

---

**$\beta$ -CATENINA, UNA PROTEÏNA AMB DIVERSES  
FUNCIONS EN L'ACOBLEMENT DE FACTORS  
TRANSCRIPCIONALS I FACTORS D'UNIONS  
ADHERENTS**

---

Guiomar Solanas Fuster





**Universitat Autònoma de Barcelona**

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Unitat de Biofísica-CEB, Facultat de Medicina

**$\beta$ -CATENINA, UNA PROTEÏNA AMB DIVERSES FUNCIONS EN  
L'ACOBLEMENT DE FACTORS TRANSCRIPCIONALS I  
FACTORS D'UNIONS ADHERENTS**

Memòria presentada per optar al grau de Doctor pel Departament de  
Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2008

Directora de la Tesi Doctoral

Doctoranda

Dra. Mireia Duñach Masjuan

Guiomar Solanas Fuster







<i>INTRODUCCIÓ</i> .....	1
<b>1 Unions Adherents</b> .....	<b>3</b>
1.1 E-cadherina.....	4
1.1.1 Estructura i interaccions d'E-cadherina.....	4
1.1.2 E-cadherina, proteïna supressora de tumors.....	6
1.2 $\beta$ -catenina.....	6
1.2.1 Estructura de $\beta$ -catenina.....	7
1.2.2 Regulació de la funció de $\beta$ -catenina.....	8
1.2.3 $\beta$ -catenina com a transductor de senyals de la via de Wnt.....	10
1.3 Placoglobina.....	12
1.3.1 Estructura de placoglobina, similituds i diferències amb $\beta$ -catenina.....	13
1.3.2 Regulació de la funcionalitat de placoglobina.....	15
1.4 $\alpha$ -catenina.....	17
1.5 p120-catenina.....	18
1.5.1 Estructura de p120-catenina, cosina llunyana de $\beta$ -catenina i placoglobina.....	18
1.5.2 Funcions de p120-catenina.....	19
<b>2 Via de NF-<math>\kappa</math>B</b> .....	<b>25</b>
2.1 Components.....	25
2.1.1 Factors de transcripció, la família Rel.....	26
2.1.2 I $\kappa$ B, molècules inhibidores.....	28
2.2 Procés d'activació de NF- $\kappa$ B.....	29
2.3 Regulació de l'activitat.....	30
2.3.1 Activació transcripcional de p65.....	31
2.3.2 Inhibició o finalització de l'activitat transcripcional.....	32
2.4 Sistema immune i inflamació.....	33
2.5 Implicació de NF- $\kappa$ B en el desenvolupament i progressió del càncer.....	34

2.5.1	Gens mutats de la via de NF- $\kappa$ B.....	36
2.5.2	Senyals moduladors de l'activitat de NF- $\kappa$ B alterats en càncer.....	37
	<b>OBJECTIUS.....</b>	<b>39</b>
	 <b>CAPÍTOL I: ELS EXTREMS TERMINALS DE LES CATENINES AMB DOMINI ARMADILLO REGULEN L'ESPECIFICITAT D'UNIÓ A FACTORS ...</b>	<b>43</b>
	<b>I. RESULTATS.....</b>	<b>45</b>
	<b>1 La modulació de l'afinitat de placoglobina pels seus cofactors està regulada pels extrems terminals.....</b>	<b>47</b>
1.1	Estudi de la regulació pels extrems terminals de placoglobina de la unió a cofactors.....	48
1.2	Interacció dels extrems terminals amb el domini armadillo de placoglobina. .....	53
	<b>2 Els extrems terminals de <math>\beta</math>-catenina i placoglobina determinen l'especificitat d'unió a factors. ....</b>	<b>55</b>
2.1	Estudis de diferències d'interacció amb proteïnes quimera.....	55
2.2	Els extrems terminals de $\beta$ -catenina i placoglobina modulen el diferent comportament d'aquestes proteïnes a la proteòlisi. ....	60
	<b>3 L'extrem N-terminal de p120-catenina restringeix la interacció amb E- cadherina.....</b>	<b>62</b>
	<b>I.DISCUSSIÓ .....</b>	<b>65</b>
	<b>1 Els extrems terminals de placoglobina interaccionen amb el domini armadillo i regulen la interacció amb els seus cofactors. ....</b>	<b>67</b>
	<b>2 Els extrems terminals de <math>\beta</math>-catenina i placoglobina determinen l'especificitat d'unió a factors. ....</b>	<b>69</b>
	<b>3 Els extrems de p120-catenina regulen la unió de l'E-cadherina al domini armadillo.....</b>	<b>73</b>



<i>I. CONCLUSIONS</i> .....	77
 <i>CAPÍTOL II: ELS COMPONENTS DE LES UNIONS ADHERENTS SÓN EFECTORS NEGATIUS DE LA VIA DE NF-κB</i> .....	
	81
<i>II. RESULTATS</i> .....	83
<i>1 La interacció de la subunitat p65 de NF-κB amb els components de les unions adherents inhibeix la seva activitat transcripcional.</i> .....	85
1.1 Les catenines disminueixen l'activitat transcripcional de NF-κB.....	86
1.2 La p120-catenina i la placoglobina interaccionen amb p65 de manera similar a com ho fan amb l'E-cadherina.....	87
1.3 Únicament les catenines associades a l'E-cadherina interaccionen amb p65. ....	92
<i>2 L'E-cadherina reprimeix l'activitat transcripcional de NF-κB.</i> .....	96
2.1 L'expressió ectòpica d'E-cadherina inhibeix l'activitat transcripcional de NF-κB en SW480 segregant la subunitat p65 a les unions adherents. ....	96
2.2 La davallada dels nivells d'E-cadherina impedeix la interacció de p65 amb les catenines i és suficient per provocar l'activació de la via de NF-κB en cèl·lules IEC-18. ....	101
<i>3 La pèrdua d'unions adherents disminueix la unió de p65 a E-cadherina i les catenines. Estudi en un model de disrupció de les unions adherents per sobreexpressió de l'oncogen K-ras.</i> .....	107
3.1 La pèrdua d'unions adherents provoca un canvi de la localització subcel·lular de p65 i l'activació de la transcripció mitjançada per NF-κB. ....	108
<i>4 IκBα no forma part del complex de p65 amb els components de les unions adherents. IκBα i E-cadherina competeixen per la interacció amb p65.</i> ...	111
4.1 TNF-α no mobilitza la fracció de p65 associada als complexos de membrana.....	113

4.2	La davallada dels nivells d'E-cadherina augmenta la resposta a TNF- $\alpha$ .	115
5	La subunitat p50 de NF- $\kappa$ B interacciona E-cadherina i $\beta$ -catenina.	116
II.DISCUSSIÓ		119
1	Inflamació crònica i càncer, dos processos lligats des d'antany.	121
2	Els components de les unions adherents i NF- $\kappa$ B, una regulació creuada.	121
3	Els components de les unions adherents inhibeixen l'activitat de NF- $\kappa$ B.	123
3.1	La p120-catenina és un efector negatiu de la via de NF- $\kappa$ B.	125
3.1.1	RhoA	126
3.2	E-cadherina, l'eix vertebrador de la inhibició de NF- $\kappa$ B.	129
4	La disrupció de les unions provoca la pèrdua de la interacció de p65 amb E-cadherina.	132
5	Un pool de NF- $\kappa$ B regulat per E-cadherina.	133
II.CONCLUSIONS		137
MATERIALS I MÈTODES		141
1	Preparació de les construccions de DNA	143
1.1	Vectors	143
1.1.1	D'expressió en procarïotes.	143
1.1.2	D'expressió en eucariotes.	144
1.2	Preparació dels inserts.	144
1.2.1	Per subclonatge.	144
1.2.2	Per PCR.	145
1.3	Lligació	145
1.4	Transformació en cèl·lules competents.	145
1.5	Extracció i comprovació del DNA.	146

---

1.6	Seqüenciació del DNA. ....	146
2	<i>Obtenció de proteïnes recombinants en E.coli.</i> .....	146
2.1	Manipulació de les soques bacterianes. ....	148
2.2	Inducció, purificació i elució de proteïnes recombinants.....	149
2.2.1	Inducció.....	149
2.2.2	Solubilització amb TX-100 1%. ....	149
2.2.3	Solubilització amb N-Lauroilsarcosine.....	149
2.2.4	Purificació amb <i>Glutathion-Sepharose 4B</i> .....	150
2.2.5	Elució amb glutatona reduïda, mantenint el <i>tag</i> GST.....	150
2.2.6	Elució amb PreScission, tallant la GST. ....	150
2.3	Quantificació per electroforesi.....	150
3	<i>Cultiu cel·lular i obtenció d'extractes proteïcs.</i> .....	151
3.1	Línies cel·lulars utilitzades. ....	151
3.1.1	Clons estables. ....	151
3.2	Manteniment, sembra i emmagatzematge de les línies.....	152
3.3	Transfecció.....	153
3.4	Preparació de lisats cel·lulars. ....	154
3.4.1	Extractes totals. ....	154
3.4.2	Fraccionament subcel·lular.....	154
4	<i>Tècniques analítiques de proteïnes.</i> .....	155
4.1	Electroforesi SDS-PAGE (Laemmli).....	155
4.2	Electrotransferència i immunodetecció ( <i>Western blot</i> ).....	156
5	<i>Assaigs d'interacció entre proteïnes.</i> .....	158
5.1	Interacció directa de proteïnes recombinants. ....	158
5.2	<i>Over-lay</i> .....	159
5.3	<i>Pull-down.</i> ....	159
5.4	Co-immunoprecipitació. ....	159

---

## ÍNDEX

---

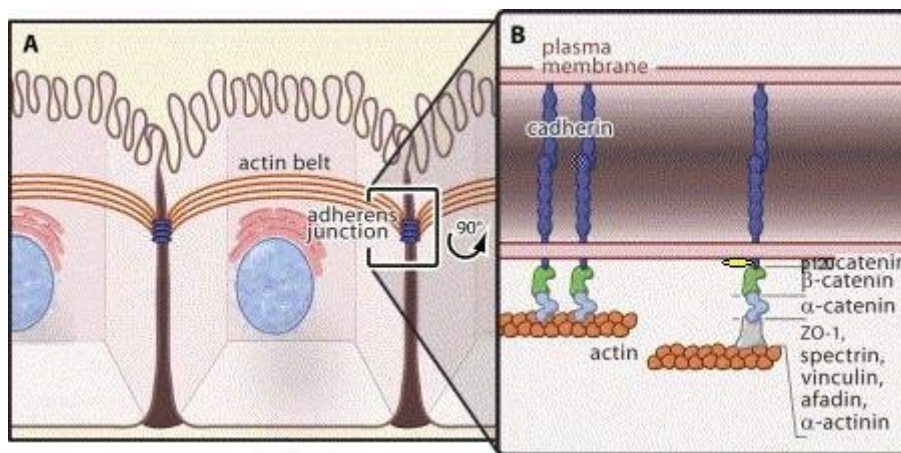
6	<i>Assaig de sensibilitat a la digestió amb tripsina.....</i>	160
7	<i>Anàlisi de l'activitat transcripcional: assaig del gen reporter.....</i>	160
8	<i>Tractaments.....</i>	161
8.1	<i>TNF-<math>\alpha</math>.....</i>	161
8.2	<i>Leptomicina B. ....</i>	161
9	<i>Detecció per immunofluorescència de proteïnes.....</i>	162
10	<i>Reactius i solucions. ....</i>	163
	<i>BIBLIOGRAFIA.....</i>	167
	<i>ANEXOS.....</i>	205
	<i>Abreviatures.....</i>	207
	<i>Agraïments.....</i>	209

# **INTRODUCCIÓ**



## 1 Unions Adherents.

Les unions adherents són un tipus d'unió intercel·lular d'ancoratge que es troba a la part superior del domini basolateral de les cèl·lules epitelials. Uneixen la xarxa de filaments d'actina amb les cadherines, glicoproteïnes de membrana. L'E-cadherina és la forma majoritària dels teixits epitelials. La Figura 1 mostra un esquema simplificat dels components de les unions adherents i les interaccions que formen.



**Figura 1: A) les unions adherents s'estableixen a les zones més apicals de la superfície basolateral de les cèl·lules epitelials. B) l'adhesió cel·lular té lloc mitjançant el contacte homotípic de cadherines de cèl·lules adjacents.** Adaptat de [1].

Durant la formació de les unions adherents, les cèl·lules estenen fil·lopodis i lamel·lipodis per promoure nous contactes de les cadherines de cèl·lules veïnes, anomenades *puncta*. Aquest procés de reorganització requereix del citoesquelet d'actina i de les seves proteïnes remodeladores, les Rho-GTPases [2].

Aquest tipus d'unions, lluny de la concepció original d'element estàtic amb funció merament estructural, es considera actualment un element clau en la homeostasi de les cèl·lules epitelials. Això és degut a que les proteïnes que les

composen controlen processos tant importants com la progressió del cicle cel·lular, la migració i la supervivència, entre d'altres.

## 1.1 E-cadherina.

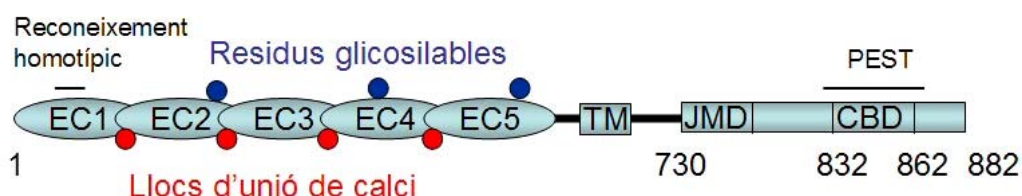
L'E-cadherina és el membre de la família de les cadherines present majoritàriament en els teixits epitelials. Les cadherines són molècules d'adhesió intercel·lular que en presència de calci poden formar contactes homotípics amb els dominis extracel·lulars de les cadherines de cèl·lules veïnes.

L'E-cadherina exerceix un paper cabdal en la regulació de la polaritat de les cèl·lules [3]. A més, la seva correcta expressió és molt rellevant durant tot el desenvolupament des de la fase de mòrula on és indispensable per la compactació cel·lular, fins a la organogènesi on és determinant en la formació d'epitelis [4].

### 1.1.1 Estructura i interaccions d'E-cadherina.

L'E-cadherina és una proteïna de tipus I amb un sol pas transmembrana. Conté 5 dominis extracel·lulars (EC) de 110 aminoàcids cadascun amb plegament independent on s'hi uneixen els ions de calci. L'EC1 és el responsable del reconeixement dels contactes homotípics (Figura 2).

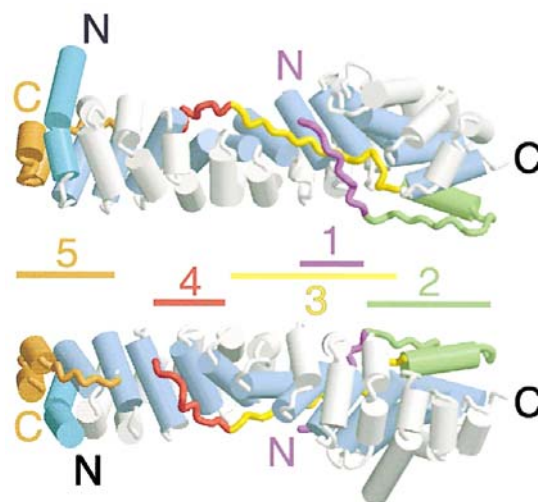
A més, per tal que els complexos d'adhesió siguin funcionals, el domini citosòlic de l'E-cadherina ha d'interaccionar amb el citoesquelet d'actina. Aquesta unió ve mitjançada per les catenines ( $\alpha$ - i  $\beta$ -catenina).



**Figura 2: Diagrama dels diferents dominis d'E-cadherina.** Els dominis extracel·lulars (EC1 a 5) contenen els llocs d'unió d'ions de calci i els residus glicosilables. Es mostren el domini transmembrana (TM) y el citosòlic (de l'aà 730 al final) amb els dominis jxtamembrana (JMD) i d'unió a catenines (CBD).



Així l'E-cadherina interacciona amb  $\beta$ -catenina per una regió de 100 aminoàcids de l'extrem C-terminal (CBD) [5, 6]. Aquesta zona es troba altament desestructurada quan no està interaccionant amb les catenines i quan no està fosforilada per CKII ni GSK3 $\beta$  als residus serina 648, 686 i 692 [6-8]. La fosforilació al reticle endoplàsmic d'aquestes serines fa augmentar l'afinitat per  $\beta$ -catenina. Aquests residus fosforilables que formen part del CBD són a més part d'una seqüència PEST, que s'emascara quan interacciona amb les catenines. Així les catenines ajudarien a l'estabilització de la E-cadherina a la membrana. L'estructura del domini citosòlic d'E-cadherina interaccionant amb el domini central de  $\beta$ -catenina, anomenat domini armadillo, ha estat determinada per difracció de raigs X a una resolució de 2.1Å (Figura 3) [7, 9].



**Figura 3: Esquema del complex d'E-cadherina amb  $\beta$ -catenina.** L'E-cadherina es representa amb cintes de colors, on cadascuna correspon a una regió del domini citosòlic. El domini armadillo de la  $\beta$ -catenina es representa amb cilindres grisos i blaus. Adaptat de [7].

En alguns casos aquest paper de  $\beta$ -catenina el pot realitzar una proteïna similar anomenada placoglobina (o  $\gamma$ -catenina). Aquesta proteïna normalment participa en un altre tipus d'unió intercel·lular, els desmosomes. La interacció d'E-cadherina amb  $\beta$ -catenina o placoglobina és mútuament excloent.

La p120-catenina interacciona pel domini juxtamembranal (JMD) [10, 11], domini essencial per l'agrupament lateral d'E-cadherina [12]. La interacció de p120-catenina amb les cadherines és independent de la de  $\beta$ -catenina i placoglobina. S'ha descrit que p120-catenina té un paper regulador de l'estabilitat d'E-cadherina (veure apartat 1.5 de la Introducció).

### **1.1.2 E-cadherina, proteïna supressora de tumors.**

El paper d'E-cadherina en la progressió del càncer ha estat un tema molt estudiat, donat que la majoria de càncers humans tenen origen epitelial. S'ha descrit àmpliament un paper de l'E-cadherina com a supressor de tumors ja que promou la disminució de la mobilitat i invasivitat cel·lular ([13], revisat a [14]). La davallada dels nivells d'E-cadherina es pot produir per varies causes:

- mutacions genètiques [15].
- repressió transcripcional per factors com Snail1 [16, 17], Slug [18], o SIP1 [19], entre d'altres.
- metilació de les illes CpG del promotor, provocant el silenciament del gen [20].
- modificacions post-transcripcionals dels complexos catenina-cadherina (veure a 1.2.2 i 1.3.2 de la Introducció).

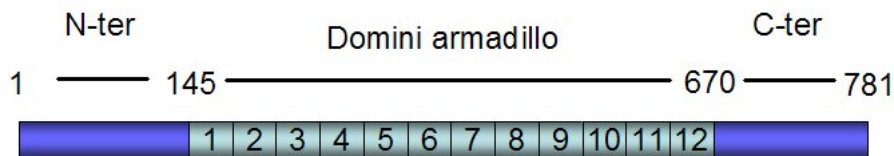
Així l'E-cadherina promou l'adhesió cel·lular pel seu paper clau en la formació de les unions adherents i atura el creixement cel·lular a través de la inhibició de la via  $\beta$ -catenina/Wnt [21]. Les cèl·lules amb expressió alta d'E-cadherina mantenen un fenotip epitelial, contrari al mesenquimal de les cèl·lules metastàsiques.

## **1.2 $\beta$ -catenina.**

La  $\beta$ -catenina va ser descrita originalment com un dels components de la cadena de proteïnes que uneixen l'E-cadherina amb el citoesquelet d'actina [5, 22]. Després, però, s'ha descobert que té un altre paper molt rellevant fora dels complexos d'adhesió com a coactivador transcripcional de la via de Wnt (ampliat a 1.2.3 de la Introducció).

### 1.2.1 Estructura de $\beta$ -catenina

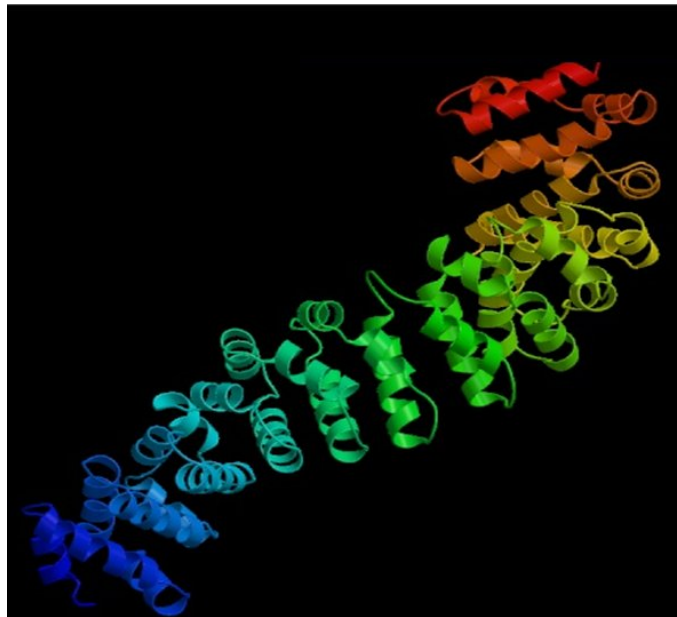
La  $\beta$ -catenina és un membre de la superfamília de proteïnes “armadillo” que consta d’una regió central amb una seqüència de 42 aminoàcids que es repeteix 12 vegades, flanquejada per dos extrems terminals (Figura 4).



**Figura 4: Esquema dels tres dominis de  $\beta$ -catenina: el domini armadillo i els extrems N- i C-terminal.**

Tot i que l’estructura cristal·logràfica de la proteïna sencera no s’ha pogut obtenir, la del domini armadillo va ser resolta el 1997 per Huber i col·laboradors (Figura 5). Es tracta d’una superhèlix de 100 Å de llarg i 35 Å de diàmetre, molt rígida i estable. Aquesta és producte de l’enrotllament de les 3 hèlices  $\alpha$  que forma cada repetició armadillo. Aquest cilindre que forma el domini armadillo està pertorbat per un gir de 50° entre la repetició 9 i la 10. Al seu interior es forma un solc carregat positivament [23], per on s’uneixen la majoria de cofactors, com l’E-cadherina [7], el producte del gen d’*adenomatous poliposis coli* (APC) [24] i *T-cell factor-4* (TCF-4) [25], de manera mútuament excloent. L’ $\alpha$ -catenina, en canvi, s’ha descrit que s’uneix a la zona de l’extrem N-terminal més propera al domini armadillo [26] (veure diagrama de les zones d’unió a la Figura 6).

Els extrems N- i C-terminals són molt més curts, 150 i 100 aminoàcids respectivament, i presenten un punt isoelèctric àcid.



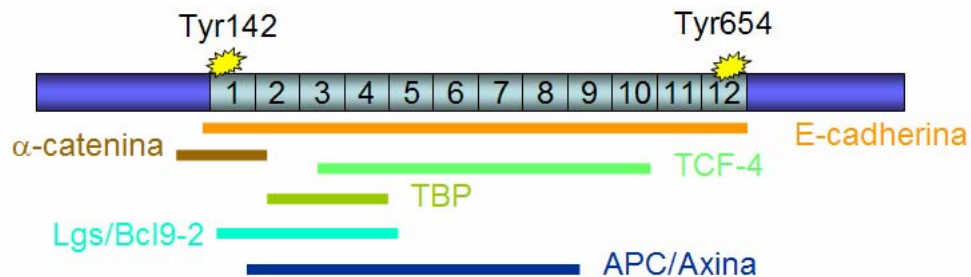
**Figura 5: Representació esquemàtica de l'estructura del domini armadillo (aà 134-671) de  $\beta$ -catenina.** Cada repetició armadillo es plega en tres hèlices  $\alpha$  que es repleguen sobre sí mateixes per formar una superhèlix. Adaptat de [23].

### 1.2.2 Regulació de la funció de $\beta$ -catenina.

La  $\beta$ -catenina pot interaccionar amb diferents cofactors selectivament pel domini armadillo sense que en variï l'estructura ni la conformació d'aquest domini. La manera com es produeix aquesta selecció de lligands per conferir-li un o altre paper és una qüestió que ajuda a comprendre una mica més la regulació de la funcionalitat d'aquesta proteïna.

Les seqüències d'APC, TCF-4 i E-cadherina que s'uneixen a  $\beta$ -catenina són acídiques i ocupen una gran superfície del solc bàsic creat per la superhèlix del domini armadillo. Els extrems terminals també tenen pI àcid. És per això que en el nostre grup es va plantejar la possibilitat que els dominis terminals poguessin interaccionar amb el domini armadillo i regular així l'accessibilitat dels diferents cofactors. Aquesta hipòtesi va ser demostrada en treballs anteriors del nostre grup que indiquen que els extrems estan interconnectats i interaccionen amb el domini central de  $\beta$ -catenina [27, 28]. La fosforilació de  $\beta$ -catenina o la unió d'un factor determinat induïx canvis conformacionals en un o els dos extrems que poden facilitar la interacció amb altres proteïnes [27, 29].

S'ha descrit àmpliament en el grup que la fosforilació en tirosines regula l'afinitat de  $\beta$ -catenina pels seus cofactors. Això és degut a que les càrregues negatives introduïdes, o bé modifiquen directament la unió dels lligands, o bé alteren la disposició dels extrems sobre el domini armadillo.



**Figura 6: Diagrama de les zones per les que  $\beta$ -catenina interacciona amb els seus cofactors.** També es mostren les tirosines 142 i 654, responsables de la regulació de la interacció amb  $\alpha$ -catenina i Bcl9-2, E-cadherina i TBP.

S'ha identificat en el nostre grup que la tirosina 654 de  $\beta$ -catenina es fosforila per EGFR o Src impedit la unió amb l'E-cadherina [30] (Figura 6). Aquesta fosforilació té lloc de manera molt dinàmica i regula la funcionalitat de les unions adherents.

També s'ha identificat en el nostre grup que la fosforilació en la tirosina 142 per les quinases Fyn, Fer o c-Met inhibeix la unió d' $\alpha$ -catenina [31]. Aquesta fosforilació té un caràcter més irreversible i promou la translocació al nucli. S'havia postulat que es produïa un canvi a l'alça de l'afinitat per Bcl9-2, un cofactor que sembla necessari per estabilitzar la  $\beta$ -catenina al nucli. Això suposava que la fosforilació d'aquesta tirosina és rellevant per induir el *switch* de la  $\beta$ -catenina entre les unions adherents i el nucli [32]. Així, la  $\beta$ -catenina desfosforilada en la tirosina 142 seria principalment un element de les unions adherents, mentre que la fosforilada, un coactivador transcripcional al nucli. Recentment, però, s'ha cristal·litzat el complex format per  $\beta$ -catenina i Bcl9 i s'ha vist que la tirosina 142 no intervé directament en aquesta interacció [33]. Aquesta discrepància es podria deure a la diferència en la metodologia

utilitzada, mentre el grup de Birchmeier va realitzar immunoprecipitacions i assaigs de *Pull-down*, el de Xu traduï les proteïnes *in vitro* en un assaig d'interacció directa, evitant qualsevol tipus de modificació posterior.

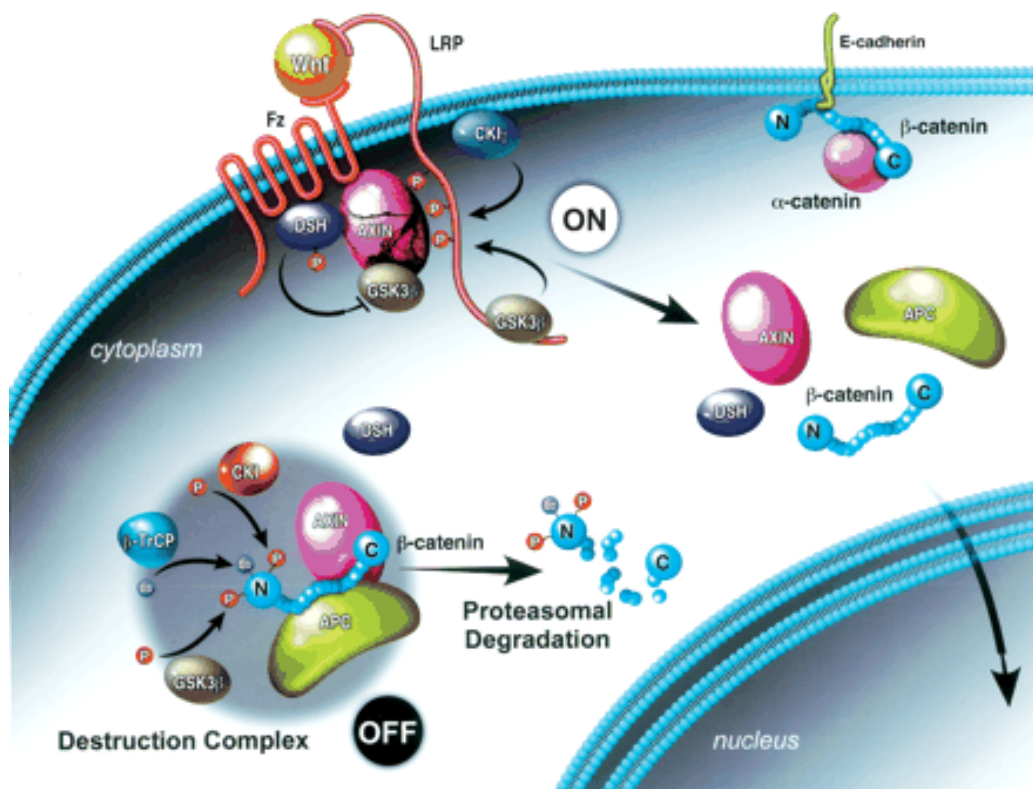
Estudis previs d'altres grups han descrit que la fosforilació en serines i treonines de  $\beta$ -catenina per CKII regula la interacció amb  $\alpha$ -catenina, a més d'estabilitzar-la, conferint a aquesta quinasa un paper pro-epitelial [34].

Com ja s'ha dit, la integritat de les unions adherents depèn en gran part de l'estat de fosforilació en tirosines de  $\beta$ -catenina. Això fa que les fosfatases encarregades de tornar-la a l'estat desfosforilat promoguin un fenotip més adhesiu. Mentre que la desfosforilació de la tirosina 654 està descrit que es porta a terme per fosfatases com PTP1-B o LMW-PTP, la responsable de la desfosforilació de la tirosina 142 no s'ha descrit encara [35]. S'estan realitzant molts estudis en aquest sentit per tal d'identificar quines fosfatases regulen aquest *switch* de la  $\beta$ -catenina d'una funció com a coactivador de la transcripció a una funció d'adhesió.

### **1.2.3 $\beta$ -catenina com a transductor de senyals de la via de Wnt.**

Les vies de Wnt tenen un paper essencial durant el desenvolupament dels organismes [36, 37]. D'entre totes, la via de  $\beta$ -catenina/Wnt és la més conservada entre espècies i a la que s'han dedicat més treballs degut a la seva implicació en la regulació de gens importants per la progressió del càncer (revisat a [38]).

L'activació de la via de  $\beta$ -catenina/Wnt comporta l'estabilització dels nivells de la  $\beta$ -catenina citosòlica a través de la inhibició del complex que la degrada, format per APC, Axina, CKI $\alpha$  i GSK3 $\beta$ . L'Axina fa de bastida perquè APC uneixi la fracció de  $\beta$ -catenina no associada als complexos d'adhesió. Aquesta unió permet que la CKI $\alpha$  fosforili la  $\beta$ -catenina en la serina 45 i la GSK3 $\beta$ , unida a Axina, la fosforili seqüencialment en la treonina 41 i les serines 37 i 33 [39]. El complex SCF, que conté la lligasa d'ubiquitines  $\beta$ Tr-CP, la reconeix, un cop fosforilada, i la marca per ser degradada pel proteasoma [40] (part inferior esquerra de la Figura 7).



