoA* mediada possiblement per aquesta interacció, i la reorganització dels filaments intermediaris de vimentina, són una proposta mecanística força coherent per a explicar el rol d'*Snail* en motilitat cel·lular, i en principi, no recauen en cap efecte transcripcional. *Snail* indueix dos fenòmens essencials en els microtúbuls: *estabilització* i *detirosinació,* que semblen determinants per a la polarització cel·lular i l'adquisició de motilitat. La reorientació dels filaments intermediaris completa els canvis en el citosquelet. L'activació de *Rho* associada a aquests successos dóna el vincle precís per a explicar els efectes en forma i moviment que *Snail* té en les cèl·lules on és expressat. L'efecte en la mobilitat deu ésser mecanísticament lligat a la davallada transcripcional que *Snail* provoca en el gen d'*E-cadherina* (vegeu més endavant). Serà però, necessari confirmar que les formes mutants d'*Snail* que no poden estabilitzar els microtúbuls o associar-s'hi, són incapaces d'induir mobilitat o capacitats invasives.

Per bé què suggerent, aquesta argumentació té alguns problemes conceptuals: el més bàsic és que desconeixem si la localització microtubular és exclusiva de l'*Snail* de mamífers, o ocorre en la resta d'homòlegs. Cap esperar que, donat que el senyal d'export nuclear és només present en els primers, sigui un fet exclusiu. Això faria de difícil interpretació la relació ancestral d'*Snail* amb migració i motilitat cel·lular, ja que el substrat mecanístic que es proposa no tindria lloc per la resta d'homòlegs. Els moviments morfogènics associats al rol d'*Snail* en gastrulació són però, sensiblement diferents entre els amniotes (aus i mamífers) i la resta de vertebrats i d'altres organismes, perquè endo- i mesoderma s'originen a partir de cèl·lules soltes delaminades del solc primitiu, i això suggereix que els mecanismes que regeixen la delaminació i moviment de les cèl·lules invaginades en els amniotes deuen ser també sensiblement diferents. En aquest sentit doncs, l'exclusivitat del mecanisme podria tenir una explicació biològica.

No obstant, el rol d'Snail en els moviments de gastrulació dels altres organismes és una incògnita. Una possibilitat fora que es limités a establir un programa fenotípic accessible al moviment, sense tenir-hi un rol mecanístic directe. Tampoc disposem de dades sòlides al voltant de la localització subcel·lular de l'*Snail* endogen, per bé que hom esperaria que fos la mateixa que l'observada per la proteïna exògena o fins i tot per la proteïna de fusió amb *GFP* sota el control del promotor endogen. La presència d'*Snail* als microtúbuls de totes les cèl·lules estudiades permet suposar un mecanisme conservat. Tanmateix, no queda clar perquè en les cèl·lules epitelials aquesta localització és molt més evident, de vegades predominant. Originalment havíem suggerit un mecanisme amb rerafons regulador - si *Snail* és citosòlic, no pot reprimir dianes

transcripcionals- però el rol funcional d'*Snail* als microtúbuls ens suggereix que aquest mecanisme és si més no en part circumstancial. No hem avaluat si els efectes sobre el dinamisme microtubular ocorren també en fibroblasts com els NIH-3T3, o si són exclusius o significatius només en les cèl·lules epitelials. Desconeixem per tant si els nivells basals i constitutius que es detecten d'*Snail* endogen en els NIH-3T3, són rellevants per a la possible funció en motilitat que atribuïm a aquest factor de transcripció.

Coordinar l'efecte transcripcional i el no transcripcional, o el "cicle" dins-fora d'Snail

En diversos factors de transcripció, la regulació de la localització subcel·lular és un mecanisme eficaç que permet controlar-ne l'efecte. El citosol actua possiblement com a reservori, i el què es modula és l'accés de la proteïna al nucli, on exerceix el seu efecte transcripcional. Un exemple d'aquest sistema és el què determina l'activitat de *MyoD* en el desenvolupament embrionari (*Rupp RAW et al, Genes & Dev 1994*). En *Xenopus*, *MyoD* és citosòlic i només esdevé nuclear davant d'estímuls associats a la diferenciació muscular, que és una de les funcions atribuïdes a aquest factor *bHLH*. Pel contrari, *MyoD* de ratolí no pot ésser controlat per aquest mecanisme quan és expressat en el mateix organisme (*Xenopus*). Es creu que les diferències en la seqüència aminoacídica poden condicionar la resposta al sistema de regulació, que sembla específic d'alguns homòlegs en l'escala filogenètica.

Sembla que quelcom similar ocorreria amb *Snail*, car el sistema d'exclusió nuclear que en controla la localització subcel·lular és probablement exclusiu de mamífers (vegeu més endavant).

No obstant, hi ha algunes dades que fan improbable que el control de la distribució d'*Snail* dins la cèl·lula tingui com a objectiu determinar la seva activitat transcripcional: (i) La funció d'*Snail* al citosol sembla significativa, i per tant, no sembla pas que el citosol actuï com a simple reservori. (ii) Malgrat permetre que la proteïna sigui exportada, les modificacions no transcripcionals i conformacionals que regulen la localització d'*Snail* no en canvien aparentment l'afinitat per l'ADN, amb el qual el sistema d'exclusió no assegura l'abolició de l'efecte transcripcional, potser perquè no n'és l'objectiu. (iii) El pas d'*Snail* pel nucli és constitutiu: les formes que són més eficientment exportades i per tant citosòliques, sempre passen prèviament pel nucli. Tot això fa pensar que el sistema de regulació que hem descrit en aquest treball no té com a objectiu evitar l'efecte d'*Snail* sobre els promotors gènics diana.

Quin és doncs el sentit funcional de portar *Snail* al citosol? Com hem mostrat, un cop al citosol *Snail* s'associa als microtúbuls i és responsable de modificacions en el seu dinamisme. Aquests efectes no transcripcionals són coherents amb un rol en la polaritat i motilitat cel·lular.

Si *Snail* és dins o fora alternativament, cap esperar una relació funcional alternativa entre ambdues localitzacions: són oposades, o complementàries? Intuïtivament, la davallada en l'expressió d'E-cadherina i la inducció d'un fenotip molecular dediferenciat -pèrdua de marcadors epitelials com *MUC-1*, *citoqueratina 18* o d'altres- són coherents amb l'adquisició de mecanismes migratoris. Ambdós fenòmens són prerequisits per al procés de gastrulació o en conjunt, per a l'EMT. La coordinació d'ambdós efectes sembla així la hipòtesi més escaient.

Els dits de zenc són la frontissa molecular de les funcions d'Snail

A nivell molecular, la coordinació entre ambdós efectes recau en el mateix domini proteic. Els dits de zenc participen directament de la unió a

l'ADN, i semblen també essencials en la unió als microtúbuls (si bé calen alguns experiments addicionals en aquest sentit). Donat que l'estat conformacional d'*Snail* no sembla condicionar l'afinitat per l'ADN, el més probable és que bona part del domini C-terminal no canviï d'estructura quan la molècula pot o no ser exportada. L'efecte que sobre la proteïna sencera té la deleció de l'últim dit de zenc (236-264) suggereix que és responsable de mantenir el plegament d'aquesta meitat C-terminal (vegeu ***Box Dc-1***), essent possible que la participació d'aquest dit en la unió a l'ADN i als microtúbuls sigui escassa.

La desestructuració de la cua C-terminal comporta la pèrdua de la co-localització amb els microtúbuls, i un increment en l'eficiència del sistema d'export, que es tradueix en un escàs efecte transcripcional. La sortida d'*Snail* al citosol és molt possiblement deguda a la interacció anòmala entre les meitats N i C-terminal per la desestructuració d'aquesta última. Aquesta deficient interacció sembla ocórrer també amb els microtúbuls. Ambdós fets em porten a pensar que és factible que la mateixa regió de la cua C-terminal que és alliberada de la interacció amb la meitat N-terminal en ésser *Snail* fosforilat, sigui la regió que en el citosol és capaç de mediar la unió d'*Snail* als microtúbuls. Les característiques estructurals dels dominis amb els què interacciona en cada cas, haurien de ser relativament superposables.

En qualsevol cas, la conclusió més acceptable és que la dualitat de funcions de la proteïna és suportada per la dualitat en les interaccions de la seva regió C-terminal.

Quan fosforilar Snail, o quan sortir del nucli, i per això E-cadherina suprimeix migració?

En condicions normals doncs, *Snail* entra al nucli de forma constitutiva. En totes les cèl·lules és també fosforilat i posteriorment exportat. En alguns sistemes, aquest flux constant és desplaçat cap al citosol, potser perquè el mecanisme d'export és més eficient en predominar l'estat fosforilat. Aquesta situació és per exemple més freqüent en algunes línies epitelials com les MCF-7. Per bé que l'entrada al nucli és aparentment constitutiva doncs, l'export és regulable.

Si els efectes d'*Snail* dins i fora del nucli són coherents dins del context de l'*EMT*, quin sentit funcional té el mecanisme no transcripcional que en regula la localització? Hem pensat que la coordinació d'ambdós efectes és l'objectiu final del sistema, basant-nos en diverses observacions: (i) La fosforilació i posterior export d'*Snail* fora del nucli és un succés relativament tardà: en estadis inicials i possiblement per sota d'un llindar d'expressió, *Snail* es distribueix de forma difosa pel nucli. L'aparició d'*speckles nuclears* no és immediata, sinó que cal temps i què *Snail* sigui fosforilat. (ii) En la mateixa cèl·lula és possible trobar *Snail* dins (en *speckles*) i fora del nucli -és la distribució més freqüent en la majoria de línies. Això suposa que en la majoria de cèl·lules es poden trobar molècules en ambdós compartiments en el mateix moment, i per tant, suggereix un flux constant d'*Snail* entre nucli i citosol. (iii) Un cop als microtúbuls, *Snail* no pot retornar al nucli com demostra la incapacitat de *LMB* de repescar-lo en aquest compartiment, pel qual possiblement aquesta localització és el punt i final del flux distributiu.

En la ***Fig Dc-7*** s'exposa aquest possible flux distributiu: síntesi citosòlica →nucli (difós)→nucli (*speckles*) → citosol (microtúbuls) → degradació citosòlica (?). Donat que la fosforilació sembla condició necessària per a la localització en *speckles* i per a l'export, el temps de persistència al nucli és variable abans d'ésser exportat. Considerem que la localització en *speckles* és

signe indicatiu de fosforilació i possiblement de la funcionalitat del procés d'export nuclear, però donat que desconeixem el sentit funcional d'aquest compartiment no sabem si l'export s'associa a d'altres successos. Desconeixem també quin és el temps que *Snail* roman als microtúbuls i als "speckles", i de què en depèn.

La *fosforilació* assenyala el moment en què *Snail* pot ésser exportat, i coordina en el temps els efectes nuclears i citosòlics d'aquest factor de transcripció. Per tant, té una rellevància biològica determinant. Els senyals responsables d'aquesta fosforilació hauran d'ésser sensibles a la coordinació d'ambdues funcions: regular a la baixa els nivells d'E-cadherina, fet essencial per a la pèrdua de les unions intercel·lulars; i activar la motilitat cel·lular modulant el dinamisme microtubular [NP77]. Possiblement, no es podrà iniciar el moviment sense haver abans modificat les unions, fet que ens ha portat a pensar que és possiblement la pèrdua de les unions intercel·lulars el què actua com a interruptor del procés de fosforilació i export. Els resultats d'una aproximació experimental per avaluar aquesta hipòtesi són mostrats a la ***Fig Dc-8***.

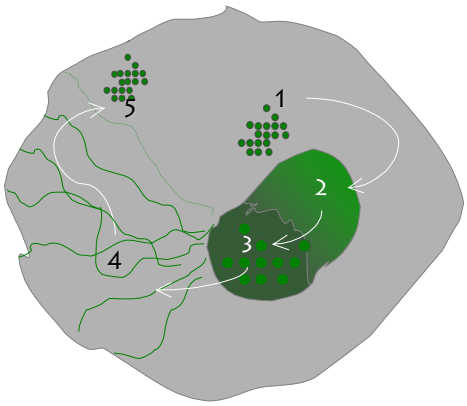


FIG DC-7 : FLUX INTRACEL·LULAR D'SNAIL
(1)La síntesi d'Snail al citosol és seguida d'una entrada ràpida al nucli, bé mediada per difusió, bé per algun tipus de senyal de localització encara no identificat. La distribució d'Snail al nucli és inicialment difosa (2), ocupant tot el nucleoplasma però respectant les regions nucleolars. En aquestes condicions, Snail és capaç d'unir-se als promotors de gens diana com E-cadherina, i exercir el seu efecte transcripcional. En algunes condicions, presents a totes les cèl·lules i afectant a totes les molècules, Snail és fosforilat en el domini ric en Serines (les dades experimentals suggereixen que potser això ocorre dins el nucli), i aquesta modificació comporta la redistribució d'Snail en nous subdominis nuclears (3), possiblement "speckles". Aquesta localització sembla ser el pas previ a a l'export nuclear d'Snail, també activat per la fosforilació del domini ric en Serines. La sortida d'Snail fora del nucli el porta predominantment i en totes les cèl·lules, a associar-se als microtúbuls (4), que decora en tota la seva longitud. Els efectes d'Snail als microtúbuls els hem caracteritzat només parcialment, però podrien ser la base mecanística de l'efecte que Snail té sobre la motilitat cel·lular. En aquesta localització i essent fosforilat, Snail no pot retornar al nucli, i molt possiblement és degradat al cap de poc temps (5). Això asseguraria un fluxe direccional d'Snail dins la cèl·lula, en determinar el punt i final.
El model és basat en la observació de la distribució subcel·lular dels diferents mutants, els assaigs en temps real i els estudis d'export i colocalització.

Cal haver fet una repressió eficient de l''expressió d'E-cadherina per a què Snail es fosforili

En condicions normals, les cèl·lules epitelials fosforilen de forma relativament eficient *mSnail*. Quan hom força l'expressió d'*E-cadherina* exògena, no subjecte a la regulació transcripcional per *mSnail*, els nivells d'*E-cadherina* no poden ésser eficientment regulats a la baixa. En aquestes condicions, *mSnail* és fosforilat amb molta menys eficiència (vegeu ***Fig Dc-8***). Pel contrari, si forcem la davallada d'E-cadherina afegint amb *mSnail* un altre factor transcripcional capaç de reprimir-ne l'expressió, com ZEB-1/SIP-1 (*Guaita S et al, J Biol Chem 2002; Comijn J et al, Mol Cell 2001*), els nivells de fosforilació d'*mSnail* s'incrementen considerablement.

La deficient fosforilació del mutant P2A d'*mSnail* confirma que quan E-cadherina no pot ésser regulada a la baixa, *Snail* no pot ésser fosforilat. El mutant P2A té la substitució puntual de la

[77] La coordinació de ben segur què és molt més complexa, perquè implica la modulació d'altres successos en les cèl·lules que formen part de tot el programa d'*EMT*: l'aturada de cicle cel·lular, fet bàsic en cèl·lules migratòries; possiblement polarització cel·lular i canvi de forma; i d'altres modificacions fenotípiques -adquisició de l'expressió de molècules com *fibronectina* o *metaloproteases de matriu*, pèrdua de filaments intermediaris rígids característics de cèl·lules no motils com les *queratines*, pèrdua de molècules de membrana no necessàries en la polarització cel·lular no epitelial, com *MUC-1* o d'altres...

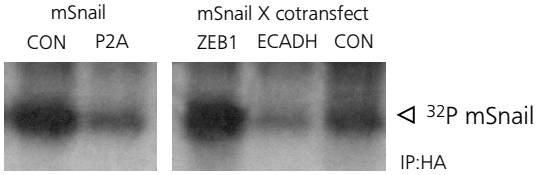


FIG DC-8 : EL GRAU DE FOSFORILACIÓ D'SNAIL RESPON A CANVIS EN L'EIX SNAIL/E-CADHERINA
Assaig de marcatge amb P^{32} i immunoprecipitació específica d'mSnail-HA. Cèl·lules RWP1 foren transfectades de forma transitòria amb els ADNc codificants per mSnail, el mutant P2A (mutació en la Pro en posició 2 per Ala, fet que evita l'efecte repressor transcripcional de la proteïna); o bé co-transfectades amb mSnail i els ADNc codificants per ZEB1 (documentat com a repressor d'E-cadherina), E-cadherina (forma sencera, amb localització membranal) o bé el vector buit, en una proporció 1:2 (Sna:ADNc problema). La imatge correspon a una exposició de 16H. En els dos primers carrils, la quantitat de ADNc transfectat d'Snail és 1.5 cops major a la dels carrils de la dreta, fet que justifica les diferencies en els controls.
Els assaigs que a priori comporten una ineficiència en la repressió exercida per Snail sobre E-cadherina (P2A per no poder reprimir-ne l'expressió, E-Cadh per a evitar-ne la davallada en ser expressada constitutivament), es corresponen a un menor nivell de fosforilació del factor de transcripció. El "sinergisme" en l'efecte transcripcional entre Zeb1 i Snail provoca l'efecte contrari.

Prolina en posició 2 (dins el domini *SNAG*) per una Alanina, mutació que és suficient per a bloquejar l'efecte repressor transcripcional que té sobre E-cadherina, potser perquè el consens del domini *SNAG* és sensible a la substitució. (*Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000; Grimes HL et al, Mol Cell Biol 1996).* Amb això, tot i expressar *mSnail* en les cèl·lules, l'expressió d'E-cadherina no cau, i en correlació amb els altres resultats, el factor de transcripció és deficientment fosforilat (vegeu ***Fig Dc-8***). Cal valorar la distribució subcel·lular del mutant *P2A* que hom esperaria que, en consonància amb els resultats de l'assaig de fosforilació, fos predominantment nuclear i difosa.

Com vincular funció i localització d'Snail en un procés modulable

La fosforilació d'Snail per PKCs i el vincle amb les unions adherents suggereixen una hipòtesi mecanística per al cicle regulador de la distribució subcel·lular d'Snail i les funcions transcripcionals i no transcripcionals.

En l'intent de definir el repertori de quinases que podien fosforilar *Snail* in vivo, vàrem testar bona part de les *Ser/Thr quinases* que tenien seqüències consens predites dins el domini ric en serines (*NetPhos Predictor, EMBL*). Com és mostrat a la ***Fig Dc-9***, els resultats dels tests in vitro indicaven que excepte *PKCalfa*, cap de les altres quinases avaluades (*CKII, GSK3beta, PKA, MEKK/ERK, i fins i tot cdc2-Cdk1*[NP78]) era capaç de fosforilar *Snail*. Els residus fosforilats probablement es troben en el domini ric en serines, ja que la deleció del segment *90-120* n'evita la fosforilació in vitro per *PKCalfa* [NP79]. No obstant, l'estequiometria de la reacció -mols incorporats d'ATP per mols de molècules- suggereix que no més d'un lloc deu ésser fosforilat per *PKCalfa*. Malauradament, en assaigs de transfecció transitòria no ens ha estat possible detectar canvis de localització d'*Snail* depenent de

[78] La idea de testar l'efecte de *cdc2/cdk1* sobre *Snail* va provenir de la observació que en un mateix grup cel·lular, era possible trobar dues cèl·lules transfectades amb diferent patró de localització subcel·lular d'*Snail*. Alhora, els moviments de gastrulació o la migració de les cèl·lules de la cresta neural semblen coincidir amb fases concretes del cicle cel·lular (vegeu *Burstyn-Cohen T i Kalcheim C, Dev Cell 2002; 3: 383-395*). Això ens va suggerir que fora possible que factors individuals en cada cèl·lula, com la fase del cicle cel·lular, fossin els què modulessin la distribució i l'estat de fosforilació d'*Snail*. Tanmateix, els assaigs de fosforilació "in vitro" amb *cdk1* immunoprecipitada d'extractes cel·lulars totals de cèl·lules proliferants (RWP1), no van aportar resultats concluients. En principi, el fet que la *Histona H1* fos fosforilada en la mateixa reacció ens suggereix que l'absència de fosforilació d'*Snail* és específica i deguda a que *cdk1* no és probablement la quinasa determinant.

[79] Aquest últim resultat cal interpretar-lo amb salvetats: el fragment *C-terminal* (*151-264*) sol també es fosforila eficientment per *PKCalfa*, molt més que no pas la molècula sencera. És molt possible que els resultats de fosforilació sobre fragments parcials de la proteïna "in vitro" siguin artefactuals i poc rellevants "in vivo", com és conegut per a altres proteïnes.

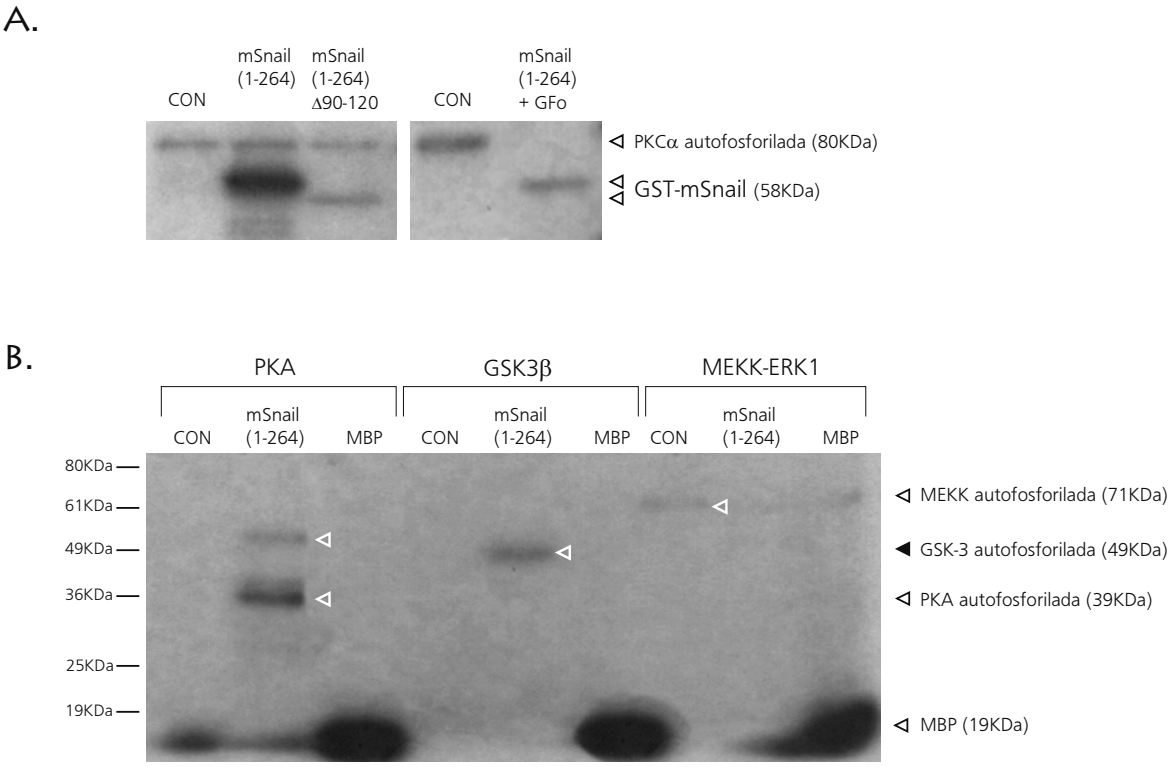


FIG DC-9 : ASSAIGS DE FOSFORILACIÓ IN VITRO D'SNAIL AMB QUINASES CANDIDATES
D'acord amb els consens de fosforilació predits dins la seqüència d'Snail, es varen realitzar assaigs in vitro per a testar possibles quinases candidates a fosforilar la proteïna. (A) PKCα és capaç de fosforilar la proteïna de fusió GST-mSnail in vitro. La delecció del domini ric en serines (tercer carril) comporta una davallada en els nivells de fosforilació de la proteïna. Tanmateix, l'adició d'un inhibidor específic de PKCα a la reacció (GFo, GF 109203X) bloqueja també la fosforilació. (B) Amb PKA, GSK-3β i MEKK/ERK1 no es varen obtenir resultats significatius, i en principi, cap d'aquestes 3 quinases és capaç de fosforilar Snail in vitro de forma eficient. Les bandes assenyalades amb triangles blancs cap interpretar-les com a bandes d'autofosforilació de les mateixes quinases, si bé crida l'atenció que només es trobin presents en els carrils on hi ha GST-mSnail. Tanmateix, la fusió GST-mSnail té un pes de 58 KDa (aproximadament, vegeu (A)), i per tant és descartable que les bandes corresponguin a traces de fosforilació de la proteïna.
MBP és utilitzada com a substrat control de la reacció, per ser fosforilada eficientment per les 3 quinases.

l'expressió d'aquesta quinasa. En la mateixa línia, l'ús d'inhibidors específics de quinases i o fosfatases com l'àcid okadaic, l'inhibidor GF109203X selectiu de *PKCs,* estaurosporina (amb selectivitat també per les PKC), el PD98059 (inhibidor selectiu de MAPK) o l'ortovanadat sòdic no han donat resultats significatius.

Els consensos de fosforilació són relativament compartits per les diverses *PKC (Toker A, Frontiers Bioscience 1998)*, de forma que *PKC atípiques* (*aPKC*) com *zeta* o *lambda* podrien fosforilar dianes putatives de les *PKC clàssiques* com *alfa*, o a l'inrevés, si bé ho fan amb molta menys eficiència. Les *aPKC* han estat implicades en processos com la polarització del fus mitòtic en neuroblasts, la constitució de les unions adherents i unions oclusives de cèl·lules epitelials des de *Drosophila* a mamífers, i la polarització dels epitelis. Un complex multiproteic funcionalment conservat en l'escala filogenètica, i que inclou *aPKC* i proteïnes *PAR (PAR-3(Bazooka-ASIP)/PAR-6/aPKC) (Suzuki A et al, J Cell Biol 2001)*, regeix aquestes funcions. Conceptualment es creu que aquest complex o "casset" multiproteic és responsable de la gènesi d'asimetria dins les cèl·lules epitelials, possiblement per associar les seves funcions al citosquelet cel·lular. Així, és imprescindible en el procés de divisió cel·lular asimètrica que té lloc en els neuroblasts, però també ho és en el procés de

polarització de les cèl·lules epitelials al llarg de tota l'escala filogenètica i en el manteniment de l'estructura dels epitelis. La polarització és determinant per a establir dominis de membrana apicals contraposats als basolaterals, fet inherent i necessari per a la diferenciació de les cèl·lules epitelials. En aquest sentit, això és també una forma de generar asimetria en les cèl·lules.

Les proteïnes *PAR* semblen localitzar el complex *PAR-aPKC* a la zona apical. En aquest punt es formaran les zònules adherents dels epitelis de *Drosophila* i també dels vertebrats, o les unions oclusives de les cèl·lules MDCK de gos (un model força estudiat). Es creu que les *aPKC* que s'associen a aquests complexes són essencialment *aPKC lambda* (*Horne-Badovinac S et al, Curr Biol 2001*) i *aPKC zeta* (*Qiu RG et al, Curr Biol 2000*). Possiblement *aPKC lambda* sigui funcionalment la contrapart més probable de l'*aPKC* que s'associa al complex a *Drosophila* o *Chenorabditis elegans*, i formaria part del complex en MDCK o NIH-3T3, però no és descartable que en alguns epitelis, com l'intestinal, també hi participi *aPKC zeta*, que de fet interacciona directament amb *PAR-3/ASIP* (*Izumi Y et al, J Cell Biol 1998*). El complex *PAR-aPKC* doncs, és un integrant perifèric dels sistemes d'unió necessari per a la correcta formació d'aquests, i la seva localització i integritat depèn directament de la integritat de les unions intercel·lulars -unions estretes i adherents - *(Izumi Y et al, J CellBiol 1998*), a les quals és reclutat [NP80].

La desestructuració de les unions adherents allibera aquest complex al citosol. Hi ha algunes evidències de que aquest fet té com a conseqüència l'adquisició d'un fenotip migratori i fibroblàstic en les cèl·lules (*Qiu RG et al, Curr Biol 2000; Mishima A et al, Genes Cells 2002*), en el qual l'*aPKC* sembla tenir un rol important. La reestructuració de les unions repescaria el complex a la zona apical, fent reversible aquest fenotip, fet que potser fonamenta els mecanismes d'inhibició per contacte de la motilitat cel·lular (*Mishima A et al, Genes Cells 2002*).

La implicació directa de les *aPKC* en tot aquest procés de definició-redefinició de la polaritat epitelial i funcionalitat de les unions intercel·lulars, l'evidència in vitro que quinases de la família *PKC* podien fosforilar *Snail (**Fig Dc-9**)*, i les dades experimentals més recents que suggereixen un rol regulador de la integritat de les unions adherents en l'estatus de fosforilació d'aquest factor de transcripció (***Fig Dc-8***), són fets força coherents i això ens ha fet testar si les *aPKC* poden ser candidates a mediar la fosforilació d'*Snail* en resposta a la pèrdua de les unions adherents, i per tant, ser les responsables de la seva sortida al citosol en aquest hipotètic cicle de distribució funcional que en regula l'activitat. L'*aPKC* alliberada per la desestructuració dels complexes d'unió podria translocar-se al nucli i fosforilar-hi substrats *(Snail* per a activar-ne l'export?). De fet, se sap que algunes *aPKC* com *PKCzeta* (*Toker A, Frontiers Bioscience 1998, Perander M et al, J Biol Chem 2001*), o amb més eficiència *PKClambda* (*Perander M, Bjørkøy G i Johansen T. J Biol Chem 2001*) poden entrar al nucli, i per tant, hi podrien fosforilar alguns substrats. Un mecanisme basat en seqüències de localització i export nuclear permet un intercanvi constant d'aquestes *aPKC* entre citosol i nucli, que en el cas concret de *PKCzeta* és probablement regulat de manera molt estricta.

[80] La formació de les unions adherents i estretes comença amb la localització d'*E-cadherina* o *ZO-1* en la membrana lateral. Això genera unions puntuals, similars a les presents en fibroblasts. El reclutament del complexe *PAR-aPKC*, possiblement a través de l'activitat d'*aPKC*, permet que aquestes unions primitives es desenvolupin i es generin els complexes d'unió "en cinturó" característics de cèl·lules epitelials (*Suzuki A et al, J Cell Sci 2002*)

Els primers resultats preliminars suggereixen que l'activació d'*aPKC zeta* té com a conseqüència l'augment de fosforilació d'*Snail* (***Fig Dc-10***), per bé que les diferències respecte el control no han estat reproduïdes amb la mateixa fiabilitat en els 2 assaigs realitzats. Desconeixem si la fosforilació és derivada de l'acció directa de *PKC zeta* sobre *Snail*, o és a través d'algun traçat molecular i per tant no és la quinasa que directament el fosforila. En un futur immediat caldrà avaluar "in vitro" l'activitat de *PKC zeta* sobre *Snail*, i encara més important, testar "in vivo" si aquest efecte és suficient per a modular-ne la distribució subcel·lular.

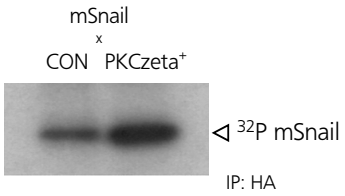


FIG DC-10 : L'EXPRESSIÓ FORÇADA DE PKCζ (ZETA) COMPORTA UN AUGMENT EN EL NIVELL DE FOSFORILACIÓ D'SNAIL
Assaig de marcatge amb 32P i immunoprecipitació d'mSnail-HA expressat de forma transitòria en cèl·lules RWP1. mSnail-HA es va co-transfectar en una proporció 2:1 (Sna/Efector) amb bé el vector buit (pcDNA3), bé l'ADNc de PKCζ, forma constitutivament activa.
Aquest experiment ha estat repetit 3 cops, i si bé en tots els casos l'adició de PKCζ comporta un increment apreciable en la fosforilació d'mSnail, les majors diferències són les mostrades en aquest assaig en concret.
Exposició durant 16H a –80ºC.

Un model per explicar la reversibilitat de l'EMT en gastrulació i metàstasi

La transició epiteli-mesènquima *(EMT)* és un procés transitori i reversible (*Hay ED, Acta Anat 1995*). Exemples paradigmàtics com la gastrulació i formació del futur endoderma o el procés d'invasió i metàstasi, així ho indiquen (vegeu *Introducció*). És possible que el propòsit ancestral de l'*EMT* fos permetre a les cèl·lules epitelials colonitzar nous nínxols d'una forma eficaç. Conceptualment això demana que el procés sigui transitori, i que tanmateix, les cèl·lules puguin retornar al seu estat de diferenciació original. La reversibilitat permet al futur endoderma organitzar-se en un tub primitiu, a les cèl·lules delaminades de la cresta neural integrar-se en els epitelis, o a les cèl·lules integrants dels fronts d'invasió tumoral generar focus metastàtics amb arquitectures eminentment epitelials, que molt possiblement faciliten la seva progressió.

Snail participa de tots els processos d'*EMT* descrits a la literatura (*Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol* i observacions personals), i és possiblement l'efector de moltes -o totes- les vies capaces de desencadenar aquest procés morfogènic, com per exemple la via de senyalització per *ILK* (*Tan C et al, Oncogene 2001*). L'expressió d'*Snail* correlaciona estrictament amb la fase d'invaginació dels futurs endo- i mesoderma (*Alberga A et al, Development 1991*), la fase de delaminació de les cèl·lules de la cresta neural i en totes les poblacions de cèl·lules migratòries en l'embrió (*Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002*). L'expressió en les cèl·lules migratòries desapareix en quant són integrades en les seves localitzacions definitives. Això coincideix amb la reversió de l'*EMT*, i la restauració de l'expressió d'E-cadherina (*Oda H, Tsukita S i Takeichi M, Dev Biol 1998*).

Per tant, el primer pas en el procès d'*EMT* implica l'activació transcripcional de l'expressió d'Snail. Com hem mencionat en la caracterització del promotor, factors associats al desenvolupament o estímuls externs en el cas del càncer, són capaços d'incrementar l'activitat del promotor i possiblement de sobrepassar la repressió exercida per regions *cis* com *l'Element d'Exclusió Epitelial*. L'increment en els nivells cel·lulars d'Snail porta possiblement a la seva acumulació dins el nucli en primera instància, on exercir la seva activitat com

a repressor transcripcional. De fet, Snail és molt més potent en aquest efecte que no pas Slug (*Hajra KM, Chen DY i Fearon ER, Cancer Res 2002*) o d'altres factors com ZEB-1 (*Guaita S et al, J Biol Chem 2002*) o E12/E47 (*Bolós V et al, J Cell Sci 2003*). Tanmateix sembla que el manteniment del fenotip mesenquimal recau en d'altres factors amb expressió més extesa, com Slug o ZEB-1, que possiblement es troben per sota d'Snail en el traçat molecular que regeix l'*EMT* (*Guaita S et al, J Biol Chem 2002, Aybar MJ, Nieto MA i Mayor R, Development 2003*).

Com s'autolimita doncs el bec d'expressió d'*Snail* induït a l'inici de tots aquests processos? Una possibilitat fora que els estímuls que n'activen l'expressió, com és el cas del senyal de *Dorsal* a l'establiment del patró dorsoventral a *Drosophila*, persistissin durant tot el temps en què l'expressió d'*Snail* és necessària. Òbviament això no ocorre així, i és biològicament inviable. L'altra possibilitat és que l'expressió d'*Snail* sigui mantinguda mentre la cèl·lula migra, i que l'arribada als diferents destins topogràfics sigui l'estímul necessari per a fer-ne davallar l'expressió. En aquest sentit, seria similar al què ocorre amb la inhibició per contacte que experimenten les cèl·lules epitelials en cultiu. Aquesta hipòtesi creiem què és la més factible d'acord amb el què es coneix dels patrons d'expressió d'*Snail* en el desenvolupament embrionari (*Alberga A et al, Development 1991; Smith D et al, Development 1992*).

La proposta conceptual de com deu ocórrer tot això és exposada a la ***Fig Dc-11***. D'acord amb les dades experimentals que hem obtingut i les premisses procedents de les referències bibliogràfiques, en refer les unions intercel·lulars, les cèl·lules que haurien experimentat una *EMT* autolimitarien l'activitat funcional d'*Snail*, fent així potser innecessària la participació de factors transcripcionals externs, i activant la reversió de l'*EMT* quan és precís: en el moment que la cèl·lula epitelial que l'ha experimentat és integrada en el seu destí final. L'expressió de *ZEB-1* (i *Slug*?), que és depenent d'Snail, i de fet el manteniment del fenotip mesenquimal associat a aquests factors, serien alhora també autolimitats per la davallada dels nivells i la pèrdua d'activitat d'Snail.

En detall, en aquest hipotètic mecanisme la integritat de les unions intercel·lulars té un paper central en el control de la funcionalitat d'*Snail*: la pèrdua d'aquesta integritat suposaria el senyal desencadenant per l'associació d'*Snail* amb la xarxa microtubular, possiblement secundari a l'alliberament d'*aPKC* de la seva localització a les unions, i així activaria la migració cel·lular. La recomposició d'aquests complexes d'unió un cop la cèl·lula és integrada en els llocs de destí posaria punt i final a l'estímul que manté *Snail* als microtúbuls, i en permetria la degradació en el citosol, on creiem què és molt més inestable. Aquest mecanisme seria doncs autolimitat, i tanmateix permetria a cada cèl·lula, de forma autònoma, completar el seu trajecte migratori independentment del què ocorri en la resta de cèl·lules on *Snail* és també expressat. Aquesta és una idea força coherent amb el què ocorre, per exemple, en el procés de migració arreu de l'organisme de les cèl·lules de la cresta neural. En essència també, això permetria en qualsevol cas la reversibilitat del procés d'*EMT* de forma controlada. Podria doncs explicar perquè les metàstasis són d'arquitectura epitelial quan de fet, són originades per cèl·lules que han patit una *EMT* i tenen un aspecte gairebé mesenquimal. L'*EMT* i el procés invasiu-metastàsic són altament dinàmics potser perquè el mecanisme que regula l'activitat d'*Snail* i de fet, la transitòrietat de l'*EMT*, ho deu ser també.

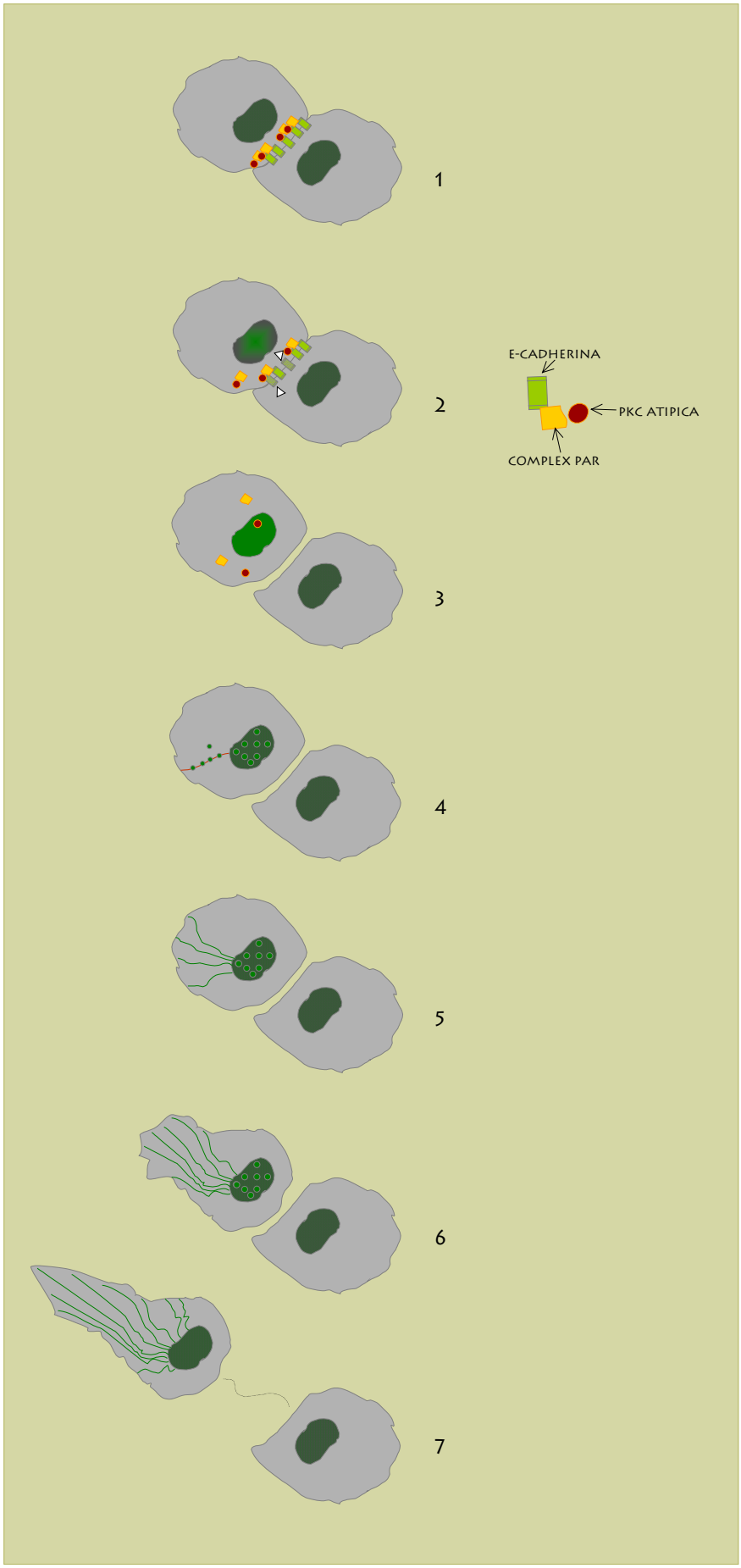


FIG DC-11 : MODEL MECANÍSTIC INTEGRAT DE L'ACCIÓ D'SNAIL EN CÈL·LULES EPITELIALS

En condicions basals (1), les cèl·lules epitelials mantenen unions intercel·lulars estables basades en l'activitat d'E-cadherina. El complexe PAR-aPKC és essencial per a la localització inicial i organització d'aquests complexes d'unió, que integren les unions adherents i les zones oclusives. (2) L'expressió d'Snail i el seu efecte transcripcional comporten, entre altres efectes, la davallada en els nivells d'E-cadherina. Això porta finalment a la pèrdua progressiva de l'E-cadherina funcional a membrana, i la desestructuració de les unions adherents (fletxes blanques). És possible que calguin d'altres estímuls per fer finalment desaparèixer les unions adherents. L'efecte final és la desorganització del complex aPKC/PAR. Els elements que el composen queden lliures al citosol, i aPKC (3) pot aleshores possiblement entrar al nucli, on interaccionar amb Snail. Aquesta interacció porta a la fosforilació d'Snail, que es relocalitza als "speckles" (4), i queda accessible a ser exportat fora del nucli. Al citosol, Snail interacciona amb elevada afinitat amb els microtúbuls (línia vermella a la fig 4), que progressivament decora i estabilitza (5). Una de les conseqüències d'aquest efecte estabilitzador és la modificació de la forma cel·lular, i possiblement la reorganització dels filaments intermediaris (vimentina) i seria coincident amb l'activació del traçat de RhoA, implicada en motilitat cel·lular i canvi de forma (6). La cèl·lula inicia així el procés migratori (7), i es desplaça independentment (invasió tumoral, gastrulació) fins poder interaccionar amb d'altres cèl·lules epitelials i revertir els fenòmens descrits, car l'estabilització d'E-cadherina a membrana pels nous contactes possiblement recluta altra cop el complexe aPKC/PAR a membrana. L'estabilitat d'Snail un cop fosforilat deu ésser menor, fet que permet la transitorietat del procés.

Aquest model mecanístic seria autònom per a cada cèl·lula, autoregulat. L'estabilitat d'E-cadherina a membrana seria determinant en tot aquest procés, i és conceptualment bàsica per a la reversibilitat del mateix.

La incongruència de la dualitat Snail/Slug

Algunes coses però, no lliguen del tot en aquest model funcional per a *Snail*. El primer forat argumental es dóna en examinar la dualitat *Snail/Slug*. Ambdós factors de transcripció comparteixen funcions essencials en l'*EMT*. *Slug* regeix en predomini els fenòmens d'*EMT* que tenen lloc en el pollastre i possiblement en totes les aus. *Snail* ho fa en mamífers, i en la majoria de vertebrats (*Sefton M et al, Development 1998)*. La inversió dels patrons d'expressió en les aus es creu deguda a fenòmens d'intercanvi entre les regions promotores d'un i altre gen, potser per mecanismes de recombinació i posterior adició de nous elements reguladors. No obstant, tant en aus com en mamífers l'expressió d'*Snail* i *Slug* ocorre en cèl·lules migratòries, i el sumatori de tots els territoris on són expressats un o altre factor de transcripció és equivalent en ambdós tipus de vertebrats.

La conservació en la seqüència aminoacídica de tots els homòlegs d'*Slug* és molt elevada (més del 90%), quan entre els homòlegs d'*Snail* les diferències són molt majors, sobretot en la meitat N-terminal (*Sefton M et al, Development 1998*). Entre *Snail* i *Slug*, la conservació és força estricta en els 4 últims dits de zenc (*Slug* en té 5, a diferència de l'*Snail* de mamífers que en té 4) i en els primers 24 aminoàcids, que inclouen el domini *SNAG*. Malgrat aquestes diferències, *Snail* i *Slug* són funcionalment equivalents, si més no en la cresta neural de les aus (*del Barrio MG i Nieto MA, Development 2002*).

Com hem pogut demostrar, les localitzacions subcel·lulars d'*Snail* i *Slug* són sensiblement diferents, donat que *Slug* no és capaç de distribuir-se al citosol ni associar-se als microtúbuls (vegeu també *Hemavathy et al, Mol Cell Biol 2000*). En mamífers, la unió d'Snail als microtúbuls té un efecte evident sobre el dinamisme d'aquestes estructures, i les troballes experimentals mostrades suggereixen que podria ser el vincle mecanístic d'Snail amb motilitat cel·lular, fins ara no descrit.

Però tot això planteja aleshores un "buit" conceptual: si bé *Slug* regeix l'*EMT* que té lloc a la cresta neural de pollastre –i es creu que a *Xenopus*, al ratolí *Slug* no s'associa pas als microtúbuls. D'acord amb l'elevada conservació de la seqüència aminoacídica existent entre tots els homòlegs d'*Slug*, és previsible que tampoc s'hi associï l'homòleg de pollastre o el de *Xenopus*. Si la localització microtubular és tant important per a la funció d'*Snail*, perquè no caldria en *Slug*? La resposta no és gens fàcil. (i) La inversió més evident en les regions d'expressió d'*Snail* i *Slug* en aus ocorre en els territoris prospectius com el mesoderma primerenc, la cresta neural pre-migratòria o la formació inicial dels somites (*Sefton M et al, Development 1998*). En les poblacions migratòries la co-expressió d'ambdós factors és més corrent, en tots els vertebrats incloses les aus. És possible que en l'etapa migratòria els nivells d'*Snail* expressats siguin els què regeixin els mecanismes de motilitat cel·lular, mentre que en les fases d'especificació com les què tenen lloc als territoris prospectius, l'activitat transcripcional -similar en ambdós factors- sigui suficient i per tant, puguin ésser utilitzats indistintament per al mateix propòsit. En sentit contrari, els homòlegs d'*Snail* a pollastre i *Xenopus*, amb elevada identitat entre ambdós, són força diferents dels homòlegs en mamífers. Per tant, la incoherència entre funció i estructura que ens planteja aquesta discussió no es resol amb aquesta primera hipòtesi. (ii) D'altra banda, cap la possibilitat que la unió a microtúbuls no tingui la rellevància funcional esperada i que per tant no sigui el substrat molecular de l'activació de la motilitat cel·lular induïda per *Snail*. (iii) Fora

possible també que *Slug* pogués associar-se als microtúbuls, però que en les condicions experimentals utilitzades, no fos possible evidenciar-ho.

Només una NES per a Snail i només per a mamífers

Finalment cap la possibilitat que l'equivalència funcional entre *Snail* i *Slug* no sigui certa, si més no en mamífers. Això, és clar, no explicaria la similitud funcional entre *mSnail* i *cSlug* exposada abans. En localitzacions típicament regides per *Slug* a pollastre -però possiblement també a *Xenopus*- com la cresta neural, *Snail* té el rol predominant en mamífers. Així, *Slug* no és essencial en la formació o migració de la cresta neural de ratolí, i és possible que en cap mamífer (*Jiang R et al, Dev Biol 1998*). Les diferències en la seqüència aminoacídica entre ambdós factors de transcripció són bastant més grans en els corresponents homòlegs mamífers que en aus o d'altres vertebrats com *Xenopus*[NP81](*Sefton M et al, Development 1998*). El tret diferencial més cridaner és la presència d'un primer dit de zenc a l'*Snail* de *Xenopus* i pollastre, absent als mamífers. Aquest dit de zenc manté una semblança acceptable amb el primer dit de zenc d'*Slug* (conserva entre d'altres residus les 2 *cisteïnes* i *histidines* que defineixen el domini). En humà, ratolí, gos, porc i vaca, aquest segment és substituït per una regió sensiblement diferent on es troba integrada la *seqüència d'export nuclear* (*NES*) que hem identificat. La pèrdua d'aquest primer dit de zenc no sembla ser funcionalment important (*Nieto MA, Nat Rev Mol Cell Biol 2002; Manzanares M et al, TRENDS Gen 2001; Hemavathy K et al, Genes 2000; Sefton M et al, Development 1998*), però d'acord amb les nostres observacions, el guany d'un domini nou amb una *NES* ha permès a l'*Snail* de mamífers ser exportat fora del nucli. Per tant, la diferència funcional entre *Snail* i *Slug* en mamífers és possiblement la mateixa que la què hi ha entre els homòlegs d'*Snail* en mamífers respecte el d'altres vertebrats i les aus.