**Figura 7:** L'activació de la senyalització per Wnt provoca l'estabilització de la  $\beta$ -catenina i l'activació de la transcripció de la ruta  $\beta$ -catenina/Wnt. Quan la cèl·lula no rep senyalització de Wnt, la  $\beta$ -catenina citosòlica es degrada (**OFF**). En canvi, si el lligand Wnt interacciona amb els receptors Frizzled i LRP6 (**ON**), s'estabilitzen els nivells de  $\beta$ -catenina perquè l'Axina s'uneix al domini intracel·lular de LRP6, deixant de formar part del complex de degradació de la  $\beta$ -catenina. Llavors,  $\beta$ -catenina entra al nucli on interacciona amb altres coactivadors transcripcionals. Adaptat de [41].

Així doncs, quan la cèl·lula rep la senyalització de Wnt, s'activen dos receptors de membrana: Frizzled i LRP6 (part superior de la Figura 7). Llavors la CK1 $\gamma$  i la GSK3 fosforilen zones riques en serines i prolines del domini citoplasmàtic de LRP6, incrementant la seva afinitat per l'Axina. L'axina deixa de formar part del complex  $\beta$ -catenina-APC, impedit la fosforilació de la  $\beta$ -catenina ([42-45] i revisat a [41, 46, 47]). Llavors, la  $\beta$ -catenina citosòlica ara estabilitzada pot entrar al nucli en un procés que no depèn de la maquinària d'importines [48]. La interacció amb Bcl9-2 y Pygopus (legless i pygo en *Drosophila*) facilita l'acumulació de  $\beta$ -catenina al nucli. Bcl9-2 li proporciona el

senyal de localització nuclear (NLS) i Pygopus l'ancora a dins [32, 49]. Un cop dins del nucli,  $\beta$ -catenina s'uneix als factors de transcripció de la família de TCF/LEF, desplaçant el repressor Groucho [50-52], i activant la transcripció de gens implicats en la progressió del cicle cel·lular (ciclinaD1 [53, 54], c-Myc [55]), en migració i capacitat invasiva (MMP [56] i uPAR [57]) i en l'adhesió (ephB [58]), entre d'altres.

Existeixen altres mecanismes de control de la via  $\beta$ -catenina/Wnt, com és el cas d'ICAT. Aquesta petita molècula s'uneix a la fracció lliure de  $\beta$ -catenina i competeix amb TCF-4 per interaccionar-hi. En canvi, no competeix amb APC. Es proposa, doncs, que ICAT inhibeix la via de  $\beta$ -catenina/Wnt en les cèl·lules intestinals madures, tamponant els nivells de  $\beta$ -catenina citosòlica [59].

En general, en els enteròcits la quantitat de  $\beta$ -catenina lliure en el citosol, i també la detectada a nucli, és molt baixa degut a la seva ràpida degradació. L'aparició de mutacions en el gen d'APC en la majoria dels tumors de colon (el 85%) impedeix la degradació de la proteïna lliure i per tant facilita que la  $\beta$ -catenina que s'allibera de les unions adherents transloqui al nucli i activi la transcripció de gens essencials pel desenvolupament dels tumors [60]. S'ha descrit que la via de  $\beta$ -catenina/TCF-4 és l'encarregada del manteniment del fenotip indiferenciat i proliferatiu de les cèl·lules de les criptes al tracte intestinal [61]. Es manté la idea, doncs, que aquesta via té un paper clau en la iniciació i progressió del càncer de colon.

$\beta$ -catenina és capaç d'unir-se a altres factors nuclears com els factors de transcripció de la família de Sox [62], deacetilases d'histones [63], *TATA-box Binding Protein* (TBP) [64], *CREB binding protein* (CBP) [65], components de la maquinària remodeladora de cromatina SWI/SNF [66], entre d'altres, per actuar com a coactivador transcripcional.

### 1.3 Placoglobina.

Una altra proteïna particularment rellevant en l'activació de gens sensibles a  $\beta$ -catenina és la placoglobina, també coneguda com  $\gamma$ -catenina. És una proteïna homòloga a  $\beta$ -catenina [67] i comparteixen molta similitud estructural

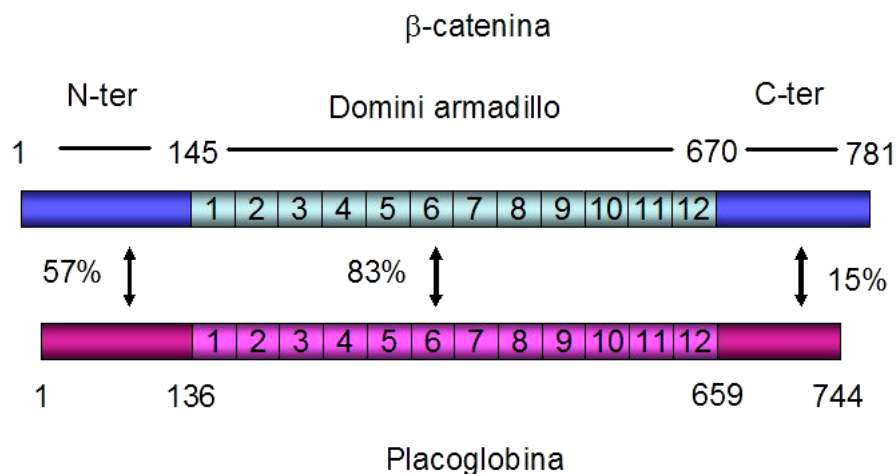


ja que també consta de 12 repeticions armadillo en un domini central, i dos extrems terminals. Va ser descrita inicialment com una proteïna associada als desmosomes [68]. Aquest tipus d'unions intercel·lulars posa en contacte cèl·lules veïnes amb els filaments intermedis i estableixen punts adhesius estrets que contribueixen a la integritat mecànica i resistència dels teixits. En aquest cas, les cadherines desmosòmiques (desmogleïna i desmocolina) s'uneixen a les proteïnes amb domini armadillo (desmoplaquina i placoglobina), i aquestes a les plaquines, essent aquestes el vincle directe amb el citoesquelet.

Se sap que la placoglobina, en alguns casos, pot formar part de les unions adherents, substituint a la  $\beta$ -catenina [69].

### 1.3.1 Estructura de placoglobina, similituds i diferències amb $\beta$ -catenina.

Tot i que l'estructura de la placoglobina no s'ha resolt, l'alt grau d'homologia (fins al 83%) que comparteix el domini armadillo de placoglobina amb el de  $\beta$ -catenina fa pensar que l'estructura serà molt similar. Cal remarcar que aquesta homologia no es conserva als extrems terminals d'ambdues proteïnes, essent només del 15% en el C-terminal (Figura 8).



**Figura 8: Esquema dels diferents dominis de  $\beta$ -catenina i placoglobina.** Mentre que els dominis armadillo conserven un alt grau d'homologia seqüencial, aquesta es perd als extrems terminals.

La similitud que comparteixen  $\beta$ -catenina i placoglobina fa que aquesta pugui substituir-la en les unions adherents, unint-se a E-cadherina i  $\alpha$ -catenina. En canvi, només s'ha trobat  $\beta$ -catenina en els desmosomes en condicions extremes, en epidermis de ratolí *knock out* per placoglobina [70].

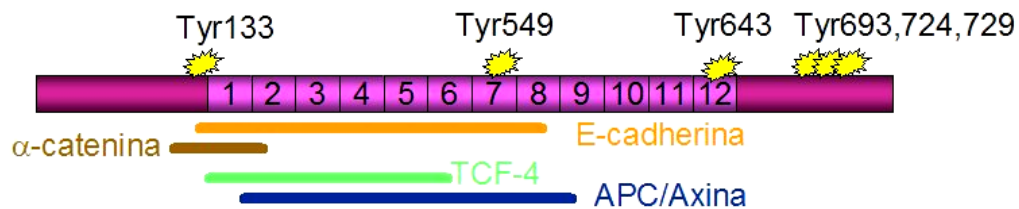
La placoglobina també pot unir els factors de transcripció de la família LEF/TCF [71, 72], tot i que la seva funció en aquesta via de senyalització no és tan clara com la de  $\beta$ -catenina. En ratolins *knock out* per placoglobina hi ha una mortalitat embrionària en estadis molt inicials del desenvolupament per anomalies estructurals cardíaques degudes a la falta de formació de desmosomes [73, 74]. El fenotip és molt diferent al causat per la falta de  $\beta$ -catenina, en el que es produeix una incapacitat de formació d'estructures dorsals [37]. Així doncs, la placoglobina té un paper diferent al de la  $\beta$ -catenina en el desenvolupament embrionari.

Assaigs fets amb la placoglobina han evidenciat que, malgrat la seva similitud amb la  $\beta$ -catenina, funciona de manera diferent: interfereix per exemple en la seva funció com a coactivador transcripcional. Estudis del nostre grup han descrit que  $\beta$ -catenina i placoglobina es poden unir simultàniament a TCF-4, però per dos dominis diferents i adjacents. També s'ha determinat que aquest complex ternari no té capacitat d'unir-se al DNA, quedant així abolida l'activitat transcripcional dependent de  $\beta$ -catenina/TCF-4 [75]. Placoglobina estaria, doncs, inhibint la via de  $\beta$ -catenina/Wnt, prevenint l'activació per  $\beta$ -catenina de gens implicats en la tumorigènesi. A favor del paper supressor de tumors, s'ha vist que la placoglobina està deplecionada en molts tumors epitelials [76, 77] i que, si se sobreexpressa en cèl·lules transformades, en disminueix la tumorigenicitat [78]. En canvi, altres autors han descrit un paper d'activador transcripcional de la via de Wnt [79]. Però com els *knock out* per placoglobina manquen de fenotip clàssic d'inactivació de la via de Wnt, és possible que aquesta activació de gens de la via de Wnt sigui per motius secundaris a la sobreexpressió de placoglobina. Aquests poden ser l'estabilització de  $\beta$ -catenina, ja que placoglobina es degrada pel mateix complex [80-82], o la substitució de  $\beta$ -catenina a les unions adherents per placoglobina, incrementant així els nivells nuclears de  $\beta$ -catenina.

Aquest paper de placoglobina com efector negatiu de la ruta de  $\beta$ -catenina/TCF-4 ha estat corroborat per dades del nostre laboratori que indiquen que factors que augmenten la unió de placoglobina a TCF-4, com la Presenilina-1, es comporten com a inhibidors de la via [83].

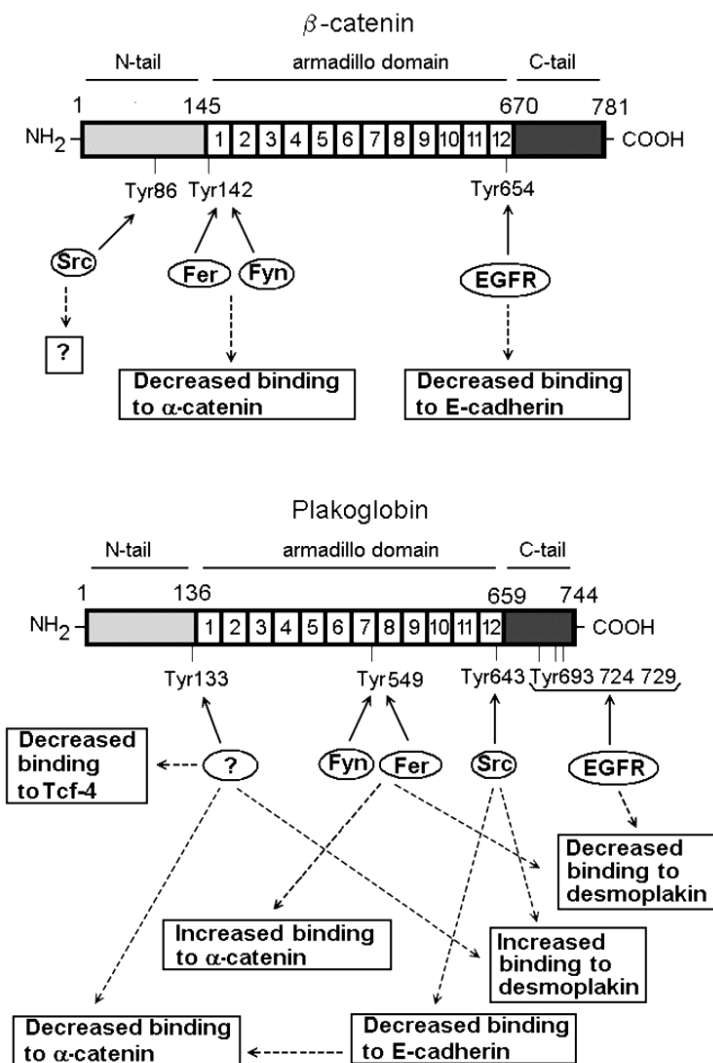
### 1.3.2 Regulació de la funcionalitat de placoglobina.

Tot i l'alt grau d'homologia que comparteix placoglobina amb  $\beta$ -catenina, aquestes exerceixen papers molt diferents.  $\beta$ -catenina és un oncogen ja que és un activador de la via  $\beta$ -catenina/Wnt, en canvi la placoglobina en el nucli tindria un paper supressor de tumors.



**Figura 9: Representació esquemàtica de la placoglobina, amb els residus tirosina que regulen la interacció amb els seus cofactors.** Es mostren també els dominis pels que interacciona amb els seus lligands.

Tal i com s'ha descrit per  $\beta$ -catenina, la placoglobina també es regula per un mecanisme post-transcripcional basat en la fosforilació i desfosforilació de residus tirosina [84]. El més destacable d'aquest mecanisme és que les mateixes quinases no fosforilen les tirosines homòlogues en les dues proteïnes. La Figura 9 mostra la localització dels residus tirosina implicats en aquesta regulació.



**Figura 10: Esquema on es mostren les fosforilacions que regulen la funcionalitat de placoglobina comparades amb les de  $\beta$ -catenina.** Es marquen amb signes d'interrogació els efectes o les quinases encara desconeguts. Adaptat de [84].

Així la fosforilació en la tirosina 643 de placoglobina, homòloga a la 654 de  $\beta$ -catenina, tot i que es fosforila per una quinasa diferent, provoca en totes dues la disminució de la interacció amb E-cadherina. El mateix ocorre amb la tirosina 133, homòloga a la 142 de  $\beta$ -catenina. Es fosforila per quinases diferents i provoca en tots dos casos una davallada de la interacció amb  $\alpha$ -catenina. La resta d'efectes (esquematzats a la Figura 10) porta a concloure que, tot i que la regulació per fosforilació en tirosines de placoglobina és similar en essència al de  $\beta$ -catenina, difereix en la finalitat. Mentre que en el cas de la  $\beta$ -catenina

regula el canvi entre el paper estructural a la membrana plasmàtica i el transcripcional al nucli, en placoglobina regula el canvi de localització entre les unions adherents i els desmosomes.

Així doncs, la placoglobina i la  $\beta$ -catenina comparteixen un alt grau d'homologia seqüencial i estructural però exerceixen tasques molt diferents tant en el seu paper estructural com transcripcional. Descobrir quin és el mecanisme que regula l'especificitat d'unió a factors d'aquestes dues proteïnes és un dels objectius principals de la primera part d'aquest treball.

#### 1.4 $\alpha$ -catenina.

L' $\alpha$ -catenina és la proteïna que proporciona a les unions adherents el vincle amb el citoesquelet d'actina. Lluny de la concepció estàtica de que és el vincle directe entre la  $\beta$ -catenina i l'actina, cada cop s'accepta més una teoria dinàmica d'unió indirecta a través de proteïnes associades a l'actina, com EPLIN [85] que implica la remodelació del citoesquelet [86-89]. En solució forma homodímers que es dissocien per unir-se a  $\beta$ -catenina o placoglobina pel seu domini N-terminal [26, 90]. També interacciona amb RhoA, de la família de les petites GTPases de membrana [91], apropant-la a l'entorn de les unions adherents.

L' $\alpha$ -catenina competeix amb els coactivadors transcripcionals per la unió a  $\beta$ -catenina, és per això que se l'ha considerat supressora de tumors [92].

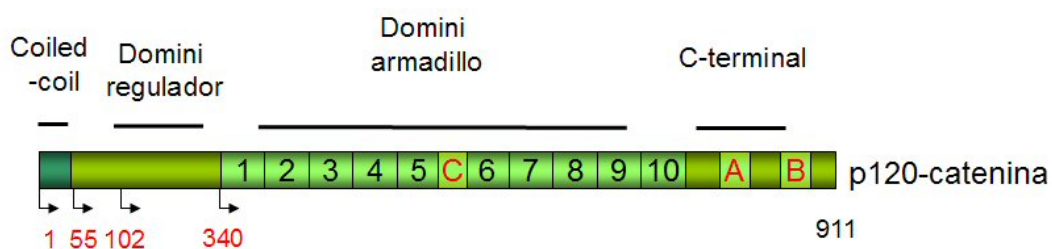
Té un paper essencial en el desenvolupament, ja que els ratolins *knock out* per  $\alpha$ -catenina moren en fase de blastocist [93]. També té implicacions en la tumorigènesi ja que l'ablació condicional d' $\alpha$ -catenina provoca en la pell símptomes característics de carcinoma de cèl·lules escamoses. Quan es va analitzar la causa de la hiperproliferació es va veure que era deguda a una activitat augmentada de Ras i MAPK [94] i de NF- $\kappa$ B [95]. Així podem dir que  $\alpha$ -catenina té, com la resta de catenines, altres funcions apart de l'estrictament estructural en les unions adherents.

## 1.5 p120-catenina.

p120-catenina es va descriure inicialment com a substrat de la quinasa v-Src [96] i d'altres receptors quinasa com els de EGF, PDGF i CSF-1 [97]. Pel que fa a la seva funció es va observar que formava part dels complexos de les unions adherents [98, 99] i que, com la resta de factors de les unions adherents, està implicada en molts fenòmens de transducció de senyals (adhesió, mobilitat, morfologia i creixement cel·lular (revisat a [100]).

### 1.5.1 Estructura de p120-catenina, cosina llunyana de $\beta$ -catenina i placoglobina.

La p120-catenina és una proteïna que conserva homologia estructural, però no de seqüència, amb  $\beta$ -catenina i placoglobina. Consta d'un domini central amb 10 repeticions armadillo i dos extrems terminals. S'ha descrit que l'extrem N-terminal conté molts residus tirosina, serina i treonina fosforilables que controlen la seva activitat, és per això que se l'ha anomenat domini regulador [30, 101].



**Figura 11: Esquema de l'estructura de p120-catenina.** Les fletxes indiquen els diferents inicis de transcripció. En vermell es detalla el nombre d'aminoàcid pel que comença cada isoforma (1, 2, 3 i 4, respectivament). Es marquen també els exons A, B i C sotmesos a *splicing* alternatiu.

Existeixen moltes isoformes de p120-catenina resultants del *splicing* alternatiu del producte del mateix gen i de l'existència de quatre inicis de transcripció (Figura 11) [102], donant lloc a les isoformes 1, 2, 3 i 4. L'expressió d'una o altra isoforma depèn del teixit i es postula que interaccionen de manera

diferent amb els seus cofactors [103]. En teixits epitelials es troba majoritàriament la isoforma 3A, associada a un fenotip més sèssil, mentre que els fibroblasts i macròfags expressen les formes més llargues, com la 1A. La forma 4, s'expressa rarament i proporciona a la cèl·lula un fenotip molt estable [104]. Això suggereix que l'extrem N-terminal té un paper molt important en aquest mecanisme regulador. El domini *coiled-coil* està present només en la isoforma 1, i es creu que pot tenir una funció important en el reclutament de proteïnes, conferint propietats específiques a aquesta isoforma.

### 1.5.2 Funcions de p120-catenina

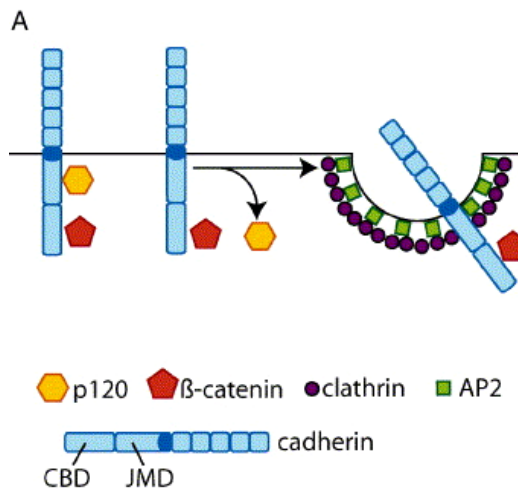
La presència o absència dels exons A, B o C i la llargada de l'extrem N-terminal determinaran les interaccions que formi la p120-catenina, regulant la funcionalitat de la proteïna.

S'ha descrit que la p120-catenina es reparteix majoritàriament entre tres compartiments subcel·lulars:

- l'associat a l'E-cadherina a la membrana, on regula la seva estabilitat, apropa quinases i fosfatases a les unions adherents i regula l'activació de la GTPasa RhoA.
- el citosòlic, associat a la regulació directa de l'activitat de RhoA, i indirecta de Rac1 i Cdc42.
- el nuclear, vinculat a la regulació del repressor transcripcional Kaiso.

#### 1.5.2.1 Estabilització de cadherines a la membrana.

En teixits epitelials, s'ha descrit que la p120-catenina associada al domini juxtamembranal de les cadherines n'augmenta la vida mitja evitant la internalització i degradació lisosòmica. Els mecanismes utilitzats són diversos, des d'ocultar motius d'internalització del domini citosòlic de les cadherines (Figura 12) fins a la regulació de l'activitat de les Rho-GTPases (revisats a [105]).



**Figura 12: Esquema d'una de les hipòtesis que es plantegen a Xiao et al. 2007 [105] per explicar l'estabilització de les cadherines per p120-catenina.** La  $\beta$ -catenina s'uneix al domini d'unió a catenines (CBD) i la p120-catenina al domini juxtamembrana (JMD), impedit la internalització depenent de clatrina.

L'estabilització de l'E-cadherina a la membrana provoca indirectament el manteniment de  $\beta$ -catenina transcripcionalment inactiva a les unions adherents. Per tant p120-catenina facilita de manera indirecta, i segons el tipus cel·lular estudiat, la localització de  $\beta$ -catenina als complexos d'adhesió.

La fosforilació en tirosines de p120-catenina per diferents quinases augmenta l'afinitat per l'E-cadherina [106-108]. Existeix, per tant, un mecanisme de regulació de la funcionalitat de p120-catenina per fosforilació de tirosines de l'extrem N-terminal.

#### 1.5.2.2 Acobladora de quinases i fosfatases.

D'entre els papers que s'han descrit per p120-catenina a les unions adherents podem destacar el d'acobladora de quinases. S'ha descrit que Fer, Fyn i Yes (activada) s'uneixen al domini N-terminal de p120-catenina. Yes activa Fer i Fyn i aquestes tenen activitat per la tirosina 142 de la  $\beta$ -catenina, que en ser modificada perd la interacció amb  $\alpha$ -catenina [31]. p120-catenina unida a E-cadherina apropa les quinases al complex de les unions adherents per tal que per exemple fosforilin la tirosina 142 de  $\beta$ -catenina.



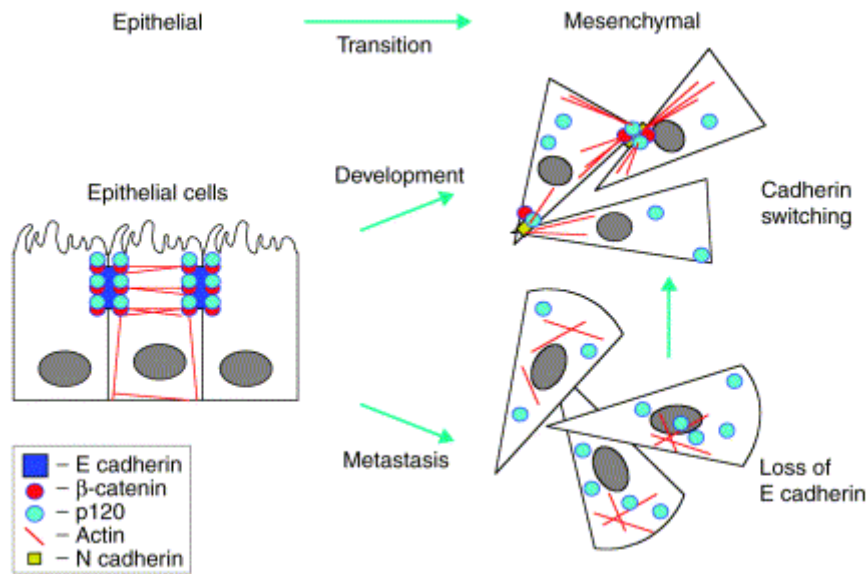
D'altra banda s'ha descrit que la presència de Fer activada unida a p120-catenina és essencial pel manteniment de les unions intercel·lulars en fibroblasts embrionaris ja que activa la PTP1B unida a N-cadherina, encarregada de desfosforilar la tirosina 654 de  $\beta$ -catenina [109]. És per això que cal recordar que l'estabilitat de les unions adherents és un fenomen regulat molt finament per diferents proteïnes i modificacions post-transcripcionals i s'ha de tenir en compte sempre el context cel·lular en què es troben.

#### 1.5.2.3 Reguladora de la funcionalitat de les Rho-GTPases.

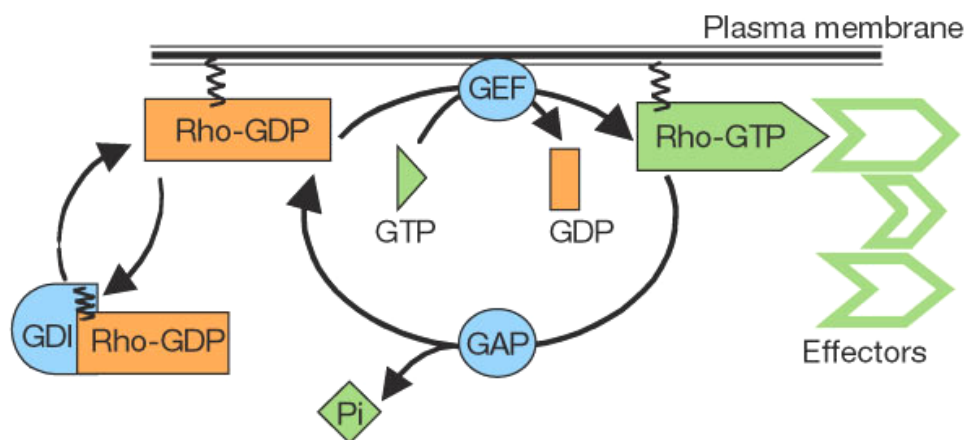
p120-catenina regula el nexa entre les cadherines i el citoesquelet inhibint l'activitat de RhoA [110, 111] i activant la de Rac1 i Cdc42 [112].

Mitjançant la regulació de les GTPases, la p120-catenina controla aspectes tan remarcables com la mobilitat cel·lular i la reorganització del citoesquelet d'actina. Un dels fets més rellevants és que l'intercanvi de p120-catenina entre el citosol i la membrana controla aquesta activitat: en estat confluent p120-catenina localitza preferentment a la membrana i promou un fenotip menys mòbil. Quan se sobreexpressa p120-catenina n'augmenten els seus nivells citosòlics i en conseqüència es produeixen canvis morfològics deguts a la regulació de les Rho-GTPases [113]. Per contra, si se sobreexpressa E-cadherina a la vegada aquests efectes es contraresten. Això és degut a que l'E-cadherina ectòpica segresta p120-catenina a la membrana on ja no pot regular de la mateixa manera l'activitat de les GTPases, afectant el balanç entre fenotip mòbil i sèssil.

En el cas de les cèl·lules mesenquimals, com que N-cadherina uneix p120-catenina amb menys afinitat que E-cadherina, la quantitat de p120-catenina lliure al citosol és major, explicant les diferències de mobilitat entre les cèl·lules epitelials, amb E-cadherina, i les fibroblàstiques, amb N-cadherina (Figura 13).



**Figura 13: La presència de p120-catenina al citosol per l'absència d'E-cadherina regula el citoesquelet d'actina i la mobilitat cel·lular.** N-cadherina no uneix amb tanta afinitat p120-catenina i no la reté a la membrana tan eficientment. De [113].



**Figura 14: Esquema del funcionament de les Rho-GTPases.** L'estat d'activació de la GTPasa depèn de les GEF, GAP i GDI, que activen l'intercanvi GDP-GTP, activen la hidròlisi i inhibeixen la unió a GTP, respectivament. Adaptat de [2].

La funcionalitat de les GTPases de la família Rho es modifica controlant la unió a GTP o GDP, que provoca l'estat actiu o inactiu, respectivament. Aquesta unió es regula per tres tipus de proteïnes (Figura 14):

- GEF (*Guanidine Exchange Factors*) que faciliten l'intercanvi entre GDP i GTP.
- GAP (*GTPase Activating Proteins*) que promouen l'activitat GTPasa i així funcionen de terminadores del senyal.
- GDI (*Guanin nucleotide Dissociation Inhibitors*) que inhibeixen la dissociació del GDP, mantenint-les en estat inactiu.

#### 1.5.2.3.1 RhoA

L'any 1996 Reynolds i col·laboradors van descriure que la sobreexpressió de p120-catenina provoca *branching* en fibroblasts (fenotip arboritzat) [11]. Després es va descriure que aquest fenotip era degut a la forta inhibició que p120-catenina exercia sobre l'activitat de RhoA en el citosol .

Estudis d'interacció *in vitro* del nostre laboratori han demostrat que RhoA s'uneix a l'extrem N-terminal de p120-catenina entre els aminoàcids 100 i 230 i que la p120-catenina té una afinitat molt més alta per la forma inactiva de RhoA [108]. La p120-catenina al citosol actua de GDI de RhoA mantenint-la en el seu estat inactiu, mentre que la RhoA unida a la p120-catenina de les membranes pot ser activada [110]. Quan p120-catenina està a la membrana pot ser fosforilada a la tirosina 112 per Fyn i perd afinitat per RhoA. En canvi, altres fosforilacions de p120-catenina a la membrana, en les tirosines 217 i 228, augmenten l'afinitat per RhoA. Existeix doncs un mecanisme de regulació post-transcripcional per p120-catenina de l'activitat de RhoA [108].

#### 1.5.2.3.2 Rac1 i Cdc42

Segons el context cel·lular aquestes dues GTPases poden activar efectors diferents i, per tant, diferents respostes [114]. Per exemple, Rac1 promou l'adhesió d'una manera independent de Fosfatidil Inositol-3 Quinasa (PI-3K), però promou la formació de lamel·lipodis, reestructurant el citoesquelet d'actina, de manera dependent d'aquesta quinasa.

Es creu, també, que l'activació d'aquestes GTPases per p120-catenina es du a terme de manera indirecta reclutant una Rho-GEF, Vav2. Aquesta seria l'encarregada de promoure l'intercanvi de GDP per GTP i activar-les [111]. Per

això la regulació de Rac1 i Cdc42 per p120-catenina no és tan clara com la de RhoA.

S'ha de tenir en compte la regulació creuada que existeix entre les 3 GTPases, ja que s'ha descrit que en determinats contextos cel·lulars Rac1 i Cdc42 poden inhibir l'activitat de RhoA [115] i que RhoA pot estar actuant sobre l'activitat de Rac1 [116]. Així s'obre un nou ventall de possibilitats de regulació entre elles i les seves GEFs, GAPs i GDIs.

### 1.5.2.4 Regulació de la malignitat tumoral a través de la interacció amb les cadherines i la regulació de l'activitat de les GTPases.

La pèrdua d'expressió d'E-cadherina és un marcador de malignitat tumoral. Quan una cèl·lula tumoral deixa d'expressar-la guanya invasivitat i malignitat, produint-se la transició epiteli-mesènquima (EMT). S'ha descrit que en tumors de colon i mama, p120-catenina localitza a citosol, perdent la localització perimembranal habitual. Aquest tret és un marcador de prognosi tumoral dolenta [117, 118]. També s'ha observat que, en aquest context de falta d'E-cadherina i presència de N-cadherina, p120-catenina regula la mobilitat cel·lular i promou un fenotip mesenquimal a través de la regulació dels nivells de cadherines mesenquimals, l'activació de Rac1 a la membrana i la inhibició de RhoA al citosol [119, 120]. Així, podem dir que la p120-catenina regula la mobilitat cel·lular, inhibint-la en presència de cadherines epitelials i promovent-la en presència de cadherines mesenquimals (Figura 13), tenint sempre en compte el nivell d'activació prèvia de les GTPases de la cèl·lula.