Domini especial per a una gastrulació especial? O la falta de consens amb les aus

La gastrulació en els amniotes (mamífers i aus) és sensiblement diferent de la què té lloc en els organismes invertebrats -eriçó de mar, *Drosophila*- o d'altres vertebrats com *Xenopus* i el peix zebra *Danio rerio*. En els primers, la invaginació del mesoderma i endoderma prospectius a través de la línia primitiva ocorre característicament en cèl·lules soltes que prèviament han experimentat una *EMT*, mentre que en la resta d'organismes citats aquest procés de gastrulació es fa en grups cel·lulars coherents (*Hay ED, Acta Anat 1995*), que tenen un dinamisme força diferent al de les cèl·lules aïllades. L'*EMT* és tanmateix reversible, fet que és crucial per a la conformació del futur endoderma o per a la cohesió d'algunes estructures derivades de les cèl·lules de la cresta neural, com ara el teixit suprarenal o les cèl·lules de Schwann.

En migrar de forma independent, les cèl·lules aprofiten un mecanisme de regulació autònoma, i així de manera particular, cadascuna pot assolir diverses "dianes" i tanmateix modular la seva motilitat sense dependre de les altres cèl·lules delaminades. En els moviments de grups cohesius que tenen lloc a *Xenopus*, per exemple, la independència és nul·la o directament lligada al destí de la resta de cèl·lules veïnes en el grup en moviment. En permetre la motilitat autònoma, l'organisme adquireix una font de diversitat no

[81] L'*Snail* de *Xenopus* té una seqüència força semblant a *Slug* en algunes regions, com els últims aminoàcids. Quelcom similar ocorre amb l'*Snail* de pollastre (*cSnail*), que és molt més semblant al de *Xenopus* i al mateix Slug que no pas al de mamífers.

prèviament existent –la cresta neural n'és un exemple.

L'*Snail* dels mamífers ha adquirit algunes característiques funcionals que són les responsables d'aquests nous events morfogènics. Aquestes millores moleculars permeten que Snail desencadeni un procés de transició epiteli-mesènquima modulable i reversible, que per bé que assegura l'autonomia de cada cèl·lula, permet la recuperació del fenotip epitelial en les cèl·lules on és necessari. Per a això, Snail ha de coordinar events transcripcionals amb successos no transcripcionals, i per tant, la seva activitat ha estat diversificada portant-lo del nucli al citosol. La dualitat funcional aportada per la presència d'un senyal d'export nuclear en el què era en els vertebrats inferiors un dit de zenc ha estat clau. La integració de l'efecte transcripcional amb la modulació del dinamisme microtubular dóna lloc a una harmoniosa conjunció entre fenotip i funció. L'efecte transcripcional modula el programa fenotípic de les cèl·lules epitelials i inicia el procés d'EMT. L'efecte proteic, que no tindria lloc fins que l'efecte transcripcional ha estat efectiu, executa l'objectiu final de tot el procés morfogènic, que no és més que el canvi de localització mediat pel moviment cel·lular. Quelcom així com "recull i marxa".

El model mecanístic que culmina aquesta tesi proposa que és un mateix factor, essencialment *E-cadherina*, el què centra la funció i el destí d'*Snail*. *E-cadherina* és peça clau en la biologia de les cèl·lules epitelials -el seu rol en desenvolupament i càncer així ho demostra. El circuit tancat entre *Snail* i *E-cadherina* permet que el procés d'EMT sigui dinàmic i autònom, i alhora n'assegura la reversibilitat, perquè en termes biològics les EMT han de ser limitades en el temps.

Això sembla encaixar bé amb els mamífers, però no amb les aus, observació que és lligada indefectiblement amb la incongruència entre la hipòtesi mecanística exposada per als primers i la dualitat *Snail/Slug* en les mateixes aus, discutida en els paràgrafs anteriors. De forma metòdica, hom hauria de descartar diverses possibilitats: (i) La primera fora que el gen que coneixem en l'actualitat com *Snail* per al pollastre (*cSnR*) fos un homòleg diferent, i que existís un altre gen que codifiqués per una proteïna amb una possible senyal d'export. Però això em sembla pel moment inviable. En una anàlisi de les bases de dades amb ESTs de pollastre, no he pogut trobar altres possibles homòlegs acceptables. (ii) Una segona explicació fora que seqüències contingudes al domini que correspon al primer dit de zenc es comportessin com a una NES. Però tot i que alguns residus hidrofòbics es mantenen, són integrats dins el què correspon a un dit de zenc. Alhora, la similitud entre la seqüència d'*Snail* a pollastre o *Xenopus* i *Slug* és força elevada, inclosa aquesta regió de la proteïna, i d'acord amb les nostres observacions, *Slug* no és exportat. (iii) Cabria per fi la possibilitat que en aus l'efecte fos possible sense que *Snail* fos exportat al citosol. En aquest cas, l'adquisició d'una NES i la pèrdua d'un dit de zenc en els mamífers no tindria el sentit funcional que hem considerat en aquest treball, fet que per altra banda podria fins i tot suposar que aquestes variacions a la proteïna no tenen sentit biològic. Tanmateix, la conservació de la NES a mamífers és força estricta, car hem pogut identificar 5 espècies en les quals es confirma la seva existència. Es difícil doncs, pensar que un canvi amb els efectes estructurals i biològics que aquest té en la proteïna, essent conservat, no sigui mecanísticament rellevant. És incert doncs, com dues proteïnes sensiblement diferents poden

desenvolupar en espècies diferents rols biològicament similars.

Slug és incapaç de substituir la funció d'*Snail* en mamífers, si bé pel contrari, l'*Snail* de mamífers sí que l'és eficient en substituir *Slug* en les aus (*del Barrio MG i Nieto MA, Development 2002*). En la cresta neural de pollastre, els dos homòlegs són relativament intercanviables. Respecte les aus, els mamífers han substituït *Slug* per *Snail* en les regions on hi haurà processos d'EMT. Sembla doncs que *Snail* ha adquirit en mamífers funcions addicionals, fet coincident amb les nostres observacions. Els raonaments exposats en el text precedent no permeten dir en aquest moment quin pot ser el guany biològic que els canvis funcionals en l'Snail de mamífers han aportat. *A priori*, els processos on la família *Snail* té un rol evident no semblen gaire diferents entre aus o mamífers. Fora possible que fets encara no determinats exemplifiquessin les diferències funcionals exposades en aquest treball. Algun d'aquests fets potser permetrà establir amb certesa perquè en mamífers *Snail* ha hagut d'adquirir propietats funcionals i moleculars especials.

EPÍLEG

He exposat un model hipotètic sobre com *Snail* condiciona el procés de *transició epiteli-mesènquima* i de com, per les seves funcions biològiques, permet que aquest procés sigui transitori i reversible.

Part d'aquesta proposta mecanística és suportada per dades experimentals sòlides. La modulació de la localització subcel·lular de la proteïna, la relació d'aquest fet amb l'activitat transcripcional, i els efectes sobre la xarxa microtubular són confirmats en diverses aproximacions experimentals. La relació entre els efectes transcripcionals i no-transcripcionals recau però en dades preliminars, i necessàriament ha de ser confirmada per nous experiments que són en curs al nostre laboratori. La sospitada autonomia del sistema de regulació no-transcripcional d'*Snail* en cada cèl·lula contrasta amb la possible dispersió del sistema de regulació transcripcional. Així, tot i que possiblement els estímuls inicials que activen l'expressió d'*Snail* afecten totes les cèl·lules, crec que és possible que un cop expressat, sigui modulat independentment en cadascuna.

La reversibilitat de la *transició epiteli-mesèquima* és un fet evident, des del què ocorre en la gastrulació dels mamífers i aus, al què hom pot observar en estudiar l'evolució d'un carcinoma. Amb aquest treball suggereixo que és autolimitada pels mateixos sistemes que la coordinen, i en aquest sentit la relació transcripcional i no-transcripcional entre *Snail* i la seva diana *E-cadherina*, en un procés d'autoregulació (diguem-ne recíproca) és essencial. Diversos autors han suggerit que la re-expressió d'E-cadherina en cèl·lules invasives és suficient per a bloquejar-ne la capacitat migratòria, per bé que no el fenotip desdiferenciat.

No obstant, hi ha diversos forats argumentals que requereixen un estudi acurat. (i)Cal primer confirmar que l'efecte d'*Snail* als microtúbuls té com a finalitat activar el moviment cel·lular. Això aportaria per fi una relació clara entre Snail i motilitat cel·lular, fet que ha estat repetidament suggerit a la literatura però mai ha estat explicat en la seva vessant molecular. (ii)Cal també verificar que la fosforilació d'*Snail* que el porta fora del nucli és depenent de l'estat de les unions adherents. (iii)Alhora, cal verificar que es pot autolimitar.

D'altres fets exposats durant la *Discussió* crec que també mereixen una atenció especial: el possible sentit funcional dels "speckles" nuclears, i la possibilitat que *Slug* es fosforili, fet que podria condicionar el seu estat conformacional i la seva localització subnuclear. Això indicaria que es tracta d'un mecanisme conservat en tota la família gènica i podria esser important per a la comprensió dels efectes biològics que aquests factors de transcripció generen en ser expressats.

En resum doncs, *Snail* fa alguna cosa més que comportar-se com un factor de transcripció. Aquestes peculiaritats han de ser determinants en el seu rol coordinador en el procés de *transició epiteli-mesènquima*. I ens permeten pensar en una possible explicació als diversos aspectes del rol que *Snail* té en desenvolupament i càncer, al meu parer difícils d'encaixar en conjunt amb els coneixements que de sobre la seva activitat molecular disposàvem fins al moment. L'existència de mecanismes de control no-transcripcional de l'activitat d'aquest factor, i per correspondència, dels processos de "transició epiteli-mesènquima", indica que fora possible desenvolupar estratègies terapèutiques per a manipular les etapes invasiva i metastàsica dels tumors epitelials. La modulació del traçat molecular que determina la distribució subcel·lular d'*Snail* podria ser un objectiu acceptable.

He provat de deixar doncs portes obertes, i això em pot haver portat a ser un pèl especulatiu en alguna part de la discussió. Però entenc que l'especulació forma part de la gestació de les hipòtesis experimentals.

Línies cel·lulars

Totes les línies cel·lulars utilitzades han estat cultivades en medi modificat de Dulbecco (DMEM), suplementat amb penicil·lina/estreptomicina, glutamina i 10% de sèrum fetal boví.

On és indicat, s'han afegit Leptomicina B (Sigma), a una concentració final de 5 ng/ml i Nocodazol (Sigma) a una concentració final de 10μM (3μg/ml), ambdós diluits en etanol absolut.

Les línies epitelials són immortalitzades o provenen de tumors primaris d'humans, ratolí i rata, de diverses localitzacions: *MDCK* (epiteli tubular renal, gos), *HT29-M6* (adenocarcinoma de colon, humà, seleccionada a partir de la línia parental *HT29* amb metrotexat a una concentració de 10^{-6} M, amb un fenotip mucosecretor), *CaCo2* (adenocarcinoma de colon humà, amb fenotip absortiu), *SW480* (adenocarcinoma de colon humà), *HCT116* (adenocarcinoma de colon humà), *IEC-18* (ileon, rata), *MIAPaCa* (adenocarcinoma ductal de pàncrees, humà), *RWP1* (carcinoma ductal de pàncrees humà), *MCF7* (carcinoma ductal de mama, humà), *EpH4* (carcinoma ductal de mama, ratolí), *HeLa* (adenocarcinoma de cèrvix, humà), *NIH-3T3* (fibroblasts dèrmics, immortalitzats, ratolí).

Les *MDCK* són utilitzades com a model de cèl·lula epitelial polaritzada i diferenciada, amb monocapes organitzades i complexes d'unió elaborats. La línia cel·lular *RWP1* és poc utilitzada com a model experimental, però mostra una elevada eficiència de transfecció i en confluència es polaritzen i formen una monocapa compacta. A baixa confluència tenen un fenotip migratori que difereix de les *MDCK*. Les cèl·lules *MCF7* són un model freqüentat de cèl·lules epitelials de mama amb nivells elevats d'E-cadherina. Aquestes 3 línies foren escollides perquè a priori mostraven els més baixos nivells d'expressió d'Snail en comparació amb d'altres línies cel·lulars.

Clons estables per Snail i ILK

Els clons estables d'HT29-M6 per l'expressió d'mSnail són mantinguts al nostre laboratori. La seva selecció fou feta prèviament (*Batlle E i cols, Nat Cell Biol 2000*). Els clons expressen *mSnail* sota un promotor induïble que deixa de ser funcional davant l'adició de Doxiciclina (2μg/ml) al medi del cultiu. L'expressió estable d'mSnail es conserva gràcies a la presència dels antibiòtics G418 (neomicina) i Higromicina a una concentració final de 500 μg/ml i 200 μg/ml en el medi, respectivament. Tenen un fenotip clarament associable a una transició epiteli-mesènquima, amb davallada de l'expressió d'E-cadherina, i pèrdua de la cohesió cel·lular.

Els clons estables d'MDCK són transfectats amb un constructe que incorpora l'ADNc d'mSnail al vector pIRES, que transcriu un ARN comú per a l'ADNc que confereix resistència a la selecció amb antibiòtic i l'ADNc desitjat. Els clons d'MDCK que expressen establement Snail són mantinguts amb una selecció usual amb G418, 500 μg/ml. Aquests clons expressen quantitats apreciables d'mSnail i perden quasi totalment l'expressió d'E-cadherina, amb la dissolució de les unions intercel·lulars i l'adquisició d'un aspecte més fibroblàstic. (*Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000; Guaita S et al, J Biol Chem 2002, i dades personals i del grup*).

Els clons d'*IEC-18* que expressen establement una forma activada constitutivament de la quinasa *ILK*, o bé un ARNm antisentit d'aquesta (*ILK AS*) o finalment una forma inactiva per l'eliminació de l'activitat quinasa per mutació puntual (*ILK KD*), són obtinguts del laboratori de S. Dedhar, a Canadà. El clon que expressa establement la forma activa té un aspecte fibroblàstic similar al present en els clons amb expressió constitutiva d'mSnail abans citats. Les cèl·lules IEC-18 són cèl·lules epitelials clàssiques, que constitueixen monocapes ben estructurades i capaces de polaritzar-se en cultiu.

L'expressió estable dels constructes exògens es manté per l'adició de G418 a una concentració de 250 μg/ml al medi de cultiu, que en tots els casos és DMEM amb un 10% de sèrum fetal.

Plàsmids, clonatges i subclonatges, mutants per deleció i constructes de fusió amb DNAc

Regió promotora d'Snail

El fragment clonat del promotor humà d'Snail és subclonat en el vector *pGL3basic* (Promega) amb una diana *KpnI* a l'extrem 5', i *HindIII* a l'extrem 3'. La seqüència íntegra del fragment (-888/+42) és dipositada al *GenBank* amb el número d'accés *AY005796*, i és mostrada també a la *Fig Rs-1*.

Totes les truncacions del promotor foren seqüenciades i verificades per a descartar l'existència de mutacions puntuals respecte de la seqüència dipositada al *GenBank*.

Les delecions progressives fins al fragment –213/+42 foren fetes amb oligonucleòtids específics de cada regió, que anellaven a 18 pb des del punt de deleció, i als quals fou afegida 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 –144/+42 fou obtingut per digestió de la diana *BsmBI* que es troba en aquest punt sobre el fragment –213/+42, i utilitzant la diana KpnI present a l'extrem 5' d'aquest últim. Després de fer roms els extrems digerits mitjançant la *Klenow* ADN polimerasa (New England Biolabs) a temperatura ambient per 1 hora, el plàsmid fou relligat.

El fragment –97/+42 fou amplificat amb oligonucleòtids específics flanquejants a la seqüència. A l'extrem 5' fou afegida de nou una diana *BglII*, i una diana *HindIII* a l'extrem 5'. L'oligonucleòtid 5' utilitzat té la seqüència 5' ATAAGATCTTGGCAGATAAGGCCCGCCC 3' (la diana *BglII* és subratllada). L'oligonucleòtid 3' fou el mateix que l'utilitzat per al clonatge del fragment original: 5' ATAAAGCTTCGCCGATTCGCGCAGCAG 3' (la diana *HindIII* és subratllada).

El fragment –48/+42 fou delecionat mitjançant enzims de restricció per a la diana *AflII* (extrem 5') i *HindIII* (extrem 3', final del fragment clonat de promotor), en digestió seqüencial, *Klenow* polimerasa per a fer els extrems roms, i relligació. Aquesta deleció fou feta en les truncacions 5' del promotor indicades en el text.

Les amplificacions per PCR dels diferents segments foren realitzades amb la polimerasa d'alta fidelitat *Pfx Platinum* (Invitrogen) d'acord amb les especificacions del fabricant.

mSnail, mSlug

Snail: L'ADN complementari (ADNc) codificant per l'*Snail* de ratolí (*mmSnail*) fou obtingut per amplificació selectiva d'Snail a partir de RNA total de fibroblasts *NIH-3T3*, i per RT-PCR mitjançant oligonucleòtids específics la seqüència dels quals fou extreta de la seqüència exposada a l'arxiu del *GenBank*, num. Accés *NM_011427 (gi:6755586)*, què havia estat clonada el 1992 pel laboratori d'en Thomas Gridley. Als oligonucleòtids flanquejants se'ls havia afegit una diana *BamHI* a 5', i una diana *EcoRV* a 3', aquesta última pensada per a mantenir la pauta de lectura i la primera Tyr (tirosina, codó TTA) del pèptid *HA (hemaglutinina)*. L'oligonucleòtid 5' inclou una seqüència *Kozak* (5'CCACC3') fusionada al final de la diana *BamHI* (cursiva) i precedint el codó *ATG* d'inici, per a millorar-ne la traducció. 5'CC*GGAT*CCACC**ATG**CCGCGCTCCTTCCTGG3'.

Aquesta seqüència *Kozak* (subratllada) ha estat afegida a tots els constructes delecionats o truncacions d'*mSnail*.

Les diferents *delecions* de la proteïna original han estat fetes de la següent manera:

Meitats *N- i C-terminal*: La digestió de la diana *BglII* situada al nucleòtid 455 de la seqüència de ratolí, separa ambdues meitats. El fragment C-terminal fou eliminat del constructe original a *peGFP-C1* (Clontech) utilitzant aquesta diana a 5', i la diana *BamHI* situada al segment de multiclonatge, 3' al final de l'etiqueta HA present a l'insert. La meitat N-terminal fou mantinguda en el vector, que fou relligat simplement. La meitat C-terminal fou reclonada a *peGFP-C2* (Clontech). Aquest fragment fou també clonat a *pGEX-6P1* (Promega) mitjançant la diana *BamHI* allí present.

El fragment C-terminal (152-264) fou alhora amplificat a partir del cDNA sencer amb oligonucleòtids específics per tal d'afegir una seqüència *Kozak* i un codó d'inici *ATG* a l'extrem 5', per tal de poder-lo expressar en cèl·lules eucariotes mitjançant el vector *pcDNA3* (Invitrogen). L'oligonucleòtid 5' anella en els 18 pb a partir de la diana *BglII* utilitzada per a separar les meitats N i C.

Es varen dissenyar oligonuclèotids específics per a amplificar mSnail previ a l'inici del domini ric en Serines (aminoàcid 82, oligonucleòtid "sentit"):

5'GCAATAGATCTTCCACC**ATG**GAGAGCCCCAAGGC3'. Afegeix una seqüència Kozak (cursiva), una diana BglII per al clonatge (subratllada) i un codó d'inici (negreta) per a permetre l'expressió dels constructes iniciats en aquest punt. Alhora es va dissenyar un oligonuclèotid antisentit per a amplificar mSnail en sentit 5' des del final del domini ric en Serines (aminoàcid 120), que afegia una diana *PstI* (subratllada) a l'extrem 3': 5'CGTCTGCAGCTCCAGGGAGGAGGCCG3'.

Fragment 82-151: Obtingut a partir del fragment 82-264 amplificat amb PCR d'alta fidelitat i després, digestió amb *BglII* per a descartar la cua C-terminal (152-264) amb els dits de Zenc.

mSnail Δ90-120 (deleció del domini ric en Serines): Es va fer mitjançant la lligació de les meitats N (1-90) i C terminals (121-264) fora d'aquesta regió, afegint una diana *SacI* al final de l'extrem N i a l'inici de l'extrem C. Oligonucleòtid 5' del fragment C terminal, 5'CCGTTAGAGCTCCGCCGAGGCCTTCATC3'.

Oligonuclèotid 3' del fragment N terminal, 5'CAATGAGCTCAGCTCTACGGCCTTGGGGCTCTCCCGCAG3'. Les dianes *SacI* són subratllades. La fusió d'ambdues dianes SacI afegeix dues Serines a la molècula, que es varen considerar poc significatives, donada la deleció. Per tant, la nova seqüència aminoacídica en aquesta regió fou 5'KAVEL**SS**AEAFI3', quan l'esperada delecionant selectivament el domini sense afegitó de dianes seria 5'KAVEL**TLE**AEAFI3'. Les serines afegides o aminoàcids substituïts són en negreta.

Fragment 1-90: Obtingut per PCR amb oligonucleòtids específics ja citats per a ambdós extrems.

Snail 1-236 (sense l'últim dit de Zenc). Amplificat per PCR d'alta fidelitat i oligonucleòtids específics. L'oligonucleòtid antisentit 3' anella a la seqüència d'mSnail evitant l'últim dit de zenc (237-264). A l'extrem 3' s'hi va afegir una diana *EcoRV* per a poder posar l'etiqueta HA en pauta. Seqüència: 5'CCGGATATCCGTATCTCTTCACATC3' (la diana *EcoRV* és subratllada).

El fragment C-terminal sense l'últim dit de zenc (*151-236*) es va obtenir a partir d'aquest mitjançant digestió amb *BglII* i descartat de la porció N-terminal.

La deleció *138-151* de la meitat N terminal es va fer utilitzant una diana BstXI present en aquesta zona.

El *mutant 1-151 (Δ90-120)* fou obtingut a partir del mutant sencer amb similar deleció, descartant la meitat C-terminal mitjançant la diana *BglII* que separa ambdues meitats d'*mSnail*.

La deleció dels *5 últims aminoàcids* es va realitzar utilitzant una diana *BspEI* present en aquesta localització, digerint el constructe *peGFP-mSnail (1-264).* El fragment alliberat inclou tot el cDNA d'Snail i una petita porció de segment de multiclonatge 5' a l'inici d'Snail. Posteriorment el fragment es va subclonar de nou a *peGFP-C1*.

Com ha estat mencionat en part, aquests fragments varen ésser clonats en vectors amb *eGFP*, *GST* o bé en el vector *pcDNA3*. Aquest últim vector tenia prèviament incorporada una etiqueta HA, clonada *EcoRV-NotI*, provinent d'un altre vector, i que es va "arrossegar" a la resta de subclonatges.

Construcció nativa, o eGFP-mSnail sota el control del promotor humà d'Snail -888/+42

Per avaluar la distribució d'*eGFP-mSnail* sota nivells d'expressió més semblants als normals, i poder fer-ne un seguiment dinàmic en resposta a les condicions de cultiu, confluència, moviment cel·lular, vàrem dissenyar un constructe que posava la fusió *eGFP-mSnail* sota el control del fragment de promotor humà que teníem clonat (*-888/+42*). Per a tal fi, vàrem utilitzar el constructe reporter del promotor clonat a *pGL3basic*, i vàrem substituir la regió codificant per *Luciferasa* (delecionant-la amb les dianes úniques *NcoI/XbaI*) per *eGFP-mSnail*, extret amb les mateixes dianes del vector *peGFP-C1*. *NcoI* acostuma a ser una diana conservada en molts ADNc perquè inclou el codó d'inici ATG, i en aquest cas, els nucleòtids flanquejants en la seqüència d'Snail completaven la diana. Tanmateix, conservàvem l'inici de traducció a una distància equivalent de l'inici de transcripció que en el constructe reporter original, fet que ens assegurava una correcta expressió i comportament del constructe.

Per tant, el constructe era ara testable per visualització directa de les cèl·lules, i seguint la distribució de la proteïna sencera.

mSlug fou clonat per RT-PCR (quit One-Step RT-PCR System, Invitrogen, amb *Platinum* Taq polimerasa) a partir de 1 μg d'ARN total de cèl·lules NIH-3T3 mitjançant oligonucleòtids específics per a les zones 5' i

3' a partir de la seqüència exposada al *GenBank (gi:6755586),* conservant l'*ATG* d'inici i eliminant el codó d'Stop, per tal de mantenir la fusió amb l'etiqueta *HA*. Les dianes *BglII* i *EcoRV* foren afegides als extrems 5 i 3', respectivament, de manera similar al què fou fet amb mSnail.

SC35, U2AF65

Els factors de processament (splicing) d'ARNm *SC35* i *U2AF65* de ratolí foren clonats per RT-PCR a partir d'1 mg d'ARN total de NIH-3T3, mitjançant oligonuclèotids específics per als extrems 5' i 3' de la seqüència exposada a la base de dades del GenBank (num accés NM011358 [gi:6755477] per a *SC35*; NM133671 [gi:19526823] per a *U2AF65*). Els oligonucleòtids afegien una diana *SalI* en situació 5' per al clonatge en pauta dins el vector *pDsRed1* (Clontech), quedant així fusionats a l'extrem 3' de la proteïna vermella fluorescent (*RFP*). Tanmateix es va afegir una seqüència *Kozak* i un codó d'inici *ATG* per a disposar de la possibilitat de clonar-los en plàsmids d'expressió amb etiquetes a l'extrem 3'.

El producte d'RT-PCR era selectivament purificat amb el quit GFX d'Amersham previ al procés de clonatge.

VP16-Snail, Rel-VP16

El constructe *VP16-Snail* utilitzat és el referenciat a *Batlle E i cols, Nat Cell Biol 2000*; sense modificacions. Per a generar la fusió *Rel-VP16*, el cDNA codificant per *VP16* obtingut del constructe anterior, fou fusionat en pauta amb el domini d'homologia *Rel* del factor de transcripció *NFκB*, subunitat *p65*, que es trobava subclonat en *pcDNA3 (*vegeu *Assaigs Reporter* en aquest mateix capítol). El domini *Rel* fou aïllat mitjançant els enzims *BamHI* i *BglII*, que digereixen en l'extrem 5' del clonatge i just després del domini *Rel,* respectivament. Aquesta fusió fou subclonada de nou al vector *pcDNA3* (Invitrogen).

Mutagènesi dirigida

Regió Promotora. Mutagènesi de la caixa DL3 de resposta a factors Rel/NFκB

La mutació puntual de la caixa putativa de resposta a factors de la família Rel/NFκB en posició (-43/-34) es va realitzar seguint el protocol detallat en l'apartat següent, basat en el sistema Quick-Change per mutagènesi dirigida (Stratagene). Sobre la seqüència original, 5'GGGAGTTGGC3', es varen substituir els nucleòtids subratllats per Adenines (A), d'acord amb el què havia estat descrit per altres autors com a eficient. Els oligonucleòtids per a realitzar la mutagènesi abastaven des de la posició –57 a la –19 de la seqüència original del promotor humà, ambdues incloses, amb el canvi d'aquestes bases. La mutagènesi es va realitzar únicament sobre el constructe reporter que conté la Regió Promotora Mínima (-97/+42), car en aquest fragment únicament es prediu la caixa DL3 com a probable element de resposta a NFκB. Les colònies obtingudes en la mutagènesi foren verificades per seqüenciació directa dels inserts.

mSnail.

Mutant *Snail Leu(139/142)Ala* (mutació al senyal d'export). Sobre *pcDNA3-mmSnail-HA*, amplificació per PCR d'alta fidelitat mitjançant dos oligonucleòtids complementaris en seqüència: (sentit: 5'GGCCAACTTCCCAAGCAG**GC**GGCCAGG**GC**CTCGGTG GCCAAGGACCCCCAG3';antisentit:5'CTGGGGGTCCTTG GCCACCGAG**GC**CCTGGCC**GC**CTGCTTGGGAAGTTGGC C3'), que abasten una seqüència de 20 i 20 pb flaquejants als llocs de mutació puntual. La mutació consisteix en el canvi dels codons codificants dels 2 aminoàcids 139 i 142 (5'CTG3' i 5'CTC3', respectivament), de Leucina a Alanina, marcats en negreta els nucleòtids mutats i subratllats els codons. La mutació puntual dirigida es va realitzar seguint el protocol del quit Quick-Change (Stratagene), si bé la polimerasa utilitzada fou *Pfx* (Invitrogen) i es van afegir petites modificacions. El producte de PCR fou purificat en columnetes de fibra de vidre (GFX Purification Kit, Amersham), i el producte purificat fou digerit amb l'enzim DpnI, per tal de fragmentar el ADN motlle. Post-transformació, es varen seleccionar els constructes mutants aprofitant l'eliminació d'una diana *PvuII* en mutar el primer codó. Posteriorment foren verificats per seqüenciació. Aquest mutant fou subclonat a *pcDNA3* i *peGFP*, i a *pGEX* (en curs).

Mutants *Serines-a-Alanines*, *Serines-a-Aspartats*: Per tal de mutar la totalitat de Serines (però no la Tre 119) presents en el domini ric en Serines, es va fer la síntesi dirigida de dos nous dominis (Sigma-Genosys). Els oligonuclèotids, complementaris, engloben els

nucleòtids 268 a 350 de la seqüència d'Snail a ratolí. Per a mantenir la pauta de lectura en els nous constructes, es varen afegir nucleòtids addicionals a la seqüència sintètica (5'C, i 3'CT). Els codons codificants per serines havien estat canviats per codons modificats que codifiquessin per Alanines o Aspartats, selectivament, mantenint la resta de la seqüència original i només en un cas modificant un dels codons per un homòleg per a evitar la creació d'un codó d'stop inesperat.

Les serines mutades són subratllades: SLSDEDSGK**S**SQPPSPPSPAPSSFSSTSASS. La Serina en negreta no és conservada en tots els homòlegs en mamífers. Les mutacions en el constructe Ser/Ala afegeixen una nova diana NotI que fou utilitzada per a localitzar constructes mutats. Tanmateix, tots els mutants seleccionats foren seqüenciats per a verificar la incorporació de les mutacions.

Les dues cadenes complementàries sintetitzades per a cada mutant es varen anellar mitjançant desnaturalització a 94º per 5' i renaturalització progressiva a temperatura ambient en un tampó amb Tris 10mM, pH 7.4, i EDTA 1mM. Els extrems 5' dels oligonucleòtids estaven fosforilats. Els dominis sintètics obtinguts eren de marges roms. Es varen inserir en el constructe Δ90-120, després d'obrir la diana *SacI* central a la deleció amb l'enzim *EcoICRI*, isosquizòmer que talla pel mateix punt però deixa extrems roms. Això permetia afegir un nou domini ric en serines, ara mutat, sense alterar sobremanera la proteïna, afegint únicament una nova Leucina (en negreta): 5'VELS-nou domini sintètic-**L**SAEA3'.

El mutant Serines/Alanines és relativament inestable, possiblement per la seqüència del domini sintètic, altament rica en GC, de forma que ocasionalment algunes colònies presenten inserts anòmals amb guanys o pèrdues de seqüència. Per tal raó, les *minipreps* que es fan per a la seva obtenció són després seqüenciades.

PCR i RT-PCR

Les amplificacions per PCR dels fragments d'Snail es varen fer utilitzant la *Pfx*^{R} *Platinum* polimerasa d'Invitrogen, que mostra una elevada fidelitat i tanmateix va associada al sistema *Platinum*, que permet muntar les reaccions a temperatura ambient car la polimerasa no s'activa fins arribar als 94ºC de la primera desnaturalització.

Depenent del fragment amplificat, els cicles foren variables, però en general es realitzaven programes d'aquest tipus: 94ºC 3' (desnaturalització inicial), 30-40 cicles de 96º/10", 57-60º/20", 68º/35-45", i un període final d'extensió de 2', 68ºC, i 4ºC finals, i les reaccions foren muntades d'acord amb les instruccions del fabricant.

La *pfx* treballa òptimament a 68º. Les reaccions es feien en presència de $MgCl_2$ 1'5mM, 0'4 μM de cada oligonucleòtid i 0'3 mM de nucleòtids trifosfat, i 1-2 unitats de polimerasa, en 50 μl finals.

Les RT-PCR es varen realitzar utilitzant el kit *One-Step RT-PCR System* d'Invitrogen, que permet fer la retro-transcripció i l'amplificació per PCR de l'ADNc generat en el primer pas en un sol tub. En la reacció es posen ambdós oligonucleòtids.

L'ARNm utilitzat en aquests assaigs era prèviament tractat (5μg) amb RQ DNAsa durant 1H a 37°C, i la reacció finalitzada amb la solució d'Stop del mateix quit (Promega). El producte era diluit fins a 10 cops fins una concentració final de 50 ng/μl, per tal de també diluir el $MgCl_2$ inclòs en el tampó de la reacció per tal de no interferir en la reacció d'amplificació.

En les nostres reaccions hi havia 500ng d'RNA total motllo, $MgCl_2$ 1'2mM, dinucleòtids trifosfat 0'4mM, 0'4 μM de cada oligonucleòtid i 1 μl del mix Retrotranscriptasa (SuperScriptII)- ADN Polimerasa del kit, en 50μl finals.

Les reaccions es varen fer en un termociclador 2400 Perkin-Elmer.

Els productes de PCR i/o RT-PCR foren resolts en gels d'agarosa a l'1% amb bromur d'etidi.

Els oligonucleòtids utilitzats per a l'amplificació d'E-cadherina, Snail i Ciclofilina per a l'avaluació dels nivells d'expressió tenien les següents seqüències: *E-cadherina humana* 5'-TTCCTCCCAATACATCTCCCTTCACAGCAG (nucleòtids 1977–2006) i 5'-CGAAGAAACAGCAAGAGCAGCAGAATCAGA (nucleòtids 2287–2316). *Ciclofilina A* per a normalitzar, 5'-ATGGTCAACCCCACCGTG (posicions 45–62) i 5'-TGCAATCCAGCTAGGCATG (690–708). *Snail humà*, 5'-TTCCAGCAGCCCTACGACCAG-3' (104-125)/5'-GCCTTTCCCACTGTCCTCATC-3' (290-310).

Per amplificar l'Snail de ratolí es varen utilitzar els mateixos oligonuclèotids que per als clonatges. Els oligonucleòtids per ciclofilina funcionen en humans i ratolí.

Seqüenciació, alineaments i prediccions de seqüència

La seqüenciació dels diferents constructes per a la seva comprovació fou feta mitjançant PCR i el kit *BigDye v2.0* i *v3.0* d'Applied Biosystems, d'acord amb les instruccions del fabricant. Les reaccions de PCR es varen encebar amb oligonucleòtids que anellaven en el vector o insert a més de 50 nucleòtids del punt a

seqüenciar en inici. Els productes de la reacció, de fins a 700 pb, foren analitzats en seqüenciadors de múltiples canals i resolució en gel i capil·lar d'Applied Biosystems, i l'electroferograma obtingut fou comprovat.

Per a alinear les diverses seqüències d'ADN o proteïna mostrades en el treball, es varen utilitzar els programes *ClustalW* (EMBL, Higgins et al. 1994) i *Dialign2* (Genomatix Software, Morgenstern et al., 1998), disponibles lliurement a la xarxa. El primer fa alineaments directes caràcter per caràcter. El segon fa alineament de similitud per les característiques de l'entorn de cada punt de la seqüència (alineament "diagonal"). Les prediccions de llocs de fosforilació foren fetes amb el recurs *NetPhos* (de l'EMBL). La predicció de senyals de localització es va fer gràcies a una utilitat gratuïta del mateix EMBL. La predicció de dominis proteics es va fer amb les utilitats *ScanProSite i MotifScan*, amb un grau d'astringència mig, també presents a l'EMBL i al servidor *ExPasy*.

Transfeccions transitòries

Els ADNc codificants per *Snail* subclonats en els diferents vectors d'expressió en eucariotes (proteïnes fluorescents o pcDNA3), foren transfectats en les diverses línies cel·lulars citades utilitzant el kit *Lipofectamine-Plus Reagent* d'Invitrogen en medi OptiMEM (Invitrogen), que és lliure de sèrum i antibiòtics. La mescla de transfecció es deixava sobre les cèl·lules de 4 a 6H (segons fossin RWP1, NIH-3T3 en el primer cas, o la resta de línies en el segon), per després rentar-les i afegir medi *DMEM* (medi essencial modificat de Dulbecco) amb 10% de sèrum fetal boví, o simplement afegir el medi fins aconseguir una concentració de 7.5% de sèrum en els pous en el cas de les HT29-M6, HCT116 i MDCK. En el cas dels assaigs amb *eGFP*, es deixava les cèl·lules expressar durant 16-18H. En els experiments reporters, entre 24 i 48H. Pels assaigs precedents a lisi i immunoprecipitació o pulldown, 36-48H.

La quantitat d'*ADN, Plus* i *Lipofectamina* utilitzats per a cada transfecció era variable depenent de la superfície del pou a transfectar i el tipus cel·lular, i d'acord amb les instruccions del fabricant i protocols establerts al nostre grup. El nombre de cèl·lules sembrades depenia de la línia cel·lular i la superfície del pou, per tal que la confluència final s'apropés al 50-70% de la superfície total.

Per als assaigs de marcatge amb fòsfor i immunoprecipitació, $1.5x10^6$ cèl·lules eren sembrades en pous de 60 mm (Nunclon), i es transfectaven entre 1.5 i 2 μg de constructe. D'altra manera, les quantitats transfectades són reflexades als peus de figura.

Per a l'obtenció de proteïna en lisats per a pull-down o immunoprecipitació en altres protocols, se sembraven $4\text{-}5x10^6$ cèl·lules en plaques de 10 cm (Nunclon), i es transfectaven entre 4 i 5 μg de constructe. Per a aquests últims assaigs s'utilitzaven cèl·lules RWP1 i NIH-3T3.

En el cas dels estudis amb GFP, les cèl·lules havien estat sembrades sobre cobreobjectes de vidre de 20x20mm que havien estat prèviament esterilitzats amb etanol absolut, 24H abans de la transfecció. Les quantitats de plàsmid transfectades eren variables depenent de la línia (750 ng per a RWP1, NIH-3T3, MIAPaCa i SW480; 1μg per a MCF7, MDCK; i 1.5 μg per a HT29-M6, CaCo2). Aquests cobreobjectes eren després fixats en paraformaldèhid al 4% a temperatura ambient, durant 12 minuts abans del muntatge en Mowiol-DABCO sobre portaobjectes i la visualització al microscopi.

Time-lapse

Per a la visualització in vivo de la distribució fluctuant de les proteïnes de fusió amb eGFP en microscòpia confocal en temps real, les cèl·lules foren sembrades en plaques preparades ad-hoc. En el fons de la placa de cultiu usual de 60mm (Nunclon) es va realitzar un orifici de 15x15mm, que fou cobert amb un cobreobjectes de 20x20mm, adherit mitjançant la fusió del plàstic amb cloroform. Les cèl·lules foren cultivades en medi DMEM+sèrum fetal al 10% de forma usual, fins al moment de l'experiment en què aquest medi fou substituït per un de similar però sense colorant roig fenol, per tal d'evitar fenòmens de "quenching" o reflexió de la fluorescència. Una sola secció en el pla central de les cèl·lules fou presa cada 1 minut. Durant el seguiment en temps real es va afegir cicloheximida al medi, a una concentració final de 20 μg/ml.

Assaigs Reporter d'activitat transcripcional

Alguns dels constructes utilitzats en aquests assaigs provenen d'altres laboratoris.

El constructe *pcDNA3-p65*, que inclou l'ADNc codificant per la subunitat *p65* del factor de transcripció *NFκB* fou cedit per Manuel Fresno [Centro de Biologia Molecular (CSIC-UAM)]. *p65* és clonada *BamHI-EcoRI*.

El constructe reporter *NF3CONA* fou cedit pel mateix laboratori. Incorpora al vector *pGL3basic* un multímer de 3 caixes consens de resposta a factors de la família NFkB sintètic. Permet avaluar l'activitat *NFκB* en assaigs reporter.

Els constructes defectius o constitutivament actius de la quinasa *ILK* (*Integrin Linked Kinase*) són cedits pel laboratori de Soukhat Dedhar, a Canadà (*Tan C et al, Oncogene 2001*). L'ADNc sencer de *ILK* o modificat és clonat en el vector *pcDNA3-HisC*, que incorpora una cua de polihistidines al principi de la proteïna, fet que en permet l'eventual purificació i immunodetecció.

El constructe reporter amb el fragment *–178/+92* del promotor del gen homòleg humà d'*E-cadherina* és el descrit per *Batlle E i cols, Nat Cell Biol 2000*, i prové del nostre laboratori. Aquest segment del promotor d'*E-cadherina* inclou les 3 *Ebox* de resposta a *Snail* descrites prèviament en el mateix treball, i respon en forma dosi depenent a la repressió per aquest factor de transcripció.

Els assaigs reporter es realitzaren sobre cèl·lules RWP1 sembrades en plaques de 24 pous, en nombre equivalent per pou. Les transfeccions transitòries es varen realitzar amb el sistema de liposomes de *Lipofectamina-Plus* (Invitrogen), com es descriu en un apartat anterior. Després de 48H d'expressió, els pous eren rentats 3 cops amb PBS i les cèl·lules lisades d'acord amb les instruccions del fabricant en 200 μl de tampó de lisi passiva, per després mesurar-ne l'activitat en un luminòmetre amb el quit *Dual-Luciferase Reporter Assay* d'Invitrogen, d'acord també amb les especificacions pertinents. Les mesures de l'activitat de *Luciferasa* de cuca de llum (*Firefly*) corresponent als reporters eren normalitzades amb les mesures de l'activitat d'un reporter control amb la luciferasa de *Renilla reniformis*, transfectat a quantitat equivalent en tots els pous. Això ens permetia relativitzar les dades depenent de l'eficiència de transfecció en cada pou, i per tant comparar alhora entre diversos experiments.

En tots els assaigs reporter les quantitats d'ADN transfectat foren enrasades amb vector buit en el cas de treballar amb quantitats d'efector variables.

Per als assaigs sobre l'activitat del promotor d'Snail, de 250 a 500 ng de constructe reporter amb el promotor (depenent de la línia cel·lular utilitzada) eren co-transfectats amb 10 a 20 ng de pRL-TK (Renilla sota el control del promotor feble de la Timidina-quinasa d'herpes virus), o 2 ng de pRL-SV40 (sota el control del promotor SV40) com a control de transfecció. Les quantitats d'efector eren variables.

Per als assaigs sobre el promotor d'E-cadherina per avaluar l'activitat transcripcional dels mutants d'Snail, 25 ng del constructe reporter amb l'esmentat promotor eren co-transfectats amb 0.5 ng de pRL-SV40.

En l'estudi de l'efecte inductor del *TPA* (èster de forbol, miristat-acetat de 12-O-tetradecanoyl-forbol) sobre el promotor d'Snail, el TPA era diluit en DMSO, utilitzat com a vehicle, a una concentració final de 100nM en el pou de transfecció.

Proteïnes de Fusió

Fusions a GST: Diversos constructes truncats o mutants d'mSnail (citats a l'apartat de *Resultats*) foren clonats al vector pGEX-6P1,2 (Promega). Aquest constructe fusiona el cDNA subclonat al cDNA codificant de *GST* (Glutatió S-transferasa), i és especialment preparat per a l'expressió de la proteïna fusionada en procariotes. GST és una proteïna de 27KDa procedent de bacteris que té extremada avidesa pel glutatió.

En cultius a mitjana escala, un subcultiu en 20ml de medi *LB* (Luria-Bertani) crescut durant la nit a 37°C, és afegit a un cultiu major de 180ml, que és crescut durant 2H, afegint *IPTG (isopropil-1-tio-βD-galactopiranòsid)* a una concentració final de 0.1M per a induir l'expressió de la proteïna. El cultiu es va mantenir en fase d'inducció per 3 hores. Es varen prendre mostres de la mostra prèvia a la inducció i després d'aquesta. El cultiu és centrifugat per 10 min a 4000xg a 4°C. El pellet és resuspés en PBS fred (*). Després de la lisi dels bacteris per sonicació en gel, en 5 polsos de 10" a mitja potència (35%), s'afegeix Tritó X100 a una concentració final de l'1%. Deixem el lisat durant 30' a 4°C en rotació constant, per tal de solubilitzar la proteïna.

(*) En l'obtenció de la proteïna de fusió GST-mSnail(1-264), al PBS se li afegeix 0.1mg/ml de lisozima i 1.5% de sarkosyl per tal de solubilitzar la proteïna, amb tendència a quedar en la fracció insoluble durant la sonicació).

Després de centrifugar l'extracte durant 5' a 20000xg i temperatura ambient o bé 20' a 4°C i 10000xg, recuperem el sobrenedant, que és purificat (en cultius a gran escala) per cromatografia d'afinitat a través d'una columna amb resina amb Glutatió conjugat (GS4B, Amersham); o bé en "batch" (incubació a petita escala amb 300μl efectius de resina en eppendorfs, durant 30' a temperatura ambient en rotació, o bé durant 16H a 4°C).

Després de tres rentats amb PBS fred (1ml per rentat en els "batch", o 10 cops el volum de la columna en el

cas dels cultius a gran escala), la proteïna és alliberada de la columna amb 1 ml d'un tampó a pH 8.0 en presència de Glutatió.

(50mM Tris-Cl, pH 8.0, +10mM Glutatió per a la majoria de proteïnes de fusió: mutants S/A, S/D, fragment 1-90 d'mSnail, GST-RBD, quinases MEKK/ERK1); o bé un tampó amb 100mM Glutatió per a eluir la fusió *GST-mSnail* (1-264), que inclou 25mM Tris-Cl pH 8.0, 200 mM NaCl, 250 mM EDTA, i 0.02% Tween 20, donada la baixa eficiència d'elució d'aquesta fusió); o finalment amb 6M urea per a eluir la fusió *GST-mSnail(1-151),* especialment difícil d'obtenir).

En el cas de les purificacions a petita escala, la proteïna és el·luïda amb 35 μl de tampó d'elució durant 10 minuts, en recuperar el sobrenedant després d'una breu centrifugació de 2 minuts a temperatura ambient i 14000 rpm.

En el cas de la proteïna sencera i la proteïna N-terminal, donada l'elevada concentració de solvents que hem pogut comprovar inhibia parcialment algunes reaccions enzimàtiques com assaigs quinasa amb *GSK3* o assaigs de pull-down, l'el·luït es dialitzava durant tota la nit a 4ºC en TBS (2L), en una membrana de diàlisi de porus petit, per després concentrar-la mitjançant la deshidratació amb polietilenglicol 4000 en polímer durant uns minuts.

La concentració de proteïna de fusió als el·luïts és quantificada visualment per comparació amb una corba de concentracions de BSA, en un gel de poliacrilamida, després de tenyir les proteïnes del gel amb blau de Coomassie, i re-verificada amb la determinació de concentracions pel mètode de Lowry.

La producció de la proteïna de fusió *GST-RBD* per a l'assaig d'activitat de *RhoA* es va realitzar amb un protocol similar, on únicament val a destacar que els cultius bacterians foren crescuts a temperatura ambient, d'acord amb les recomanacions de S.Gutkind, qui ens va fer arribar el constructe.

Electroforesi de proteïnes i Western Blot

L'electroforesi de proteïnes es va realitzar en minigels de poliacrilamida al 10-12%, en condicions desnaturalitzants. Les mostres proteiques havien estat bullides prèviament en *tampó de càrrega*, o de *Laemmli* (Tris 10 mM, SDS (1%) i en condicions reductores (presència de beta-mercaptoetanol) i blau de bromofenol (colorant) i glicerol (10%)). El 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 0,2% (TBS-t), llet en pols desnatada al 5%). En aquesta mateixa solució de bloqueig (immunodetecció de proteïnes amb l'etiqueta *HA i GST*) o en una similar on s'havia substituït la llet per Albúmina Sèrica Bovina (BSA) al 2% (*Snail, α-Tubulina, Glu-Tubulina, RhoA*), es diluïa l'anticós primari específic. L'anticós secundari fou sempre diluit en tampó de bloqueig amb llet al 5%. L'anticós primari era incubat amb la membrana durant 2 hores a temperatura ambient en lleu agitació, excepte per al cas de l'anticós anti-*Snail* (*7G1S*), per al qual la incubació va ser feta durant tota la nit a 4ºC amb lleu agitació. Després de fer 5 rentats de 5 minuts a temperatura ambient i abundant solució de bloqueig, es procedia a realitzar la incubació amb l'anticós secundari conjugat a peroxidasa de rave (HRP), específic contra l'espècie originària del primari, durant 45-60' i a temperatura ambient, a una dilució d'1:2000 (anti-conill per a *Snail*, *Glu-Tubulina*; anti-cabra per a *GST*), 1:3000 (anti-ratolí per a *α-Tubulina, RhoA*), o 1:1500 (anti-rata per a *HA*) . Després de nous rentats amb solució Tris-Salí+Tween (TBS-t), es revelava la reacció amb un substrat específic per a l'HRP, quimioluminiscent (*Enhanced ChemiLuminiscence*, *ECL*, Amersham-Pharmacia) durant 1 minut, per després exposar diferents temps la membrana a pel·lícules autoradiogràfiques Agfa-Curix.