### 1.5.2.5 Reguladora de la transcripció gènica.

S'ha trobat p120-catenina de forma minoritària al nucli interaccionant amb el factor de transcripció Kaiso [121]. Existeix controvèrsia en el control del tràfic citosol-nucli de p120-catenina. S'ha postulat que està regulat per la seqüència NLS del domini armadillo, entre la repetició 6 i la 7 [122]. També s'ha vist, però, que les repeticions 3 a 5 d'aquest mateix domini són essencials per la localització nuclear [123]. No s'exclou la possibilitat de l'existència d'altres mecanismes de control.

Quan Kaiso no està unit a p120-catenina, pot unir-se al DNA i reprimir la transcripció de gens depenent de Wnt, com per exemple Siamois [124], Ciclina D1 [125], entre d'altres (revisat a [126]). La interacció de p120-catenina amb Kaiso impedeix la unió d'aquest al DNA, facilitant l'activació d'aquests gens.

## **2 Via de NF- $\kappa$ B.**

La via de transducció de senyals de NF- $\kappa$ B està conservada des de *Drosophila* [127] fins als humans, donant una idea de la importància de la senyalització controlada per aquests factors de transcripció. Les seves funcions són molt variades, i inclouen la regulació de la resposta immune, inflamació, apoptosi, proliferació, migració i adhesió, angiogènesi, desenvolupament, entre d'altres (revisat a [128]). La manera com una sola família de factors de transcripció regula processos tant dispars ha estat objecte d'estudi durant molts anys i els resultats obtinguts apunten que el context cel·lular i el factor activador en són les claus. A més, pel fet de controlar processos com angiogènesi, proliferació i invasivitat, altament implicats en el desenvolupament i progressió dels tumors, se'ls considera oncogens. La seva rellevància augmenta si es té en compte que altres vies potencialment oncogèniques exerceixen el seu efecte a través de l'activació de NF- $\kappa$ B, com és el cas de Ras [129-132], activat en molts càncers, inclosos els adenocarcinomes de pròstata, pàncrees, mama i colon. És per això que la via de NF- $\kappa$ B ha d'estar subjecta a una regulació finíssima que impedeixi la seva activació aberrant. En aquest apartat s'intenten explicar les generalitats del mecanisme de regulació i com les modificacions en aquesta via poden afectar l'homeostasi de la cèl·lula provocant estats d'inflamació crònica o processos cancerosos, incloent la inducció de l'EMT.

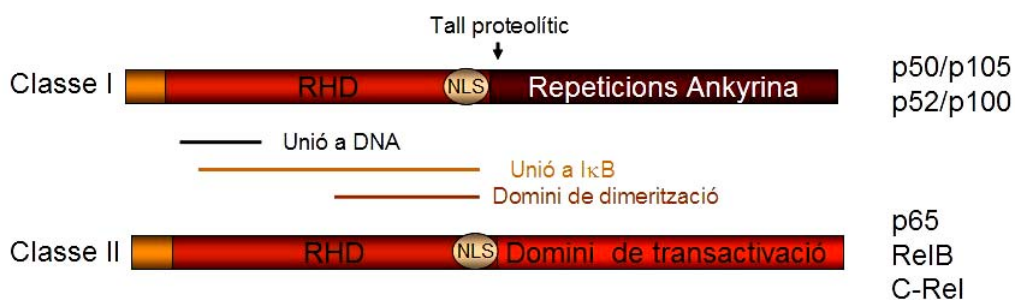
### **2.1 Components.**

Els components de la via es poden separar en tres grups, els factors de transcripció de la família Rel, els inhibidors I $\kappa$ B i els activadors IKK. A continuació es detallen les característiques dels components d'aquests grans grups.

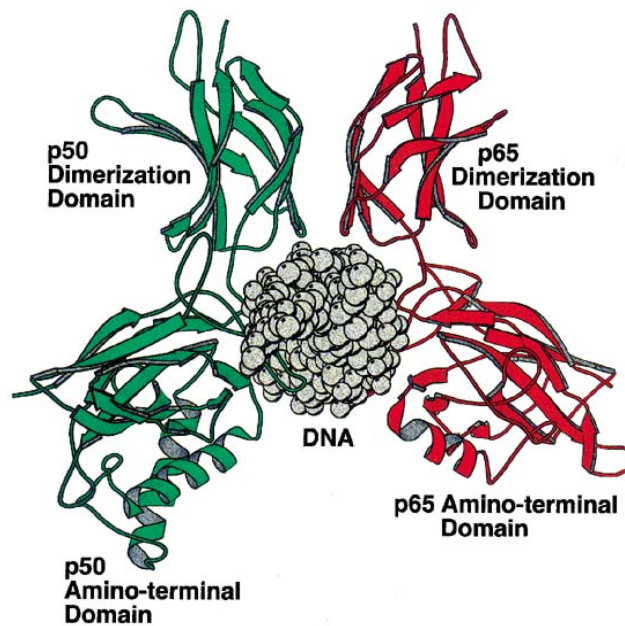
**2.1.1 Factors de transcripció, la família Rel.**

Els membres de la família Rel són els encarregats d'activar la transcripció dels gens diana de la via de NF- $\kappa$ B. Tots els seus components contenen un domini d'homologia Rel (RHD). El grup està compost per dues classes de proteïnes. A la primera hi trobem p50/p105 i p52/p100 que tenen a l'extrem carboxi-terminal un domini amb repeticions ankyrina, típiques de les molècules inhibidores I $\kappa$ B, i a la segona, p65 (RelA), c-Rel i RelB, que contenen un domini de transactivació al C-terminal (veure Figura 15)[133].

Els factors de transcripció Rel actuen en forma de homo- o heterodímers, unint-se a seqüències consens del DNA de 9-10 parells de bases, anomenades llocs  $\kappa$ B. Cada tipus de lloc  $\kappa$ B controla diferents sets de gens i és la seqüència d'aquests la que determina l'especificitat d'unió dels diferents dímers i el reclutament de la maquinària coactivadora, produint diferents efectes en la transactivació [134]. La unió dels dímers depèn, apart de la seva composició, de les modificacions post-transcripcionals d'aquests. Segons el tipus de factors que componen els dímers es parla de la via canònica de NF- $\kappa$ B (quan són p65-p50) o de la via no-canònica (p100/p52 i RelB). Normalment, quan es parla de NF- $\kappa$ B es fa esment dels dímers p65-p50.



**Figura 15: Esquema dels dominis dels factors de transcripció de la família Rel.** Els membres de les dues classe contenen un domini RHD per on dimeritzen, interaccionen amb el DNA i I $\kappa$ B $\alpha$ . Els de la classe I tenen a l'extrem C-terminal un domini inhibidor similar a les molècules I $\kappa$ B, i els de la classe II contenen un domini de transactivació.



**Figura 16:** Imatge de l'estructura secundària dels heterodímers de p50 i p65 amb el DNA. Només es mostren els RHD d'ambdues proteïnes. Adaptat de [135].

S'ha pogut obtenir l'estructura per cristal·lografia de raigs X dels complexos NF- $\kappa$ B-DNA i s'ha descrit que la unió té lloc per una zona molt àmplia de l'extrem N-terminal de p65 i p50 [136] (Figura 16). El fet que l'estructura només contingui el RHD de NF- $\kappa$ B fa impossible predir els canvis conformacionals que es produeixen a l'extrem C-terminal (on resideix el domini de transactivació de p65) quan es forma el complex amb la molècula de DNA. Les diferències en l'estructura de les seqüències  $\kappa$ B fa que els dímers que s'hi uneixen adoptin conformacions diferents i que els extrems amino-terminal adoptin posicions variables (revisat a [135]). Aquest fet confereix un grau d'especificitat a la transcripció gènica mitjançada per NF- $\kappa$ B.

Aquest estudi s'ha centrat en la subunitat p65 ja que s'ha descrit una interrelació entre la transcripció mitjançada per aquesta proteïna i la inducció i manteniment de la EMT [137-139].

### 2.1.2 I $\kappa$ B, molècules inhibidores.

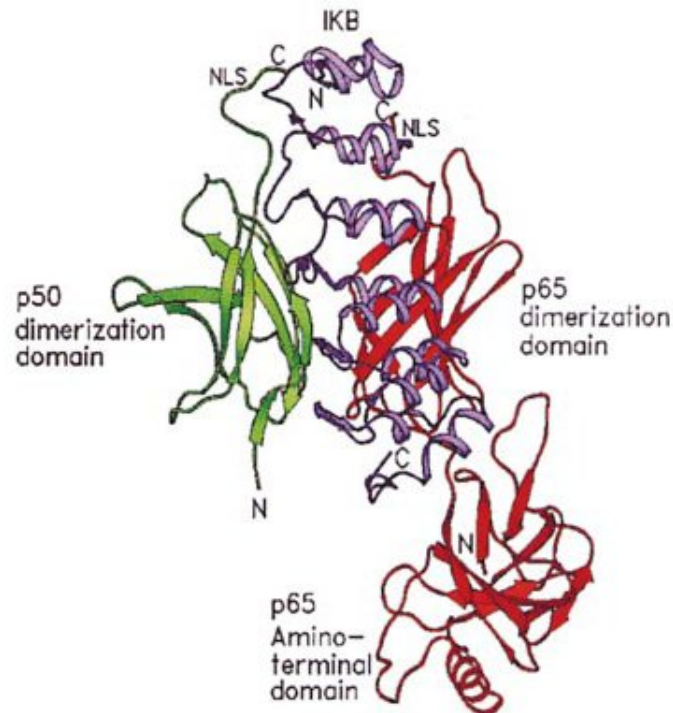
Les I $\kappa$ B són molècules inhibidores que formen complexos molt estables i de molta afinitat amb els factors de la família de Rel al citosol. Se n'han descrit fins al moment sis, I $\kappa$ B $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\varepsilon$ ,  $\zeta$ , apart de p100 i p105.

Les proteïnes I $\kappa$ B contenen sis repeticions de tipus ankyrina per les que interaccionen amb l'extrem N-terminal dels factors de transcripció Rel i dues seqüències d'export nuclear (NES) que provoquen una ràpida expulsió del nucli dels complexos NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B [140-142].

El cas de p105 i p100, els precursors de p50 i p52, és especial. L'extrem C-terminal es plega sobre la resta de la molècula, simulant la forma que prenen les proteïnes de la família Rel unides a I $\kappa$ B, impedit la formació de dímers. Són per tant molècules inactives. Aquest domini C-terminal inhibidor es processa per proteòlisi limitada dependent d'ubiquitines i proteasoma de manera constitutiva [143, 144].

De les molècules de la família I $\kappa$ B la més estudiada és I $\kappa$ B $\alpha$ . En estudis de cristal·lografia per raigs X dels complexos I $\kappa$ B $\alpha$ -NF- $\kappa$ B s'ha descobert que la zona d'interacció amb el DNA i el senyal de localització nuclear (NLS) dels factors de transcripció queden coberts per I $\kappa$ B $\alpha$  de manera que no pot unir les seqüències  $\kappa$ B i el balanç entre el citosol i el nucli es decanta clarament cap al citosol (Figura 17) ([145-149] i revisat a [135]).





**Figura 17: Representació de l'estructura secundària de IκBα unit als dímers de p50 i p65.** IκBα utilitza una gran part del domini N-terminal de NF-κB per unir-s'hi, impedit la unió al DNA i promovent una localització citosòlica dels trímers. Adaptat de [145]

## 2.2 Procés d'activació de NF-κB.

Un pas essencial en l'activitat de NF-κB és la regulació de la interacció amb els inhibidors IκB, duta a terme per les IKK. Els estímuls activadors de NF-κB poden ser de molts tipus, des de citokines proinflamàtories, factors de creixement, agents que provoquen dany al DNA, fins a patògens ([128] i [www.nf-kb.org](http://www.nf-kb.org)). Aquests convergeixen en l'activació del complex multiproteic format per IKKα, β i γ (NEMO) [150]. IKKα i β són serina-quinases, conserven alta homologia entre elles i contenen dominis quinasa al N-terminal i motius *Leucine zipper* (LZ) i *Helix-loop-helix* (HLH) més cap al C-terminal [151]. IKKγ és la subunitat reguladora que integra els senyals i fa de acobladora de la reacció quinasa [152].

En la via clàssica de NF-κB, l'activació de les IKKs provoca la fosforilació de les serines 32 i 36 de IκBα per IKKβ. Aquestes serines fosforilades són el motiu

de reconeixement de la lligasa d'ubiquitines  $\beta$ TrCP i es produeix la degradació de  $I\kappa B\alpha$  pel proteasoma [153-156]. Llavors NF- $\kappa$ B és lliure per poder entrar al nucli i activar la transcripció gènica. És remarcable que un dels gens diana de la via NF- $\kappa$ B és la mateixa  $I\kappa B\alpha$ , que un cop traduïda exporta NF- $\kappa$ B del nucli en un procés depenent de CRM-1 [142, 157], creant un bucle autoregulator negatiu (revisat a [158]).

Altres estímuls, com la hipòxia, provoquen la dissociació de  $I\kappa B\alpha$  i NF- $\kappa$ B sense implicació del proteasoma per la fosforilació de la tirosina 42 de  $I\kappa B\alpha$ . S'ha proposat que aquesta fosforilació la podrien dur a terme les quinases de la família de Src o la PI3K [159].

Moltes evidències posen de manifest que la regulació de la transcripció gènica mitjançada per NF- $\kappa$ B està regulada d'una manera molt més complexa que la simple entrada/sortida de nucli, involucrant altres processos com la fosforilació o acetilació (entre d'altres) de les subunitats transactivadores, com p65 (revisat a [160, 161]). Dins d'aquest capítol de mecanismes de regulació, s'ha descrit que les IKKs, apart de marcar  $I\kappa B\alpha$  per la degradació, també activen p65 per fosforilació directa. Aquest tema es tracta més a fons a l'Apartat 2.3.1 de la Introducció.

També s'ha descrit un paper nuclear per les IKKs. Un exemple és el descrit per  $IKK\alpha$ , que mitjançant la fosforilació d'histones (H3), promou la transcripció depenent dels llocs  $\kappa$ B [162].

### **2.3 Regulació de l'activitat.**

Tot el ventall d'estímuls que poden activar la via de NF- $\kappa$ B fa servir diferents cascades intracel·lulars per activar la transcripció de gens depenent de NF- $\kappa$ B. Per exemple, l'activació per TNF- $\alpha$  i per Interleukina-1 (IL-1) senyalitzen a través de diferents efectors, conferint a cada senyal especificitat per activar la transcripció d'un o altre grup de gens [163].

### 2.3.1 Activació transcripcional de p65.

Com ja s'ha esmentat, l'activació transcripcional de NF- $\kappa$ B està regulada per un mecanisme molt més complex que la simple entrada a nucli. Aquest apartat explica les modificacions post-traduccionals que s'han descrit per p65 que fan augmentar la seva activitat transcripcional.

Generalment, aquestes són serines o treonines del RHD o dels dominis de transactivació 1 i 2 (TAD) que produeixen canvis conformacionals augmentant l'afinitat per coactivadors transcripcionals i el DNA i disminuint l'afinitat per I $\kappa$ B $\alpha$  (resumides a la Taula 1). També es pot concloure dels estudis realitzats que l'efecte de les modificacions és totalment dependent del context cel·lular i de l'estímul que les ha provocat (revisat a [161]).

**Taula 1: Resum de les modificacions activadores de p65 més rellevants.**

Residu de p65	Estímul	Modificació	Enzim	Efecte	Ref.
T254	TNF	Fosforilació	?	Disminució d'interacció amb I $\kappa$ B $\alpha$ . Protecció de la degradació.	[164]
S468	TNF- $\alpha$ , IL-1, T-cell (CD3/CD28)	Fosforilació	IKK $\epsilon$ , $\beta$ , GSK3 $\beta$	Activació transcripcional	[165, 166]
S276	LPS, TNF- $\alpha$	Fosforilació	PKAc, MSK1	Augment d'interacció amb p300/CBP i DNA. Disminució d'interacció amb HDAC1.	[167, 168]
S536	TNF- $\alpha$ , IL-1, T-cell (CD3/CD28), dany al DNA	Fosforilació	IKK $\alpha$ , $\beta$ , $\epsilon$ , RSK1, TBK-1	Augment de l'activitat transcripcional, disminució de la interacció amb I $\kappa$ B $\alpha$ , localització nuclear	[169-172]
S529	TNF- $\alpha$ , IL-1	Fosforilació	CK2	Activació transcripcional	[173-175]
S311	TNF- $\alpha$	Fosforilació	PKC $\zeta$	Activació transcripcional	[176]
K218 K221 K310	TNF- $\alpha$	Acetilació	p300/CBP	Augment d'interacció amb el DNA. Disminució d'interacció amb I $\kappa$ B $\alpha$ .	[177]

Com es pot veure a la Taula 1, un altre mecanisme que activa la transcripció és l'acetilació de lisines localitzades al RHD. En aquest cas, les modificacions produïdes per p300/CBP també augmenten l'afinitat de p65 pel DNA i disminueixen la interacció amb I $\kappa$ B $\alpha$ . Hi ha estudis que descriuen una dependència dels dos processos de regulació, ja que en absència de les quinases PKAc, IKK $\alpha$  i  $\beta$  no es produeix l'acetilació per p300/CBP [178].

Hi ha estudis, però, que descriuen que la subunitat p65 no sempre té funció d'activadora transcripcional. En determinades circumstàncies pot reprimir els mateixos gens que en altres circumstàncies activa. Aquesta forma repressora s'indueix per estímuls atípics i per l'acció d'alguns supressors de tumors [179].

### **2.3.2 Inhibició o finalització de l'activitat transcripcional.**

Donada la gran rellevància dels processos controlats per la via de NF- $\kappa$ B és necessari un mecanisme de finalització del senyal. En aquest cas, trobem diferents modificacions post-transcripcionals que disminueixen l'afinitat pel DNA i pels coactivadors transcripcionals i augmenten la interacció amb I $\kappa$ B $\alpha$ , produint un ràpid export del nucli. Un exemple d'aquest tipus de regulació és la fosforilació de serines i treonines del domini de transactivació 2 (TAD2), zona per on p65 interacciona amb CBP [168] (Taula 2). L'acetilació en lisines per p300/CBP pot funcionar com a senyal terminador de la transcripció, al contrari del que s'ha descrit abans. Això es deu a que, com passa amb les fosforilacions, el context cel·lular és el factor determinant de l'efecte [180]. També es pot recórrer a la degradació de p65 per finalitzar la senyalització. Aquest és el mecanisme que involucra la treonina 505, que, quan es troba en estat fosforilat, és reconeguda juntament amb la prolina adjacent per la prolil-isomerasa Pin-1 i es converteix en un senyal perquè la lligasa d'ubiquitines SOCS-1 marqui p65 per la seva degradació via proteasoma [164]. Altres mecanismes menys estudiats com l'oxidació de residus cisteïna o la nitrosilació de tirosines també són modificacions inhibidores de la senyalització de la via de NF- $\kappa$ B [181, 182].

Taula 2: Modificacions que inhibeixen o finalitzen l'activitat de p65.

Residu de p65	Enzim	Modificació	Efecte	Ref.
T435	-	Fosforilació	Disminució de l'activitat transcripcional	[183]
S468	GSK3 $\beta$	Fosforilació	Disminució de l'activitat transcripcional	[184]
T505	Requereix Chk1	Fosforilació	Augment de la interacció amb HDAC, disminució de l'activitat transcripcional	[164, 185]
K122 K123	p300/CBP, PCAF	Acetilació	Disminució de l'activitat transcripcional	[180]
C38	-	Oxidació	Disminució de l'activitat transcripcional	[181]
Y66, Y152	Òxid nítric	Nitrosilació	Dissociació de p50 i unió a I $\kappa$ B $\alpha$	[182]
220-335	SOCS-1	Ubiquitinització	Degradació	[164]

## 2.4 Sistema immune i inflamació.

Els processos clàssicament vinculats a l'activitat de NF- $\kappa$ B són els de la immunitat adaptativa i la inflamació. En el primer procés, NF- $\kappa$ B està implicat en el desenvolupament i activació de les cèl·lules T i desenvolupament de les cèl·lules B. Es produeix l'activació de la via per patògens, senyals d'estrès, interleuquines i TNF- $\alpha$ . Quan NF- $\kappa$ B s'activa per desencadenar una resposta immune es crea un focus inflamatori degut a la natura dels mateixos gens diana que activa (citoquines proinflamatòries, factors de creixement, metal·loproteases, gens antiapoptòtics, entre d'altres). Es considera que un teixit està inflammat quan l'expressió local de quimoquines, molècules d'adhesió i citoquines proinflamatòries provoca l'atracció de leucòcits i activació de fibroblasts i cèl·lules endotelials perquè es divideixin, remodelin el teixit i produeixin nous vasos. Al lloc de la inflamació els macròfags són la major font de citoquines i factors de creixement, espècies reactives d'oxigen i nitrogen (ROS i NOS), tots ells activadors de NF- $\kappa$ B (revisat a [186, 187]).

Aquesta via és la responsable de l'inici de la inflamació a través de la translocació dels complexos p65-p50 al nucli, però també s'encarrega de finalitzar-la, aquest cop mitjançant la translocació dels complexos p50-p50-Bcl-3, que activen gens pro-apoptòtics [188].

### **2.5 Implicació de NF- $\kappa$ B en el desenvolupament i progressió del càncer.**

En cèl·lules sanes és difícil trobar els factors de transcripció de la via de NF- $\kappa$ B activats constitutivament, només s'ha descrit en cèl·lules T, B, timòcits monòcits i astròcits en estat proliferatiu. Això és degut a que, en cas que es produeix un estat inflamatiu, quan aquest ha acabat, l'expressió de gens anti-inflamatoris i pro-apoptòtics i la reversió de la vascularització tornen el teixit al seu estat normal.

Els processos d'inflamació crònica són un cas diferent ja que el teixit manté els senyals pro-inflamatoris activats durant un temps llarg i els leucòcits romanen al teixit, actius i refractaris a l'apoptosi [189]. S'ha estimat que més del 20% de càncers tenen darrere un procés inflamatori. El fet que el tractament amb antiinflamatoris no esteroïdals redueixi fins al 50% el risc de patir càncer, en el cas del càncer de colon, recolza la hipòtesi que hi ha un vincle molt directe entre aquests dos fenòmens [190]. A la Taula 3 es troba un resum dels processos tumorals més comuns associats a inflamació crònica.

Quan s'analitza l'estat de NF- $\kappa$ B en processos cancerosos i metastàtics s'ha detectat que en molts casos està activat constitutivament (revisat a [191-193]). Aquest fet és molt rellevant ja que alguns gens diana d'aquesta via són importants en la progressió d'aquests processos patogènics. Entre ells podem trobar c-Myc [194, 195], Ciclina D1 [196], enzims proteolítics (metal·loproteases (MMP), activador de plasminogen (uPA)), factors vascularitzadors (VEGF), citoquines, quimoquines i els seus receptors (revisat a [128]). Apart de la transcripció de gens pro-proliferatius, pro-angiogènics i pro-metastàtics, una altra de les propietats oncogèniques de NF- $\kappa$ B és la de bloquejar l'apoptosi induïda per TNF- $\alpha$ , mitjançant l'activació de la transcripció de gens antiapoptòtics [197-199]. Aquest canvi en la sensibilitat a la mort cel·lular

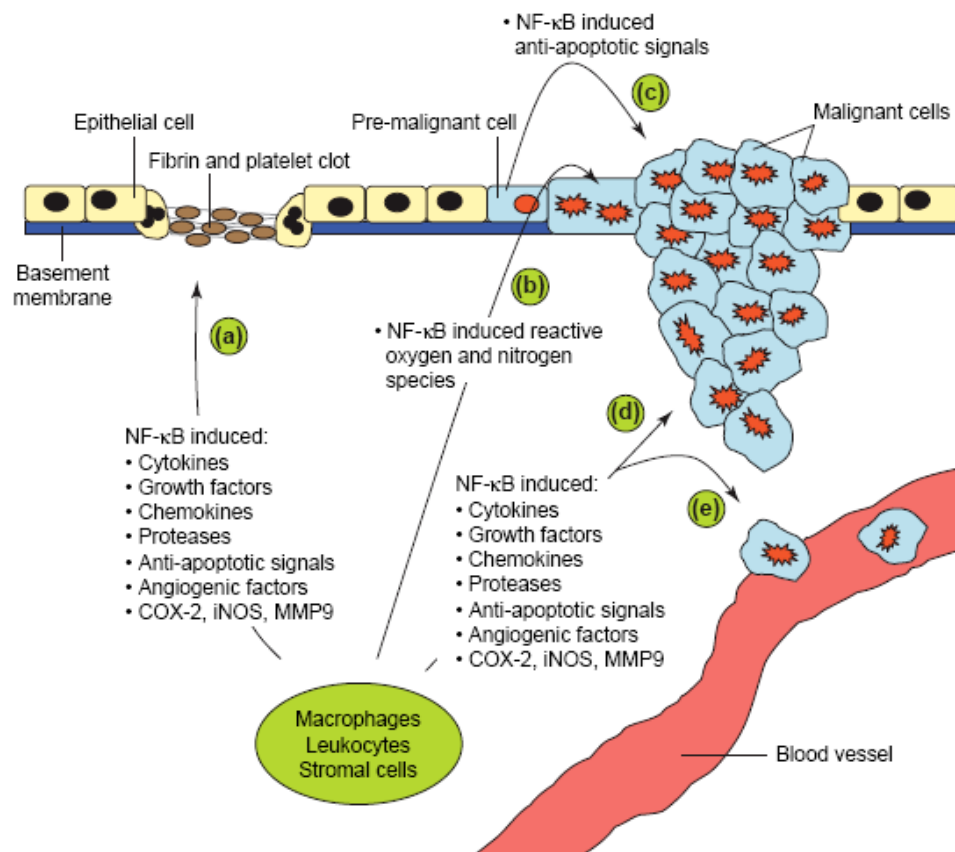
programada confereix als tumors, un cop diagnosticats, resistència als agents quimioteràpics. Diferents estudis han posat de rellevància que NF- $\kappa$ B no seria un dels factors iniciadors del procés tumoral, sinó que és un senyal que promou la supervivència de les cèl·lules pre-malignes [200, 201], com es pot observar a l'esquema de la Figura 18.

**Taula 3: Resum dels processos neoplàsics derivats d'inflamació crònica més freqüents.** Adaptat de [186].

Inflamació crònica	Procés neoplàsic
Bronquitis, Silicosis	Carcinoma de pulmó
Gastritis	Adenocarcioma gàstric
Pancreatitis	Carcinoma pancreàtic
Malaltia de Crohn, colitis ulcerativa	Càncer colorectal
Berrugues	Carcinoma de pell (no-melanoma)
Hepatitis	Carcinoma hepatocel·lular
Mononucleosi	Limfoma No-Hodgkin i Hodgkin

L'activació aberrant de la via de NF- $\kappa$ B s'ha trobat associada a diferents causes, com són els errors genètics en els gens codificants per proteïnes de la via o canvis en l'activitat d'enzims (quinases, fosfatases i acetilases) que regulen la seva activitat transcripcional provocats per senyals extracel·lulars (citoquines i factors de creixement), entre d'altres.

D'altra banda, en alguns treballs s'ha descrit per NF- $\kappa$ B un paper de repressor de la progressió de cicle cel·lular en la transició G1/S o del creixement cel·lular en línies cel·lulars o en cèl·lules de pell transgènica en cultiu [202-204]. Això denota que el context cel·lular (les mutacions acumulades en les cèl·lules canceroses, l'ambient i els senyals extracel·lulars, entre d'altres) tenen un paper cabdal en la regulació de la transcripció dependent de NF- $\kappa$ B.



**Figura 18: Esquema de l'inici i la progressió d'un procés tumoral i els passos en els que NF-κB està implicat mitjançant el control de l'expressió de substàncies pro-inflamatòries.** (a) els leucòcits i cèl·lules de l'estroma secreten proteïnes pro-inflamatòries per reparar els danys de la inflamació (b) les substàncies pro-inflamatòries (ROS i NOS) produeixen dany al DNA de les cèl·lules pre-malignes (c) NF-κB facilita la inhibició de l'apoptosi (d) NF-κB actiu en l'estroma i leucòcits del voltant de les cèl·lules malignes facilita la migració i la vascularització, permetent la metàstasi i progressió del procés tumoral. Adaptat de [186].

### 2.5.1 Gens mutats de la via de NF-κB.

Les mutacions genètiques en la via de NF-κB tenen un impacte relativament alt en el desenvolupament de malalties canceroses en humans (revisat a [205]). S'ha detectat amplificació cromosòmica i canvis en l'expressió de gens de la família Rel/NF-κB en molts tumors hematopoiètics i sòlids. També s'ha descrit que els gens *c-rel* i *rela* es troben amplificats o reallotjats en un gran percentatge de limfomes de cèl·lules B i mielomes. Pel que fa a tumors sòlids,



s'ha observat un augment en l'expressió dels gens de la família Rel en carcinomes de pulmó, mama, estómac, tiroides i colon. Les mutacions que redueixen l'activitat de les I $\kappa$ Bs són rellevants en el manteniment del senyal aberrant de NF- $\kappa$ B. Aquestes poden ser degudes a la inactivitat del producte gènic, a la davallada de l'expressió o a la hiperactivitat de les IKKs. El paper específic de cada causa en el desenvolupament tumoral encara no s'ha pogut descriure amb certesa.

### **2.5.2 Senyals moduladors de l'activitat de NF- $\kappa$ B alterats en càncer.**

Com ja s'ha esmentat la via de NF- $\kappa$ B s'activa per moltes quinases *upstream*. Les mutacions en aquestes poden ser les causants de la hiperactivació d'aquesta via, convertint-les així en protooncogens. Aquest és el cas del receptor de factor de creixement epidèrmic (EGFR), de la via PI3K/AKT o de les Ras-MAP quinases (revisat a [186]). Un cas especial és el del receptor Her-2/neu que quan es sobreexpressa produeix la degradació de I $\kappa$ B $\alpha$  via calpaïna sense necessitat de l'activitat de les IKK [206].

S'ha trobat en alguns tipus de càncer que l'activació aberrant es produeix per l'establiment de cercles de secreció autocrina de citokines inflamatòries com IL-1 [207]. A més, s'ha de tenir en compte que l'estroma tumoral és l'ambient adequat per mantenir activada la via de NF- $\kappa$ B degut a que acostuma a ser un teixit amb símptomes d'inflamació, com la infiltració leucocitària, on la secreció de citoquines és constant [208, 209].



**OBJECTIUS**



Aquesta tesi està plantejada en dues parts:

**I.** Estudi de la rellevància dels extrems terminals de les catenines amb dominis armadillo,  $\beta$ -catenina, placoglobina i p120-catenina, en la interacció amb els seus cofactors:

1. caracteritzar el paper dels extrems terminals en la interacció de les catenines amb els diferents cofactors implicats en les unions intercel·lulars i la senyalització nuclear.
2. determinar la importància dels extrems terminals de  $\beta$ -catenina i placoglobina en conferir especificitat d'unió de factors emprant proteïnes quimera que combinen els diferents dominis de les dues proteïnes.

**II.** Estudi del mecanisme d'inhibició de les catenines sobre la via de NF- $\kappa$ B:

1. determinar els pes específic d'algun dels factors de les unions adherents (E-cadherina i p120-catenina) en aquest fenomen inhibitor.

Els resultats i les discussions dels dos capítols de la tesi es presenten per separat.



**CAPÍTOL I: ELS EXTREMS TERMINALS DE  
LES CATENINES AMB DOMINI ARMADILLO  
REGULEN L'ESPECIFICITAT D'UNIÓ A FACTORS**





## **I. RESULTATS**

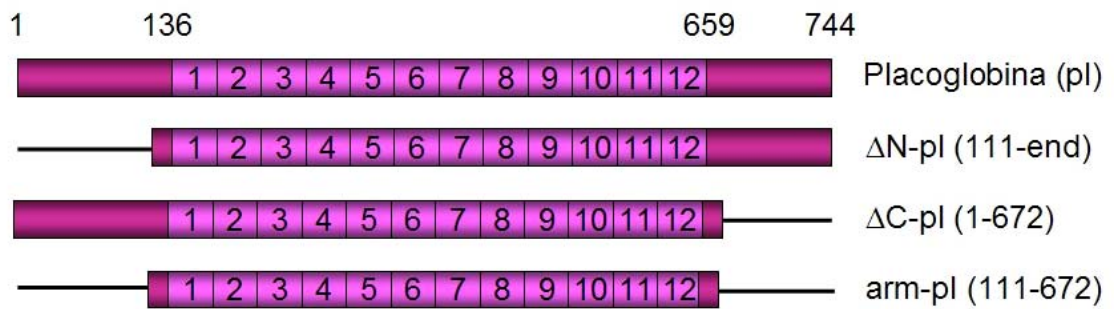


La  $\beta$ -catenina i la placoglobina són dues proteïnes que comparteixen una alta homologia en el seu domini central de repeticions armadillo. Aquestes difereixen en els seus extrems N- i C-terminal. A través dels seus dominis armadillo interaccionen amb factors que són comuns per  $\beta$ -catenina i per placoglobina. Hi ha factors, però, que s'uneixen específicament a una d'elles i no a l'altra.