Immunoprecipitacions

Les cèl·lules en cultiu, que en el cas de l'expressió de constructes exògens amb *Snail* havien estat transfectades 36H abans, eren rentades 3 cops en PBS (tampó salí-fosfat) fred després de descartar el medi de cultiu original, i es rascaven per desprendre-les de la placa, sobre gel. El sediment de cèl·lules obtingut després d'una breu centrifugació de 5' a 4ºC i 1000 rpm, era resuspés en 2'5 volums de tampó de lisi no desnaturalitzant per a immunoprecipitació (50mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Tritó X-100, 0'5% NP-40/Nonidet, 1mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 1mM EGTA, ditiotreitol 1mM com agent reductor, inhibidors de proteases -leupeptina 1μg/ml, pepstatina 1 μg/ml, pefabloc 50mM i aprotinina 10μg/ml). En el cas de les immunoprecipitacions en els assaigs per avaluar la fosforilació d'Snail (vegeu més endavant), s'hi afegien

inhibidors de fosfatases: NaF 5mM, ortovanadat sòdic 1mM, beta-glicerofosfat 2mM. Aquest mateix tampó s'utilitzava durant la immunoprecipitació i els rentats. Les cèl·lules resuspeses en aquest tampó eren incubades durant 30' a 4ºC en agitació, després el lisat era passat per una xeringa de 20 gauge per 10 cops, i la solució resultant centrifugada a 15000 rpm, durant 15' a 4ºC. El sobrenedant obtingut era considerat "lisat total en condicions natives".

Prèvia obtenció d'una petita alíquota de 50 μl (sobre 1 ml de lisat), els lisats eren pre-absorbits durant 4H a 4ºC i en agitació constant amb 30 μl efectius de resina proteïna-G-agarosa, prèviament equilibrada en tampó de lisi-immunoprecipitació. Després de centrifugar a 14000 rpm, durant 2' a 4ºC, el sobrenedant ja pre-absorbit era incubat amb 1 μg d'anticós primari específic contra la proteïna a immunoprecipitar (essencialment, *HA* (1μg), o *α-tubulina* (2μg)). La incubació amb l'anticós es feia durant tota una nit a 4ºC i en agitació constant. L'endemà s'afegien 30 μl efectius de proteïna-G-agarosa neta, i es deixava incubant la reacció en les mateixes condicions durant 3H. El sediment de resina procedent d'aquesta incubació conté l'immunoprecipitat. Després de descartar el sobrenedant (lisat post-immunoprecipitació), la resina era rentada 4 cops (10' incubació a 4ºC en agitació i centrifugació posterior de 1 minut) en 500ml de tampó d'immunoprecipitació. Finalment era resuspesa en tampó de càrrega i després de bullida la mostra, se'n feia l'electroforesi i immunodetecció per Western Blot.

Immunofluorescència

Els estudis per immunofluorescència es varen realitzar sobre cèl·lules prèviament fixades amb paraformaldèhid (PFA) al 4% durant 12' a temperatura ambient i rentades en PBS per 3 cops.

Després de la fixació les cèl·lules varen ser permeabilitzades en Tritó X-100 al 0'2% durant 5', i rentades de nou amb PBS. A continuació es feu un bloqueig curt de 20' amb Clorur d'Amoni 50mM per a eliminar la fluorescència inespecífica i els radicals generats pel PFA, per posteriorment fer-se un bloqueig amb BSA dissolta al 3% en PBS, durant 1H. A continuació els cobreobjectes es varen incubar sobre una gota de la dilució pertinent de l'anticós primari, en cambra humida i fosca durant 1H30' a temperatura ambient (la majoria) o tota la nit a 4ºC (Snail), depenent de les necessitats de cada antigen. Després de rentar de nou els cobreobjectes en PBS, es van incubar amb la dilució de l'anticós secundari conjugat a fluoresceïna (isotiocianat de fluoresceïna, FITC, 1:20, Dako) o Alexa 594 (espectre similar a la Rhodamina, 1:50, Alexa) segons fos necessari, específic per cada primari, i durant 45'-1H en la mateixa cambra.

Un cop rentats els cobreobjectes de nou en PBS, foren muntats en Mowiol-DABCO i visualitzats al microscopi. Per a la contratinció de nuclis, foren emprats el Hoescht 33258 (incubació a 1:1000 de l'estoc, en PBS, durant 1 minut), o bé iodur de propidi (durant 30', dissolt en PBS a 5μg/ml i amb presència d'RNAsa A 100 U/ml), o finalment el compost TOP-Ro, a una dilució 1:1000 de l'estoc, durant 5 minuts. Tots 3 en aquestes condicions tenen afinitat per l'ADN. TOP-Ro emet en el vermell llunyà.

Microscòpia confocal i co-localització

Les imatges de microscòpia confocal foren captades 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, i en les co-localitzacions les emissions en cada canal foren captades de forma seqüencial per assegurar-se que no hi havia pas d'un senyal al canal contrari. En cada imatge es varen realitzar d'entre 4 i 8 talls per a generar després una projecció. Les co-localitzacions es varen comprovar tall per tall. El contrast i la intensitat del senyal foren retocats ocasionalment mitjançant programes de processament d'imatge (Adobe Photoshop 6.0).

Anticossos

Per a detectar:

Hemmaglutinina: *Anti-HA*, alta afinitat. De rata, policlonal. Roche Pharmaceuticals. Dilució 1:1000 en Western Blot. Immunoprecipitació, 1μg per 1ml d' immunoprecipitat.

GST (glutatió-S-transferasa): *Anti-GST*. De cabra, policlonal. BD Biosciences/Transduction Laboratories. Dilució 1:2000 en Western Blot.

Snail: 7G1S. Sèrum policlonal de conill. Reacciona, pel què sabem, amb l'Snail de ratolí i l'humà. Fet al nostre grup per na Clara Francí, Judit Grueso, Mercè Monfar, Marta Garrido i Carme Torns. Funciona en Western Blot (dil. 1:500) i Immunohistoquímica i Immunofluorescència (1:10) per a detectar la proteïna exògena sobreexpressada. La utilitat per a immunoprecipitació és encara en avaluació experimental. 7G1S és un sèrum purificat per cromatografia d'afinitat amb GST-mSnail fixat a la columna, i re-purificat amb una columna amb únicament GST per a eliminar els anticossos dirigits contra aquesta part de la fusió. 7G1S prové del 7 cicle de purificació a partir del sèrum original, i testat per ELISA per avaluar-ne el títol.

L'anticós s'ha generat per injeccions successives de 1-2 mg de proteïna de fusió GST-mmSnail en un conill i purificació a partir del sèrum de l'animal amb columnes d'afinitat per a descartar les molècules que reaccionen contra GST.

Alfa-Tubulina: *Anti-α-tubulina*. D'ascites de ratolí, monoclonal. Sigma. Reacciona contra l'α-tubulina de ratolí, rata, humà i gos. Immunofluorescència, 1:500. Western Blot, 1:2000. Immunoprecipitació, 2μg/ml.

Alfa-Tubulina Detirosinada (Glu-αTub): Sèrum policlonal de conill (sèrum SG). Amablement proporcionat per en Greg G Gundersen, de la Universitat de Columbia, New York, NY (*Gurland G i Gundersen GG, J Cell Biol 1995*). Detecta la forma detirosinada de l'α-tubulina específicament, que es troba només en microtúbuls estabilitzats i polimeritzats. En humà i ratolí. Western Blot, 1:2000. Immunofluorescència, 1:500.

Gamma-Tubulina: Anticós monoclonal (Sigma). Per a immunofluorescència, 1:500.

Vimentina: Anticós monoclonal (Dako). Utilitzat per a immunofluorescència, 1:50. Funciona també per a immunoprecipitació (2μg/ml). Funciona en humà, ratolí, rata i gos.

RhoA: Anticós monoclonal comercial (Santa Cruz Biotechnology). Detecta específicament la isoforma *A* de la *Rho GTPasa* en humà, rata i ratolí. Western Blot, 1:2000.

Assaig de fusió d'Heterocarions

Els *heterocarions* són cèl·lules generades per la fusió dels citoplasmes de dues cèl·lules provinents d'espècies diferents, de forma que s'obté una nova cèl·lula multinucleada en la qual hi ha nuclis provinents de dues espècies. Aquests nuclis es poden diferenciar al microscopi.

El protocol fou lleugerament modificat a partir de diverses referències (*Bail L i Merchant JL, Mol Cell Biol 2001; 21(14): 4670-83; Cowper AE, Cáceres JF, Mayeda A i Screaton GR, J Biol Chem 2001; 276(52): 48908-14*).

180.000 cèl·lules humanes epitelials *HeLa* es varen sembrar en cobreobjectes estèrils de 20x20mm. Es varen deixar créixer durant 24 H, en DMEM+10% de sèrum, abans de transfectar-les transitòriament amb el constructe mmSnail-GFP.

Després de 16H d'expressió, s'hi van afegir 750.000 fibroblasts de ratolí *NIH-3T3*, sense transfectar, de manera que hi havia ben bé 4-5 cops més cèl·lules d'aquest tipus. Es van deixar 6H per aconseguir que s'adherissin al cobreobjectes, al voltant de les *HeLa*. Es va afegir aleshores *cicloheximida* al medi, en una concentració final de 100 μg/ml, durant 45 minuts, per a inhibir la síntesi protèïca.

Després d'aquesta incubació, es va retirar el medi dels pous i es varen rentar les cèl·lules amb PBS, a 37ºC i estèril, 2 cops, per a eliminar tots els possibles restes. El medi fou aleshores substituït per Polietilenglicol 8000 (PEG pes molecular 8000), al 50% en PBS, durant no més de 2'5 minuts i a 37ºC. El PEG permet la fusió de membranes entre les cèl·lules per absorbir l'aigua efectiva que les separa, doncs és un polímer ràpidament hidratable.

El PEG es va retirar i els pous es van rentar amb PBS abundant per retirar-ne tots els restes. Fet això, es va reafegir medi nou DMEM amb sèrum al 10%, ara amb cicloheximida a 100 μg/ml, durant 2H. Així deixàvem que les proteïnes es redistribuïssin, però evitàvem nova síntesi que emmascarés els resultats derivats de la distribució pels mecanismes de transport. Les fusions obtingudes eren homo i heterocarions. En aquests últims es va valorar l'existència d'export nuclear efectiu.

Els nuclis dels NIH-3T3 tenen una aparença característica quan són tenyits amb el compost Hoescht 33258. És possible apreciar un reforç del contorn nuclear i cossos nuclears més intensos, que fàcilment són identificables i permeten la diferenciació d'aquests nuclis amb els de les cèl·lules HeLa, per exemple (*Moser FG, Dorman BP i Ruddle FH. J Cell Biol 1975; 66(3): 676-80*).

Marcatge amb fòsfor radioactiu (P^{32} ATP)

Per a avaluar si Snail es fosforilava "in vivo", l'*mSnail* en *pcDNA3* va ésser transfectat transitòriament en cèl·lules NIH-3T3, MCF-7 i RWP1, sembrades en pous de 60mm. Després de 36H d'expressió, el medi DMEM-FCS 10% usual fou reemplaçat per un medi sense fosfats (DMEM sense fosfats, FCS dialitzat durant 48H), i les cèl·lules foren incubades per 3H en condicions normals. Aquest medi era suplementat amb 50mM d'HEPES-K, pH 7.6 com a tamponador en l'absència de CO_2 en la fase de marcatge.

Després d'aquestes 3 hores es va reafegir aquest mateix medi però amb un excés de ^{32}P radioactiu en forma d'ortofosfat (Amersham) diluit en HCl 0.01M com a vehicle, posant 300μCi/ml d'aquest ATP radioactiu per pou. Les cèl·lules en aquest medi foren incubades durant 3 hores més a 37ºC.

Posteriorment es va realitzar la immunoprecipitació de l'*mSnail-HA*, amb anticossos específics per l'etiqueta *HA*, com és descrita més amunt. Els lisats foren realitzats com és descrit a l'apartat d' Immunoprecipitacions. Els immunoprecipitats foren rentats abundantment en tampó d'immunoprecipitació, resolts en una electroforesi usual SDS-PAGE en gels del 12% de poliacrilamida, i aquests, un cop rentats en 30%Metanol-10% Acètic en aigua durant 90 minuts (amb canvis cada 15 minuts) per a fixar les proteïnes a la poliacrilamida i extreure l'ATP no fixat, foren assecats amb buit i calor, i després exposats a films autoradiogràfics Agfa-Curix entre 16 H i 2 dies a -80ºC.

En paral·lel es varen realitzar les immunoprecipitacions de pous transfectats de manera similar en els quals el medi afegit durant el temps de marcatge era medi DMEM+FCS 10% usual, sense ATP marcat, per a tenir una mesura aproximada de la relació entre la proteïna expressada, immunoprecipitada, i la intensitat del marcatge.

Els constructe *pcDNA3-E-cadherina* correspon a l'ADNc sencer codificant per l'*E-cadherina* humana, i fou clonat per en Josep Baulida (gràcies Jepi). El constructe *pcDNA3-mSnail(P2A)* és el mateix que és citat a *Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000*. El constructe *pcDNA3-ZEB1* correspon al què és citat a *Guaita S et al, J Biol Chem 2002* (gràcies Sandra). El constructe *pcDNA3-HisC-PKCzeta* fou amablement cedit per el Dr. Jorge Moscat.

Assaigs de fosforilació "in vitro" ("Assaigs Quinasa")

Les quinases purificades *PKA(subunitat catalítica), PKCα, GSK3β* procedien d'Upstate Biotech. *MEKK* i *ERK1* foren purificades d'*E.coli* després de forçar-ne l'expressió amb plàsmids de fusió a GST, proporcionats per en Francesc Posas, del grup de Bioquímica de l'Universitat Pompeu Fabra.

Una quantitat variable de cada quinasa (nanògrams) fou incubada amb 1-2 μg de la proteïna de fusió *GST-Snail* o només amb *GST* (equimolar); o bé amb el substrat específic corresponent (*MBP*, *myelin basic protein*; o *histona H1*). La reacció es realitzava en un tampó a pH 7.4 amb Tris 50mM, Ditiotreitol 1mM, 1mM $MgCl_2$, ATP a una concentració final de 500 μM, amb 3000 picomols d'ATP radioactiu (γATP P^{32}) per reacció, i depenent de la quinasa compostos accessoris (en el cas de PKCα, fosfolípids 80mM i clorur de calci 1mM). Després d'una incubació de 20' a 30ºC, les mostres eren bullides en tampó de càrrega i resoltes per SDS-PAGE en gels del 12%. El gel un cop fixat, rentat i assecat, era exposat a films autoradiogràfics Agfa-Curix durant 1 nit a -80ºC.

Assaigs de "Pull-Down"

En els experiments de pull-down per avaluar interaccions entre els dominis de la proteïna, es varen transfectar cèl·lules RWP1 en plaques de 100mm amb el protocol usual, i 4 μg d'ADN de les construccions d'mSnail-HA corresponents al fragment C terminal (*152-264* i *152-236*) subclonats en pcDNA3. Després de 36H d'expressió, les cèl·lules es varen lisar en un tampó no desnaturalitzant (TrisCl pH 7.4, 50 mM, NaCl 150 mM, Ditiotreitol 1mM, 1mM EGTA, $MgCl_2$ 1mM, 0'5% NP-40, i inhibidors de proteases usuals). El lisat de cada placa, obtingut de forma similar als fets per a immunoprecipitació, fou pre-aclarit amb 30 μl efectius de resina glutatió-sefarosa (GS4B, d'Amersham) durant 3H a 4ºC en agitació constant o en el seu defecte, 30' a temperatura ambient. El sobrenedant es va utilitzar per a l'experiment. Una alíquota de 20μl de cada lisat fou desada com a control de càrrega.

80μl de lisat preabsorbit (aproximadament 250 μg de proteïna total) foren incubats amb 2μg de la proteïna

de fusió GST-Nterminal Snail normal o bé els mutants (1-90, S/A, S/D, vegeu figures). La reacció d'interacció es completava afegint tampó de lisi sense detergent, i inhibidors de proteases fins a un volum final de 200 μl. Després de 2H a 4ºC o 30' a temperatura ambient i en agitació, es va afegir a les reaccions 30 μl efectius de resina GS4B neta i es va deixar incubar la reacció 30' més a temperatura ambient en presència d'etilenglicol al 10%, per a evitar la unió inespecífica de l'Snail a la resina -sabem que ocorre-. La reacció fou centrifugada a 15000 rpm durant 2' i els sobrenedants descartats. La resina resultant del "pull-down" fou rentada 3 cops en tampó de lisi abundant (500 μl), i després bullida en tampó de càrrega i resolta per SDS-PAGE en gels del 14%, per després fer els Western-Blot pertinents.

Els assaigs amb proteïnes de fusió purificades, MBP-mmSnail i GST-mmSnail foren realitzats en les mateixes condicions, utilitzant 1μg de cada proteïna de fusió.

Les fusions a *MBP* (*Maltose Binding Protein*) foren purificades a partir d'extractes en *E.coli*, realitzats en manera similar als de *GST*, però el·luint les proteïnes pertinents prèviament unides a una columna de *sefarosa-maltosa*, mitjançant un tampó ric en *maltosa*, d'acord amb les instruccions del fabricant (Promega).

Co-sedimentació de microtúbuls in vitro

Els extractes cel·lulars rics en tubulina foren obtinguts a partir de cèl·lules RWP1 en cultiu. Després d'ésser mantingudes en medi de cultiu, però sobre gel durant 30', per tal d'induir la despolimerització massiva de la xarxa microtubular, es va realitzar un lisat en un tampó d'extracció citosòlica, BRB80, lleugerament modificat dels protocols consultats (*Mitchison T, pàgina web del laboratori; Giannakakou P et al, Nat Cell Biol 2000; Ziegelbauer J et al, Mol Cell 2001*): PIPES-K 80mM, pH 6.8, EGTA 1mM, inhibidors de proteases usuals, ditiotreitol 1mM. Les cèl·lules rascades en PBS fred, foren centrifugades a 4ºC per 5 minuts a 1000 rpm, i el sediment fou resuspés en BRB80 refredat en gel, per a continuació ésser centrifugades durant 30' a 14000 rpm, 4ºC, per tal d'obtenir un extracte citosòlic per xoc hipotònic. El lisat obtingut era preaclarit centrifugant-lo durant 30' a 100000xg en una ultracentrífuga Beckman a 4ºC, per a eliminar compostos que precipitessin inespecíficament sense necessitat de polimerització.

El sobrenedant obtingut fou desat a –40ºC fins al moment de la seva utilització.

En el cas de la co-sedimentació de l'Snail endogen en NIH-3T3, el lisat fou obtingut de manera similar. Per a l'avaluació de la co-sedimentació de l'Snail-HA expressat en RWP1, les cèl·lules foren transfectades 36H abans de la lisi.

Les reaccions de co-sedimentació es varen fer amb 300 μg d'extracte citosòlic (1mg en el cas de l'experiment amb l'Snail endògen en NIH-3T3), en un volum final de 200 μl de reacció (variable en el cas dels NIH-3T3), en presència de tampó BRB80 suplementat amb 1mM $MgCl_2$, 4mM EGTA, 2mM DTT, 150 mM NaCl, 100 mg/ml de Taxol com estabilitzant de la polimerització, 1mM de GTP com activador, i BSA 100μg/ml per a evitar unions inespecífiques i estabilitzar la reacció, i inhibidors de proteases usuals. Cada cicle de polimerització fou fet incubant la reacció a 37oC durant 30'. En el cas de l'estudi amb proteïnes de fusió d'Snail amb GST, per al mapeig del domini d'unió, s'afegien 300 ng de proteïna de fusió a les reaccions.

Després de la incubació, el producte era centrifugat a 40000xg en una ultracentrífuga Beckman, a 30ºC, a través d'un coixí de sucrosa al 40% i taxol 20mM. El sediment obtingut, consistent en els microtúbuls polimeritzats, era resuspés en tampó BRB80 en presència de $CaCl_2$ 2mM, i incubat en gel durant 30'. Després d'afegir de nou taxol, GTP i EGTA a les concentracions pertinents, es realitzava un nou cicle de polimerització. El sediment obtingut després del tercer cicle de polimerització es considera, d'acord amb les referències existents, com certament pur i integrat exclusivament per microtúbuls i proteïnes associades.

El sediment era bullit en tampó de càrrega amb SDS i resolt per electroforesi en gels del 12%, per a fer posteriorment el Western Blot pertinent.

Els sobrenedants, donat el seu volum, eren precipitats en acetona durant tota la nit a –40ºC, per després ésser centrifugats a 14000 rpm durant 20', rentats per segon cop en acetona freda, i un cop obtingut el sediment definitiu, assecat a l'aire, era resuspés en tampó d'extracció citosòlica i pertinentment escalfat fins a la seva dissolució abans d'ésser bullit en tampó de càrrega.

Assaig d'activitat de Rho GTPases

L'assaig per a la detecció de *RhoA* activat es basa en un mètode de co-precipitació (pull-down) simple, aprofitant l'afinitat que algunes proteïnes tenen per les

formes de *Rho GTPases* associades a *GTP* (formes actives).

Les *Rho GTPases* ciclen entre aquest estat actiu i un inactiu (lligades a *GDP* un cop hidrolitzat el *GTP*), i és en l'estat actiu quan poden interaccionar amb efectors situats més avall en la ruta molecular de la què participen. En conseqüència, són les formes actives les que exerceixen l'efecte molecular.

En aquest cas, *RhoA* és capturat amb el domini específic d'unió a *Rho* de la proteïna *Rhotekina* (*RBD*, o *Rho Binding Domain*). Aquest domini ha estat fusionat a la proteïna *GST* per tal de poder ésser expressada en bacteris i purificada.

El constructe fou obtingut del laboratori de S. Gutkind, a l'NCBI a Bethesda, MD, EUA.

La proteïna de fusió *GST-RBD* fou obtinguda per un protocol convencional de purificació de proteïnes de fusió, detallat en apartats anteriors, amb l'única salvetat que el cultiu bacterià fou realitzat a temperatura ambient. La inducció i purificació foren fetes en manera similar al protocol usual.

Cèl·lules RWP1 transfectades amb quantitats similars de cDNA codificant per *mSnail* o els mutants detallats en les figures, foren lisades després de 24H d'expressió i no més, per a evitar efectes de la sobreexpressió.

Després de dos rentats en PBS fred, les cèl·lules es varen lisar directament de la placa amb un tampó de lisi modificat respecte de l'utilitzat en els assaigs de pull-down: HEPES-Na 50mM, pH 7.5; NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 10mM (essencial), 0.5% Nonidet (NP40), EGTA 1mM, inhibidors de fosfatases (2mM β-Glicerofosfat, 2mM NaF, 1mM ortovanadat sòdic), i inhibidors de proteases usuals. La lisi es va fer de manera ràpida sobre gel, i immediatament els lisats foren centrifugats a 15000 rpm, 4ºC, durant 5' per tal d'obtenir l'extracte proteic total.

Els passos d'incubació en agitació i disrupció en xeringa, usuals en el protocol d'extracció per a pulldown o immunoprecipitació, foren evitats donat que les Rho GTPases són força inestables i perllongar els temps d'incubació o extracció va en detriment de l'èxit de l'experiment.

El sobrenedant obtingut (lisat) fou dividit en parts iguals per a tots els assaigs pertinents, desant una petita part proporcional (un 10%) del volum com a control de càrrega. Els lisats es varen mesclar directament amb *GST-RBD* ja pre-unida a la resina *GS4B*, en quantitats equivalents corresponents aproximadament a 3 μg de proteïna de fusió, i després d'una incubació de 35' a 4ºC en agitació constant, la resina fou sedimentada per centrifugació curta i rentada 3 cops amb 500 μl del mateix tampó de lisi freda. El sediment final fou bullit en tampó de càrrega i resolt per electroforesi en gels de poliacrilamida del 12%.

D'acord amb l'afinitat del constructe de fusió, tota la proteïna *RhoA* detectada en l'immunoblot de l'assaig correspon a *RhoA* activada.

Assaig d'immunoprecipitació i amplificació d'ARN associats a Snail

Purificació de possibles ADNc candidats

Per a avaluar la hipotètica interacció entre mSnail i possibles ARNm, es va procedir a immunoprecipitar l'mSnail-HA exogen expressat transitòriament en cèl·lules NIH-3T3 durant 36 H. El protocol d'immunoprecipitació és similar a l'esmentat en l'apartat pertinent, però amb lleugeres modificacions. Així, el tampó de lisi i immunoprecipitació fou preparat en aigua tractada amb DEPC, i un cop constituït un primer tampó amb el Tris·Cl, l'EDTA i EGTA, el $MgCl_2$ i NaCl, fou autoclavat previ a l'adició de 0.5% NP-40, 1% Tritó X-100, i els inhibidors de proteases usuals. En el moment de fer el lisat, al volum final de tampó utilitzat se li afegien inhibidors d'ARNases (RNAsin, Promega), 1U per 50 μl de lisat. Els lisats eren sempre mantinguts en gel. Durant les incubacions amb l'anticós primari i la resina prèvia a l'obtenció de l'immunoprecipitat final, es mantenia la presència d'inhibidors d'ARNases en el tampó. Els rentats es realitzaven en tampó de lisi freda, seguint el protocol usual.