### **1 La modulació de l'afinitat de placoglobina pels seus cofactors està regulada pels extrems terminals.**

En un treball previ del nostre grup es va demostrar que la interacció amb cofactors que s'uneixen al domini armadillo de  $\beta$ -catenina està regulada pels extrems terminals. També es va descriure que aquests extrems terminals interaccionen amb el domini armadillo central, limitant la unió dels diferents cofactors [27, 28]. La fosforilació de la  $\beta$ -catenina o la unió d'un determinat cofactor indueix canvis conformacionals en els seus extrems que faciliten o no la interacció amb altres proteïnes. En aquest sentit s'ha evidenciat que en alguns casos la unió de factors a  $\beta$ -catenina indueix canvis conformacionals en els seus extrems terminals que faciliten la unió coordinada de factors, tant els implicats en els complexos d'adhesió ( $\alpha$ -catenina, E-cadherina) com en l'activitat transcripcional de la  $\beta$ -catenina (TCF-4, TBP). Ens vam plantejar, donat l'alt grau d'homologia entre els dominis armadillo de  $\beta$ -catenina i placoglobina, si el mateix tipus de mecanisme regulador dels extrems terminals sobre el domini armadillo també succeïa en el cas de la placoglobina.

Per portar a terme aquests experiments, es van preparar construccions amb els dominis N-, C-terminal o ambdós extrems delecionats. A la Figura 19 es pot veure un esquema dels productes resultants d'aquests fragments de la placoglobina. Aquests es van expressar i purificar com proteïnes de fusió amb la GST.



**Figura 19: Esquema dels diferents constructes de placoglobina, per tal d'estudiar la regulació dels extrems terminals sobre les interaccions de placoglobina amb els seus cofactors.**

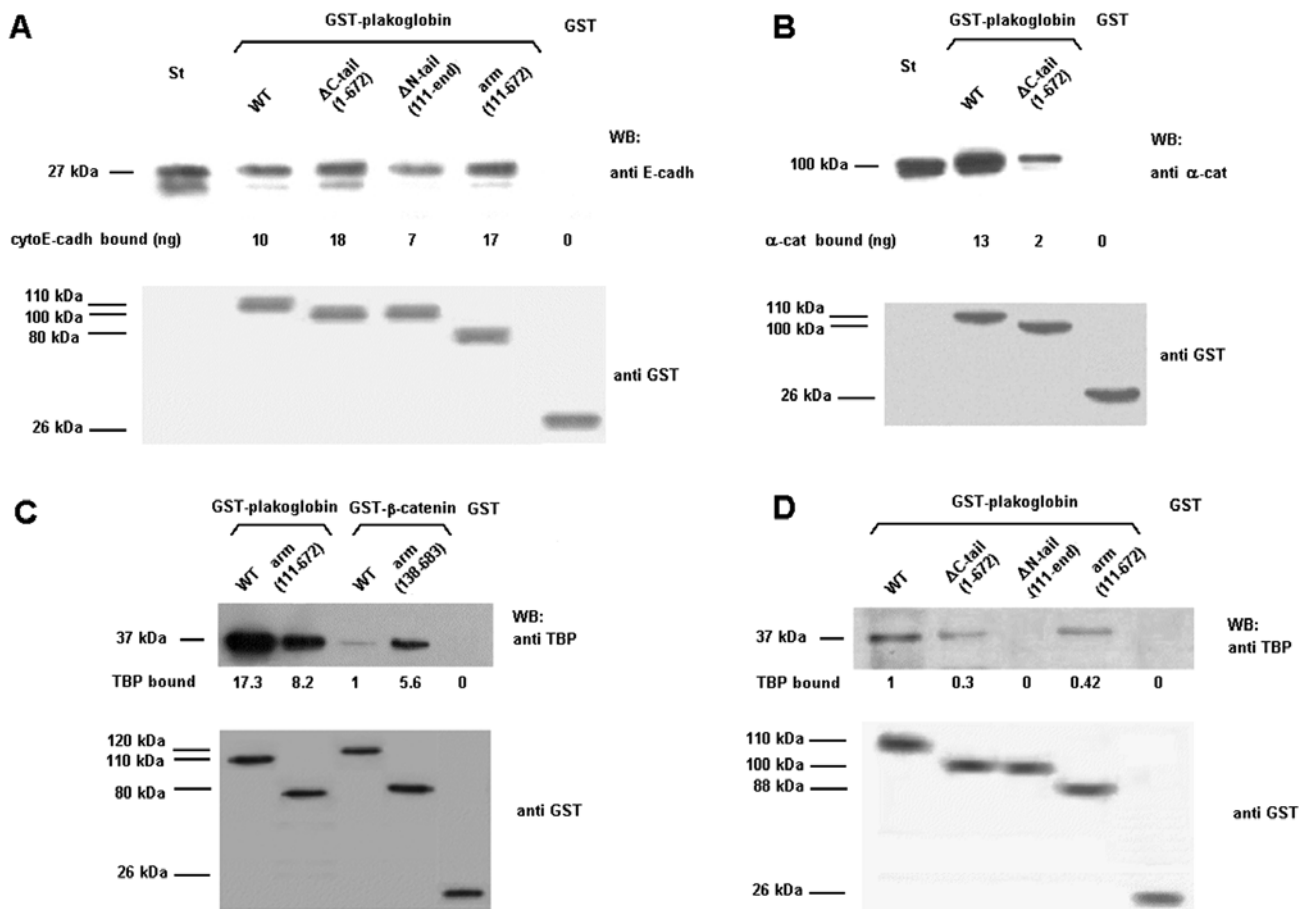
### 1.1 Estudi de la regulació pels extrems terminals de placoglobina de la unió a cofactors.

Es va analitzar la interacció de placoglobina amb l'E-cadherina. Es van realitzar assaigs d'interacció *in vitro* amb proteïnes recombinants entre els diferents fragments de placoglobina fusionats a GST i el fragment citosòlic d'E-cadherina (cyto-E-cadh) (Figura 20, panell A). Els resultats indiquen que la deleció de l'extrem C-terminal (carril 3) afavoreix la interacció, comparat amb la proteïna sencera (carril 2), essent l'afinitat similar a la del domini armadillo sol, desprovisat dels extrems terminals (carril 5). Aquesta dada suggereix que l'extrem C-terminal està dificultant l'accessibilitat de l'E-cadherina al domini armadillo, per on s'uneix. Aquest mateix efecte s'havia descrit prèviament per  $\beta$ -catenina, on la deleció de l'extrem N-terminal produïa un augment de la interacció amb E-cadherina, molt més marcat [27]. En canvi, la deleció de l'extrem N-terminal de placoglobina no provocava cap canvi considerable en aquesta interacció (panell A, carril 4).

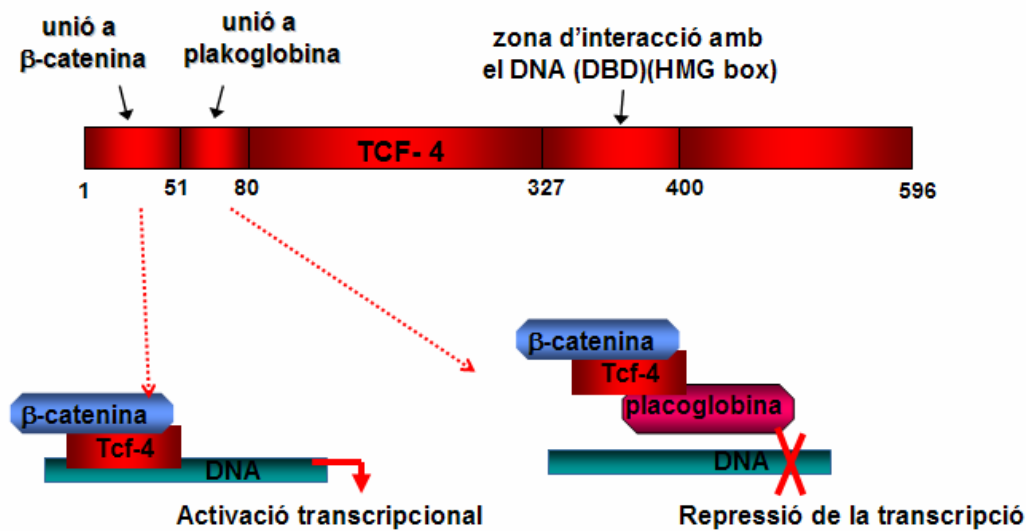
Un altre component de les unions adherents és l' $\alpha$ -catenina i es va estudiar si els extrems de placoglobina també modulaven aquesta interacció. S'ha de tenir en compte que en aquest cas el lloc d'unió és al final de l'extrem N-terminal i principi del domini armadillo de placoglobina (aà 109-137). Lògicament, les construccions a les que els manca el N-terminal de

placoglobina ( $\Delta N$  i arm) no uneixen  $\alpha$ -catenina (no es mostra a la figura). Es va comparar, doncs, la interacció de la proteïna sencera (aà 1-744) amb la que li faltava l'extrem carboxi-terminal (aà 1-672) i es va observar que aquesta deleció provoca una disminució de l'afinitat (Figura 20, panell B, carrils 2 i 3). Tot i que el lloc d'unió d' $\alpha$ -catenina a placoglobina es troba a l'altre extrem del domini armadillo, la falta de l'extrem C-terminal provoca un canvi conformacional al N-terminal que li dificulta l'accés. Aquest resultat posa de manifest la importància de la interconnexió entre els extrems, modulant recíprocament la funcionalitat de la placoglobina.

Un altre factor que permetia avançar en l'estudi de la funcionalitat dels extrems terminals de placoglobina era la interacció amb factors nuclears, com la TBP. El panell C de la Figura 20 mostra que l'afinitat de la placoglobina per la TBP és molt major que la de la  $\beta$ -catenina (comparar carrils 1 i 3). Mentre que en la  $\beta$ -catenina, els extrems sembla que amaguin el domini d'interacció de TBP (panell C, carrils 3 i 4), el domini armadillo de placoglobina uneix TBP amb menys afinitat que la proteïna sencera (carrils 1 i 2). El fet que la diferència d'afinitat entre placoglobina i  $\beta$ -catenina per la TBP es redueixi dràsticament quan es comparen les afinitats dels dominis armadillo d'ambdues proteïnes posa de manifest el paper regulador dels extrems terminals, que és diferent en  $\beta$ -catenina i placoglobina. Quan analitzem amb més detall el paper dels extrems de placoglobina (panell D) veiem que la deleció l'extrem N-terminal disminueix l'afinitat per TBP comparat amb el domini armadillo sol (carrils 3 i 4).



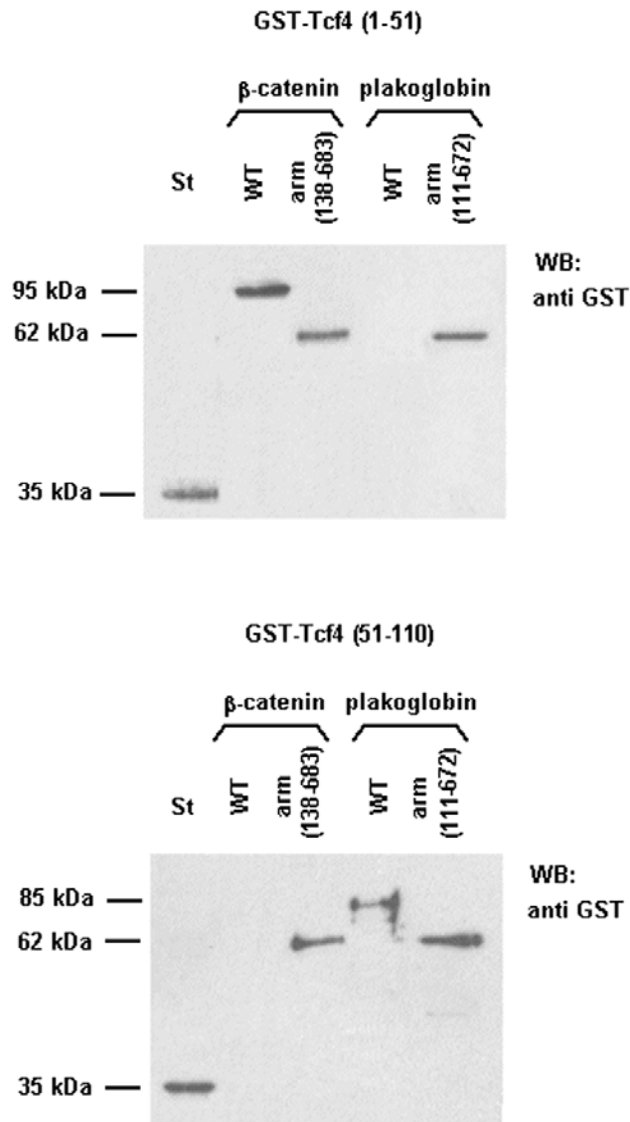
**Figura 20: Efecte dels extrems terminals de plakoglobina en la unió a E-cadherina, α-catenina i TBP.** **A**, el domini citosòlic d'E-cadherina (cyto-E-cadh) (4 pmol) es van incubar amb 1pmol de GST-placoglobina, de GST-placoglobina delecionada o GST com a control. Els complexos formats es van purificar amb *Glutathion-Sepharose* i analitzar per Western blot amb anticòs monoclonal contra E-cadherina i re-analitzats posteriorment amb anti-GST. Els nombres sota els carrils corresponen a la quantitat de proteïna unida referida als patrons (St.) utilitzats en l'experiment, 0.5 pmol (12 ng). **B**, α-catenina (2pmol) es van incubar amb 2 pmol de GST-placoglobina, GST-placoglobina amb el C-terminal delecionat o GST com a control. La quantitat d'α-catenina unida es va determinar amb anticòs monoclonal contra aquesta proteïna. 0.1 pmol (9ng) es van fer servir com a control intern (St.). **C i D**, 6 pmol de les diferents proteïnes senceres o delecionades de β-catenina o plakoglobina fusionades a GST o GST com a control es van incubar amb 200 μg d'extractes proteics totals de cèl·lules SW480. Es van purificar els complexos amb *Glutathion-Sepharose* i es van analitzar per Western blot amb anticòs anti-TBP. Les figures mostren experiments representatius de duplicats realitzats tres cops almenys.



**Figura 21: Esquema que mostra els diferents dominis de TCF-4 on s'uneixen la  $\beta$ -catenina i la plakoglobina.**  $\beta$ -catenina s'uneix als 50 primers aminoàcids, i la plakoglobina als 30 següents. La unió de plakoglobina al complex  $\beta$ -catenina-TCF-4 provoca la repressió de la transcripció [75].

El cas de la regulació de la unió a TCF-4 és també sorprenent ja que, com s'ha esmentat a la Introducció, aquest factor de transcripció consta de dos dominis diferents pels que interacciona selectivament amb  $\beta$ -catenina (TCF-4 aà 1-50) o plakoglobina (TCF-4 aà 51-80) [75]. TCF-4 s'uneix als dominis armadillo d'ambdues proteïnes [25, 72] (Figura 21). És per això que vam decidir analitzar si els extrems terminals també podien estar regulant en aquest cas l'especificitat d'unió a TCF-4. Es va observar fent assaigs d'*overlay*, que mentre la  $\beta$ -catenina, però no la plakoglobina, s'uneix als primers 50 aminoàcids de TCF-4 (Figura 22, panell superior, carrils 2 i 4), la plakoglobina, però no la  $\beta$ -catenina, interacciona amb la seqüència adjacent de TCF-4 (aà 50-110) (Figura 22, panell inferior, carrils 2 i 4). Eliminant els extrems terminals, els dominis armadillo de les dues proteïnes uneixen indistintament les dues seqüències de TCF-4 (Figura 22, carrils 3 i 5 dels dos panells). És a dir, els dominis armadillo sense dels extrems terminals perden l'especificitat d'unió als diferents dominis de TCF-4

Estem davant d'un mecanisme regulador de la funcionalitat de placoglobina basat en la conformació dels extrems terminals que restringeixen l'accessibilitat dels factors al domini armadillo i confereixen especificitat d'unió.



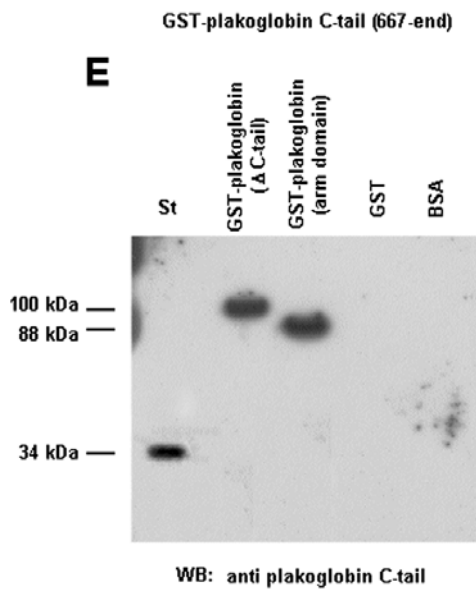
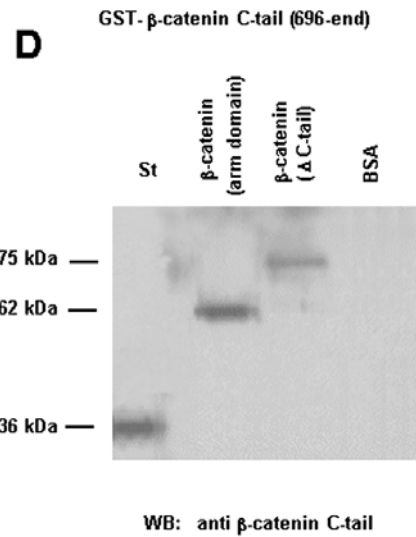
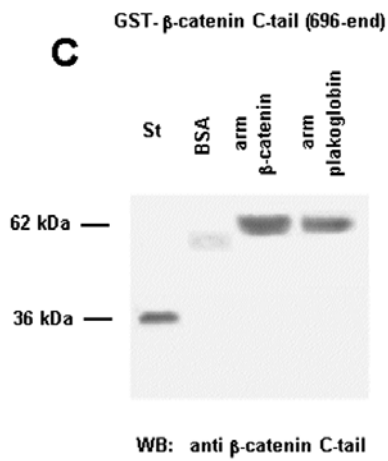
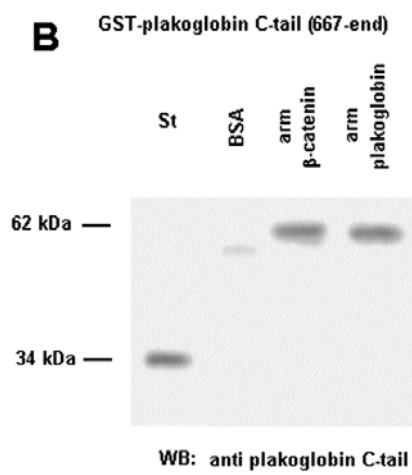
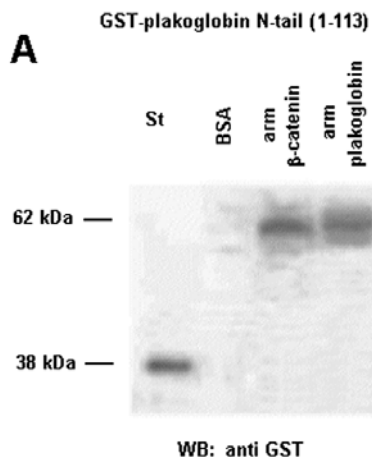
**Figura 22: Els extrems terminals de β-catenina i placoglobina regulen la unió a dominis diferents de TCF-4.** β-catenina i placoglobina recombinants o els dominis armadillo corresponents es van separar en un gel de SDS-PAGE i transferir a una membrana de nitrocel·lulosa. La unió a TCF-4 es va determinar incubant les membranes amb una solució de GST-TCF-4(1-51) o GST-TCF-4(50-110) a 0.15 nmol/ml. La unió es va determinar mitjançant l'anticòs anti-GST. Les referències internes utilitzades són 2.5 pmol de GST-TCF-4(1-51) o GST-TCF-4(50-110) (St). Per assegurar que la mateixa quantitat de proteïna s'ha fet servir en cada experiment es tenyeixen les membranes amb Ponceau S.



## 1.2 Interacció dels extrems terminals amb el domini armadillo de placoglobina.

Prèviament en el nostre grup s'havia descrit que els extrems de  $\beta$ -catenina interaccionen amb el domini armadillo, regulant l'accessibilitat dels cofactors [27]. Com que els extrems de placoglobina també limiten la capacitat de la proteïna d'unir cofactors, ens vam plantejar si aquests extrems terminals també podien interaccionar amb el domini armadillo, com en el cas de la  $\beta$ -catenina.

Mitjançant assaigs d'*overlay* i amb anticossos específics, es va determinar que els dos extrems (N- i C- terminal) interaccionen amb el domini armadillo de la placoglobina (Figura 23, panells A i B). És remarcable que aquests extrems també interaccionen amb una afinitat similar amb el domini armadillo de  $\beta$ -catenina. Recíprocament, l'extrem C-terminal de  $\beta$ -catenina té capacitat d'unir l'armadillo de placoglobina amb una afinitat similar a la que té pel seu propi domini armadillo (Figura 23, panell C). De tota manera, la dependència mútua dels extrems per la unió al domini armadillo no és la mateixa en les dues proteïnes. Per la  $\beta$ -catenina s'havia descrit que la presència de l'extrem N-terminal restringia la unió del C-terminal al domini armadillo (Figura 23, panell D). En el cas de placoglobina no es va veure aquest efecte, l'extrem N-terminal no provoca cap canvi d'afinitat en la unió del C-terminal al domini armadillo (Figura 23, panell E). Aquests resultats suggereixen que, tot i que els extrems terminals de placoglobina també interaccionen amb el domini armadillo, les interconnexions establertes entre aquests dos extrems terminals no són les mateixes que en el cas de la  $\beta$ -catenina. Això és degut a les diferents propietats dels dos extrems carboxi-terminals.

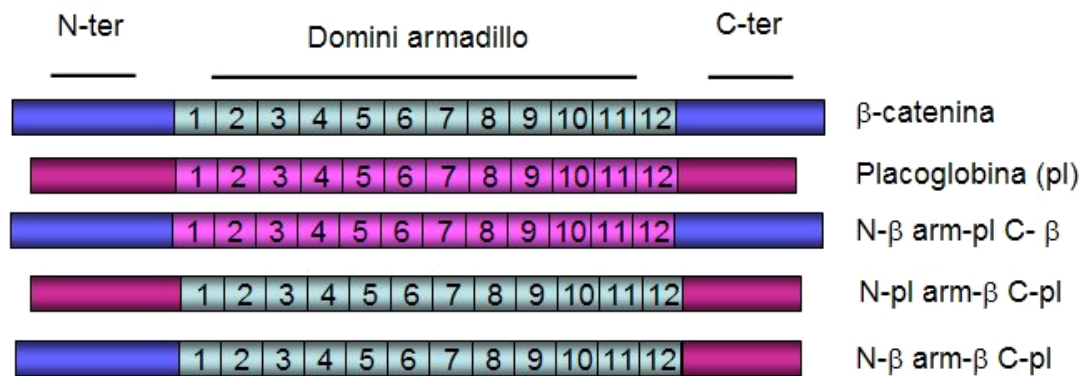


**Figura 23: Interacció dels extrems N- i C-terminals amb els dominis armadillo de  $\beta$ -catenina i placoglobina.** 8 pmol dels dominis armadillo de  $\beta$ -catenina o placoglobina es van separar per SDS-PAGE i transferir a membranes de nitrocel·lulosa. **A**, la unió de les proteïnes recombinants es va determinar per assaig d'*overlay*. Les membranes es van incubar amb solucions de proteïna GST-N-terminal-placoglobina recombinant (aà 1-113) (0.25 nmol/ml). Es va analitzar la unió amb anticòs anti-GST. **B i C**, es va repetir el mateix procediment incubant la membrana amb solucions a 0.25 nmol/ml de GST-C-terminal-placoglobina (aà 677-final) i analitzat amb anticòs anti-C-ter de placoglobina (B) o incubant amb GST-C-terminal- $\beta$ -catenina (aà 696-final) i analitzat amb anticòs anti-C-ter de  $\beta$ -catenina (C). **D i E**, 8 pmol del domini armadillo de  $\beta$ -catenina, de  $\Delta$ C- $\beta$ -catenina (aà 1- 683) (D), del domini armadillo de placoglobina o de  $\Delta$ C-placoglobina (E) es van separar per SDS-PAGE i transferir a membranes de nitrocel·lulosa. Es van realitzar assaigs d'*overlay* incubant les membranes amb proteïna recombinant GST-C-terminal- $\beta$ -catenina o GST-C-terminal-placoglobina (0.25 nmol/ml). Es van analitzar amb anticossos contra els extrems C-terminal de cada proteïna. Es van incloure 25 ng de cada extrem terminal per fer servir com a control intern (St). Per assegurar que la mateixa quantitat de proteïna s'ha fet servir en cada experiment es tenyeixen les membranes PonceauS.

## **2 Els extrems terminals de $\beta$ -catenina i placoglobina determinen l'especificitat d'unió a factors.**

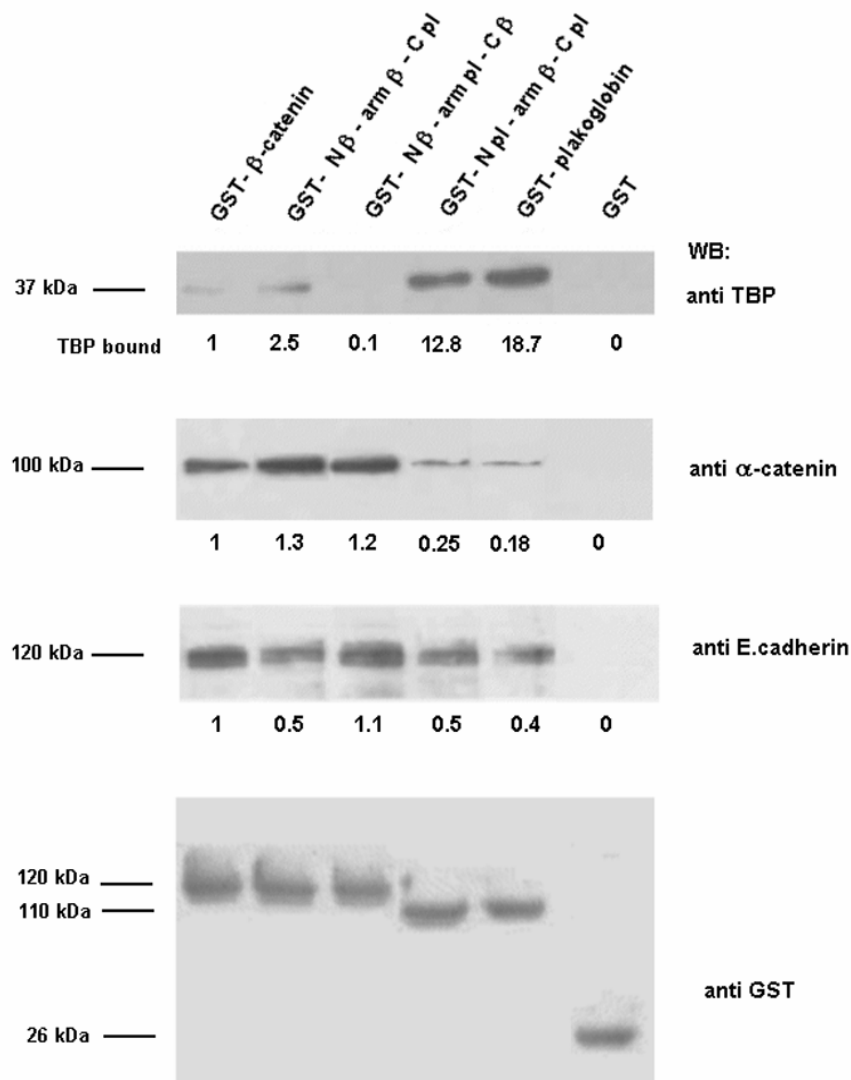
### **2.1 Estudis de diferències d'interacció amb proteïnes quimera.**

Com que tot els resultats portaven a pensar que eren els extrems terminals els que conferien l'especificitat d'unió de factors a  $\beta$ -catenina i placoglobina, es va decidir construir proteïnes quimèriques fusionant el domini armadillo d'una amb els extrems terminals de l'altra. La Figura 24 mostra un esquema de les proteïnes producte d'aquestes construccions. Un cop expressades i purificades en *E. coli* es va continuar amb el treball d'anàlisi de les interaccions d'aquestes quimeres amb els cofactors de  $\beta$ -catenina i placoglobina.



**Figura 24: Esquema on es mostren les construccions quimèriques entre β-catenina i placoglobina.**

Es va començar estudiant la unió a TBP, que interacciona amb β-catenina i placoglobina pels dominis armadillo. Ja havíem vist que la β-catenina té molta menys afinitat que la placoglobina per aquest factor (Figura 20, panell C). La quimera Npl-armβ-Cpl, tot i tenir el domini armadillo de β-catenina, manté una afinitat semblant a la de placoglobina (Figura 25, panell superior, comparar carrils 1, 4 i 5). En canvi, en el cas de la quimera Nβ-armpl-Cβ, els extrems de β-catenina estan restringint la interacció de la TBP amb el domini armadillo de placoglobina (Figura 25, panell superior, carril 3). És remarcable que només la presència de l'extrem N-terminal de β-catenina és suficient per reduir la unió de TBP al domini armadillo ja que, quan s'intercanvia el N-terminal entre les quimeres Npl-armβ-Cpl i Nβ-armβ-Npl, disminueix en aquesta última de manera dràstica la unió a TBP. Així, es pot concloure que l'extrem amino-terminal és determinant per la diferent afinitat d'unió a TBP que mostren la β-catenina i la placoglobina.



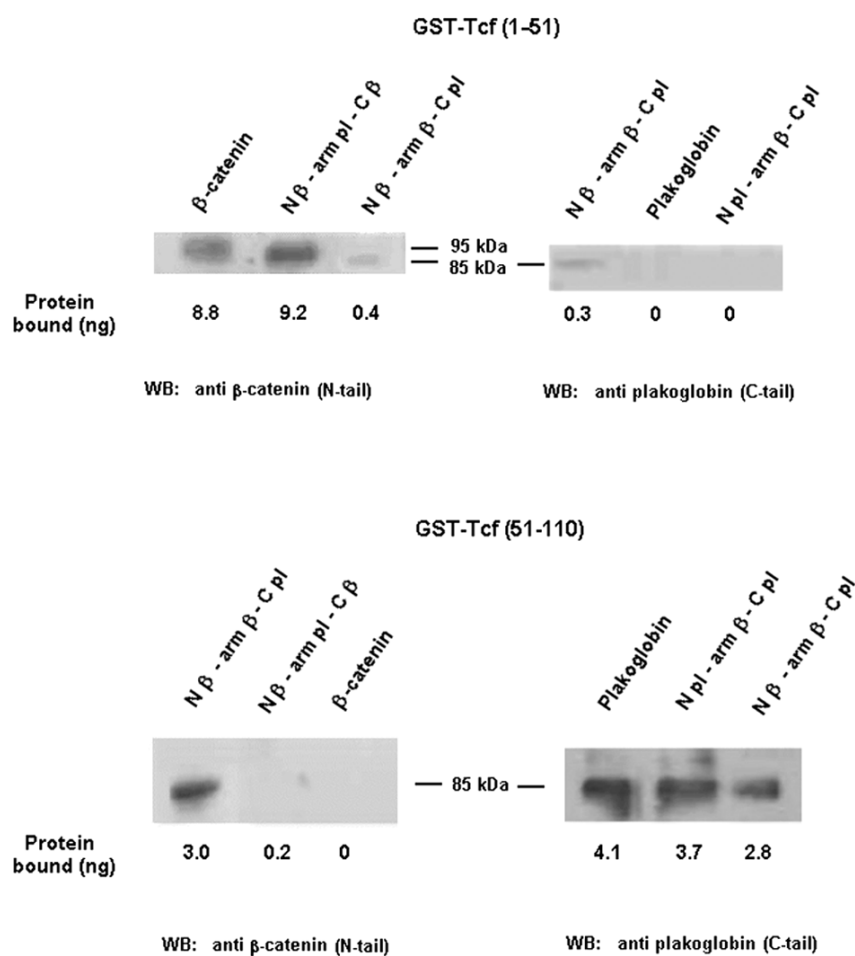
**Figura 25: Unió de les quimeres a TBP,  $\alpha$ -catenina i E-cadherina.** Es van incubar 7 pmol de proteïna  $\beta$ -catenina, plakoglobin o cadascuna de les quimeres fusionades a GST, o GST com a control, amb 200  $\mu$ g d'extractes proteics totals de cèl·lules RWP1. Els complexos formats es van purificar amb *Glutathion-Sepharose* i analitzar per *Western blot* amb anticossos monoclonals contra TBP,  $\alpha$ -catenina o E-cadherina. Es van tornar a analitzar els *blots* amb anti-GST. Els nombres sota els carrils corresponen a la quantitat de proteïna unida en relació a la quantitat de proteïna que uneix  $\beta$ -catenina *wt*. La figura mostra un experiment representatiu d'una sèrie de tres realitzats.