Els immunoprecipitats obtinguts eren resuspesos en Solució D (isotiocianat de guanidini) amb β-mercaptoetanol, per ésser sotmesos després a una extracció usual amb fenol-cloroform i acetat sòdic. El sediment resultant era resuspés en aigua DEPC.

La immunoprecipitació era feta en cèl·lules transfectades amb vector buit i vector amb mSnail, i utilitzant un anticós irrellevant (anti-Vimentina, Dako) o l'anticós adreçat contra l'etiqueta HA present a l'extrem 3' d'mSnail.

El protocol és lleugerament modificat del proporcionat per na Maya Vilà (gràcies, Maya), del laboratori de recerca de la Vall d'Hebron, Barcelona.

Amplificació i subclonatge de ADNc candidats.

Els ARN obtinguts eren retrotranscrits utilitzant el quit Sensiscript RT system, de QIAGEN, d'acord amb les

instruccions del fabricant (*gràcies, Susana Aguilar i Pilar Navarro*). Com a encebador s'utilitzava Oligo-dT (Promega), per tal de minimitzar la possible contaminació per ARN no missatgers, que malgrat tot era present en tots els experiments realitzats. Per a eliminar els ARN motllo, es realitzava una reacció d'hidròlisi alcalina amb NaOH 1M i 10 μl d'HEPES 1M, en un volum final de 35 μl, d'acord amb alguns protocols estudiats per a la purificació d'ADNc.

Els ADNc de cadena simple obtinguts eren replicats mitjançant la *Klenow ADN polimerasa* (New England Biolabs), utilitzant com a encebadors uns oligonuclèotids específicament dissenyats amb la seqüència 5'CCGCCGGGATCACTCTCGN$_6$3' . La seqüència inicial correspon a un fragment de eGFP, presumiblement no present en cap ARN humà o de ratolí (això fou verificat per consulta a la utilitat *BLAST* de l'NCBI). Amb això, afegíem una cua coneguda a l'extrem dels ADNc, que ens permetria després amplificar el fragment sencer per PCR. Els 6 nucleòtids aleatoris finals permetien anellar l'oligonuclèotid amb qualsevol ADNc motllo. Així ens asseguràvem que tots els ARN purificats foren representats.

Aquest protocol és una modificació d'un protocol descrit per a l'amplificació inespecífica d'ADNc, anomenat d'Amplificació amb Hexàmers aleatoris marcats (*TRHA*, o *Tagged Random Hexamer Amplification*, exposat a *Wong KK et al, Nucleic Acids Res 1996*).

Els ADNc eren sotmesos a dos cicles de polimerització, amb un període de desnaturalització a 95ºC entre ambdós per a separar la cadena generada de nou de la motllo. Les polimeritzacions constaven d'un primer període d'anellament a 25ºC durant 10 minuts, per a després afegir la *Klenow* polimerasa i *dNTPs* (a la concentració indicada pel fabricant per a la síntesi de segones cadenes d'ADNc), i realitzar un cicle de polimerització d'1 hora a 30ºC.

Amb dos cicles augmentàvem el nombre possible de ADNc de doble cadena amb l'etiqueta eGFP a l'extrem. Tanmateix, amb un sol cicle hem comprovat que és també relativament efectiu.

Un cop obtinguts els ADNc de doble cadena "marcats", es procedia a realitzar una amplificació per PCR amb oligonuclèotids complementaris de la regió *GFP*, per 38 cicles.

La majoria de vegades s'obtenia un "smear" en el carril corresponent a la immunoprecipitació amb l'anticós específic tant en les cèl·lules transfectades amb vector buit com amb mSnail. Tanmateix l'smear era sensiblement diferent.

El producte de PCR era purificat per columneta i subclonat en *pcDNA3* amb marges roms. Les colònies obtingudes eren testades per PCR per avaluar l'existència d'inserts amb *GFP* als extrems. Un cop seleccionades aquestes colònies, l'ADN obtingut era digerit amb *DpnI* per tal de fragmentar-lo i poder distingir patrons de restricció diferents, que eren escollits com a corresponents a diferents ADNc.

Els ADN finalment seleccionats eren seqüenciats per protocol usual, i les seqüències enfrontades a la base de dades de l'NCBI amb el programa *BLAST*. Això va proporcionar algunes correspondències, exposades en la Discussió.

En el 80% de les colònies provinents dels ARN immunoprecipitats de les cèl·lules transfectades amb vector buit, els fragments obtinguts eren fragments de vector. Aquesta proporció era del 50% en el cas dels possibles associats a Snail.

Assaig de precipitació amb oligonucleòtids biotinil·lats

Protocol lleugerament modificat del referenciat per *Hata A, Seoane J, Lagna G, Montalvo E, Hemmati-Brivanlou A i Massagué J, a Cell 2000; 100: 229-40.*

Per avaluar l'afinitat de diferents mutants d'Snail per les Ebox presents en el promotor d'E-cadherina humà, cèl·lules RWP1 es varen transfectar de forma transitòria amb els diferents constructes en pcDNA3. Després de 36H d'expressió, les cèl·lules foren rentades en PBS fred, i lisades en tampó HKMG (10 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10% glycerol, 1 mM DTT, i 0.5% NP-40) amb inhibidors de proteases i fosfatases usuals, durant 30' a 4ºC en agitació constant. El producte de lisi fou disgregat amb 10 passades per una agulla de 20 gauge i després centrifugat durant 10' a 14000 rpm i 4ºC. El sobrenedant fou congelat una nit a –80ºC.

El sobrenedant (lisat total) era pre-absorbit durant 1H a 4ºC en agitació amb 30μl efectius de resina (estreptavidina-agarosa, Sigma), per després ésser incubat en un volum final de 200 μl (200 μg de lisat per tub de reacció) amb 1μg d'oligonuclèotids de doble cadena biotinil·lats que incloïen l'Ebox1 del promotor d'E-cadherina i 10 μg de *poli dI-dC* (Promega), durant 16H a 4ºC en agitació. Després d'aquest període, 30 μl efectius de resina estreptavidina-agarosa eren afegits i incubats amb la reacció durant 1H. La resina era

sedimentada i rentada 3 cops amb 500 μl de tampó HKMG. Després era resuspesa en tampó de càrrega amb SDS, bullida i resolta per electroforesi en gels de poliacrilamida.

El Western Blot per l'etiqueta HA permet visualitzar les proteïnes que han estat co-precipitades amb l'oligonucleòtid biotinil·lat que ha estat precipitat amb la resina amb estreptavidina.

Els oligonucleòtids que inclouen l'Ebox1 del promotor humà d'E-cadherina són complementaris i amb la seqüència 5'GGCTGAGGGTTCACCTGCCGCCACAGCC3' (l'Ebox és subratllada) i biotinil·lats (síntesi per Sigma-Genosys). Un cop resuspesos en aigua, foren anellats a temperatura ambient durant 4 hores prèvia desnaturalització de 5' a 95°C en tampó TEN (Tris-EDTA). Només la cadena "sentit" és biotinil·lada.

Assaig de canvis en la mobilitat electroforètica (EMSA o "band-shift")

Un petit fragment del promotor humà d'E-cadherina, ADN de doble cadena, que inclou la 1ª de les 3 caixes d'unió a Snail (prèviament descrit a *Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000*), fou marcat radioactivament en els seus extrems mitjançant γATP P^{32} i la T4 polinucleòtid quinasa (Life Technologies-Invitrogen). La sonda marcada fou purificada mitjançant columnes de filltrat molecular per a descartar l'ATP no incorporat.

200 femtomols d'aquesta sonda foren incubats amb 50 ng de proteïna de fusió (les indicades a la Figura), durant 30 minuts i en gel. El tampó d'incubació era compost de HEPES 20mM, pH 7.9; KCl 100 mM, MgCl2 3 mM, glicerol 4%, 0.1% NP-40, DTT 1mM i ZnCl2 1'5 μM. La reacció es va realitzar en presència de 1 μg poli dI-dC , i en 25 μl de volum final.

On és indicat, 20 pmols de sonda freda, amb la seqüència de l'Ebox1 conservada o mutada, foren afegits a la reacció d'interacció com a competidors per avaluar la especificitat de la interacció.

El resultat de la reacció d'interacció proteïna-ADN fou resolt per electroforesi en un gel de seqüenciació al 4% en tampó Tris-Borat (TB), que havia estat prèviament corregut durant 30' per atemperar-lo. L'electroforesi es va fer a temperatura ambient i amb un amperatge constant (35 mA). Un cop resoltes les mostres, es va assecar el gel i fou exposat 12H a -80ºC sobre un film autoradiogràfic d'alta sensibilitat (Hyperfilm).

A

- Akimaru H, Hou DX, Ishii S. Nat Genet 1997; 17(2): 211-4. *Drosophila CBP is required for dorsal-dependent twist gene expression.*
- Alberga A, Boulay JL, Kempe E, Dennefeld C, Haenlin M. Development 1991; 111(4): 983-92. *The snail gene required for mesoderma formation in Drosophila is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers.*
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K i Watson JD. Molecular Biology of the Cell, third Edition.1994 New York
- Andela VB, Schwarz Em, Puzas JE, O'Keefe RJ,Rosier RN. Cancer Res 2000; 60(23): 6557-62. *Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB.*
- Apte RN i Voronov E, Semin Cancer Biol 2002; 12(4): 277-90. *Interleukin-1-a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions.*
- Ashraf SI i Ip YT. Development 2001; 128: 4757-67. *The Snail protein family regulates neuroblast expression of inscuteable and string, genes involved in asymmetry and cell division in Drosophila.*
- Ashraf SI, Hu X, Roote J i Ip YT. EMBO J 1999; 18(22): 6426-38. *The mesoderma determinant Snail collaborates with related zinc-finger proteins to control Drosophila neurogenesis.*
- Aybar MJ, Nieto MA i Mayor R. Development 2003; 130: 483-94. *Snail precedes Slug in the genetic cascade required for the specification and migration of the Xenopus neural crest.*

B

- Barker N i Clevers H. TRENDS Mol Med 2001; 7(12): 535-7. *Tumor environment: a potent driving force in colorectal cancer?*
- Barolo S i Posanoky JW. Genes Dev 2002; 16: 1167-81. *Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling.*
- Barrett K, Leptin M i Settleman J. Cell 1997; 91: 905-15. *The Rho GTPase and a putative RhoGEF mediate a signaling pathway for the cell sahpe changes in Drosophila gastrulation.*
- Bar-Sagi D i Hall A. Cell 2000; 103: 227-38. *Ras and Rho GTPases: a family reunion.*
- Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MMW, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T i Clevers H. Cell 2002; 111(2): 251-63. *Beta-Catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/EphrinB.*
- Batlle E, Sancho E, Francí C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J i García de Herreros A. Nat Cell Biol 2000; 2: 84-9. *The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumor cells.*
- Batlle E, Verdú J, Domínguez D, del Mont Llosas- M, Díaz V, Louliki N, Paciucci R, Alameda F i García deHerreros A. J Biol Chem 1998; 273(24): 15091-8. *Protein kinase C-alpha activity inversely modulates invasion and growth of intestinal cells.*
- Bear JE. Dev Cell 2002; 3(2): 149-50. *Formins: taking a ride on the barbed end.*
- Beck CW, Sutherland DJ i Woodland HR. Int J Dev Biol 1998; 42(1). *Involvement of NF-kappaB associated proteins in FGF-mediated mesoderma induction.*
- Berrueta L, Kraeft SK, Tirnauer JS, Schuyler SC, Chen LB, Hill DE, Pellman D i Bierer BE. Proc Natl Acad Sci 1998; 95: 10596-601. *Tha adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules.*
- Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C i van Roy F. EMBOJ 1995; 14(24): 6107-15. *E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers.*
- Berx G, Cleton-Jansen AM, Strumane K, de Leeuw WJ, Nollet F, van Roy F i Cornelisse C. Oncogene 1996; 13(9): 1919-25. *E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain.*
- Bienz M i Clevers H. Cell 2000; 103(2): 311-20. *Linking colorectal cancer to Wnt signaling.*
- Bienz M. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3(5): 328-38. *The subcellular destinations of APC proteins.*
- Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J i Nieto MA. Oncogene 2002; 21(20): 3241-6. *Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas.*
- Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M i Cano Ä. J Cell Sci 2003; 116(3): 499-511. *The transcription factor Slug represses E-cadherin and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors.*
- Borràs JM et al. Càncer Catalunya 2001. L'Hospitalet: Institut Català d'Oncologia i Departament de Sanitat i Seguretat Social, Generalitat de Catalunya, 2001.

- Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F i Kirchner T. Am J Pathol 1999; 155(4): 1033-8. *β-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer.*
- Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R i Kirchner T. Proc Natl Acad Sci 2001; 98(18): 10356-61. *Variable β-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment.*
- Brantjes H, Roose J, van De Wetering M i Clevers H. Nucleic Acids Res 2001; 29(7): 1410-9. *All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors.*

C

- Cáceres JF, Misteli T, Screaton GR, Spector DL i Krainer AR. J Cell Biol 1997; 138(2): 225-38. *Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity.*
- Cai Y, Chia W i Yang X . EMBO J 2001; 20: 1704-14. *A family of snail-related zinc finger proteins regulates two distinct and parallel mechanisms that mediate Drosophila neuroblast asymmetric divisions.*
- Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F i Nieto MA. Nat Cell Biol 2000, 2: 76-83. *The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression.*
- Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF i Gridley T. Mol Cell Biol 2001; 21(23): 8184-8. *The mouse Snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition.*
- Chambers AF, Groom AC i MacDonald IC. Nat Rev Cancer 2002; 2: 563-72. *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.*
- Chan TA, Wang Z, Dang LH, Vogelstein B i Kinzler KW. Proc Natl Acad Sci 2002; 99(12): 8265-70. *Targeted inactivation of CTNNB1 reveals unexpected effects of β-catenin mutation.*
- Chausovsky A, Bershadsky AD i Borisy GG. Nat Cell Biol 2000; 2(11): 913-7. *Cadherin -mediated regulation of microtubule dynamics.*
- Chesire DR, Ewing CM, Gage WR i Isaacs WB. Oncogene 2002; 21(17):2679-94. *In vitro evidence for complex modes of nuclear beta-catenin signaling during prostate growth and tumorigenesis.*
- Ciruna B i Rossant J. Dev Cell 2001; 1(1): 34-49. *FGF signaling regulates mesoderma cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak.*
- Clark EA, Golub TR, Lander ES i Hynes RO. Nature 2000; 406: 532-5. *Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC.*
- Clarke EJ i Allan V. Curr Biol 2002; 12: R596-8. *Intermediate Filaments: Vimentin Moves in*
- Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D i van Roy F. Mol Cell 2001; 7(6): 1267-78. *The two-handed Ebox binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion.*
- Cook TA, Nagasaki T i Gundersen GG. J Cell Biol 1998; 141(1): 175-85. *Rho Guanosine Triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by Lysophosphatidic acid.*
- Cote F, Boisvert FM, Grondin B, Bazinet M, Goodyer CG, Bazett-Jones DP i Aubry M. DNA Cell Biol 2001; 20(3): 159-73. *Alternative promoter usage and splicing of ZNF74 multifinger gene produce protein isoforms with a different repressor activity and nuclear partitioning.*
- Cui W, Fowlis DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A i Akhurst RJ. Cell 1996; 86(4): 531-42. *TGFβ-1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice*.

D

- Davies RC, Calvio C, Bratt E, Larsson SH, Lamond AI i Hastie ND. Genes Dev 1998; 12(20): 3217-25. *WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes.*
- Dedhars S. Curr Opin Cell Biol 2000; 12: 250-6. *Cell-substrate interactions and signaling through ILK.*
- Del Barrio MG i Nieto MA, Development 2002; 129(7): 1583-93. *Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation.*
- Dhawan P i Richmond A. J Biol Chem 2001; 277(10): 7920-8. *A novel NF-κB-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-κB activity in melanoma cells.*
- Diebold J, Mosinger K, Peiro G, Pannekamp U, Kaltz C, Baretton GB, Meier W i Lohrs U. J Pathol 2000; 190(5): 564-71. *20q13and cyclin D1 in ovarian carcinomas. Analysis by fluorescence in situ hybridization.*
- Dong C, Li Z, Alvarez R Jr, Feng XH i Goldschmidt-Clermont P. Mol Cell 2000; 5(1): 27-34. *Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity.*
- Dong G, Chen Z, Kato T i Van Waes C. Cancer Res 1999; 59(14): 3495-504. *The host environment promotes the constitutive activation of nuclear factor-kappaB and*

proinflammatory cytokine expression during metastatic tumor progression of murine squamous cell carcinoma.

E

- El-Bahrawym A, Poulsom R, Jeffery R, Talbot I i Alison MR. Hum Pathol 2001; 32(11): 1216-24. *The expression of E-cadherin and catenins in sporadic colorectal carcinoma.*
- Englert C, Vidal M, Maheswaran S, Ge Y, Ezzell RM, Isselbacher KJ i Haber DA. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92(26): 11960-4. *Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild-type protein.*

F

- Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K i Bairoch A. Nucleic Acids Res 2002; 30: 235-8. *The PROSITE database, its status in 2002.*
- Fearon ER i Vogelstein B. Cell 1990; 61: 759-67. *A genetic model for colorectal tumorigenesis.*
- Fodde R, Smits S i Clevers H. Nat Rev Cancer 2001; 1: 55-67.*APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer.*
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M i Mattaj IW. Cell 1997; 1051-60. *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals.*
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D i Birchmeier W. J Cell Biol 1991; 113(1): 173-85. *E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells.*
- Fukata M, Watanabe T, Noritake J, Nakagawa M, Yamaga M, Kuroda S, Matsuura Y, Iwamatsu A, Perez F i Kaibuchi K. Cell 2002; 109(7): 873-85. *Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170.*
- Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S i Hirohashi S. Cancer Res 1998; 58(16): 3526-8. *Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium.*
- Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M i Nishida E. Nature 1997; 390: 308-10. *CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal.*

G

- Gama-Carvalho M, Krauss RD, Chiang L, Valcarcel J, Greem MR i Carmo-Fonseca M. J Cell Biol 1997; 137(5): 975-87. *Targeting of U2AF65 to sites of active splicing in the nucleus.*
- Gama-Carvalho M i Carmo-Fonseca M. FEBS Letters 2001; 498: 157-63. *The rules and roles of nucleocytoplasmic shuttling proteins.*
- Giannakakou P, Sackett DL, Ward Y, Webster KR, Blagosklonny MV i Fojo T. Nat Cell Biol 2000; 2: 709-17. *p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein.*
- Goldstein B, Leviten MW i Weisblat DA. Dev Genes Evol 2001; 211(7): 329-37. *Dorsal and snail homologs in leech development.*
- Gradl D, Kuhl M i Wedlich D. Mol Cell Biol 1999; 19(8): 5576-87. *The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression.*
- Graveley BR, Hertel KJ i Maniatis T. RNA 2001; 7(6): 806-18. *The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing.*
- Grimes HL, Chan TO, Zweidler-McKay PA, Tong B i Tsichlis PN. Mol Cell Biol 1996; 16(11): 6263-72. *The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repression domain, SNAG, and inhibits G_1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal.*
- Grondin B, Bazinet M i Aubry M. J Biol Chem 1996; 271(26): 15458-67. *The KRAB zinc finger gene ZNF74 encodes an RNA-binding protein tightly associated with the nuclear matrix.*
- Groβhans J i Wieschaus E. Cell 2000; 101: 523-31. *A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in Drosophila.*
- Guaita S, Puig I, Francí C, Garrido M, Domínguez D, Batlle E, Sancho E, Dedhar S, García de Herreros A i Baulida J. J Biol Chem 2002; 277(42): 39209-16. *Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression.*
- Gundersen GG. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3:6-14. *Evolutionary conservation of microtubule-capture mechanisms.*
- Gurland G i Gundersen GG. J Cell Biol 1995; 131(5): 1271-90. *Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts.*

H

- Habas R, Kato Y i He X. Cell 2001; 107(7): 843-54. *Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel formin homology protein Daam1.*
- Häcker U i Perrimon N, Genes Dev 1998; 12: 274-84. *DRhoGEF2 encodes a member of the Dbl family of oncogenes and controls cell sahpe changes during gastrulation in Drosophila.*
- Haegel H, Larue L, Ohsugi M, Fedorov L, Herrenknecht K i Kemler R. Development 1995; 121: 3529-37. *Lack of β-catenin affects mouse development at gastrulation.*

- Hajra KM i Fearon ER. Genes Chromosomes Cancer 2002; 34: 255-68. *Cadherin and Catenin alterations in human cancer.*
- Hajra KM, Chen DY-S, Fearon ER. Cancer Res 2002; 62(6): 1613-8. *The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer.*
- Hajra KM, Ji X i Fearon ER, Oncogene 1999; 18: 7274-9. *Extinction of E-cadherin expression in breast cancer via adominant repression pathway acting on proximal promoter elements.*
- Hanahan D i Weinberg RA. Cell 2000; 100: 57-70. *The hallmarks of cancer.*
- Haren L i Merdes A. J Cell Sci 2002; 115(Pt9): 1815-24. *Direct binding of NuMA to tubulin is mediated by a novel sequence motif in the tail domain that bundles and stabilizes microtubules.*
- Hay Ed. Acta Anat 1995; 154(1): 8-20. *An overview of epithelio-mesenchymal transformation.*
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B i Kinzler KW. Science 1998; 281(5382): 1505-12. *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway.*
- Hemavathy K, Ashraf SI i Ip YT. Gene 2000; 257: 1-12. *Snail/Slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer.*
- Hemavathy K, Guru SC, Harris J, Chen JD i Ip YT. Mol Cell Biol 2000; 20(14): 5087-95. *Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription.*
- Hemavathy K, Meng X i Ip YT. Development 1997; 124: 3683-91. *Differential regulation of gastrulation and neuroectodermal gene expression by Snail in the Drosophila embryo.*
- Herrera R. J Cell Sci 1998; 111(Pt8): 1039-49. *Modulation of hepatocyte growth factor-induced scattering of HT29 colon carcinoma cells. Involvement of the MAPK pathway.*
- Hidaka S, Yasutake T, Takeshita H, Kondo M, Tsuji T, Nanashima A, Sawai T, Yamaguchi H, Nakagoe T, Ayabe H i Tagawa Y. Clin Cancer Res 2000; 6(7). *Differences in 20q13.2 copy number between colorectal cancers with and without liver metastasis.*
- Hogan PG i Rao A. Nature 1999; 398: 200-1. *Modification by nuclear export?*
- Hoogenraad CC, Akhmanova A, Grosveld F, De Zeeuw CI i Galjart N. J Cell Sci 2000; 113: 2285-97. *Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules.*
- Hoogenraad CC, Koekkoek B, Akhmanova A, Krugers H, Dortland B, Miedema M, van Alphen A, Kistler WM, Jaegle M, Koutsourakis M, Van Camp N, Verhoye M, van der Linden A, Kaverina I, Grosveld F, De Zeeuw CI i Galjart N. Nat Genet 2002; 32(1): 116-27. *Targeted mutation of Cyln2 in the Williams syndrome critical region links CLIP-115 haploinsufficiency to neurodevelopmental abnormalities in mice.*
- Horne-Badovinac S, Lin D, Waldron S, Schwarz M, Mbamalu G, Pawson T, Jan YN, Stainier DYR, Abdelilah-Seyfried S. Curr Biol 2001; 11: 1492-502. *Positional cloning of heart and soul reveals multiple roles for PKCλ in zebrafish organogenesis.*
- Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, Erdmann B, Birchmeier C i Birchmeier W. J Cell Biol 2000; 148(3): 567-78. *Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice.*
- Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G i Birchmeier W. Cell 2001; 105(4): 533-45. *β-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin.*

I

- Ikeguchi M, Makino M i Kaibara N. J Surg Oncol 2001; 77(3):201-7. *Clinical significance of E-cadherin-catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma.*
- Ilyas M, J Pathol 2000; 190(1): 3-5. *Adhesion molecule expression in breast cancer: the phoenix in tumour metastasis?*
- Ip YT i Gridley T. Curr Opin Gen Dev 2002; 12: 423-9. *Cell movements during gastrulation: Snail dependent and independent pathways.*
- Ip YT, Levine M i Bier E. Development 1994; 120(1): 199-207. *Neurogenic expression of snail is controlled by separable CNS and PNS promoter elements.*
- Ip YT, Park RE, Kosman D, Yazdanbakhsh K i Levine M. Genes Dev 1992; 6: 1518-30. *Dorsal-Twist interactions establish Snail expression in the presumptive mesoderma of the Drosophila embryo.*
- Isaac A, Sargent MG i Cooke J. Science 1997; 275: 1301-4. *Control of vertebrate left-right asymmetry by a Snail-related zinc finger gene.*
- Ishida N, Hara T, Kamura T, Yoshida M, Nakayma K i Nakayama KI. J Biol Chem 2002; 277(1): 14355-8. *Phosphorylation of $p27^{Kip1}$ on Serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export.*
- Ishizaki T, Morishima Y, Okamoto M, Furuyashiki T, Kato T i Naruyima S. NatCell Biol 2000; 3: 8-14. *Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1.*
- Izumi Y, Hirosi T, Tamai Y, Hirai S, Nagashima Y, Fujimoto T, Tabuse Y, Kemphues KJ i Ohno S. J Cell Biol 1998; 143(1): 95-106. *An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a*

mammalian homologue of the Caenorhabditis elegans polarity protein PAR-3.