Continuant l'anàlisi de la interacció amb altres factors es va observar que la  $\beta$ -catenina té més afinitat per  $\alpha$ -catenina que la placoglobina (Figura 25, segon panell, carrils 1 i 5). Es va determinar que, en aquest cas també, els extrems regulen l'especificitat d'unió: la quimera amb extrems de  $\beta$ -catenina (N $\beta$ -armpl-C $\beta$ ) conserva una afinitat alta, similar a la de la  $\beta$ -catenina *wt*. En canvi, la quimera amb extrems de placoglobina (Npl-arm $\beta$ -Cpl) s'uneix dèbilment a l' $\alpha$ -catenina i amb una afinitat similar a placoglobina. També en aquest cas, l'extrem N-terminal és determinant per conferir l'especificitat d'unió a  $\alpha$ -catenina, ja que només l'intercanvi del N-terminal de placoglobina pel de  $\beta$ -catenina augmenta l'afinitat per  $\alpha$ -catenina unes 5 vegades (Figura 25, segon panell, carrils 2 i 4). Així, trobem que qualsevol quimera amb l'extrem amino-terminal de  $\beta$ -catenina es comporta com la  $\beta$ -catenina *wt* pel que fa a la unió a l' $\alpha$ -catenina.

La unió a E-cadherina és similar a la descrita per  $\alpha$ -catenina i TBP, tot i que les diferències d'afinitat entre  $\beta$ -catenina i placoglobina per l'E-cadherina són menors. En aquest cas, l'extrem determinant és el C-terminal, ja que la seva substitució provoca un canvi en l'afinitat, fent que la quimera es comporti segons el seu extrem C-terminal (comparar  $\beta$ -catenina *wt* amb les quimeres N $\beta$ -arm $\beta$ -Cpl i N $\beta$ -armpl-C $\beta$  a la Figura 25, tercer panell).

Per continuar explorant el paper dels extrems terminals, i basant-nos en el cas especial del TCF-4 per contenir dos dominis d'interacció diferents per  $\beta$ -catenina i placoglobina, vam realitzar el mateix tipus d'assaig amb els fragments de TCF-4 utilitzats abans. Cal recordar que la  $\beta$ -catenina té alta afinitat pel fragment de TCF-4 que comprèn els primers 50 aminoàcids (TCF-4 aà 1-51), i la placoglobina pels 30 següents (TCF-4 aà 50-110) (Figura 22). Es pot observar que la substitució del domini armadillo de  $\beta$ -catenina pel de placoglobina (quimera N $\beta$ -armpl-C $\beta$ ) no canvia l'afinitat pel TCF-4 (aà 1-50), mentre que l'intercanvi del domini C-terminal (N $\beta$ -arm $\beta$ -Cpl) l'aboleix totalment (Figura 26, panell superior esquerre). El fragment de TCF-4 que conté el domini d'unió a placoglobina (TCF-4 (51-110)) interacciona amb afinitat similar amb la

placoglobina *wt* i amb la quimera que té el domini armadillo de  $\beta$ -catenina (N $\beta$ -arm $\beta$ -Cpl) (Figura 26, panell inferior). Clarament, només la presència del domini C-terminal de placoglobina (N $\beta$ -arm $\beta$ -Cpl) és suficient per obtenir interacció amb aquest fragment (aà 51-110). Així, també en aquest cas, l'extrem C-terminal confereix especificitat d'unió a cofactors i la substitució del domini armadillo de  $\beta$ -catenina pel de placoglobina tampoc augmenta l'afinitat pel TCF-4 (51-110) (Figura 26, panell inferior esquerre).



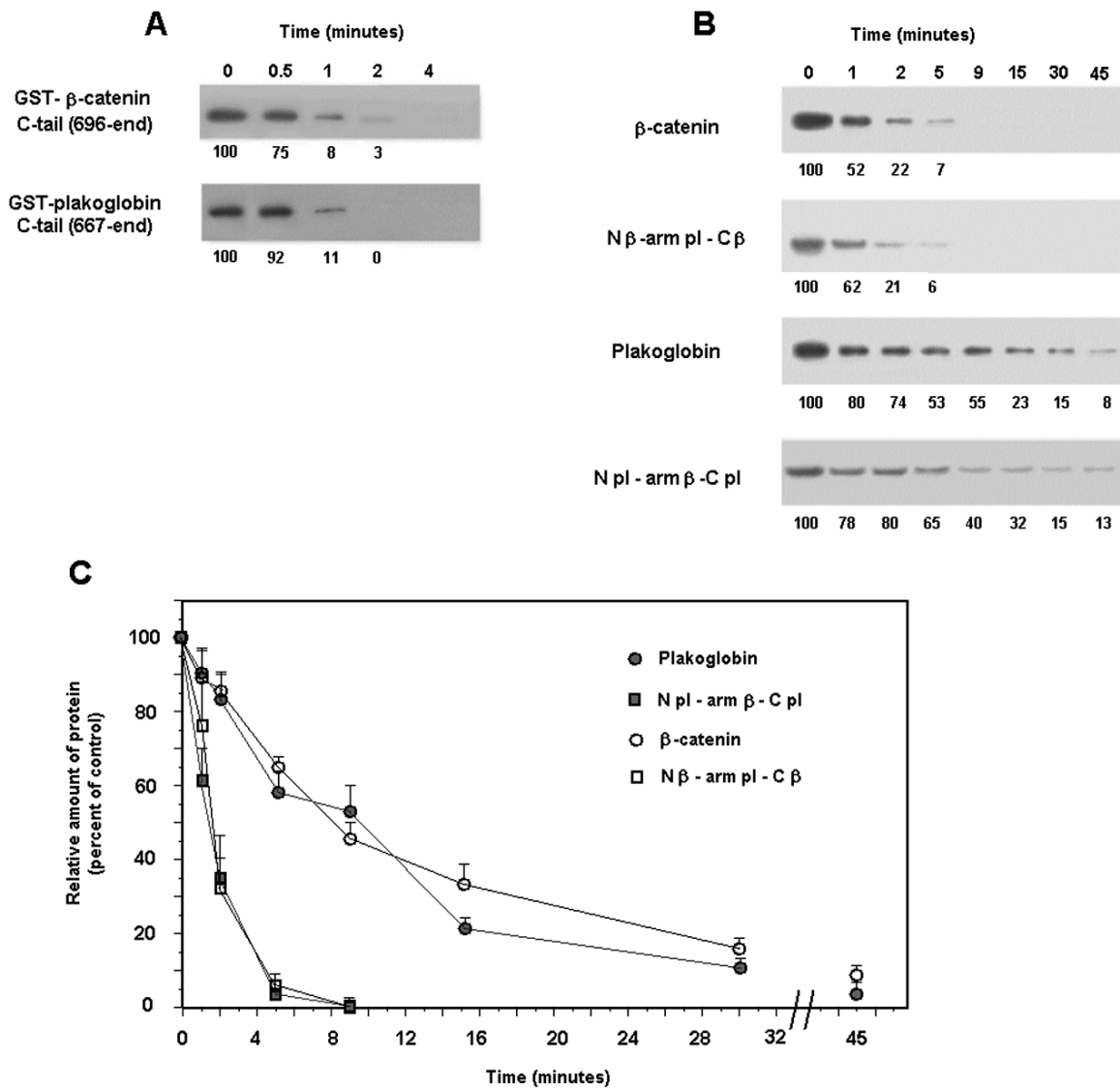
**Figura 26: Unió de les quimeres als dominis N-terminal de TCF-4.** 1 pmol de GST, GST-TCF-4(1-51) o GST-TCF-4(51-110) es va incubar amb 1 pmol de  $\beta$ -catenina, placoglobina o les quimeres. La quantitat de proteïna unida es va determinar amb anticossos monoclonals específics per l'extrem N-terminal de  $\beta$ -catenina o C-terminal de placoglobina. La quantitat de senyal de cada carril es va referir als patrons interns utilitzats: 10 ng de  $\beta$ -catenina i 5 ng de placoglobina.

## 2.2 Els extrems terminals de $\beta$ -catenina i placoglobina modulen el diferent comportament d'aquestes proteïnes a la proteòlisi.

Per estudiar més en detall les bases moleculars de les diferències en l'especificitat conferides pels extrems C-terminal de  $\beta$ -catenina i placoglobina es van realitzar estudis de tripsinolisi limitada seguint la desaparició d'aquest epítot. Els dos extrems C-terminal de les proteïnes es digereixen a velocitats similars quan s'expressen en forma de proteïnes fusionades a GST (Figura 27, panell A).

Quan s'estudia el comportament dels extrems C-terminal de  $\beta$ -catenina i placoglobina en l'entorn de la proteïna sencera, el de la primera es degrada més ràpidament que el de placoglobina (Figura 27, panell B i C). Això suggereix que en la proteïna plegada l'extrem C-terminal de placoglobina està menys exposat a l'exterior, i per tant, és menys accessible a l'acció de la tripsina. En el cas de les proteïnes quimeres amb els dominis armadillo intercanviats ( $\text{pl-}\beta\text{-pl}$  i  $\beta\text{-pl-}\beta$ ) la digestió és similar a placoglobina i  $\beta$ -catenina *wt*, respectivament. Suggestint, doncs, que els extrems de placoglobina interaccionen amb el domini armadillo de  $\beta$ -catenina de manera similar a com ho fan amb el seu propi. El mateix succeeix quan es tracta de la quimera inversa,  $\beta\text{-pl-}\beta$ . Es mostren els resultats en forma de gràfica, seguint la desaparició de l'epítot C-terminal, al panell C. Així, els resultats demostren el que s'havia postulat a l'inici del nostre treball: els extrems de  $\beta$ -catenina i placoglobina interaccionen de manera diferent amb el domini armadillo, regulant de manera diferent la interacció amb els seus cofactors.



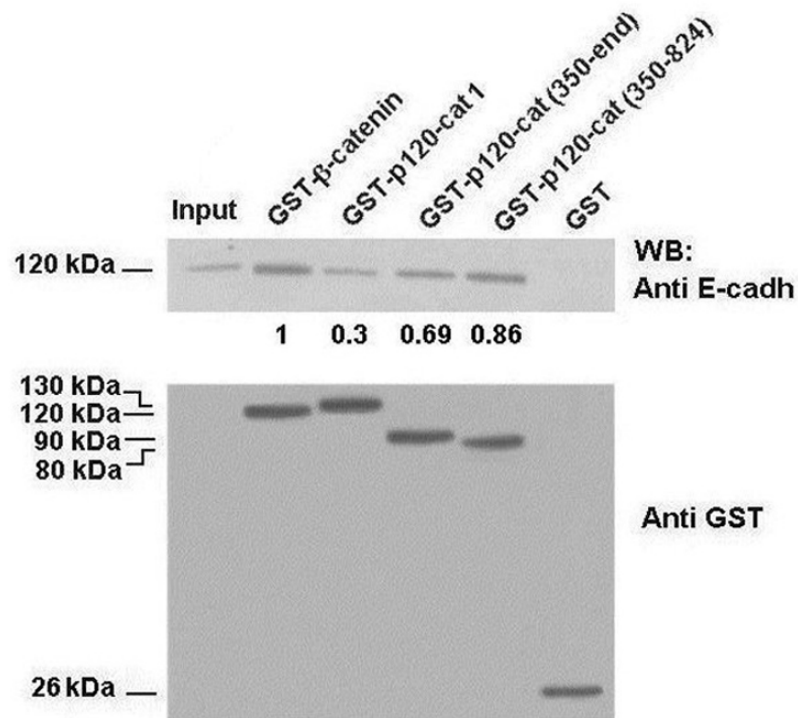


**Figura 27: Els extrems C-terminal de  $\beta$ -catenina i placoglobina tenen diferent sensibilitat a tripsina quan es troben units al domini armadillo.** 5 pmol de GST- $\beta$ -catenina-C-terminal, GST-placoglobina-C-terminal (A) o  $\beta$ -catenina, placoglobina o quimeres (B) es van incubar amb 50 ng de tripsina a 25 °C. La digestió es va aturar als temps indicats amb tampó de càrrega d'electroforesi. Les mostres es van analitzar per *Western blot* amb anticossos monoclonals contra els extrems C-terminal de  $\beta$ -catenina o placoglobina. Els nombres sota els carrils corresponen al percentatge dels epítops de  $\beta$ -catenina o placoglobina que romanen a cada temps. Les quantitats es van calcular escanejant els autoradiogrames. (C) Gràfica on es mostra la diferent sensibilitat de les proteïnes estudiades a la tripsina mitjançant el seguiment de la desaparició de l'epítop C-terminal.

### **3 L'extrem N-terminal de p120-catenina restringeix la interacció amb E-cadherina.**

La p120-catenina també presenta un domini armadillo flanquejat per dos extrems terminals. Tot i que la p120-catenina presenta menys homologia seqüencial amb la  $\beta$ -catenina i la placoglobina, només es conserva el 22% entre ella i la  $\beta$ -catenina, el fet que guardessin homologia estructural ens va fer pensar que podia estar-se donant el mateix mecanisme regulador.

Vam realitzar assaigs de *Pull-down* amb la p120-catenina sencera (aà 1-911) i els mutants delecionats  $\Delta$ N-terminal (350-911) i armadillo (350-824). En els resultats obtinguts es pot observar que la p120-catenina segueix un comportament similar al descrit per  $\beta$ -catenina i placoglobina. E-cadherina s'uneix al domini armadillo de p120-catenina, i hem vist que tant la deleción d'un extrem ( $\Delta$ N-terminal) com dels dos (armadillo) afavoreix la interacció (comparar el carril 3 amb els carrils 4 i 5 de la Figura 28). La deleción del C-terminal no provoca canvis significatius en la unió (comparar els carrils 4 i 5 de la Figura 28). En aquest cas, també, sembla que els extrems terminals de la p120-catenina restringeixen l'accessibilitat dels cofactors al domini armadillo.



**Figura 28: L'extrem N-terminal de p120-catenina limita la interacció amb E-cadherina.**

7 pmol de proteïna fusionada a la GST, o GST com a control, es van incubar amb 270 µg d'extractes cel·lulars totals RIPA de IEC-18. Els complexos es van purificar com es descriu a Materials i Mètodes i es van analitzar amb anticòs monoclonal contra E-cadherina. Les membranes es van analitzar després amb anti-GST per assegurar que la quantitat de proteïna esquer era la mateixa en totes les condicions.



## **I.DISCUSSIÓ**



En el nostre grup s'havia descrit que els extrems terminals de  $\beta$ -catenina interaccionen amb el domini armadillo i que aquests extrems regulen la capacitat del domini armadillo per unir cofactors [27].

La  $\beta$ -catenina i la placoglobina són dues proteïnes similars implicades en funcions molt diverses. S'ha descrit que a més de tenir un paper essencial en la formació de les unions adherents i desmosomes, respectivament, també participen en la transcripció de gens involucrats en el desenvolupament i la tumorigènesi, tot i que ho fan de manera diferent. Mentre que la unió de  $\beta$ -catenina al TCF-4 promou l'activació de gens regulats per aquest complex, la unió de placoglobina al TCF-4 inhibeix la unió al DNA. Per tant, al nucli, la placoglobina és un repressor de gens activats per  $\beta$ -catenina/TCF. Per dur a terme aquestes funcions, la  $\beta$ -catenina i la placoglobina han d'interaccionar amb diferents cofactors, i ho fan, majoritàriament, a través del seu domini central, anomenat armadillo. La  $\beta$ -catenina i la placoglobina conserven un alt grau d'homologia en aquests dominis centrals (fins al 85%), però la perden als extrems terminals (Figura 8). La semblança entre la  $\beta$ -catenina i la placoglobina ens va suggerir la idea de que aquest model de regulació descrit per la  $\beta$ -catenina podria ser aplicable a altres proteïnes amb domini armadillo, com la placoglobina.

### **1 Els extrems terminals de placoglobina interaccionen amb el domini armadillo i regulen la interacció amb els seus cofactors.**

En estudis previs del nostre grup s'havia descrit que els extrems N- i C-terminals de  $\beta$ -catenina interaccionen amb el domini armadillo [27]. El C-terminal de  $\beta$ -catenina interacciona de manera més íntima que el N-terminal amb el domini armadillo, ja que és menys accessible a les proteases. També es va observar que la presència de l'extrem C-terminal de  $\beta$ -catenina facilita la unió del N-terminal al domini armadillo i el protegeix de la digestió amb proteases. Aquesta interdependència dels extrems terminals per unir-se al

domini armadillo provoca que la unió de cofactors a  $\beta$ -catenina es faci de manera coordinada. Així, la unió prèvia d' $\alpha$ -catenina al final del N-terminal i la primera repetició armadillo de  $\beta$ -catenina (aà 118-142) facilita la unió de l'E-cadherina a les repeticions 7 a 12 del domini armadillo [27]. També s'ha pogut demostrar aquesta unió coordinada per factors nuclears. Així, la unió de  $\beta$ -catenina a TCF-4 facilita la interacció amb el coactivador TBP.

Els dominis armadillo de  $\beta$ -catenina i placoglobina tenen un pl bàsic i els extrems N- i C-terminals de  $\beta$ -catenina i placoglobina, tot i no conservar molta homologia seqüencial, sí que tenen un pl àcid. Com que els extrems terminals de  $\beta$ -catenina interaccionen amb el domini armadillo restringint d'aquesta manera l'accessibilitat dels diferents cofactors al domini central, ens vam plantejar si en la placoglobina es podia donar un mecanisme de regulació similar.

Els nostres resultats indiquen que els extrems de placoglobina interaccionen amb el domini armadillo de placoglobina (panells A i B de la Figura 23). En canvi, de manera diferent a com passa amb la  $\beta$ -catenina, en la placoglobina la presència de l'extrem N-terminal no afecta la unió del C-terminal al domini armadillo (Figura 23, panell D i E). Aquest resultat suggereix que la interacció dels extrems terminals de  $\beta$ -catenina i placoglobina amb els dominis armadillo es produeix de manera diferent. Això es posa de rellevància en els experiments de proteòlisi limitada. Es pot observar que els extrems C-terminal de  $\beta$ -catenina i placoglobina tenen un diferent plegament sobre el domini armadillo, ja que l'accessibilitat a la tripsina és diferent (Figura 27). Aquestes diferències també es posen de manifest quan s'estudia la unió coordinada de factors a la placoglobina. En aquest cas, la unió prèvia d'E-cadherina al domini armadillo potencia l'afinitat per  $\alpha$ -catenina (al contrari del que passa en la  $\beta$ -catenina) [84].

Fins ara no hi havien dades sobre el possible efecte dels extrems terminals de la placoglobina en la interacció amb cofactors que s'uneixen a través del domini armadillo. En tots els casos estudiats s'ha vist que la deleció d'un dels



dos extrems terminals provoca canvis en la unió dels cofactors al domini central armadillo (Figura 20).

El model que es proposa en aquest treball, en el que els extrems terminals estan regulant la unió de cofactors a la placoglobina, es referma amb les dades publicades posteriorment per altres grups. Aquests corroboren també que els dominis terminals estan modulant la funcionalitat de la placoglobina [210]. Com a exemple, en el treball de Yin i col·laboradors es descriu que l'extrem C-terminal de placoglobina és necessari perquè la placoglobina inhibeixi la mobilitat de cèl·lules aïllades en queratinòcits de ratolí. Aquest efecte és degut a la dificultat que té la forma  $\Delta$ C-placoglobina per inhibir Src (quinasa que la fosforila a la tirosina 643, produint una davallada de l'afinitat per l'E-cadherina [84]).

S'havia suggerit que els extrems terminals de placoglobina podrien regular la interacció amb diferents components dels desmosomes [211, 212], o amb Lef-1 [72], però, fins ara, no s'havia fet un treball exhaustiu estudiant la rellevància dels extrems de placoglobina en la interacció amb els diferents cofactors través del domini armadillo.

## **2 Els extrems terminals de $\beta$ -catenina i placoglobina determinen l'especificitat d'unió a factors.**

La regulació de l'especificitat de la unió a lligands de  $\beta$ -catenina pels seus extrems terminals també havia estat suggerida per altres grups [72, 213]. Aquests treballs, però, se centraven en l'estudi d'un sol cofactor i no proposaven un model més general de regulació, com s'ha intentat en aquest treball. Es va utilitzar proteïnes quimera, en les què el domini armadillo de  $\beta$ -catenina es va substituir pel de placoglobina i viceversa, per estudiar l'efecte de la unió a cofactors, tant de les unions adherents com nuclears. Els extrems terminals de  $\beta$ -catenina poden interaccionar amb el domini armadillo de placoglobina, de la mateixa manera com els extrems terminals de placoglobina interaccionen amb el domini armadillo de la  $\beta$ -catenina (Figura 23). En les quimeres, per tant, els extrems terminals mantenen la capacitat de regular

l'accessibilitat dels diferents cofactors al domini armadillo, de la mateixa manera que ho fan en les proteïnes natives.

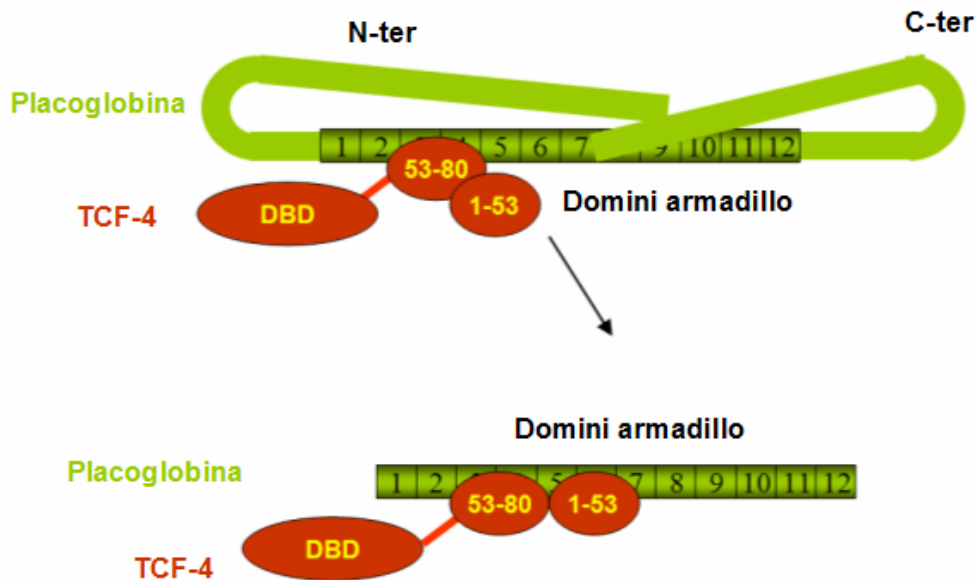
Els nostres resultats han demostrat que, per exemple, l'intercanvi del domini armadillo de la  $\beta$ -catenina pel de la placoglobina no provoca canvis en l'especificitat per la unió a la seqüència de TCF-4 específica per  $\beta$ -catenina (aà 1-50). És important destacar que el paper dels extrems terminals en determinar l'especificitat de la interacció no és igual pels diferents cofactors. Com a exemple, en la unió a TBP i  $\alpha$ -catenina l'extrem N-terminal sembla ser el determinant per la diferent afinitat mostrada per  $\beta$ -catenina i placoglobina. En aquest cas, el canvi de l'extrem N-terminal entre N $\beta$ -arm $\beta$ -Cpl i Npl-arm $\beta$ -pl provoca un canvi dràstic en l'afinitat per aquests cofactors, mentre que l'intercanvi entre els extrems C-terminals no provoca cap canvi considerable (Figura 25, panell 1 i 2). D'altra banda, l'afinitat per E-cadherina (Figura 25, panell 3) i per les diferents seqüències de TCF-4 (Figura 26) està determinada per l'extrem C-terminal.

El cas del TCF-4 requereix especial atenció ja que la  $\beta$ -catenina i la placoglobina s'uneixen pels seus dominis armadillo a dues zones adjacents del TCF-4. Mentre que  $\beta$ -catenina s'uneix pels 50 primers aminoàcids, la placoglobina ho fa pels trenta següents (aà 51-80). La unió de  $\beta$ -catenina i placoglobina al TCF-4 pot ser simultània, però la presència de placoglobina en el complex inhibeix la unió de TCF-4 al DNA [75]. Llavors, la  $\beta$ -catenina unida a TCF-4 és coactivadora de la transcripció, però quan la placoglobina és present al complex, actua de repressor de gens activats per  $\beta$ -catenina/TCF-4 (Figura 21). Sorprenentment, els aminoàcids del domini armadillo de  $\beta$ -catenina implicats en la unió a TCF-4 es troben quasi totalment conservats en placoglobina [25]. Les úniques variacions són canvis conservatius, substitució de Pro606 i Ile607 per Ser i Ala, respectivament. En els nostres experiments hem observat que la deleció dels extrems terminals de  $\beta$ -catenina i placoglobina provoca la pèrdua de l'especificitat d'unió a les dues seqüències de TCF-4. Els dominis armadillo de  $\beta$ -catenina i placoglobina s'uneixen de manera indistinta a les dues seqüències de TCF-4 (Figura 22). A més, hem

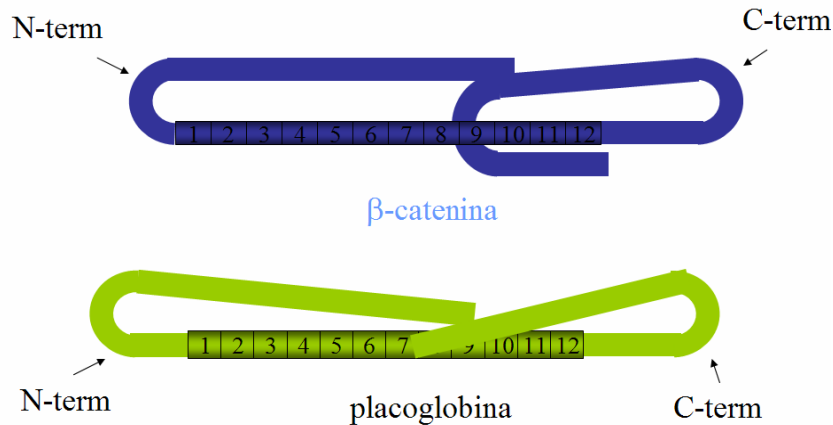
observat que la substitució únicament de l'extrem C-terminal de  $\beta$ -catenina pel de placoglobina en la quimera N $\beta$ -arm $\beta$ -Cpl confereix a la proteïna l'habilitat d'interaccionar amb la seqüència de TCF-4 específica per placoglobina (aà 51-110). D'altra banda aquesta quimera N $\beta$ -arm $\beta$ -Cpl, que només té l'extrem C-terminal de placoglobina i la resta de la molècula correspon a  $\beta$ -catenina, té pràcticament inhibida la capacitat d'interaccionar amb la seqüència de TCF-4 específica de  $\beta$ -catenina (aà 1-51) (Figura 26). Els resultats del nostre treball permeten explicar perquè les dues proteïnes s'uneixen a seqüències diferents de TCF-4. Tot i que les dues catenines contenen els dos llocs d'unió a TCF-4, aquests estan amagats pels extrems N- i C-terminals. El diferent plegament dels extrems terminals en la conformació nativa de les proteïnes és la raó per la qual només un dels llocs és accessible en cada una de les catenines (veure esquema a la Figura 29). En tots els casos els nostres resultats demostren que el domini armadillo, tot i tenir molta afinitat pels cofactors, no és el responsable de l'especificitat d'unió a la  $\beta$ -catenina o a la placoglobina. Són els extrems terminals els que determinen l'especificitat. A més, les diferències de la interacció dels extrems terminals amb el domini central són degudes a les diferents propietats dels extrems de  $\beta$ -catenina i placoglobina i no dels dominis armadillo.

Aquests resultats han permès proposar un model de regulació de la funcionalitat d'aquestes proteïnes com a peces clau dels complexos d'adhesió intercel·lular i com a efectors de la ruta  $\beta$ -catenina/TCF-4. Els extrems N- i C-terminals són els responsables de l'especificitat i actuen amagant els llocs potencials d'interacció amb cofactors presents en els dominis armadillo. Aquest efecte requereix la interacció dels dos extrems amb el domini armadillo. Com es mostra en aquest estudi, la interacció dels extrems terminals amb el domini armadillo no es produeix de la mateixa manera en  $\beta$ -catenina i en placoglobina (Figura 30). En particular, l'extrem N-terminal de  $\beta$ -catenina dificulta la interacció del C-terminal amb el domini armadillo, mentre que en el cas de la placoglobina, l'extrem N-terminal no afecta aquesta interacció. Possiblement, degut a això, l'extrem C-terminal de placoglobina és menys accessible a la

proteòlisi, suggerint que aquesta proteïna té una estructura més compacta (Figura 27). Seria interessant estudiar quins aminoàcids, probablement de l'extrem C-terminal, són rellevants per la interacció amb el domini armadillo i, per tant, responsables d'aquesta estructura diferent. En resum, els nostres resultats reforcen la conclusió que, malgrat que els dominis armadillo són els llocs per on s'uneixen la majoria de cofactors de  $\beta$ -catenina i placoglobina, aquests dominis no són els responsables de l'especificitat d'aquestes interaccions i actuen simplement com elements d'ancoratge.



**Figura 29: Esquema de l'efecte dels extrems terminals de placoglobina en la interacció amb TCF-4.** La placoglobina interacciona específicament amb la seqüència de TCF-4 de l'àa 53 al 80. La deleció dels extrems terminals de placoglobina permet que el domini armadillo interaccioni amb les dues seqüències de TCF-4: la d'unió a placoglobina (aà 53-80) i la d'unió a  $\beta$ -catenina (aà 1-53), perdent així l'especificitat. (DBD: domini d'unió a DNA).



**Figura 30: Model proposat per explicar les diferències en les interaccions dels extrems terminals de placoglobina i  $\beta$ -catenina amb els dominis armadillo.**

### 3 Els extrems de p120-catenina regulen la unió de l'E-cadherina al domini armadillo.

Amb la idea d'estendre el nostre model de regulació de la unió a factors pels extrems terminals de  $\beta$ -catenina i placoglobina, es van realitzar assaigs d'interacció *in vitro* amb la p120-catenina. La p120-catenina és una catenina que també consta d'un domini central de repeticions armadillo i dos extrems terminals, com la  $\beta$ -catenina i la placoglobina. Tot i això, hi ha característiques que la fan diferent. Mentre que la  $\beta$ -catenina i la placoglobina competeixen per la unió a l'E-cadherina, p120-catenina s'hi uneix de manera independent pel domini juxtamembrana (JMD) [10]. La p120-catenina difereix d'aquestes altres dues catenines pel fet que no interacciona amb  $\alpha$ -catenina ni APC [214]. La p120-catenina estableix l'E-cadherina a les unions adherents i té un paper d'acobladora de factors a les unions adherents, com tirosina quinases [31] i GTPases de la família de Rho [108, 111]. La p120-catenina també pot translocar al nucli.

La regulació que els extrems terminals de la p120-catenina exerceixen sobre la unió de l'E-cadherina al domini central armadillo és comparable a la que s'ha descrit en aquest mateix treball per la  $\beta$ -catenina i la placoglobina. Com ja s'ha comentat, els dominis armadillo de la placoglobina i de la  $\beta$ -catenina tenen un

punt isoelèctric (pI) bàsic que permet que els extrems terminals (amb pI àcid) interaccionin amb la seva superfície. En el cas de p120-catenina, el domini armadillo també té un pI bàsic, però només l'extrem N-terminal té pI àcid. El C-terminal, en canvi, el té neutre. Aquesta dada fa pensar en un paper més rellevant del domini N-terminal en la regulació de la unió dels diferents cofactors al domini armadillo. Això es posa de manifest en els nostres experiments, on s'observa que la deleció de l'extrem C-terminal no provoca un gran canvi en l'afinitat de p120-catenina per E-cadherina respecte la forma  $\Delta$ N-p120-catenina (comparar entre  $\Delta$ N-p120-catenina i armadillo, els carrils 4 i 5 a la Figura 28).

Es troben diverses isoformes de p120-catenina originades per diferents orígens de transcripció (Figura 11). L'expressió d'una o altra isoforma depèn del teixit: les formes més llargues de la p120-catenina s'associen a fenotips més mòbils, les més curtes, més sèssils. La isoforma més curta, la 4, que comença a l'aminoàcid 347, a més de promoure un fenotip extremadament sèssil, no interacciona amb RhoA i, per tant, tampoc la inhibeix [104, 215]. Es pot considerar que aquesta isoforma 4 és equivalent a la construcció  $\Delta$ N-terminal-p120-catenina (350-911) emprada en els nostres experiments *in vitro*. Conseqüentment, la forma  $\Delta$ N-terminal (350-911) interacciona amb més afinitat amb E-cadherina que la proteïna sencera (aà 1-911), promovent estabilitat a les unions adherents.

L'associació entre la p120-catenina i l'E-cadherina està modulada per les tirosina quinases Fyn, Src i Fer. En el nostre grup es va descriure que la fosforilació de la p120-catenina per Src, Fer o Fyn incrementa l'afinitat per l'E-cadherina [30]. És remarcable que el domini armadillo de p120-catenina, regió responsable de la unió a E-cadherina, no es fosforila per aquestes quinases [108]. S'ha determinat que els llocs on aquestes quinases fosforilen la p120-catenina es localitzen al domini N-terminal. Això suggereix que el domini armadillo i l'extrem regulador N-terminal estan propers i que, de manera similar a com passa amb  $\beta$ -catenina i placoglobina, la interacció de cofactors al domini armadillo també està regulada per canvis conformacionals en els extrems

terminals. Aquests canvis conformacionals es poden deure a fosforilacions o a la unió prèvia d'altres cofactors.

La p120-catenina, en determinades circumstàncies, es pot trobar al nucli unida al repressor transcripcional Kaiso [122]. Kaiso s'uneix als promotors de gens diana de la via de Wnt, com la ciclina D1, matrilisina i la metal·loproteasa de matriu MMP7 [125], i en reprimeix la seva expressió. La interacció de p120-catenina amb Kaiso impedeix la unió d'aquest factor al DNA, facilitant l'activació dels gens reprimits per Kaiso [216]. En aquest cas, la p120-catenina està actuant de Kaiso s'uneix a través del domini armadillo de p120-catenina, segurament exclouent l'E-cadherina del complex ja que fan servir la mateixa superfície per unir-s'hi. En la seqüència de p120-catenina es pot reconèixer un senyal de localització nuclear (NLS) i dos senyals d'export nuclear (NES), seqüències que regulen el trànsit de p120-catenina a través de la membrana nuclear. Els canvis conformacionals en els extrems terminals poden exposar o amagar seqüències de la p120-catenina implicades en aquest mecanisme de control de la localització subcel·lular de p120-catenina. Si la interacció amb Kaiso es regula només per la localització de p120-catenina o si hi ha algun altre mecanisme post-transcripcional implicat és encara una qüestió oberta en la que treballen membres del nostre grup. Per tant, en el cas de p120-catenina, a més de la interacció amb els seus cofactors, la disposició de l'extrem N-terminal sobre el domini armadillo regula la seva localització subcel·lular [104].





## **I.CONCLUSIONS**



- ✓ Els dominis armadillo de  $\beta$ -catenina i placoglobina tenen molta afinitat però poca especificitat pels seus lligands, comparat amb la proteïna *wt*.
- ✓ Els extrems N- i C-terminal interaccionen amb els dominis armadillo de placoglobina i restringeixen la unió de factors.
- ✓ Els extrems terminals, i no els dominis armadillo, són essencials per la diferent especificitat d'unió de factors a  $\beta$ -catenina i placoglobina.
- ✓ La interacció dels extrems amb el domini armadillo és interdependent: com a conseqüència, la unió de factors a  $\beta$ -catenina i placoglobina és coordinada.
- ✓ Tot i la baixa homologia seqüencial que p120-catenina conserva amb  $\beta$ -catenina i placoglobina, s'ha descrit un mecanisme semblant de regulació de la interacció amb E-cadherina.



**CAPÍTOL II: ELS COMPONENTS DE LES  
UNIONS ADHERENTS SÓN EFECTORS  
NEGATIUS DE LA VIA DE NF- $\kappa$ B**



## **II.RESULTATS**



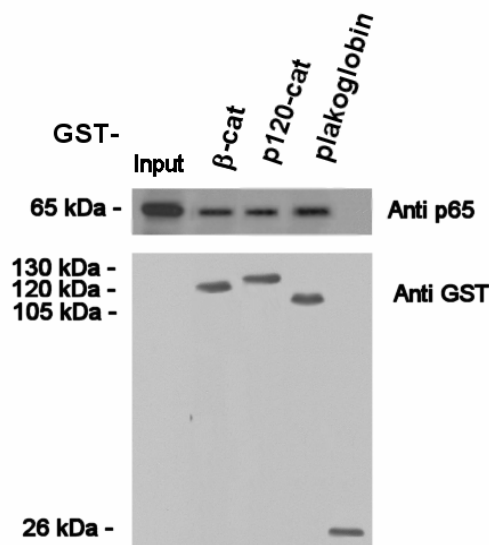


### **1 La interacció de la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B amb els components de les unions adherents inhibeix la seva activitat transcripcional.**

En treballs previs s'havia descrit que la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B i  $\beta$ -catenina formaven part d'un mateix complex, indicant, però, que la interacció entre aquests dos factors no era directa [217]. És per això que nosaltres vam voler estudiar més a fons aquesta relació i si altres factors de les unions adherents podien formar part d'aquests complexos. També ens va semblar interessant analitzar si p65 podia estar associat a la membrana, formant part de les unions adherents, o bé si, aquests complexos amb  $\beta$ -catenina es troben al citosol o al nucli de les cèl·lules.

Vam realitzar assaigs de *Pull-down* incubant les diferents catenines fusionades a GST amb extractes totals de cèl·lules tumorals epitelials de colon SW480. Es va observar que tant  $\beta$ -catenina, p120-catenina com placoglobina interaccionen amb la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B (Figura 31).

El fet que p65 interaccionés amb més d'un component de les unions adherents suggeria que la interacció de p65 amb  $\beta$ -catenina podria donar-se als complexos d'aquest tipus d'unions intercel·lulars.



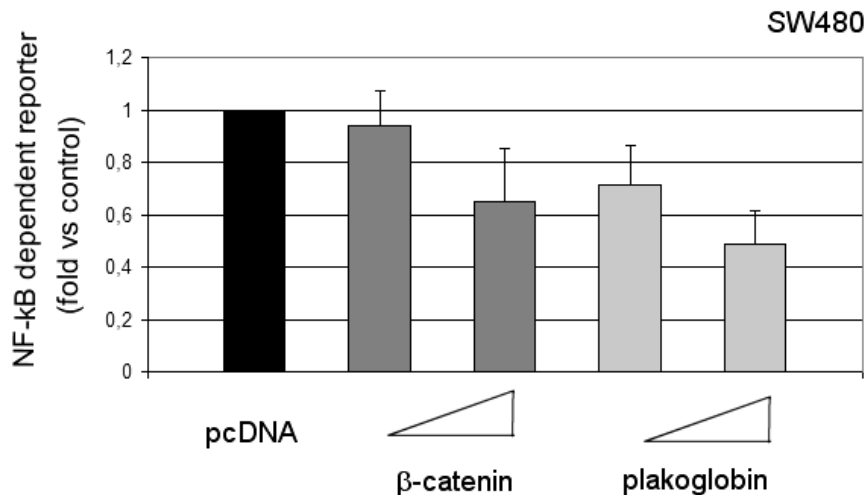
**Figura 31:  $\beta$ -catenina, p120-catenina i placoglobina interaccionen amb p65.** Assaig de *Pull-down* de p65 amb les catenines purificades en *E. coli* fusionades a la GST. Es van incubar 6 pmol de proteïnes recombinants amb 500  $\mu$ g d'extractes totals RIPA de SW480. Els complexos purificats amb *Glutathion-Sepharose 4B* es van analitzar per *Western blot* amb un anticòs monoclonal anti-p65. Les membranes es van tornar a analitzar amb anti-GST per assegurar que hi havia la mateixa quantitat de proteïna esquer.

### 1.1 Les catenines disminueixen l'activitat transcripcional de NF- $\kappa$ B.

Tal i com ja s'havia descrit, la  $\beta$ -catenina és capaç d'inhibir l'activitat transcripcional mitjançada per p65 [217]. Degut a que placoglobina també interacciona amb p65, vam voler estudiar si aquesta unió provocava el mateix efecte sobre la seva activitat transcripcional.

Vam observar que la placoglobina inhibeix l'activitat transcripcional d'un promotor sintètic sensible a NF- $\kappa$ B, que conté tres caixes d'unió a NF- $\kappa$ B, anomenat NF3 fins al 50%, mentre que  $\beta$ -catenina té menor capacitat d'inhibició (Figura 32). Això s'explica perquè en el model cel·lular utilitzat la  $\beta$ -catenina sobreexpressada tendeix a formar part de la fracció citosòlica i nuclear. Això es deu a que està altament fosforilada en tirosines, per tant, alliberada de les unions adherents, per la presència de la forma oncogènica de

K-ras (G12V) i també per la impossibilitat de ser degradada per una mutació en el gen d'APC que trunca el producte. En canvi la placoglobina, encara que se sobreexpressi, s'ancora a les unions intercel·lulars i pot desplaçar la  $\beta$ -catenina del complexos d'adhesió.



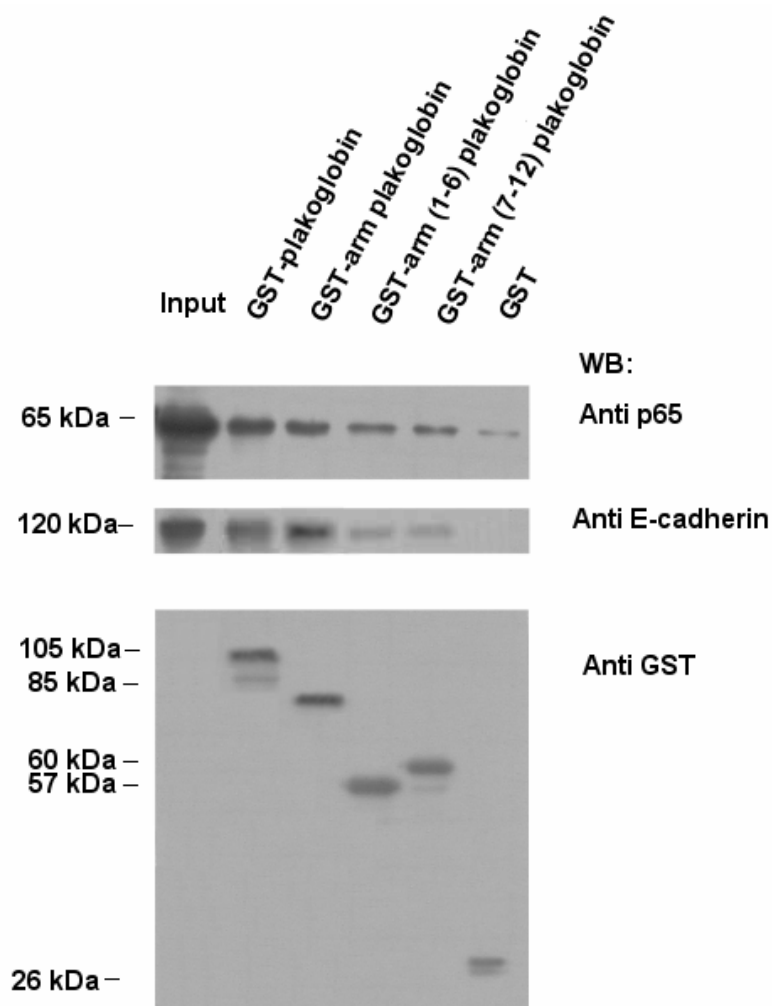
**Figura 32: La placoglobina té més capacitat que la  $\beta$ -catenina d'inhibir l'activitat d'un promotor sintètic que respon a NF- $\kappa$ B.** Quantitats creixents de  $\beta$ -catenina i placoglobina (150 i 300 ng) es van co-transfectar en cèl·lules SW480 juntament amb el plàsmid NF3 i la renilla com a control intern. En aquesta gràfica es presenta la mitjana ( $\pm$ SD) dels resultats de tres experiments independents realitzats per triplicat.

## 1.2 La p120-catenina i la placoglobina interaccionen amb p65 de manera similar a com ho fan amb l'E-cadherina.

La interacció entre  $\beta$ -catenina i p65 no és directa [217]. En l'intent de trobar el factor de les unions adherents que interacciona directament amb p65 es va decidir estudiar més a fons la interacció de la placoglobina i la p120-catenina amb p65.

Vam realitzar assaigs de *Pull-down* comparant la proteïna sencera amb fragments de placoglobina i es va determinar que la presència dels extrems terminals facilita en aquest cas la interacció amb p65 (Figura 33). També es

pot observar que la integritat del domini armadillo de placoglobina és necessària per la correcta interacció amb p65 (carrils 3, 4 i 5 de la Figura 33). Això indica que l'associació amb p65 podria donar-se a través de la unió a més d'un factor a través del domini armadillo, necessitant així més d'una zona de la proteïna per formar el complex. Es pot observar que la interacció amb l'E-cadherina també requereix el domini armadillo sencer (segon panell, Figura 33).

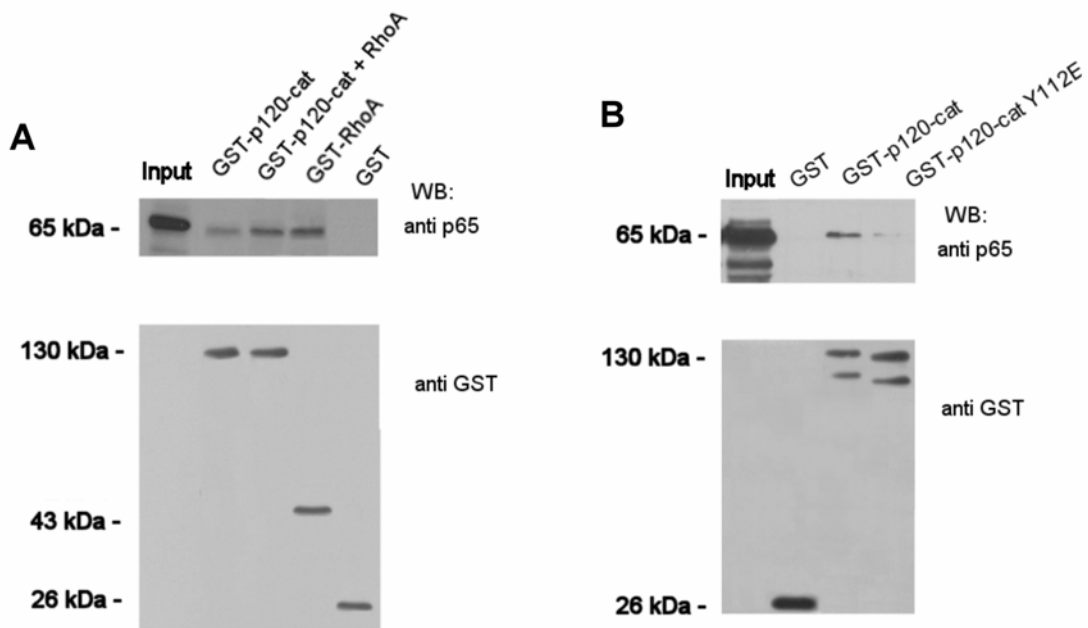


**Figura 33: Anàlisi del domini de placoglobina necessari per la interacció amb p65.**

Diferents fragments de placoglobina fusionats a GST (6 pmol) es van utilitzar com a esquer en assaigs de *Pull-down* amb 500 µg d'extractes RIPA de SW480. La GST sola es va fer servir com a control. Els complexes purificats van ser analitzats per *Western blot* amb anticòs monoclonal contra p65. Després les membranes es van revelar anti-GST per assegurar la quantitat de proteïna en cada condició.

La p120-catenina també interacciona amb p65 *in vitro*. L'interès de la interacció amb p65 recau en què la p120-catenina és una proteïna que acobla diferents factors a les unions adherents. Entre ells podem trobar quinases com Fyn i Fer [31] i GTPases, entre les que trobem RhoA [108]. Degut al gran nombre de factors als que s'uneix la p120-catenina, l'estudi de la seva interacció amb p65 ens podria aportar dades sobre el factor de les unions adherents que interacciona directament amb p65.

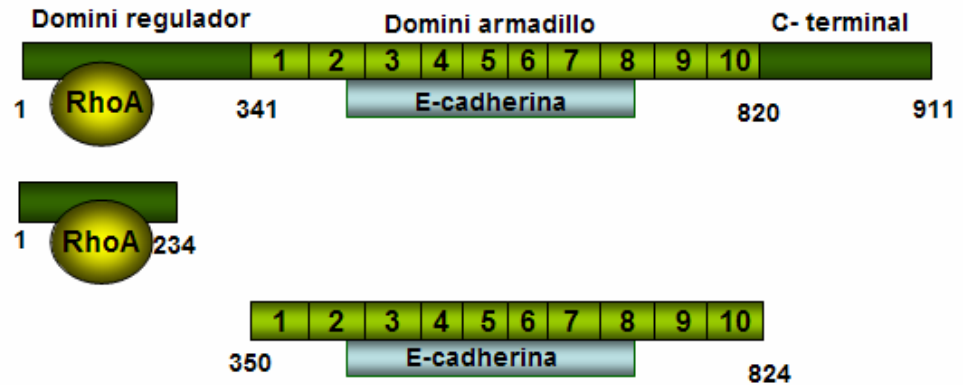
Per aprofundir en l'estudi del possible interactor directe de p65 vam analitzar si la presència de RhoA tenia algun efecte en la formació del complex p65-p120-catenina. Vam realitzar assaigs de *Pull-down* amb proteïnes recombinants fusionades a la GST i vam analitzar els complexos purificats. La unió de p65 a p120-catenina augmentava quan s'havia preincubat la p120-catenina-GST amb RhoA recombinant (comparar carrils 2 i 3 del panell A de la Figura 34). És remarcable que RhoA-GST també forma un complex *in vitro* amb la subunitat p65 (carril 4 del panell A de la Figura 34). També vam analitzar si en absència de RhoA unida a p120-catenina, la unió entre p120-catenina i p65 es veia afectada. Es va fer servir la construcció de p120-catenina amb la tirosina 112 mutada a glutàmic, que mimetitza la fosforilació per Fyn d'aquest residu, i no uneix RhoA [108] per fer assaigs de *Pull-Down* de p65 d'extractes totals de SW480. Vam observar que la p120-catenina-Y112E, incapaç d'unir RhoA, uneix p65 amb molta menys afinitat que la p120-catenina *wt* (Figura 34, panell B).



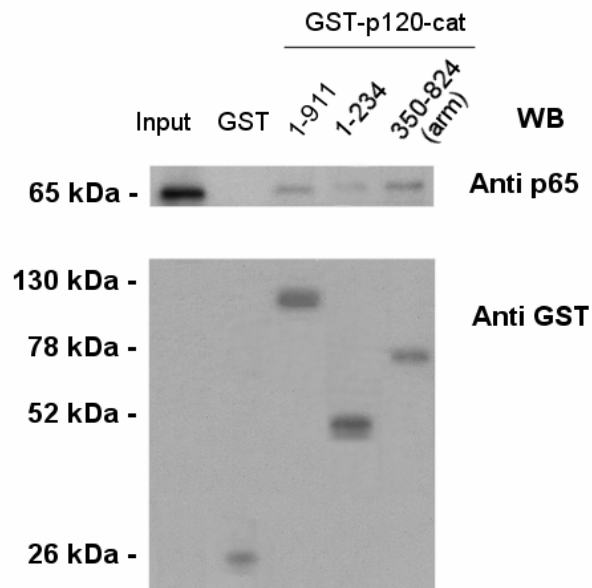
**Figura 34: La p120-catenina unida a RhoA interacciona amb més afinitat amb p65. (A) La unió prèvia de RhoA a p120-catenina facilita la interacció amb p65.** Es van incubar 7 pmol de proteïna fusionada a la GST o GST sola com a control amb 500  $\mu$ g d'extractes totals de SW480. Per la preincubació amb RhoA, la p120-catenina-GST es va incubar amb 35 pmol de RhoA prèviament al *Pull-down*. **(B) La p120-catenina que no pot interaccionar amb RhoA (Y112E) uneix p65 amb menys afinitat.** 7 pmol de proteïna fusionada a la GST o GST sola com a control amb 500  $\mu$ g d'extractes totals de SW480. En tots dos casos els complexos purificats es van analitzar per *Western blot* amb anticòs monoclonal contra p65. Les membranes es van re-analitzar contra GST per assegurar que s'havien inclòs les mateixes quantitats de proteïnes esquer. El 3% d'extractes es van carregar com a control (Input).

Degut a l'efecte afavoridor de RhoA sobre la interacció p120-catenina-p65, vam voler provar si RhoA era l'interactor directe amb p65. Per això, vam realitzar assaigs de *Pull-down* de p65 amb dos fragments de p120-catenina: el que correspon al principi del domini N-terminal, que uneix RhoA però no E-cadherina, i el domini armadillo, que uneix amb més afinitat E-cadherina que la proteïna sencera, però no uneix RhoA (Figura 35). Si RhoA fos el vincle entre p120-catenina i p65, el fragment N-terminal (aà 1-234) seria suficient per observar interacció amb p65.

## p120-catenina



**Figura 35: Esquema de les construccions de p120-catenina utilitzades pels assaigs de *Pull-down* de p65.** La construcció p120-catenina (aà 1-234) interacciona amb RhoA però no amb E-cadherina, i la p120-catenina (aà 350-824) interacciona amb E-cadherina però no conté el lloc d'interacció amb RhoA.



**Figura 36: El domini armadillo de p120-catenina és essencial per la interacció amb p65.** 7 pmol de proteïna fusionada a GST corresponent a les diferents zones de p120-catenina es van incubar amb 500 µg d'extractes RIPA de SW480. Els complexos purificats amb *Glutathion-Sepharose* es van analitzar per *Western blot*.

Es va observar, però, que la construcció que comprèn els 234 primers aminoàcids (aà 1-234) uneix p65 amb molt poca afinitat (carrils 3 i 4 de la Figura 36). Descartant, llavors, a RhoA com a interactor directe amb p65. En canvi, el domini armadillo (aà 350-824) uneix p65 amb una afinitat lleugerament superior que la proteïna sencera (comparar carrils 3 i 5 de la Figura 36). Com s'ha demostrat al primer capítol d'aquesta tesi, l'E-cadherina interacciona amb el domini armadillo de la p120-catenina amb més afinitat que amb la proteïna sencera (Figura 28). El fet que el domini armadillo de p120-catenina també uneixi p65 amb més afinitat que la proteïna sencera, suggereix que l'E-cadherina pot tenir un paper rellevant en la interacció entre la p120-catenina i p65.

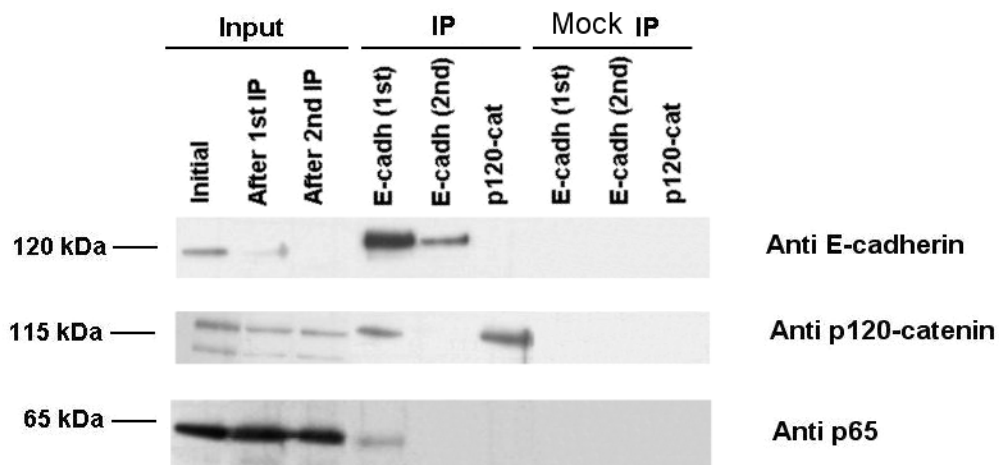
Com que els dominis armadillo de placoglobina i p120-catenina són essencials per interaccionar tant amb p65 com amb E-cadherina ens vam plantejar que l'E-cadherina podria estar implicada en la formació dels complexos catenines-p65.

### **1.3 Únicament les catenines associades a l'E-cadherina interaccionen amb p65.**

Com ja s'ha esmentat, p65 interacciona la placoglobina i la p120-catenina a més d'amb la  $\beta$ -catenina, tots ells, factors dels complexos d'adhesió intercel·lular. A més la placoglobina i la p120-catenina interaccionen amb p65 d'una manera semblant a com ho fa amb l'E-cadherina. Aquests resultats van fer pensar que l'E-cadherina podria ser necessària per la interacció entre aquests factors. Per tal de verificar la interacció de p65 amb l'E-cadherina i també per constatar si els complexos de p65 amb les catenines estaven restringits a les unions adherents es va immunoprecipitar E-cadherina de les cèl·lules epitelials intestinals IEC-18 (carril 4, Figura 37). D'altra banda, es va immunodeplecionar l'E-cadherina amb dues immunoprecipitacions seqüencials amb anticòs contra E-cadherina i, posteriorment, es va immunoprecipitar la fracció restant de p120-catenina, la citosòlica (carril 6, Figura 37). Mentre que la immunodepleció d'E-cadherina va reduir els nivells de p120-catenina, els de p65 no queden afectats de manera significativa, suggerint que la major part de



p65 no està unida a l'E-cadherina (carril 1 i 2 dels Inputs). Tal com esperàvem, es detecta p65 i p120-catenina associades a E-cadherina (carril 4). En canvi, no es va observar interacció entre la p120-catenina citosòlica (no associada a E-cadherina) i p65 (carril 6). Corroborant, així, que només la fracció de p120-catenina associada a la membrana és capaç d'interaccionar amb p65.

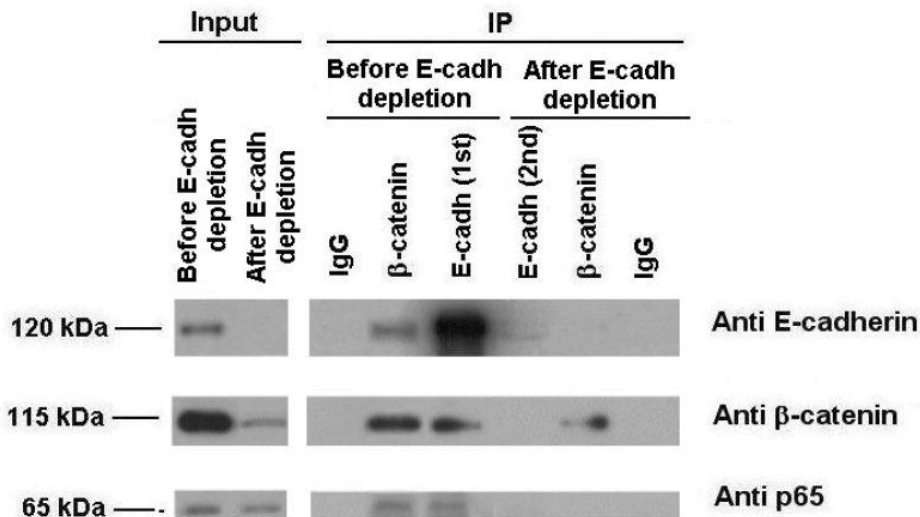


**Figura 37: Només la fracció de p120-catenina unida a E-cadherina interacciona amb p65.** Es va realitzar dues immunoprecipitacions seqüencials d'E-cadherina de 500 µg d'extractes totals de cèl·lules IEC-18. Es va repetir el procés i del sobrenedant, ara sense E-cadherina (ni els altres components associats a les unions adherents), es va immunoprecipitar la p120-catenina romanent. Tots els complexos purificats es van analitzar per *Western blot*. El 2% dels extractes a cada pas es van fer servir com a controls (*Input*).

Es va realitzar el mateix tipus d'experiment, ara, però, immunoprecipitant la  $\beta$ -catenina dels extractes immunodeplecionats amb anticòs contra E-cadherina. La fracció de  $\beta$ -catenina no associada a E-cadherina és molt reduïda en aquestes cèl·lules IEC-18 ja que es degrada ràpidament quan s'allibera de les unions adherents. Per això, quan s'immunoprecipita l'E-cadherina dels extractes totals es redueixen els nivells de  $\beta$ -catenina dràsticament (comparar primer i segon carril dels Inputs de la Figura 38). Quan s'immunoprecipita  $\beta$ -catenina dels extractes totals es troba una quantitat de p65 associada similar a la que trobem quan immunoprecipitem l'E-cadherina (comparar carrils 2 i 3 de la immunoprecipitació prèvia a la immunodepleció d'E-

## II.RESULTATS

cadherina, Figura 38). En canvi, quan s'analitzen els complexos associats a la  $\beta$ -catenina no associada a E-cadherina no es detecta p65 (carril 2 de la immunoprecipitació post-immunodepleció, Figura 38).