J

- Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H i Grunert S. J Cell Biol 2002; 156(2): 299-313. *Ras and TGFβ cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways.*
- Jiang R, Lan Y, Norton CR, Sundberg JP i Gridley T. Dev Biol 1998; 198(2): 277-85. *The Slug gene is not essential for mesoderma or neural crest development in mice.*
- Jiao W, Miyazaki K i Kitajima Y. Br J Cancer 2002; 86(1): 98-101. *Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo.*

K

- Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D i Weiss A. Curr Biol 1999; 9(11): 601-4. *Induction of NF-κB by the Akt/PKB kinase.*
- Kao KR, Lockwood A. Mech Dev 1996; 58(1-2): 129-39: *Negative regulation of dorsal patterning in early embryos by overexpression of XrelA, a Xenopus homologue of NF-κB.*
- Keller G, Vogelsang H, Becker I, Hutter J, Ott K, Candidus S, Grundei T, Becker KF, Mueller J, Siewert JR i Hofler H. Am J Pathol 1999; 155(2). *Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation.*
- Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS i Chung J. FASEB J 2001; 15(11): 1953-62. *Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production.*
- Kirchner T i Brabletz T. Am J Pathol 2000; 157(4): 1113-21. *Patterning and nuclear β-catenin expression in the colonic adenoma-carcinoma sequence. Analogies with embryonic gastrulation.*
- Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Unden AB, Sandstedt B, Toftgard R i Zaphiropoulos PG. Nat Cell Biol 1999; 1(5): 312-9. *Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1.*
- Krylova O, Messenger MJ i Salinas PC. J Cell Biol 2000; 151(1): 83-93. *Dishevelled-1 regulates microtubule stability: a new function mediated by Glycogen Synthase Kinase-3β.*
- Kudo N, Matsumori N, Taoka H, Fujiwara D, Schreiner EP, Wolff B, Yoshida M i Horinouchi S. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 9112-7. *Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1bycovalent modification at a cysteine residue in the central conserved region.*

L

- Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, van Heyningen V i Hastie ND. Cell 1995; 81: 391-401. *Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing.*
- Lehming N, Thanos D, Brickman JM, Ma J, Maniatis T i Ptashne M. Nature 1994; 371(6493):175-9. *An HMG-like protein that can switch a transcriptional activator to a repressor.*
- Lespinet O, Nederbragt AJ, Cassan M, Dictus WJ, Van Loon AE i Adoutte A. Dev Genes Evol 2002; 212(4): 186-95. *Characterisation of two snail genes in the gastropod mollusc Patella vulgata.Implications for understanding the ancestral function of the snail-related genes in Bilateria.*
- Li X, Fang Y, Zhao X, Jiang X, Duong T i Kain SR. J Biol Chem 1999; 274(30): 21244-50. *Characterization of NFkappaB activation by detection of green fluorescent protein-tagged IkappaB degradation in living cells.*
- Ligon LA, Karki S, Tokito M i Holzbaur ELF. Nat Cell Biol 2001; 3(10): 913-7. *Dynein binds to β-catenin and may tether microtubules at adherens junctions.*
- Lin SX, Gundersen GG i Maxfield FR. Mol Biol Cell 2002; 13: 96-109. *Export from pericentriolar endocytic recycling compartment to cell surface depends on stable, detyrosinated (glu) microtubules and kinesin.*
- Liu JP i Jessell TM. Development 1998; 125: 5055-67. *A role for RhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube.*
- Livingston BT i Wilt FH. J Cell Biol 1992; 119(6): 1641-8. *Phorbol estersalter cell fateduring development of Sea Urchin embryos.*
- Locascio A iNieto MA. Curr Opin Gen Dev 2001; 11: 464-9. *Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration.*
- Locascio A, Vega S, de Frutos CA, Manzanares M i Nieto MA et al, J Biol Chem 2002;277(41):38803-9. *Biological Potential of a Functional Human SNAIL Retrogene.*

M

- Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M.et al. Oncogene 2001; 20(12). *E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma.*
- Mackay JB i Crossley M. Trends Biochem Sci 1998; 23: 1-4. *Zinc fingers are sticking together.*

- Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY i Baldwin AS Jr. J Biol Chem 2001; 276(22): 18934-40. *Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-κB through utilization of the IκB kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38.*
- Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ i Hanski C. Proc Natl Acad Sci 1999; 96: 1603-8. *Target genes of β-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas.*
- Mantovani R. Nucleic Acids Res 1998; 26(5): 1135-43. *A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes.*
- Manzanares M, Locascio A i Nieto MA. Trends Genet 2001; 17(4): 178-81. *The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution.*
- Marotta A, Tan C, Gray V, Malik S, Gallinger S, Sanghera J, Dupuis B, Owen D, Dedhar S i Salh B. Oncogene 2001; 20(43): 6250-7. *Dysregulation of Integrin-linked kinase (ILK) signaling in colonic polyposis.*
- Martínez Arias A. Cell 2001; 105: 425-31. *Epithelial mesenchymal interactions in cancer and development.*
- Mauhin V, Lutz Y, Dennefeld C i Alberga A. Nucleic Acids Res 1993; 21(17): 3951-7. *Definition of the DNA-binding site repertoire for the Drosophila transcription factor SNAIL.*
- Mayor R, Essex LJ, Bennett MF i Sargent MG.Development 1993; 119(3): 661-71. *Distinct elements of the xsna promoter are required for mesodermaal and ectodermal expression.*
- Mc Cartney BM, McEwen DG, Grevengoed E, Maddox P, Bejsovec A i Peifer M. Nat Cell Biol 2001; 3(10): 933-8. *Drosophila APC2 and Armadillo participate in tethering mitotic spindles to cortical actin.*
- Michaelson JS i Leder P, Oncogene 2001; 20(37): 5093-9. *β-catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland.*
- Mishima A, Suzuki A, Enaka M, Hirose T, Mizuno K, Ohnishi T, Mohri H, Ishigatsubo Y i Ohno S. Genes Cells 2002; 7(6): 581-96. *Over-expression of PAR-3 suppresses contact-mediated inhibition of cell migration in MDCK cells.*
- Misteli T i Spector DL, Nat Biotechnol 1997; 15(10): 961-4. *Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology.*
- Misteli T. J Cell Sci 2000; 113: 1841-9. *Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function.*
- Misteli T. Science 2001; 291: 843-7. *Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression.*
- Morali OG, Delmas V, Moore R, Jeanney C, Thiery JP i Larue L.. Oncogene 2001; 20(36): 4942-50. *IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition.*
- Morize P, Christiansen AE, Costa M, Parks S i Wieschaus E. Development 1998; 125: 589-97. *Hyperactivation of the folded gastrulation pathway induces specific cell shape changes.*
- Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E i Zlotnik A. Nature 2001; 410: 50-6. *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis.*
- Murakami T, Toda S, Fujimoto M, Ohtsuki M, Byers HR, Etoh T i Nakagawa H. Biochem Biophys Res Commun 2001; 288(1): 8-15. *Constitutive activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway in migration-active melanoma cells: role of LEF-1 in melanoma with increased metastatic potential.*

N

- Nabeshima K, Shimao Y, Inoue T, Itoh H, Kataoka H i Koono M. Int J Cancer 1998; 78(6): 750-9. *Hepatocyte growth factor/scatter factor induces not only scattering but also cohort migration of human colorectal-adenocarcinoma cells.*
- Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Kataoka H i Koono M. Histol Histopathol 1999; 14(4): 1183-97. *Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets.*
- Nakakura EK, Watkins DN, Schuebel KE, Sriurapong V, Borges MW, Nelkin BD i Ball DW. Proc Natl Acad Sci 2001; 98(7): 4010-5. *Mammalian Scratch: a neural-specific Snail family transcriptional repressor.*
- Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ i Sledge GW. Mol Cell Biol 1997; 17(7): 3629-39. *Constitutive activation of NF-κB during progression of breast cancer to hormone-independent growth.*
- Nieto MA, Bennett MF, Sargent MG i Wilkinson DG. Development 1992; 116(1): 227-37. *Cloning and developmental expression of Sna, a murine homologue of the Drosophila snail gene.*
- Nieto MA. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3: 155-66. *The Snail superfamily of zinc-finger transcription factors.*
- Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ i DePamphilis ML. J Biol Chem 1995; 270(38): 22077-80. *Regulation of gene expression at the beggining of mammalian development.*
- Novak A, Hsu SC, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Papkoff J, Montesano R, Roskelley C, Grosschedl R i Dedhar S., Proc Natl Acad Sci 1998; 95(8): 4374-9. *Cell adhesion and the*

integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways.

O

- Oda H, Tsukita S i Takeichi M. Dev Biol 1998;203(2):435-50. *Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during Drosophila gastrulation.*
- Oda T, Kanai Y, Oyama T, Yoshiura K, Shimoyama Y, Birchmeier W, Sugimura T i Hirohashi S. Proc Natl Acad Sci 1994; 91(5);1858-62. *E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines.*
- Okubo T, Truong TK, Yu B, Itoh T, Zhao J, Grube B, Zhou D i Chen S. Cancer Res 2001; 61: 1338-46. *Down-regulation of promoter I.3 activity of the human Aromatase gene in breast tissue by zinc-finger protein, Snail (SnaH).*
- Oshima H, Oshima M, Kobayashi M, Tsutsumi M i Taketo MM. Cancer Res 1997; 57(9): 1644-9. *Morphological and molecular processes of polyp formation in Apc(delta716) knockout mice.*
- Otte AP i Moon RT. Cell 1992; 68(6): 1021-9. *Protein kinase C isozymes have distinct roles in neural induction and competence in Xenopus.*
- Otte AP, Koster CH, Snoek GT, Durston AJ. Nature 1988; 334(6183): 618-20. *Protein kinase C mediates neural induction in Xenopus laevis.*

P

- Palazzo AF, Cook TA, Alberts AS i Gundersen GG. Nat Cell Biol 2001; 3: 723-9. *mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules.*
- Paznekas WA, Okajima K, Schertzer M, Wood S i Wang Jabs E. Genomics 1999; 62(1): 42-9. *Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAI1) and a related processed pseudogene (SNAI1P).*
- Perander M, Bjørkøy G i Johansen T. J Biol Chem 2001; 16: 13015-24. *Nuclear import and export signals enable rapid nucleocytoplasmic shuttling of the atypical protein kinase C λ.*
- Pérez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, Cano A. J Biol Chem 2001; 276(29): 27424-31. *A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions.*
- Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R i Bosserhoff AK. J Biol Chem 2001; 276(27):24661-6. *Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail.*
- Prasher DC, Trends Genet 1995; 11(8): 320-3. *Using GFP to see the light.*

Q

- Qiu RG, Abo A i Steven Martin G. Curr Biol 2000; 10(12): 697-707. *A human homolog of the C. elegans polarity determinant Par-6 links Rac and Cdc42 to PKCzeta signaling and cell transformation.*

R

- Rayet B i Gelinas C, Oncogene 1999; 18(49): 6938-47. *Aberrant rel/nfκb genes and activity in human cancer.*
- Ridley A. Nature 2000; 406: 466-7. *Molecular switches in metastasis.*
- Rocheleau CE, Downs WD, Lin R, Wittmann C, Bei Y, Cha Y-H, Ali M, Priess JR i Mello CC. Cell 1997; 90: 707-16. *Wnt signaling and APC-related gene specify endoderma in early C-elegans embryos.*
- Rosivatz E, Becker I, Spetch K, Fricke E, Luber B, Busch R, Höfler H i Becker KF. Am J Pathol 2002; 161(5): 1881-91. *Differential expression of the Epithelial-Mesenchymal Transition regulatos Snail, SIP1, and Twist in Gastric Cancer.*
- Rupp RAW, Snider L i Weintraub H. Genes Dev 1994; 8: 1311-23. *Xenopus embryos regulate the nuclear localization of XmyoD.*

S

- Schmidt-Ullrich R, Mémet S, Lilienbaum A, Feuillard J, Raphael M i Israël A. Development 1996; 122(7): 2117-28. *NF-κB activity in transgenic mice: developmental regulation and tissue specificity.*
- Sefton M, Sánchez S i Nieto MA. Development 1998; 125: 3111-21. *Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo.*
- Sekine S, Shibata T, Sakamoto M i Hirohashi S. Oncogene 2002; 21(38): 5906-11. *Target disruption of the mutant beta-catenin gene in colon cancer cell line HCT116: preservation of its malignant phenotype.*
- Settleman J. Nat Cell Biol 2000; 2: E7-9. *Getting in shape with Rho.*
- Smith DE, Franco del Amo F i Gridley T. Development 1992; 116: 1033-39. *Isolation of Sna, a mouse gene homologous to the Drosophila genes snail and escargot: its expression pattern suggests multiple roles during postimplantation development.*
- Song J, Ugai H, Kanazawa I, Sun K i Yokoyama KK. J Biol Chem 2001; 276(3): 19897-904. *Independent repression*

of a GC-rich housekeeping gene by Sp1 and MAZ involves the same cis-elements.

- Spector DL. J Cell Sci 2001; 114(16): 2891-3. *Nuclear domains.*
- Spencer JA, Eliazer S, Ilaria RL Jr, Richardson JA i Olson EN. J Cell Biol 2000; 150(4): 771-84. *Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein.*
- Sporn MB. Lancet 1996; 347(9012): 1377-81. *The war on cancer.*
- Steward R. Science 1987; 238(4827). *Dorsal, an embryonic polarity gene in Drosophila, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, c-rel.*
- Sutherland HG, Mumford GK, NewtonK, Ford LV, Farrall L, Delaire G, Cáceres JF i Bickmore WA. Hum Mol Genet 2001; 10(18): 1995-2011.*Large-scale identification of mammalian proteins localized to nuclear sub-compartments.*
- Suzuki A, Ishiyama C, Hashiba K, Shimizu M, Ebnet K i Ohno S. J Cell Sci 2002; 115(Pt8): 3565-73. *aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization.*
- Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T, Manabe N, Mizuno K, Shimizu M, Akimoto K, Izumi Y, Ohnishi T i Ohno S. J Cell Biol 2001; 152(6): 1183-96. *Atypical Protein Kinase C is involved in the evolutionary conserved PAR protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures.*

T

- Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, Nakamura Y i Furukawa Y. Oncogene 2002; 21(38): 5861-7. *Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the β-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers.*
- Tan C, Costello P, Sanghera J, Dominguez D, Baulida J, de Herreros AG i Dedhar S. Oncogene 2001; 20(1):133-40. *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.*
- Tan C, Mui A i Dedhar S, J Biol Chem 2002; 277(5): 3109-16. *Integrin-linked kinase regulates inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in an NF-κB-dependent manner.*
- Tannahill D i Wardle FC.Int J Dev Biol 1995; 39(4): 549-58. *Control of axis formation in Xenopus by the NF-kappa B-I kappa B system.*
- Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A,Collins C, Stokke T, Karhu R, Kowbel D, Shadravan F, Hintz M, Kuo WL, et al. Cancer Res 1994; 54(16). *Increased copy number at 20q13 in breast cancer: defining the critical region and exclusion of candidate genes.*
- Teruel MN i Meyer T. Cell 2000; 103: 181-4. *Translocation and reversible localization of signaling proteins: a dynamic future for signal transduction.*
- Tetsu O i McCormick F. Nature 1999; 398(6726): 422-6. *Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells.*
- Thiery JP, Nat Rev Cancer 2002;2: 442-54. *Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression.*
- Toker A. Frontiers in Bioscience 1998; 3: d1134-47. *Signaling through Protein Kinase C.*
- Torres MA i Nelson WI. J Cell Biol 2000; 149(7): 1433-42. *Colocalization and redistribution of Dishevelled and Actin during Wnt-induced mesenchymal morphogenesis.*
- Twigg SR i Wilkie AD, Hum Genet 1999; 105(4): 320-6. *Characterisation of the human snail (SNAI1) gene and exclusion as a major disease gene in craniosynostosis.*

U

- Ullman KS, Powers MA i Forbes DJ. Cell 1997; 90: 967-70. *Nuclear export receptors: from importin to exportin.*

V-W

- Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R i Clevers H. Cell 2002; 111: 241-50. *The Beta-Catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells*.
- Van Roessel P i Brand AH, Nat Cell Biol 2002; 4(1): E15-20. *Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins.*
- Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W i van Roy F. Cell 1991; 6(1): 107-19. *Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role.*
- Walczak CE, Vernos I, Mitchison TJ, Karsenti E i Heald R. Curr Biol 1998; 8: 903-13. *A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity.*
- Wallingford B i Harland RM. Development 2001; 128: 2581-92. *Xenpopus Dishevelled signaling regulates both neural and mesodermaal convergent extension: parallel forces elongating the body axis.*
- Wasan HS, Park HS, Liu KC, Mandir NK, Winnett A, Sasieni P, Bodmer WF, Goodlad RA i Wright NA. J Pathol 1998; 185(3): 246-55. *APC in the regulation of intestinal crypt fission.*

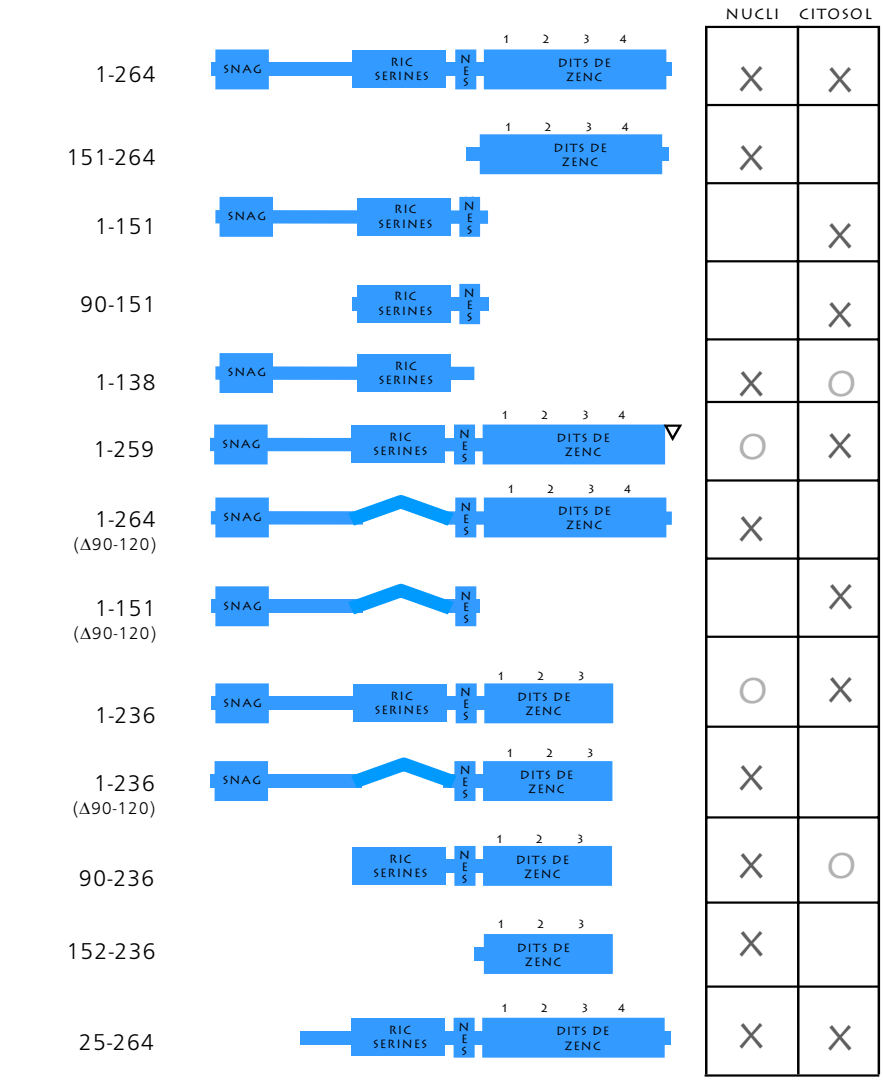
- White DE, Cardiff RD, Dedhar S i Muller WJ. Oncogene 2001; 20(48): 7064-72. *Mammary epithelial-specific expression of the integrin-linked kinase (ILK) results in the induction of mammary gland hyperplasias and tumors in transgenic mice.*
- Whiteside ST i Goodbourn S. J Cell Sci 1993; 104: 949-55. *Signal transduction and nuclear targeting: regulation of transcription factor activity by subcellular localisation.*
- Wong KK, Stillwell LC, Dockery CA i Saffer JD. Nucleic Acids Res 1996; 24(19): 3778-83. *Use of tagged random hexamer amplification (TRHA) to clone and sequence minute quantities of DNA--application to a 180 kb plasmid isolated from Sphingomonas F199.*
- Wong MH, Hermiston ML, Syder AJ i Gordon JI. Proc Natl Acad Sci 1996; 93: 9588-93. *Forced expression of the tumor supressor adenomatosis polyposis coli protein induces disordered cell migration in theintestinal epithelium.*
- Wu C i Dedhar S. J Cell Biol 2001; 155(4): 505-10. *Integrin-linked kinase (ILK) and its interactions: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes.*

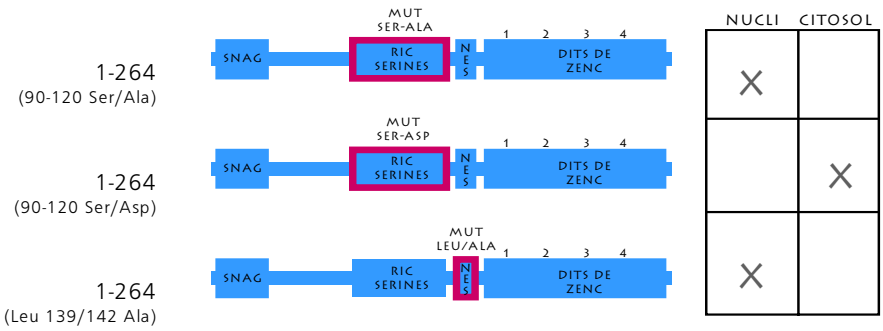
Y

- Yokoyama K, Kamata N, Hayashi E, Hoteiya T, Ueda N, Fujimoto R i Nagayama M. Oral Oncol 2001; 37(1): 65-71. *Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro.*

Z

- Zervas CG, Gregory SL i Brown NH. J Cell Biol 2001; 152(5): 1007-18. *Drosophila integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane.*
- Zhang Y i Xiong Y. Science 2001; 292: 1910-5. *A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation.*
- Ziegelbauer J, Shan B, Yager D, Larabell C, Hoffman B i Tjian R. Mol Cell 2001; 8: 339-49. *Transcription factor MIZ-1 is regulated via microtubule association.*
- Zolotukhin AS, Tan W, Bear J, Smulevitch S i Felber BK. J Biol Chem 2002; 277(6): 3935-42. *U2AF participates in the binding of TAP (NXF1) to mRNA.*
- Zurawel RH, Chiappa SA, Allen C i Raffel C. Cancer Res 1998; 58(5): 896-9. *Sporadic medulloblastomas contain oncogenic β-catenin mutations.*





ANNEX : TOTS ELS MUTANTS I TRUNCACIONS D'MSNAIL I LA SEVA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR

Esquema arquitectural de tots els mutants i deleccions d'mSnail construits i esmentats a la tesi, i resum orientatiu de la seva localització subcel·lular, essencialment respecte a la distribució nuclear o citosòlica. En aquells constructes en els quals la distribució era predominant en un dels compartiments (X), pero ocasionalment present en un altre (si més no, apreciable), s'ha assenyalat aquesta última localització amb una "O". En la majoria de constructes la localització és però inequívoca.

Els dominis que han estat mutats són emmarcats en color morat. Els números sobre el domini C-terminal marquen la posició i presència o no de cadascun dels dits de Zenc.

El domini ovo-1 no s'ha inclós en l'esquema.

La nomenclatura és la què apareix esmentada al texte de la tesi.