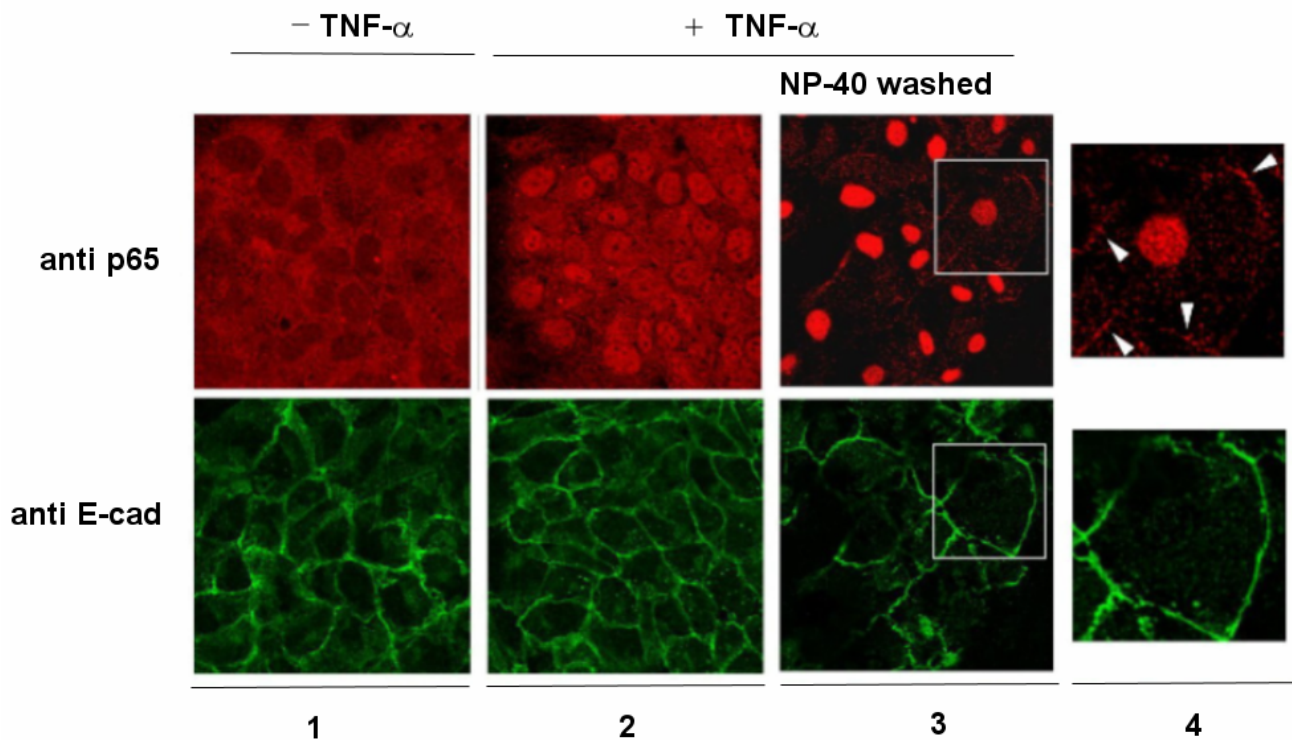


**Figura 38: La fracció de  $\beta$ -catenina no associada a E-cadherina no interacciona amb p65 en IEC-18.** Es va immunoprecipitar la  $\beta$ -catenina i l'E-cadherina de 500  $\mu$ g extractes totals tipus RIPA de IEC-18. Els complexos purificats es van analitzar per *Western blot* ("Before E-cadherin depletion"). Es va immunodeplecionar E-cadherina amb dues immunoprecipitacions seqüencials amb anticòs contra E-cadherina de 500  $\mu$ g d'extractes RIPA totals de IEC-18. Del sobrenedant es va immunoprecipitar la  $\beta$ -catenina romanent, no associada a E-cadherina. Els complexos purificats es van analitzar per *Western blot* ("After E-cadherin depletion"). El 3 % dels extractes utilitzats es van carregar com a control (*Input*).

En aquests experiments s'evidencia que l'E-cadherina i p65 interaccionen en cèl·lules. Aquest resultat és novedós, ja que per primer cop s'indica que els complexos de les unions adherents poden retenir p65.

Es va fer un assaig d'immunofluorescència per determinar la localització dels complexos d'E-cadherina i p65 en les cèl·lules epitelials IEC-18. L'E-cadherina, marcada en verd a la Figura 39, es distribueix al llarg de tot el perímetre de les cèl·lules, resseguint les membranes. La intensitat de la fracció citosòlica de p65 (en vermell) impedia diferenciar-la de que podia estar associada a la membrana. Per això es va reduir la quantitat de p65 del citosol

amb  $\text{TNF-}\alpha$ , que provoca la seva activació i translocació al nucli (panell 2, Figura 39). Com que aquest mètode no era suficient per aïllar la fracció de p65 associada a les membranes, es van rentar les cèl·lules prèviament a la fixació amb detergent a baixa concentració (0,025% NP-40 en PBS) (panell 3, Figura 39). Tot i que p65 localitza preferentment al citosol, on roman inactiu unit a  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , es va poder detectar una fracció minoritària de p65 que colocalitza amb E-cadherina a la membrana, probablement associada a les unions adherents (fletxes blanques al panell 4 de la Figura 39).



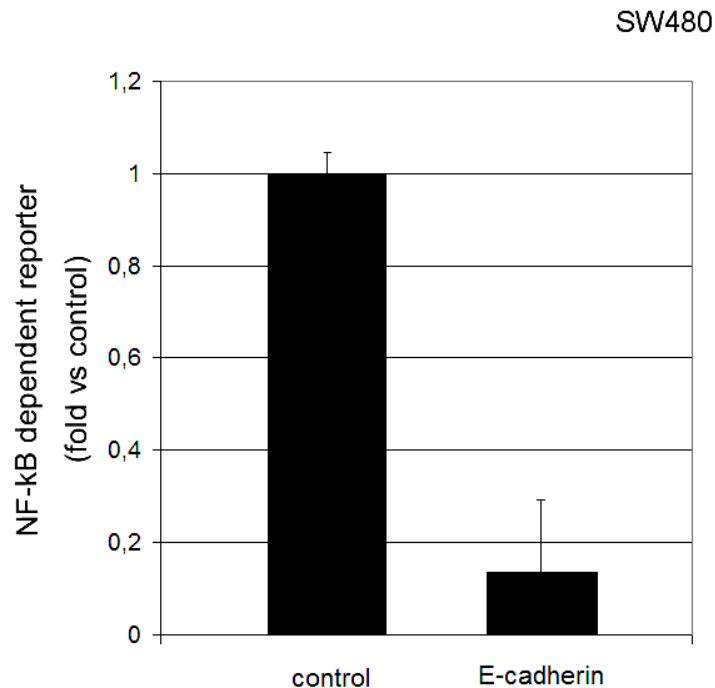
**Figura 39: Colocalització per immunofluorescència de p65 i E-cadherina. (1)** Detecció d'E-cadherina (verd, Alexa 488) i p65 (vermell, Alexa 555) en cèl·lules IEC-18 sembrades sobre cobreobjectes de vidre i portades a confluència. **(2)** Per ressaltar p65 a la zona de membrana, es va tractar les cèl·lules amb 20 ng/ml de  $\text{TNF-}\alpha$  (per mobilitzar p65 del citosol cap al nucli) **(3)** i es van rentar amb 0,025% NP-40-PBS (per permeabilitzar les membranes plasmàtiques i restar senyal de p65 al citosol). La petita quantitat de p65 que roman a la membrana colocalitza amb E-cadherina, ampliat a **(4)**.

## **2 L'E-cadherina reprimeix l'activitat transcripcional de NF- $\kappa$ B.**

Com que s'havia detectat interacció entre E-cadherina i la subunitat p65 es va decidir estudiar l'efecte d'aquesta cadherina sobre la via de NF- $\kappa$ B. Es va decidir utilitzar un sistema cel·lular amb alta activitat transcripcional de la via NF- $\kappa$ B, com les SW480 [218], per estudiar-ne la inhibició. El Dr. García de Herreros ens va cedir cèl·lules SW480 transfectades establement amb E-cadherina (E-cad), Snail1-HA (repressor transcripcional d'E-cadherina) (Snail) i ambdues proteïnes (Snail-E-cad). L'expressió ectòpica d'E-cadherina en aquestes cèl·lules promou un fenotip molt més epitelial, quan es comparen amb les cèl·lules control (comparar panell dret (control) i esquerre (E-cad) de la Figura 41).

### **2.1 L'expressió ectòpica d'E-cadherina inhibeix l'activitat transcripcional de NF- $\kappa$ B en SW480 segregant la subunitat p65 a les unions adherents.**

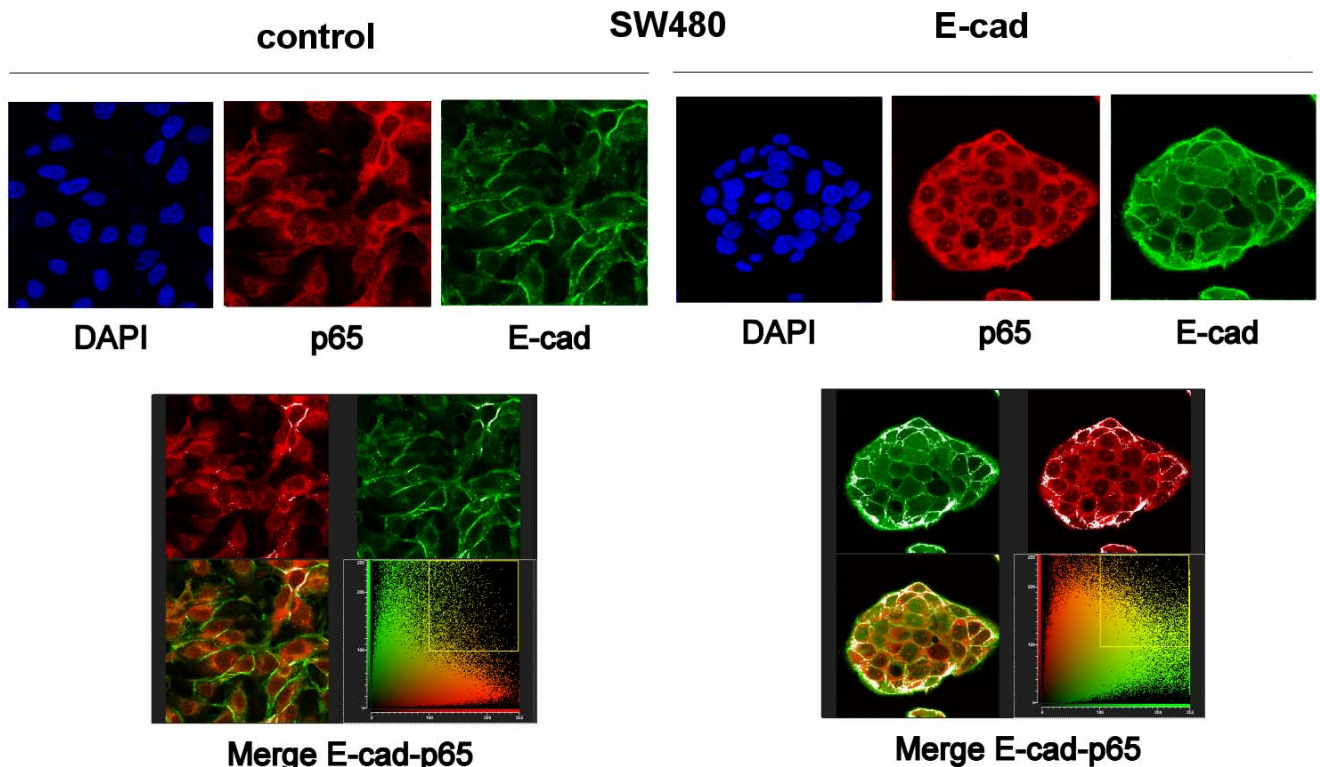
Es va analitzar l'activitat transcripcional depenent de NF- $\kappa$ B en les cèl·lules SW480 expressant o no E-cadherina. Es va observar una davallada molt acusada (del 85%) de l'activitat del plàsmid reporter sensible a NF- $\kappa$ B, NF-3, en les cèl·lules que expressen E-cadherina (Figura 40).



**Figura 40: L'expressió ectòpica d'E-cadherina produeix una davallada de l'activitat transcripcional de p65.** L'activitat transcripcional de NF- $\kappa$ B es va mesurar amb el plàsmid reporter NF3 en cèl·lules amb expressió estable d'E-cadherina i el seu control. Es va fer servir la renilla com a control intern. Els resultats presentats són la mitjana de tres experiments independents realitzats per triplicat ( $\pm$ SD).

Es va analitzar si la inhibició de la transcripció mitjançada per p65 en les cèl·lules SW480-E-cad era deguda al segrest del factor de transcripció a les unions adherents. Es van tenir els nuclis de les cèl·lules amb DAPI (blau), i es van fer servir anticossos conjugats a fluorocroms Alexa per l'E-cadherina (Alexa 488, verd) i p65 (Alexa 555, vermell). Es va observar que l'E-cadherina ectòpicament expressada és capaç de localitzar a la membrana i incrementar la presència de la subunitat p65 a les unions intercel·lulars (comparar el senyal de p65, vermell, entre el panell esquerre (control) i dret (transfectades amb E-cadherina) a la Figura 41). Els punts de colocalització, que es marquen en blanc a la imatge inferior dels panells dret i esquerre de la Figura 41, són més nombrosos en les cèl·lules SW480-E-cad que en les SW480-control. Aquest resultat dóna suport a la idea que la davallada d'activitat transcripcional de NF-

$\kappa$ B induïda per l'expressió d'E-cadherina pugui ser deguda a la retenció de p65 a les unions adherents.

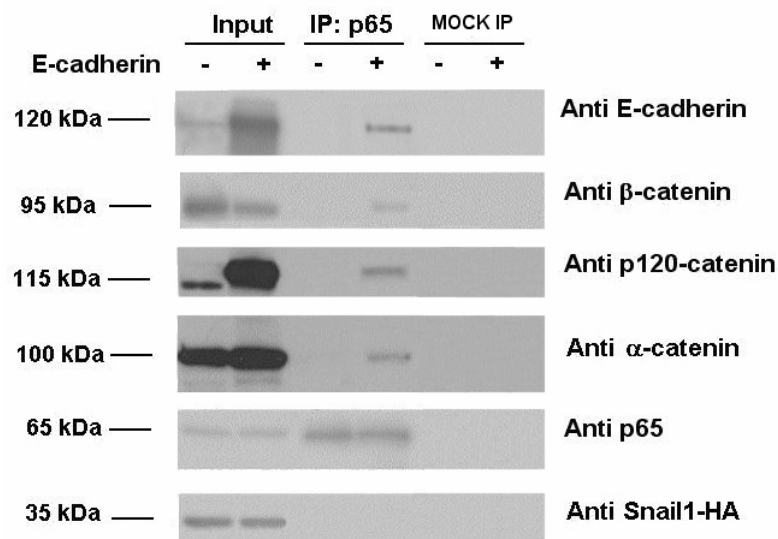


**Figura 41: L'E-cadherina ectòpica segresta p65 endogen.** Immunofluorescència de p65 (vermell, Alexa 555), E-cadherina (verd, Alexa 488) en SW480 estables per l'expressió d'E-cadherina i control. Es van tenyir els nuclis amb DAPI (blau).

Com que l'E-cadherina és el factor amb més capacitat de reprimir l'activitat transcripcional de NF- $\kappa$ B i donat que les catenines interaccionen amb p65 quan estan associades a les unions adherents, unides a E-cadherina, es va voler aprofundir en l'estudi de la interacció de l'E-cadherina amb p65.

Ja havíem demostrat que l'E-cadherina era essencial per la formació dels complexos de p65 amb les catenines. Es va estudiar si el restabliment de l'expressió d'E-cadherina en cèl·lules amb nivells molt baixos d'E-cadherina permetia de nou la formació dels complexos de les catenines amb p65. Per això, es van fer servir les cèl·lules SW480 transfectades establement amb Snail1-HA (Snail) i Snail1-HA i E-cadherina (Snail-E-cad). Així, s'obtenen

cèl·lules amb nivells molt baixos d'E-cadherina per l'efecte repressor de Snail1 i cèl·lules on l'expressió d'E-cadherina és elevada per l'expressió ectòpica d'aquesta. Quan s'analitzen els complexos que co-immunoprecipiten amb p65 en les cèl·lules SW480-Snail no es detecta interacció amb cap de les catenines. En canvi, en les que expressen ectòpicament E-cadherina (SW480-Snail-E-cad) s'observa p65 associada a E-cadherina i les catenines. Es recuperen els complexos formats per  $\beta$ -catenina, p120-catenina i  $\alpha$ -catenina amb p65 (Figura 42).



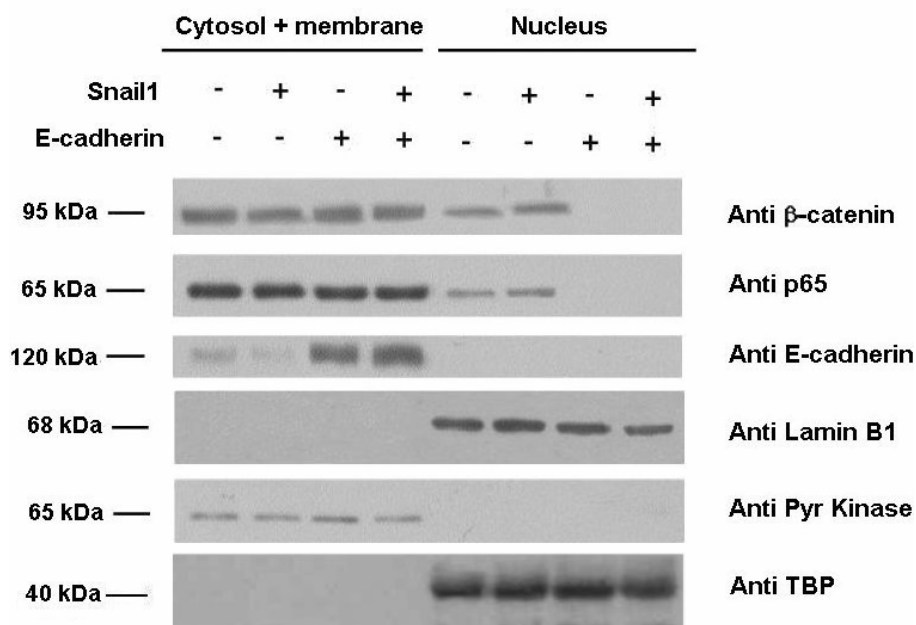
**Figura 42: La interacció entre p65 i les catenines depèn de la presència d'E-cadherina.** S'analitzen per *Western blot* els complexos que co-immunoprecipiten amb p65 de 500  $\mu$ g d'extractes totals de cèl·lules SW480-Snail transfectades establement amb E-cadherina. Es fa servir com a control (*Input*) el 2% d'extractes.

En aquest mateix sistema cel·lular es va analitzar la localització subcel·lular de p65. Es van preparar extractes cel·lulars separant la fracció citosòlica i de membrana de la fracció nuclear. A la Figura 43 es pot observar que les proteïnes de membrana (E-cadherina, tercer panell) i citosòliques (Piruvat quinasa, cinquè panell) s'havien separat de les proteïnes nuclears (LaminaB1 i TBP, quart i sisè panell). Tot i que la subunitat p65 es troba majoritàriament al

## II.RESULTATS

citòsol, en les cèl·lules SW480-control i SW480-Snail està present al nucli (segon panell de la Figura 43, carrils 5 i 6). L'expressió d'E-cadherina impedeix la localització nuclear de p65 (segon panell de la Figura 43, carrils 7 i 8). Resultats similars s'obtenen quan s'analitza la localització de la  $\beta$ -catenina, ja que quan s'expressa E-cadherina, aquesta queda retinguda a la membrana als complexos d'adhesió (primer panell de la Figura 43).

En conjunt, tots aquests resultats demostren que la presència d'E-cadherina és essencial per la formació dels complexos p65-catenines.



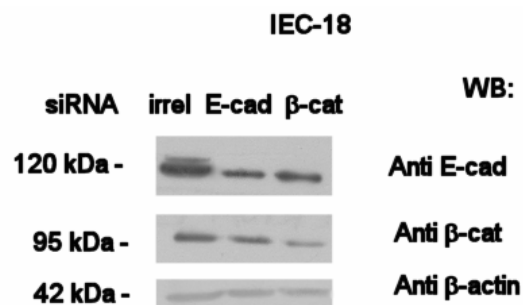
**Figura 43: Fraccionament subcel·lular de cèl·lules SW480 transfectades establement amb Snail1 i E-cadherina.** Es va realitzar el fraccionament subcel·lular de les proteïnes i es va carregar 10  $\mu$ g d'extractes "citòsol-membrana" i el corresponent volum d'extractes de la fracció "nucli". La quantitat de cada proteïna present a cada fracció s'analitza per *Western blot*. Els corresponents marcadors dels compartiments es van utilitzar per normalitzar i per descartar contaminacions entre ells (nucli: TBP i Lamina B1, citòsol: piruvat quinasa).



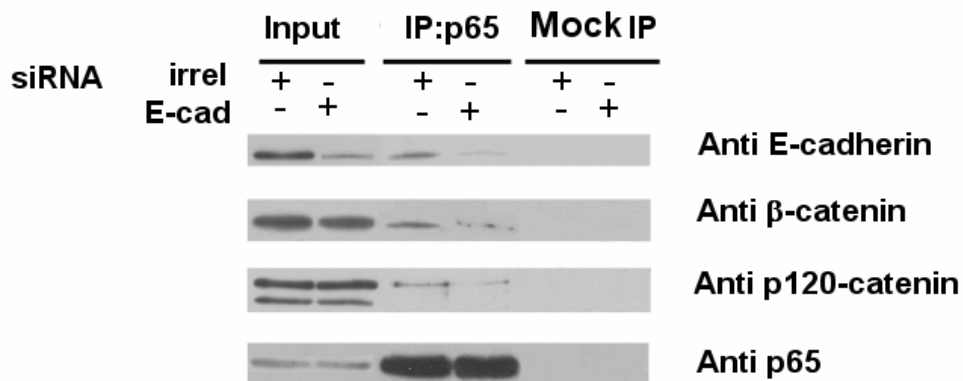
## 2.2 La davallada dels nivells d'E-cadherina impedeix la interacció de p65 amb les catenines i és suficient per provocar l'activació de la via de NF- $\kappa$ B en cèl·lules IEC-18.

Per verificar el paper d'E-cadherina en el control de l'activitat de NF- $\kappa$ B evitant qualsevol efecte derivat de l'expressió de Snail1 es va transfectar un siRNA (de l'anglès *small interfering RNA*) específic per E-cadherina. Com a control, es va transfectar el mateix plàsmid amb un siRNA per  $\beta$ -catenina o una seqüència irrellevant. Es va comprovar primer que el sistema funcionava mitjançant anàlisi per *Western Blot* d'extractes totals de cèl·lules IEC-18 (Figura 44).

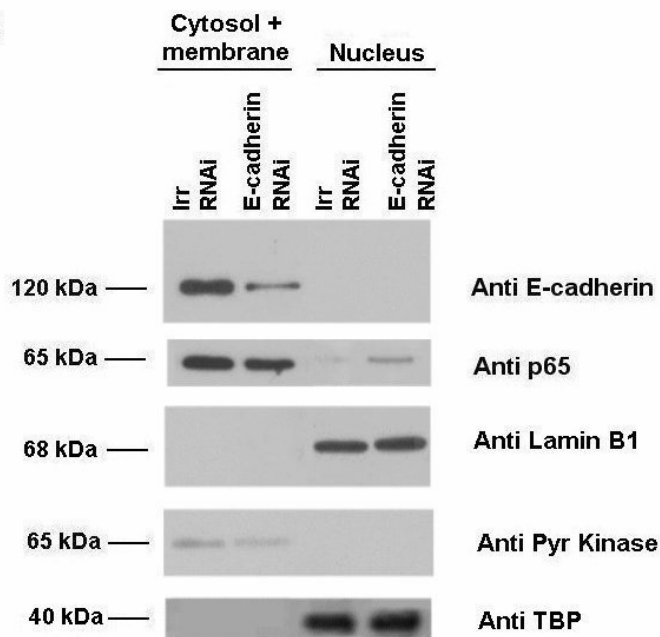
Es van analitzar els complexos que co-immunoprecipiten amb p65 en condicions de baixos nivells d'E-cadherina i es va trobar una disminució de la interacció amb  $\beta$ -catenina i p120-catenina, comparat amb la condició control (Figura 45). S'evidencia el requeriment d'E-cadherina per la formació dels complexos de p65 amb les catenines.



**Figura 44: Davallada dels nivells d'E-cadherina i  $\beta$ -catenina amb el sistema del siRNA.** S'obté una davallada d'E-cadherina del 70% amb el siRNA per E-cadherina i del 50% de  $\beta$ -catenina amb el siRNA per  $\beta$ -catenina respecte a les cèl·lules transfectades amb el siRNA irrellevant.



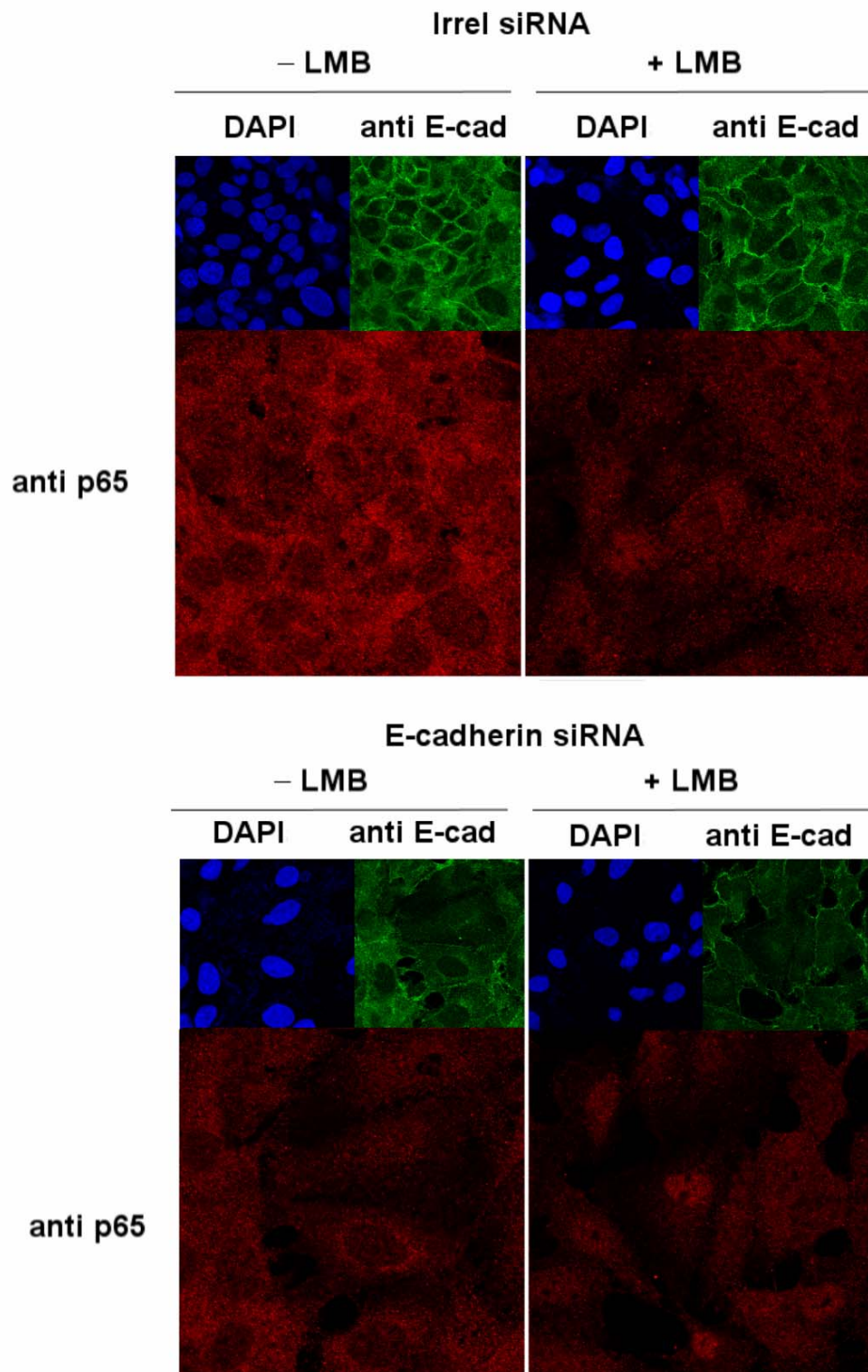
**Figura 45: Disminució de la interacció de p65 amb les catenines degut a la reducció dels nivells de proteïna d'E-cadherina.** Es van analitzar per *Western blot* els complexos coimmunoprecipitats amb la subunitat p65 de 500 µg d'extractes RIPA de cèl·lules IEC-18 transfectades amb el siRNA d'E-cadherina o irrellevant com a control. Es fa servir com a control de càrrega (*Input*) el 2% d'extractes.



**Figura 46: La davallada dels nivells d'E-cadherina permet l'entrada a nucli de p65.** Cèl·lules IEC-18 transfectades amb el siRNA d'E-cadherina o control van ser lisades per obtenir les dues fraccions (citosol-membrana i nucli). 10 µg d'extractes citosòlics i el corresponent volum de nuclis van ser carregats en un gel SDS-PAGE i analitzats per *Western blot*. Els corresponents marcadors dels compartiments es van fer servir per normalitzar i per descartar contaminacions (nucli: TBP i LaminaB1, citosol: Piruvat quinasa).

A continuació es va analitzar si aquesta reducció dels nivells d'E-cadherina produïa un augment de la fracció nuclear de p65, condició essencial per la seva activitat com a factor de transcripció. Es van preparar extractes proteics de cèl·lules IEC-18 separant les fraccions de membrana i citosol d'una banda i la nuclear d'una altra. Un cop analitzats els extractes per *Western blot* s'observa que en la condició on s'havia transfectat el siRNA d'E-cadherina es troba més p65 nuclear (Figura 46).

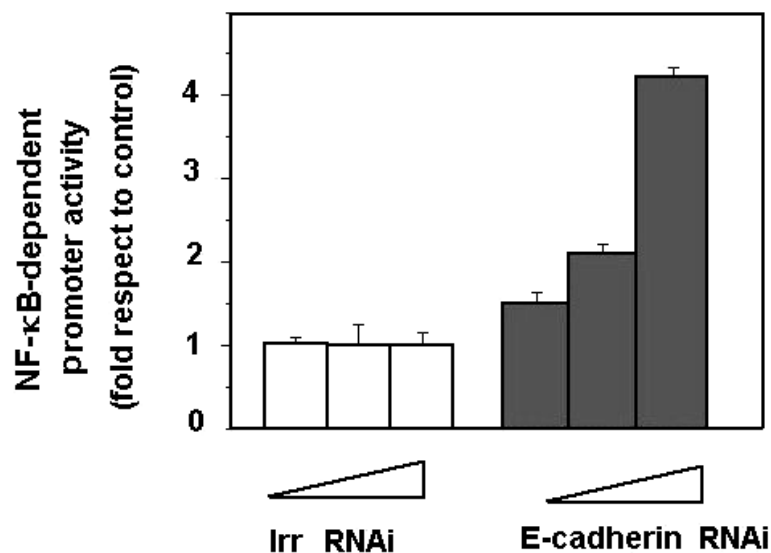
Per corroborar aquesta observació, es va estudiar en aquest mateix model cel·lular la localització subcel·lular de p65 per immunofluorescència. La Figura 47 mostra una localització majoritàriament citosòlica de p65 (vermell) en les cèl·lules IEC-18 transfectades amb el siRNA irrellevant (Figura 47, panell superior, costat esquerre). La baixada dels nivells d'E-cadherina provoca la desaparició de la disposició ordenada de les cèl·lules control, observant-se un augment de la localització nuclear de p65, tal com havíem observat per *Western blot* (Figura 47, panell inferior, costat esquerre). Es va decidir tractar les cèl·lules amb un inhibidor de l'export nuclear, com és la Leptomicina B (LMB). Aquest àcid gras inhibeix el complex d'export CRM-1 impedit la interacció amb els seus substrats. Es va tractar les cèl·lules amb una dosi molt baixa de LMB (1ng/ml) durant un temps curt (1 hora) per no saturar de p65 els nuclis de les cèl·lules transfectades amb el siRNA control. Així, aquest procediment ens permetia veure una major quantitat de p65 nuclear en les cèl·lules amb baixos nivells d'E-cadherina, quan es comparen amb les control (comparar entre el superior i inferior del costat dret de la Figura 47).



**Figura 47: Canvi de la localització subcel·lular de p65 a causa de la davallada dels nivells d'E-cadherina.** Es van transfectar cèl·lules IEC-18 amb siRNA irrellevant (panell superior) o amb el siRNA per E-cadherina (panell inferior) i es va analitzar la localització de p65, en vermell (Alexa 555) i d'E-cadherina, en verd (Alexa 488). Com a control es van tenyir els nuclis amb DAPI (blau). Quan s'indica, les cèl·lules es van tractar 1 hora amb Leptomicina B a 1 ng/ml (+LMB).

Tal i com s'ha explicat a l'apartat 2.1, la sobreexpressió d'E-cadherina disminueix l'activitat transcripcional de p65. Ara bé, vam voler determinar si l'alliberació de p65 dels complexos d'adhesió, per la davallada dels nivells d'E-cadherina, era capaç d'activar la transcripció mitjançada per p65.

La Figura 48 mostra com el plàsmid reporter sensible a l'activació per NF- $\kappa$ B s'activa unes 4 vegades respecte al control quan es cotransfecta el siRNA per E-cadherina. També s'observa un efecte depenent de la dosi de siRNA transfectat.