ABREVIATURES

APC: Adenomatous Polyposis Coli protein, Proteïna de la Poliposi Adenomatosa del Colon
CRM1: Chromosome Region Maintenance-, exportina 1
EBOX: Ephrussi box-like motif (*Ephrussi A, Church GM, Tonegawa S y Gilbert W. Science 1985; 227: 134-40*)
EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein, Proteïna Verda Fluorescent millorada
EMT: Transició Epiteli-Mesènquima
FZL: Frizzled
ILK: Integrin-Linked Kinase, Quinasa Lligada a Integrines
LMB: Leptomicina-B
NF-κB: Nuclear Factor Kappa-B
NES: Seqüència d'Export Nuclear
NLS: Senyal de Localització Nuclear
PKC: Protein-Kinase C, Proteïna Quinasa-C
TPA: 12-Tetradecanoyl Phorbol 13-Myristate acetate, Ester de Forbol (Forbol miristat-acetat)
WB: Western Blot
WNT: Wingless

AGRAÏMENTS

Qui hagi decidit llegir aquesta tesi sàpiga que hi és destil·lat el treball d'uns quants anys, com fora de suposar. Però sobretot deixeu que us faci saber que sobretot hi ha el traç d'una profunda gratitud per tothom qui un dia o altra, o molts dies d'aquests anys, han volgut obsequiar-me amb la seva inestimable amistat, atenció, dedicació, sapiència i paciència, entusiasme i alegria sincera.
En aquesta tesi hi he vessat tot el què el cap i l'esforç han pogut. Per tota la gent qui ha estat al meu costat, encara que fos perquè no hi havia més remei, hi poso aquestes paraules que em dicta el cor.

Mil gràcies a la meva família gran -els meus benvolguts pares Ramon i Carme, la meva germana Anna, el Marc i el petit Pol que ve de camí, els meus altres pares Miquel i Chelo, i en Miquel i la Espe, l'Òscar i la Marta, la Montse, i els qui a Cambrils o Penouta formen part d'aquest munt de gent que em fa la vida feliç. Mil gràcies per la vostra presència, pels ànims, les rialles o les preguntes constants sobre la meva feina. Mil gràcies pel vostre profund respecte, per aquell "t'he vist a la tele perquè parlaven de recerca i he pensat que potser ereu vosaltres" (eh, papa?), per engrescar-vos en la meva falera. Mil gràcies per cuidar dels meus Cheli i Dídac quan el temps em faltava. Mil gràcies per cuidar de mi quan, com l'aire, ho necessitava.

Mil i una gràcies a l'Antonio, perquè m'ha descobert un món que mai s'acaba, on em trobo com peix a l'aigua. Mil i una gràcies per la seva infinita paciència i bondat, pel seu immens respecte, per acompanyar-me i no portar-me de la mà, per creure en les meves idees o no dir-me que no ho veia clar. Mil i una gràcies per ensenyar-me a fer ciència i créixer en ella, i una i mil més per tot i més del què puc escriure amb els dits o comptar amb els de les mans.

Mil i dues gràcies al Sergi i l'Assumpta, per engrescar-me sempre, per la seva fidelitat, per donar-me empenta. Mil i dues gràcies per ensenyar-me mil coses quan volia aprendre, per ensenyar-me que fins i tot quan no t'ho penses, el món no és només feina. Mil i dues gràcies per obrir-me les seves portes sense ni un grinyol, per estirar-me quan vacil·lava, per fer-me seure quan massa alt volava.

Mil i tres gràcies a la Clara, pel somriure amable que sempre em donava, pel caire dolç de les seves paraules, per creure en mi. Mil i tres gràcies per no deixar-me caure quan donava les primeres passes i per cordar-me les sabates noves quan gairebé ja corria. Mil i tres gràcies per no oblidar-se mai del que els altres oblidem, per ser part essencial d'un record que sempre duré a la butxaca.
Mil i quatre gràcies a l'Eduard i l'Elena per fer-me somiar cada dia. Mil i quatre gràcies per ensenyar-me les beceroles quan encara no havia sortit de l'ou, per engrescar-me sempre, per no deixar-me defallir. Mil i quatre gràcies també per l'Snail, com no, per aquesta idea estimulant, per aquesta empenta, per la mà estesa.

Mil i cinc gràcies a en Jepi. Per moltes coses i per una sola, per ser el meu amic. Mil i cinc gràcies per mil i cinc coses que mai podré comptar encara que esmenti, perquè entre ciència i amistat són totes confoses. Mil i cinc gràcies per mil i cinc paraules lligades, una darrera l'altra, en un discurs sapient, sincer i amable. Mil i cinc gràcies per contestar-me quan li canviava el nom, potser producte de l'immens respecte i estimació que em desperta. Mil i cinc gràcies de tot cor.

Mil i més gràcies al Pep, benvolgut amic, admirat. Mil i més gràcies per sempre tenir temps per mí, quan els dos sabem que els temps es curt, sinó escàs. Mil i més gràcies per la serenor, els bons consells, les rialles en temps difícils i la teva impoluta amistat. Mil i més gràcies per bons records i mil més pels què tant de bó vindran.

Mil i sis gràcies a l'Ariadna per la inspiració del principi i per la sensatesa dels últims dies. Mil i sis gràcies pel seu somriure i les seves cabòries. Per mil i sis xerrades i uns quants viatges al bus. Mil i sis gràcies per ser musa i caverna alhora. Mil i sis gracies per ser diferent i donar el contrast a aquesta vida de colors pàlids.
Mil i set gràcies a la Bàrbara, per moltes coses i moltes més. Per la companyonia personal i cientifica, per pujar al tren en marxa sense despentinar-se. Mil i set gràcies pel desordre sublim i pel passeig amb moto, Mil i set gràcies per compartir espai, temps i idees. Mil i set gràcies per més del que puc agrair-te i per moltes coses que no t'he dit, com feia la cançó, o la pel·lícula.
Mil i sis i set gracies a les dues de fet, perque aquest treball es tan vostre com meu.

Mil i vuit gràcies a la Judit, per les rialles, la seva dansa vital, la seva presencia. Mil i vuit gràcies per fer la feina més fàcil en molts sentits, pels "bon dia" matiners i pels "fins dema" diaris. Mil i vuit gràcies pel silenci de qui sap que de vegades corria massa, per estar sempre quan et buscava. Mil i vuit gràcies per tu.
Mil i nou gràcies per la Cristina, per les xerrades a l'altra banda de la bancada. Mil i nou gràcies per un temps massa curt, un llibre sense llegir, o un poema d'en Pessoa fugaç com el metro fins Verdaguer. Mil i nou gràcies per parar el temps.
Mil i deu gràcies a la Sandra, per la frescura del seu quefer, per l'alegria del mot certer. Mil i deu gràcies per mil i deu bons moments, per mil i deu frases que m'han musicat els dies sencers. Mil i deu gràcies per la llàgrima de l'últim dia, que no se pas si va correr galta avall, tant de bó fos recollida.
Mil onze gràcies a la Isabel, per petits silencis que no esperaven res, per no dir-me res quan t'hauria d'haver demanat perdó. Mil onze gràcies per tot això.
Mil onze més onze gràcies a la Mª José benvolguda. Mil onze més onze (vint-i-dós) gràcies per fer-me sentir una mica més gran que un cigró, que de tant en quant va bé.
Mil i onze coma cinc gràcies a la Montse Porta, alumne avançada, companya adelantada. Mil onze coma cinc gràcies per la feina ben feta, que com aquell honorable deia, no té fronteres, com tampoc les tindràs tu.
Mil dotze gràcies i mil dotze més per la Mercè Monfar, per la frase d'en Poul Anderson, per d'altres mil que em vas dir. Mil dotze gracies pels dies que et vaig veure, i mil dotze gracies per si a veure't torno.

Mil i tretze gràcies al bon amic Fausto. Per les postes de sol a cultius, per les xerrades al metro, o a l'hora de dinar (els menys de mil tretze dies que vaig anar-hi). Mil i tretze gràcies pel discurs pausat, el grinyol articular, per la simfonia excel·lent que ha estat conèixer-lo. Mil i tretze gràcies i molta sort.
Mil i més de tretze gràcies al Santi Roura i a la Mª del Mont. Al Santi, gran persona i millor científic, per el temps que vaig poder compartir al labo, per l'antisentit experimental i el sentit personal. Et desitjo el millor. A la Mont, per les xerrades de temps incomptable que vàrem fer abans que fes jo cap a l'IMIM (qui hagués en aquells dies que aniria a parar a la teva bancada), pels consells, per engrescar-me, sabent-ho o no. Moltes gràcies.
I d'aquestes mil tretze, gràcies també a la Mercè Martín i la Miriam Fabre, l'una de rialla esplendorosa, l'altre de discurs melós, per les preguntes i l'interés, per l'amabilitat feta a l'engròs.

Mil i catorze gràcies a l'Arrate Mallabiabarrena, com mil lletres té el seu nom. Mil catorze gràcies per mil catorze hores somniant al microscopi, per mil catorze "speckles", per mil catorze cops que amb experiència i paciència m'ha ajudat amb aquesta feina. Mil catorze gràcies per desentortolligar la maranya de microtúbuls que cada dia li portava i no despentinar-se més que quan va amb patins, fet ben mirat, prodigiós.
Catorze mil gràcies a l'encantadora Pilar Navarro, per la seva presència, pel seu ajut científic, pel seu somriure, per la sort d'haver-la conegut.

Mil catorze setze divuit vegades al Paco i la Núria. Per l'amistat, pels consells, per les més de mil oportunitats que m'heu oferit. Per pensar en mí, per preocupar-vos, per l'ajut gratuït.
Mil i quinze gràcies als admirats Xavi Mayol i en Gabriel Gil, per les mil i quinze respostes que sempre m'han volgut donar a les mil quinze preguntes que cada dia els feia. Us estic mil quinze vegades agraït.
I quinze gràcies més a en Francesc Posas, per savis consells que han sigut determinants en el curs d'aquesta tesi. Tot un luxe.
Mil i setze tropicals gràcies a la Clara Mayo, Clarita, per musicar hores de cultius interminables amb gràcia exquisida. Per la tonada de la seva veu, que de ben segur m'és record alegre, i ho serà per al seu petit o petita.
Mil disset a les molt estimades Susanna i la Meritxell, de tot cor. Mil disset gràcies pels somriures i les paraules. Per molts records que no puc destriar, me'ls quedo tots.

Sense voler-me deixar a ningú perquè tots m'heu donat un record que mai voldré esborrar, milivint gràcies a tota l'UBCM: a la petita i maravellosa Laia, el gran Francesc, l'immens Maurici, la dolça Coral, la fantàstica Sandra, l'agradable Anouchka, l'impecable Josep Mª d'Anta, l'admirat Miki, la molt apreciada Marta Garrido, l'entranyable Carme Torns, les benvolgudes Carme de Bolós i Montse Torà, el sorprenent Oriol, el bon Manel, els molt recordats Leo i Alfons, l'alegre Montse García i l'amable Olga, la benvolguda Mònica, el bon company Fran (i en Dani), la Tania, la Montse Natcher, l'Elisabet Engel i l'Anna Enjuanes (us poso aquí perque com a cultius, compartim lloc) . Mil vint gràcies a tots. Entre tots heu aconseguit que us trobi a faltar.

I com les coses van començar en algun lloc, mil cinquanta gràcies a en Josep Mª Corominas, estimat Coro, per milers de dies de residència, per ser qui ets, per tot el que m'has ajudat i m'has ensenyat, m'has donat. Per gratar-me per primer cop amb això de la recerca, que de ben segur vas ser tu. Al Francesc Alameda, per moltes coses més, que ni tan sols comencen amb allò dels ratolins. Pels consells, per l'ajut, per la sinceritat, per l'empenta. Al Carles Barranco, perquè caram, t'haig d'agrair moltes coses però sobretot l'amistat. I mil cinquanta gràcies al benvolgut i estimat Julian, mestre genial, a les molt estimades i recordades Joana i MªElena. A la gran Lluïsa, i la petita Teresa, dues persones immenses. I als benvolguts Luís, Maria i Pilar García, a les estimades Maria Conangla, Imma i Lali, a l'entranyable Pepi, les fantàstiques Yolanda Nuñez i Ángela, la benvolguda Rosa, la Pilar, i a les apreciades Juani, Yolanda, i la Griselda i la Úrsula, a les què fa temps que no veig,
I més que més, a les molt estimades Àngels, Cristina i Lola, per milers d'hores i temps vital compartit, per una època dolça, que no fàcil, per molts records vius com el dia. Us trobo molt a faltar. I a la Montse, la Núria, la Bàrbara (on deus ser?), l'estimada Mar, l'Ester, i l'Irene i la Marga. I el Víctor. Per acompanyar-me en els primers dies on tot això va començar, no pas la tesi, però si el meu futur.
I és clar, també gràcies al Quico Soler, la Lourdes Florensa, la Soledad Woessner, el Carles Besses i en Jordi Sans-Sabrafen. Uns per estimular-me a ser on soc ara, altres per haver-me donat espai en el món científic.

Quasi ja al final, mil setanta-cinc gràcies a una part del què soc que es diu Centre. Al benvolgut i recordat Joan Pelegrí, del qui voldria dir moltes coses, però que per sobre de tot va ser mestre, amic i es part del meu record més arrelat. Tant de bó fossis aquí. I a l'estimat i enyorat Eugeni, que va fer la millor tesi que mai he llegit, sobre l'amistat i l'essència de l'ésser qui som. Eugeni, amic Eugeni. Als benvolguts monitors del Centre, els antics, els nous, tots els qui han sigut amics i companys. I als infants, petits i grans, amb els qui he pogut compartir dies i dies de gresca, aprenentatge, joc i sobretot, amistat. Moltes gràcies.
De fet, qui soc, com soc, allò que les paraules destil·len, es en part com és perquè us he conegut.

Arribant a la fí, mil noranta-nou gràcies finals a la Maya Vilà. Per més que no puc posar mil noranta-nou coses que agrair-te (tampoc em dóna el vocabulari per tant), mil noranta-nou gràcies perquè ets molt gran. Menys mal que estàs a NY i

em vas recollir quan hi vaig caure. Mil noranta-nou gràcies per la gratitud espontània, per la paciència interminable (la de tenir a casa algú que porta una amiga dita "tesi"), per les classes vitals, per la descoberta del nou món. Mil noranta-nou gràcies per un protocol experimental i cent-mil protocols quotidians. Per mil sopars (bé, tampoc porto tants dies aquí), centenars de laundromats i gristedes, un futton i pocs farenheits (si fa fred!!). Per més del què mai et podré tornar, gràcies noia.

També mil cent gracies al Jim Botton, maquinista afamat d'un tren llunyà, al que molts cops vaig pujar. Mil cent gracies pels bons moments passats, i mil cent més pels mil cent titols dels mil cents capitols escrits de "com escriure un titol o com ordenar paraules i fer-les ballar".
I mil i mil gràcies a en José Saramago, per milers de versos i frases certes, per milers de sentiments que comparteixo. Pel millor llibre que he llegit, i per aquell avi que sempre he volgut trobar. Mil i mil gràcies per moltes coses, pero sobretot per fer sentir el món sencer (que caram, és molt gran).

I com que és ja el què és, mil remil gràcies a l'Snail, recargolat factor de transcripció, que és tema i motiu de tot això. Mil remil gràcies per amagar-te només a estones, per treure el cap i deixar-te veure, o per escolar-te sota la closca. Mil remil gràcies per engrescar-me, per treure'm la son (només una mica) fins a fer-me somiar, per deixar-te estirar. En fí, mil remil gràcies, que potser són poques, perque per ésser qui ets, soc on soc, i he fet els amics que he fet, i això de ben segur se'm queda dins per sempre més.

I heus ací que havent arribat a l'últim agraïment, et dono milimil gràcies a tu, pobre lectora o lector, que fins aquí has arribat, potser amb ulls cansats, potser amb cap bullent, per llegir el què hagi estat, que ja està prou bé, segur. Milimil gràcies pel temps dedicat, el què hagi estat, i el teu interés que fa que això, si més no, no es quedi aqui. Milimil alegries si d'aqui surten idees que et puguin ajudar, o si d'aquest text surten maneres que et facin, encara que sigui només un pèl, somiar. Això de la recerca, ja saps, és moltes coses, però més una, és l'essència del què som fets, del preguntar i respondre, del pensar i del trobar. Milimil gràcies que fan mil per mil, un milió.

Nova York (o New York)
Gener del 2003, per fí.

INDEX DE FIGURES

	PAG	INTRODUCCIÓ
In-1	5	Gradació arquitectural en un adenocarcinoma de colon
In-2	11	Beta-catenina esdevé nuclear en els focus invasius dels adenocarcinomes de colon
In-2	15	Snail indueix la davallada d'expressió d'E-cadherina

	PAG	RESULTATS
Rs-1	25	Mapa de seqüència del fragment –888/+42 de la regió promotora de l'homòleg humà d'Snail
Rs-2	27	Delimitació de la Regió Mínima Promotora i de l'Element d'Exclusió Epitelial
Rs-3	28	El segment –48/+42 inclou elements *cis* essencials per la funció del promotor
Rs-4	29	La Regió Mínima Promotora es correspon amb la regió promotora que regeix l'expressió del retrogen d'Snail humà, però inclou una regió 5'CCACCACC3' no present en aquest últim, i amb rellevancia transcripcional
Rs-5	30	Arquitectura transcripcional del promotor d'Snail humà
Rs-6	32	Efecte del TPA (èsters de forbol) sobre l'activitat del promotor d'Snail
Rs-7	33	El TPA o l'activació de PKCα incrementa els nivells d'ARNm d'Snail en cèl·lules epitelials
Rs-8	35	Identificació d'un element de resposta a l'activació d'ILK (quinasa lligada a integrines) en el promotor d'Snail humà
Rs-9	36	Similituds arquitecturals entre els promotors d'Snail a Drosophila i humans.
Rs-10	38	Resposta del promotor d'Snail a la senyalització per factors de la família Rel/NFκB
Rs-11	39	Caracterització dels elements de resposta i de l'efecte transcripcional dels factors de la familia Rel/NFκB sobre el promotor d'Snail
Rs-12	40	Modulació de l'activitat del promotor d'Snail en cèl·lules epitelials depenent del grau de cohesió-confluència i rol transcripcional de l'Element d'Exclusió Epitelial
Rs-13	41	Expressió d'Snail i E-cadherina en diverses línies epitelials en cultiu
Rs-14	43	Distribució subcel·lular de la fusió eGFP-mSnail i mSnail-HA en diverses línies cel·lulars epitelials
Rs-15	44	Exclusivitat de la localització citosòlica d'Snail en el grup de factors de transcripció i entre els membres de la seva família protèïca
Rs-16	46	Les meitats N i C terminal d'Snail tenen una distribució subcel·lular oposada i complementària.
Rs-17	47	L'assaig de fusió cel·lular i formació d'heterocarions suggereix l'existència de fenòmens d'export nuclear
Rs-18	48	La conservació de seqüència entre els diferents homòlegs d'Snail és discontinua
Rs-19	50	Presència d'una possible seqüència d'export nuclear (NES), rica en Leucines, en la meitat N terminal de l'Snail de mamífers
Rs-20	51	La regió rica en Leucines d'Snail en mamífers es comporta com una senyal d'export i media la localització citosòlica de la proteïna
Rs-21	53	El Domini Ric en Serines d'Snail té rellevància funcional, i modula l'eficiència del sistema d'export nuclear de la proteïna

	PAG	
Rs-22	54	Distribució dels consens de fosforilació en la seqüència aminoacídica d'mSnail
Rs-23	55	Snail és fosforilat in vivo en cèl·lules epitelials i mesenquimals, essencialment en els residus Serina concentrats al Domini Ric en Serines
Rs-24	56	L'estat de fosforilació del Domini Ric en Serines condiciona la distribució subcel·lular de la proteïna
Rs-25	58	La delecció de l'últim dit de Zenc (237-264) condiciona la distribució subcel·lular d'Snail
Rs-26	60	Les cues N- i C-terminal d'Snail interaccionen entre elles i la interacció, modulada per l'estat de fosforilació del Domini Ric en Serines, condiciona l'eficiència del sistema d'export
Rs-27	62	Canvis en l'activitat transcripcional d'mSnail condicionats per la seva localització subcel·lular
Rs-28	63	La delecció de l'últim dit de Zenc, però no l'estat de fosforilació, condiciona l'afinitat d'Snail per l'ADN.
Rs-29	65	Snail es distribueix en subdominis nuclears discrets localitzats en els espais intercromatínics
Rs-30	67	La distribució d'Snail en els subdominis nuclears depen de regions de la molècula situades en ambdues meitats, i de l'estat de fosforilació del Domini Ric en Serines
Rs-31	68	La localització en subdominis nuclears no és immediata i ocorre al cap de cert temps d'estar Snail al nucli
Rs-32	69	Snail es distribueix en compartiments ocupats per factors de processament de l'ARNm (speckles)
Rs-33	72	L'Snail citosòlic té avidesa pel citoesquelet, on co-localitza exclusivament amb la xarxa de microtúbuls
Rs-34	74	Snail co-localitza amb gamma-tubulina al centrosoma
Rs-35	76	La unió d'Snail als microtúbuls en condiciona forma i distribució, i suggereix l'existència d'un procès d'estabilització de la xarxa microtubular.
Rs-36	77	El bloqueig de l'export nuclear no és capaç de re-localitzar l'snail associat als microtúbuls de nou al nucli
Rs-37	78	Snail s'uneix indirectament i co-sedimenta amb els microtúbuls.
Rs-38	81	Correspondència entre co-localització i co-sedimentació entre Snail i la xarxa microtubular i definició de la meitat C-terminal com la regió candidata d'unió a microtúbuls
Rs-39	82	La delecció de l'últim dit de Zenc però no dels últims 5 aminoàcids afecta la capacitat d'Snail de co-localitzar amb els microtúbuls
Rs-40	83	Associació als microtúbuls de les formes fosforilades d'Snail
Rs-41	85	Les formes d'Snail que co-localitzen els microtúbuls els estabilitzen selectivament
Rs-42	87	Snail indueix l'aparició de modificacions post-traduccionals als microtúbuls on s'uneix (detirosinació) associades a l'estabilització persistent de la xarxa microtubular
Rs-43	88	Reorientació dels filaments de vimentina al voltant dels microtúbuls estabilitzats per Snail
Box-1	9	Traçats moleculars depenents de la senyalització per Wnt-Wingless
Box-2	45	Estructura en dominis de la superfamília gènica Snail, i definició comparativa de les diverses famílies gèniques
Box-3	80	Alineament de seqüència entre el domini d'unió a microtúbuls del factor MIZ1, i Snail.

	PAG	DISCUSSIÓ
Dc-1	93	Snail i E-cadherina són co-expressats en algunes línies cel·lulars epitelials no humanes
Dc-2	95	Efecte transcripcional del constructe de fusió VP16-Snail sobre el promotor humà d'Snail.
Dc-3	100	La delecció dels últims cinc aminoàcids (260-264) comporta la relocalització predominant d'Snail al citosol
Dc-4	103	Comparació del mapa predicitiu de fosforilació d'mSnail i mSlug
Dc-5	105	Electroforesi dels productes d'amplificació aleatòria d'ARN amb hexamers etiquetats (TRHA), associats a Snail
Dc-6	110	L'expressió d'mSnail incrementa els nivells cel·lulars de RhoA-GTP (actiu)
Dc-7	114	Flux intracel·lular d'Snail
Dc-8	115	El grau de fosforilació d'Snail respon a canvis en l'eix Snail/E-cadherina
Dc-9	116	Assaigs de fosforilació in vitro d'Snail amb quinases candidates
Dc-10	118	L'expressió forçada de PKCζ (zeta) comporta un augment en el nivell de fosforilació d'Snail
Dc-11	120	Model mecanístic integrat de l'acció d'Snail en cèl·lules epitelials
Box Dc-1	101	Model hipotètic dels canvis estructurals d'Snail en resposta a la fosforilació del Domini Ric en Serines o la delecció de l'últim dit de Zenc
Taula Dc-1	98	Breu llistat de proteïnes conegudes amb l' arquitectura domini ric en Serines-dits de Zenc similar a la trobada en Snail
Taula Dc-2	106	Relació dels factors codificats pels ARNm co-immunoprecipitats amb Snail
Annex	150	Tots els mutants i truncacions d'mSnail i la seva localització subcel·lular

El treball experimental contingut en aquesta tesi doctoral ha estat realitzat durant el periode 1999-2002, anys durant els quals he pogut gaudir d'una beca de recerca post-residència de l'Institut Municipal d'Assistència Sanitària i l'Hospital del Mar (any 1999), i d'una beca FP del Instituto de Salud Carlos III del Govern Espanyol (anys 2000-2002).
Part dels resultats són conjunts amb el treball de l'Ariadna Virgós i la Bàrbara Montserrat, amb les qui he compartit temps de la meva estada pre-doctoral.. Altres resultats, què he utilitzat per a fer més entenedora la discussió o les hipòtesis experimentals, corresponen a resultats d'altres membres del grup del Dr Antonio García de Herreros (Clara Francí, Sandra Guaita, Isabel Puig, Josep Baulida, i Eduard Batlle i Elena Sancho), i he volgut reflectir el nom de qui me'ls ha cedit amablement (Batlle E et al, Nat Cell Biol 2000; Guaita S et al, J Biol Chem 2002).
De dades parcials del treball presentat hem pogut publicar dos articles que són reflexats a la bibliografia (Poser I et al, J Biol Chem 2001; Tan C et al, Oncogene 2001). En el moment de dipositar aquesta tesi, tenim sotmés a revisió un article amb els resultats corresponents a la part que avalua la regulació de la localització subcel·lular d'Snail.