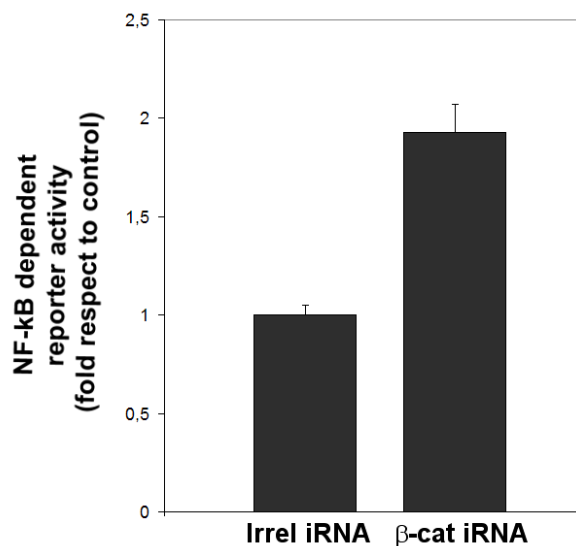


**Figura 48: L'activitat transcripcional depenent de NF- $\kappa$ B s'activa al disminuir els nivells d'E-cadherina.** Es va mesurar l'activitat transcripcional de NF- $\kappa$ B de cèl·lules IEC-18 cotransfectades amb el siRNA per E-cadherina (100, 200 i 300 ng), el plàsmid NF3 i la pTK-renilla (com a control intern). En aquesta gràfica es presenta la mitjana ( $\pm$ SD) dels resultats de tres experiments independents realitzats per triplicat.

Per assegurar que l'efecte produït pel siRNA d'E-cadherina és degut a la disrupció de les unions adherents es va decidir transfectar un siRNA per una altra proteïna implicada a les unions adherents, la  $\beta$ -catenina. La davallada dels nivells de proteïna de  $\beta$ -catenina per efecte del siRNA era menor que

l'assolida amb el siRNA per E-cadherina (Figura 44). Segurament per aquesta raó, l'activació transcripcional de la ruta de NF- $\kappa$ B és menor (Figura 49).

El conjunt d'aquests resultats sembla indicar que l'E-cadherina és un efector negatiu de la via de NF- $\kappa$ B. Podem concloure que l'alliberació de la fracció de p65 retinguda a les membranes provoca activació del plàsmid reporter sensible a NF- $\kappa$ B, sense necessitat de cap altre estímul. La pèrdua de les unions adherents és suficient per provocar, no només una major presència de p65 al nucli, sinó també un augment de la seva activitat transcripcional.

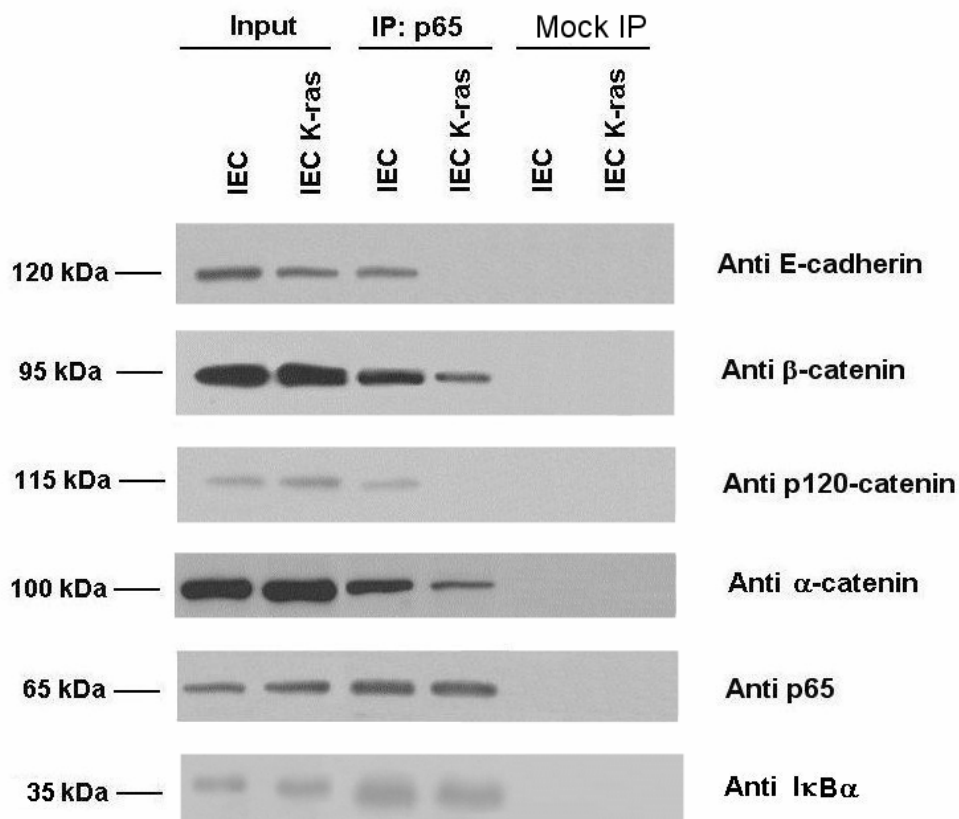


**Figura 49: L'activitat transcripcional dependent de NF- $\kappa$ B s'activa amb la davallada dels nivells de  $\beta$ -catenina.** Es van cotransfectar cèl·lules IEC-18 amb 300 ng del siRNA de  $\beta$ -catenina, el plàsmid NF3 i la pTK- renilla i es va analitzar l'activitat de la luciferasa. Es presenta la mitjana dels resultats de tres experiments independents realitzats per triplicat ( $\pm$ SD).

### **3 La pèrdua d'unions adherents disminueix la unió de p65 a E-cadherina i les catenines. Estudi en un model de disrupció de les unions adherents per sobreexpressió de l'oncogen K-ras.**

Donat que el complex que p65 forma amb les catenines i l'E-cadherina es dona a les unions adherents es va plantejar si la disrupció d'aquestes unions podia alterar la formació d'aquest complex. Per portar a terme aquesta sèrie d'experiments es va fer servir un model cel·lular en el que les cèl·lules epitelials intestinals sanes IEC-18 sobreexpressen de manera estable la forma oncogènica de K-ras, G12V. S'ha descrit prèviament en el nostre grup que en aquestes cèl·lules, a partir d'ara anomenades K-ras, la  $\beta$ -catenina està altament fosforilada en tirosines, fent que aquesta perdi afinitat pels components de les unions adherents, i provocant una pèrdua dels complexos d'adhesió i un augment de l'activitat transcripcional de la  $\beta$ -catenina [31].

Es va voler estudiar per co-immunoprecipitació els complexos associats a p65 en aquest context cel·lular de pèrdua de les unions adherents en les cèl·lules IEC-18 K-ras. En les cèl·lules control (IEC-18), p65 està unit a E-cadherina,  $\beta$ -catenina, p120-catenina i  $\alpha$ -catenina en major proporció que en les K-ras. En canvi, la quantitat d' $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  que coimmunoprecipita amb p65 és similar en els dos casos (Figura 50).

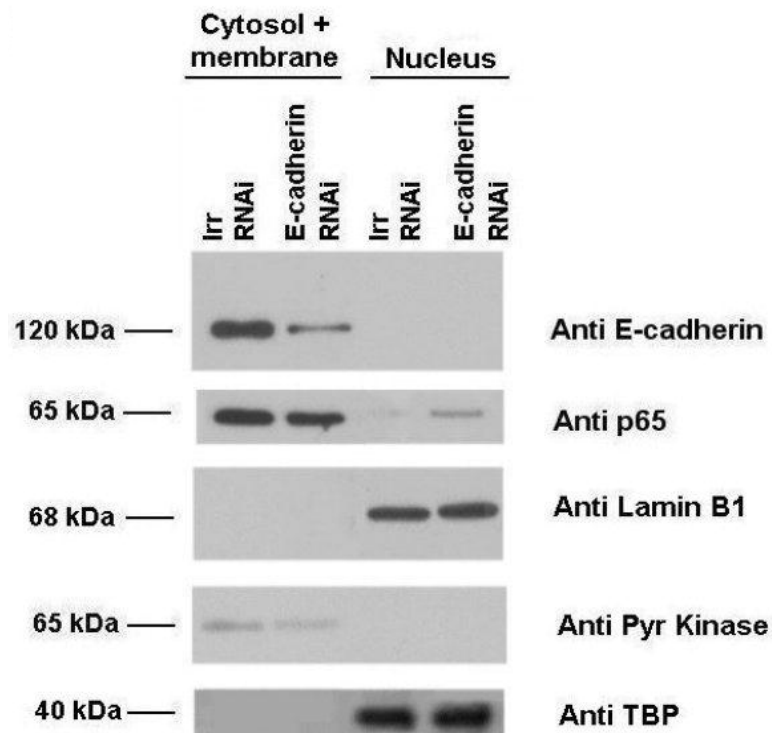


**Figura 50: La pèrdua de les unions adherents (IEC K-ras) disminueix la interacció de p65 amb E-cadherina i les catenines.** Es va immunoprecipitar p65 de 500  $\mu\text{g}$  d'extractes RIPA. Les proteïnes purificades es van analitzar per *Western blot*. Es fa servir com a control (*Input*) el 2% d'extractes.

### 3.1 La pèrdua d'unions adherents provoca un canvi de la localització subcel·lular de p65 i l'activació de la transcripció mitjançada per NF- $\kappa$ B.

A continuació es va examinar si la pèrdua d'unions adherents induïda per K-ras afectava la localització subcel·lular de la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B. Es van preparar extractes cel·lulars fraccionats i s'observà per *Western blot* que en les cèl·lules K-ras la presència de p65 a la fracció nuclear és major que en les control (Figura 51).

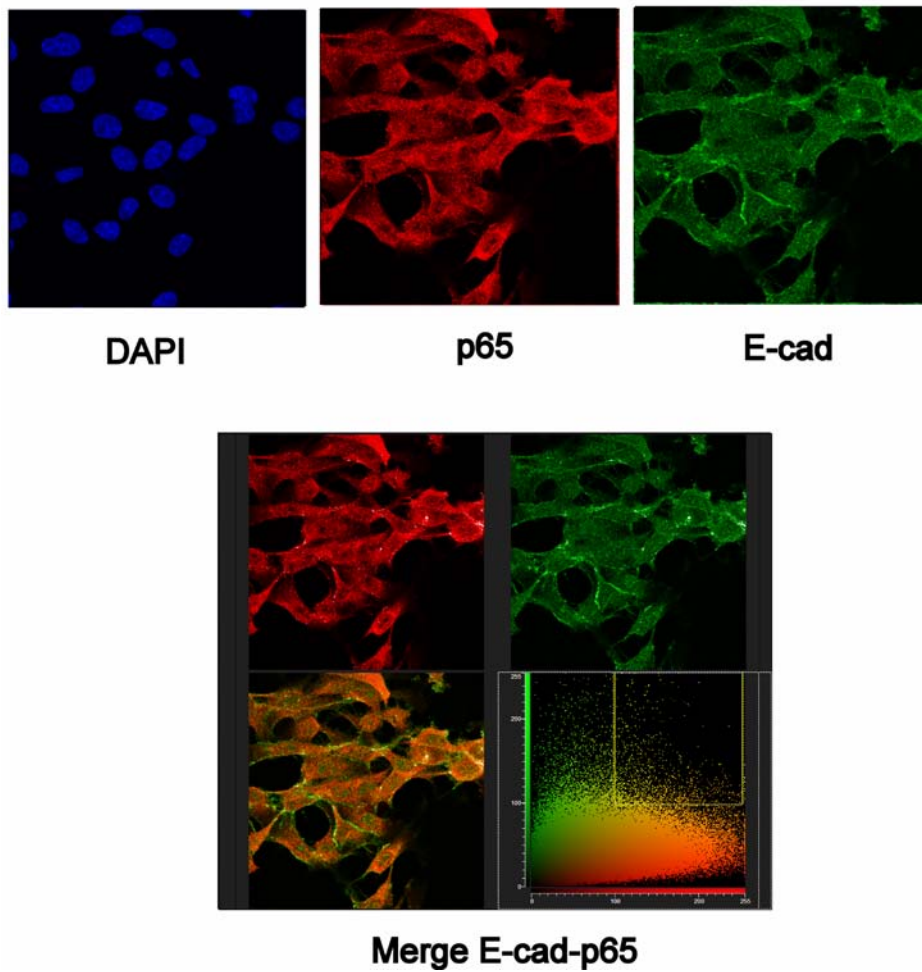




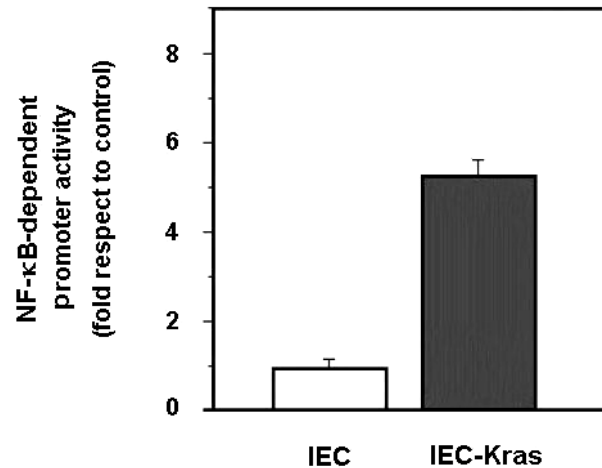
**Figura 51: La disrupció de les unions adherents augmenta la presència de p65 a la fracció nuclear.** Es van fraccionar els extractes proteics per analitzar les proteïnes corresponents a nucli i citosol amb membrana. Es van analitzar les proteïnes d'interès per *Western blot* de 10 µg d'extractes citosol-membrana i el corresponent volum d'extractes nuclears. Els marcadors nuclear (Lamina B1) i citosòlic (Piruvat quinasa) es van fer servir tant per normalitzar les diferents condicions com per corroborar l'absència de contaminació.

Analitzant la localització de p65 per immunofluorescència (Figura 52) s'observa un canvi en la seva distribució subcel·lular entre les dues línies cel·lulars que corrobora el resultat observat per fraccionament cel·lular. Així, en la línia control (IEC-18), amb fenotip epitelial, la distribució de p65 és clarament citosòlica, però també s'observa en una proporció significativa de cèl·lules en els contactes intercel·lulars (Figura 39). En les cèl·lules K-ras la distribució és més difusa, sense marcatge a les membranes. També s'observa una localització parcial de p65 al nucli d'aquestes cèl·lules (Figura 52).

L'augment de p65 nuclear en les cèl·lules K-ras va acompanyat d'una major activitat del plàsmid reporter NF-3 respecte a les cèl·lules control (Figura 53).



**Figura 52: La distribució subcel·lular de p65 s'altera per la disrupció de les unions adherents.** Anàlisi per immunofluorescència en les cèl·lules IEC K-ras de p65 (Alexa 555, en vermell) i E-cadherina (Alexa 488, en verd). Com a control es va tenyir el DNA amb DAPI (blau). El panell inferior mostra la superposició de les dues imatges i la colocalització s'assenyala amb punts blancs.



**Figura 53: La disrupció de les unions activa la transcripció dependent de NF-κB.**

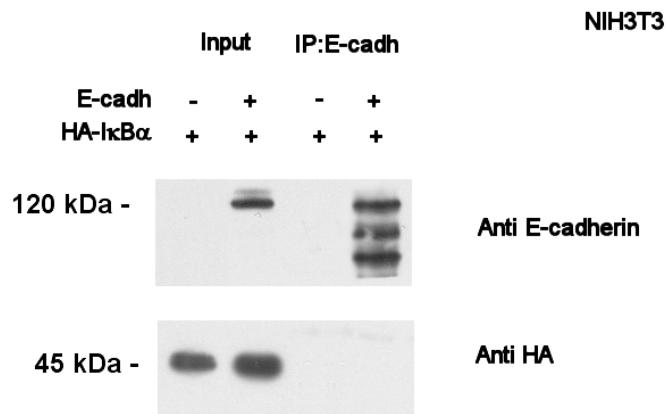
S'analitza l'activitat transcripcional dependent de NF-κB amb el reporter NF3, usant la renilla com a control intern, en les dues línies cel·lulars, IEC-18 i K-ras. La gràfica mostra les mitjanes de les dades ( $\pm$ SD) de tres experiments independents realitzats per triplicat.

#### **4 IκBα no forma part del complex de p65 amb els components de les unions adherents. IκBα i E-cadherina competeixen per la interacció amb p65.**

El conjunt dels nostres resultats indicava que p65 pot ser segrestat als contactes intercel·lulars pels components de les unions adherents i com a conseqüència es produeix la inhibició de l'activitat transcripcional de NF-κB. També havíem observat que la disrupció de les unions adherents en les condicions estudiades no semblava afectar la interacció amb IκBα (Figura 50). Vam voler estudiar amb més detall la relació entre els complexos clàssics de regulació de p65 (els que forma amb IκBα) i els que s'han descrit en aquest treball (els que forma amb els components de les unions adherents), per tal de determinar si la fracció de p65 associada a l'E-cadherina també interaccionava amb IκBα.

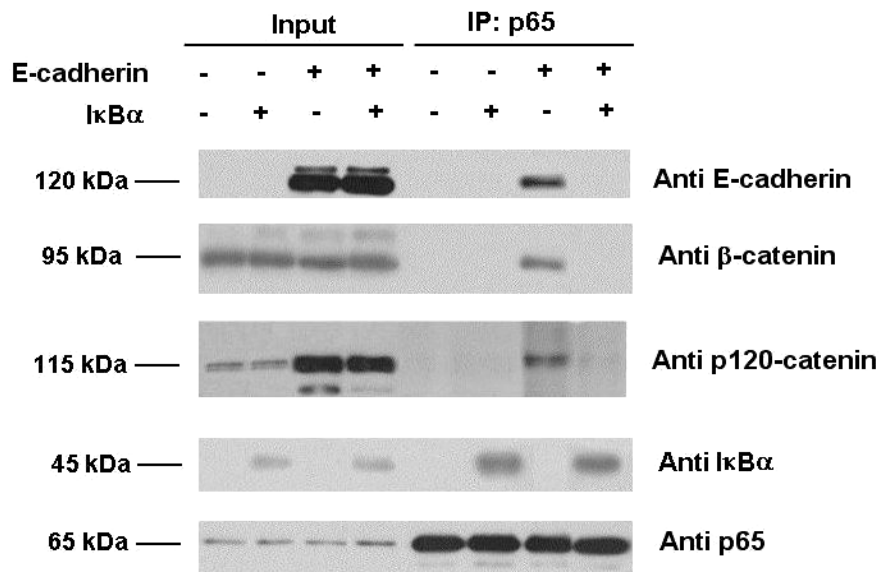
Es va analitzar si E-cadherina i IκBα podien formar part del mateix complex. Es van co-transfectar E-cadherina i IκBα en la seva forma superrepressora (mutant S32/36A que no pot ser degradat) en fibroblasts NIH3T3. La Figura 54

mostra com els complexes que co-immunoprecipiten amb E-cadherina no contenen I $\kappa$ B $\alpha$  detectable. Aquest resultat suggeriria que E-cadherina i I $\kappa$ B $\alpha$  no formen part del mateix complex i que la interacció de p65 amb E-cadherina i amb I $\kappa$ B $\alpha$  podria ser excloent.



**Figura 54: E-cadherina i I $\kappa$ B $\alpha$  no interaccionen.** Cèl·lules NIH3T3 van ser transfectades amb E-cadherina i I $\kappa$ B $\alpha$ -HA(S32/36A). Es van immunoprecipitar l'E-cadherina de 500  $\mu$ g d'extractes RIPA i els complexos purificats es van analitzar per *Western blot*.

Per demostrar si E-cadherina i I $\kappa$ B $\alpha$  competien per unir-se a p65 es van co-transfectar fibroblasts NIH3T3 amb I $\kappa$ B $\alpha$ -HA S32/36A i E-cadherina i es va immunoprecipitar p65 dels extractes totals. S'observà que p65 interacciona amb les catenines només en la condició on s'expressa E-cadherina, reforçant els resultats obtinguts en els apartats anteriors (Figura 55). També es va observar que quan se sobreexpressa la forma superrepressora d'I $\kappa$ B $\alpha$ , la interacció de p65 amb E-cadherina desapareix (carrils 6 i 8). Aquesta dada suggereix que I $\kappa$ B $\alpha$  és capaç de competir la interacció entre p65 i E-cadherina. Cal remarcar que la presència d'E-cadherina no pertorba els complexos p65-I $\kappa$ B $\alpha$  S32/36A. Això fa pensar que p65 té menys afinitat per E-cadherina que pel seu inhibidor clàssic, I $\kappa$ B $\alpha$ , i que els complexos E-cadherina-p65 només es formen quan p65 no està unit a I $\kappa$ B $\alpha$ .



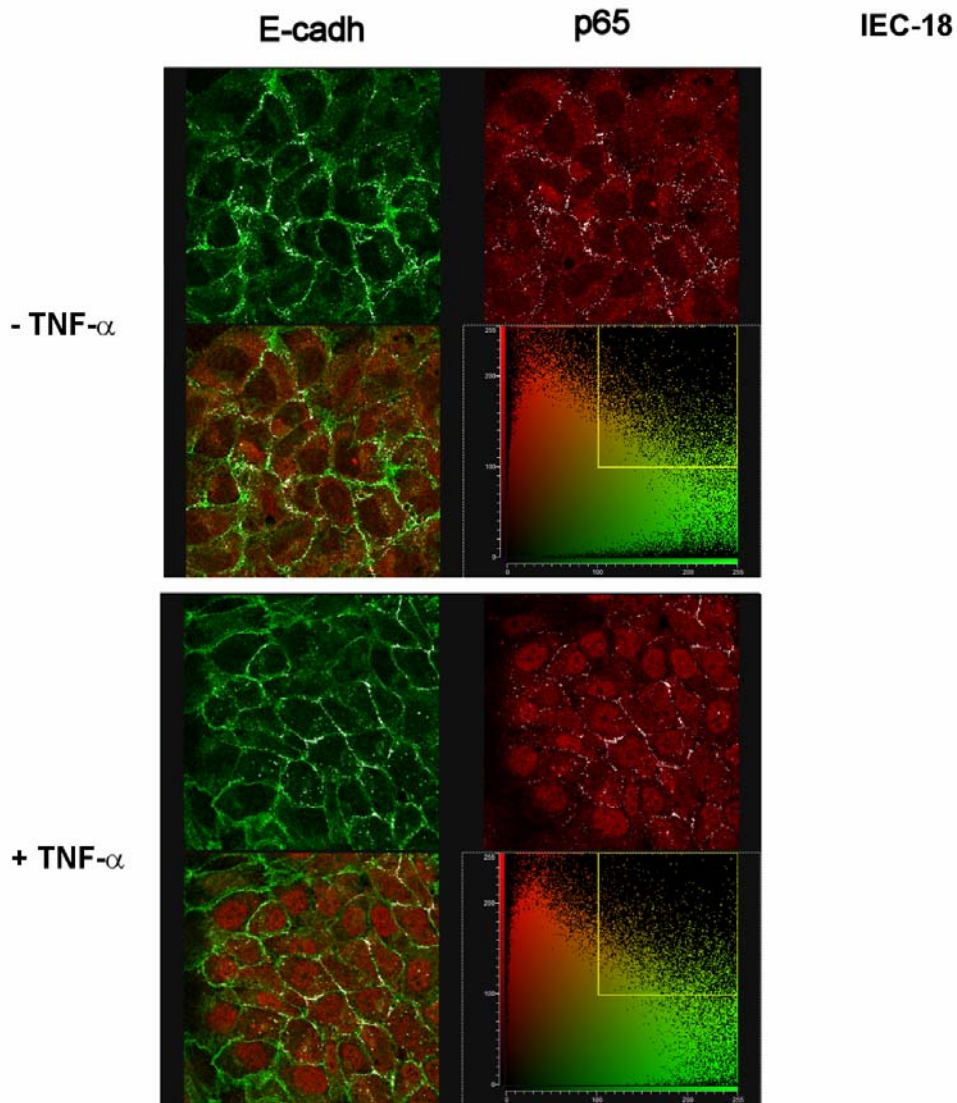
**Figura 55: E-cadherina i I $\kappa$ B $\alpha$  competeixen per la unió a p65.** 500  $\mu$ g d'extractes totals RIPA de NIH3T3 transfectats amb I $\kappa$ B $\alpha$ -HA S32/36A i E-cadherina (quan s'indica a la figura) es van immunoprecipitar amb anti p65. Els complexos purificats es van analitzar per *Western blot*.

#### 4.1 TNF- $\alpha$ no mobilitza la fracció de p65 associada als complexos de membrana.

Un dels activadors clàssics de la via canònica de NF- $\kappa$ B és TNF- $\alpha$ . Quan aquesta citokina s'uneix al seu receptor de membrana es recluta i activa una sèrie de proteïnes, com TRADD, RIP, o TRAF2. És mitjançant aquesta cascada intracel·lular que s'aconsegueix activar el complex de IKK i la ràpida fosforilació i degradació de I $\kappa$ B $\alpha$ . L'activació per TNF- $\alpha$  també provoca l'activació transcripcional de p65 per fosforilació en serines del TAD i RHD per quinases com IKK $\beta$ , PKC $\zeta$ , CK2, entre d'altres (revisat a [161]). En cultiu cel·lular mitjançant el tractament amb TNF- $\alpha$  s'aconsegueix, en un temps molt curt, l'activació de NF- $\kappa$ B unit a I $\kappa$ B $\alpha$ , translocació a nucli de p65 i activació de la transcripció mitjançada per aquest factor.

Ens vam plantejar si l'estímul per TNF- $\alpha$  afectava la fracció de p65 unida a E-cadherina i els complexos d'adhesió. Es va decidir analitzar per

immunofluorescència la localització de p65 en cèl·lules tractades amb TNF- $\alpha$ . En les cèl·lules tractades, com és d'esperar, s'observa un increment substancial de p65 nuclear. Es va trobar que el *pool* de p65 associat a E-cadherina restava inactiu en aquests condicions i que la colocalització p65 i E-cadherina no es pertorba pel tractament (panell dret, colocalització marcada amb punts blancs, Figura 56).



**Figura 56: El *pool* membranal de p65 no es mobilitza amb TNF- $\alpha$ .** Cèl·lules IEC-18 es van tractar amb 20 ng/ml de TNF- $\alpha$  durant 10 minuts (panell inferior). Es van fixar immediatament després amb PFA 4% 20 minuts. L'E-cadherina (Alexa 488, verd) colocalitza amb p65 (Alexa 555, vermell) als complexos d'adhesió. Els punts de colocalització es marquen en blanc.

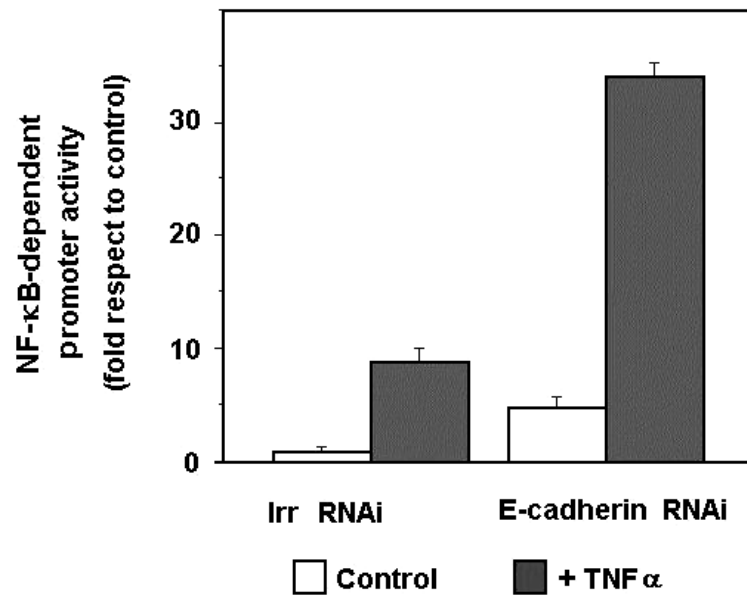
#### **4.2 La davallada dels nivells d'E-cadherina augmenta la resposta a TNF- $\alpha$ .**

Com que la fracció membranal de p65 no es mobilitza amb el tractament de TNF- $\alpha$  sinó per la disrupció de les unions adherents, es va voler determinar si podia haver interrelació entre aquests dos mecanismes. Per això es va analitzar la resposta a TNF- $\alpha$  en cèl·lules IEC-18 transfectades amb el siRNA per E-cadherina o un siRNA irrellevant.

Un cop comprovat que el tractament amb TNF- $\alpha$  estava funcionant en la condició amb el siRNA irrellevant, es va analitzar la condició amb baixos nivells d'E-cadherina. S'observà que la davallada dels nivells d'E-cadherina provoca una major sensibilitat al tractament amb TNF- $\alpha$ , augmentant la resposta al tractament 4 vegades respecte a les cèl·lules transfectades amb el siRNA irrellevant (Figura 57).

Aquest resultat indica que l'E-cadherina és un efector negatiu de la via de NF- $\kappa$ B i suggereix que, a més de segrestar p65, protegeix aquest factor de ser activat per estímuls clàssics, com pot ser el TNF- $\alpha$ .

Tots aquests resultats han permès identificar per primera vegada una fracció de p65 associada a les unions adherents, tot i que minoritària si es compara amb la unida a I $\kappa$ B $\alpha$ . No obstant, aquesta fracció de membrana té una importància funcional ja que la pèrdua de les unions adherents augmenta l'activitat transcripcional de NF- $\kappa$ B. A més, la davallada dels nivells d'E-cadherina potencia l'activació per TNF- $\alpha$  d'un plàsmid reporter sensible a NF- $\kappa$ B.

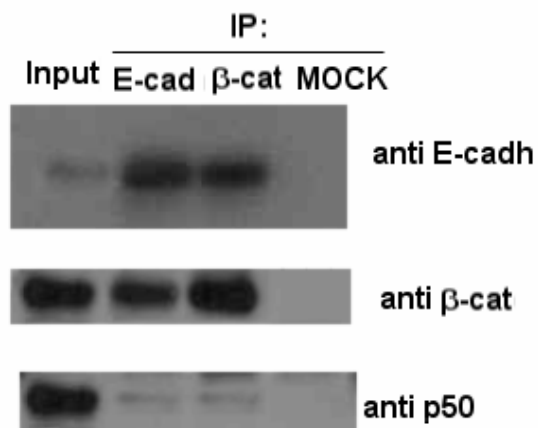


**Figura 57: Les cèl·lules amb nivells baixos d'E-cadherina són més sensibles a l'activació de la via de NF- $\kappa$ B per TNF- $\alpha$ .** Es van transfectar 10.000 cèl·lules epitelials IEC-18 amb el plàsmid que codifica pel siRNA d'E-cadherina, i el siRNA irrellevant com a control. Es va cotransfectar el plàsmid reporter NF3 (i la renilla com a control intern) per mesurar l'activitat transcripcional de la via de NF- $\kappa$ B. Les cèl·lules es van tractar amb 20 ng/ml de TNF- $\alpha$  durant 6 hores.

## 5 La subunitat p50 de NF- $\kappa$ B interacciona E-cadherina i $\beta$ -catenina.

Es va plantejar la possibilitat que el model de regulació descrit per p65 es pogués aplicar a altres subunitats de NF- $\kappa$ B. Per això es va immunoprecipitar l'E-cadherina (Figura 58, carril 2) i la  $\beta$ -catenina (Figura 58, carril 3) en cèl·lules epitelials IEC-18 i es va analitzar la presència de p50 als complexes. Es va trobar p50 interaccionant amb els dos components de les unions adherents. Aquest resultat suggereix que aquest mecanisme de regulació de l'activitat de la via de NF- $\kappa$ B podria afectar altres subunitats, com p50.





**Figura 58: La subunitat p50 forma un complex en cèl·lules amb els components de les unions adherents.** Es va immunoprecipitar la  $\beta$ -catenina i l'E-cadherina de 500  $\mu$ g d'extractes totals RIPA de IEC-18. Els complexos purificats es van analitzar per *Western Blot*. El 3% de la quantitat utilitzada d'extractes es va carregar com a control (*Input*).



## **II.DISCUSSIÓ**



### **1 Inflamació crònica i càncer, dos processos lligats des d'antany.**

Des del segle XIX es coneix la vinculació entre els processos d'inflamació crònica i la seva tendència a la progressió cap a la malignitat. De fet, s'ha descrit que el 20% de processos cancerosos tenen darrere una infecció o una inflamació. Quan als anys 80 es va descobrir que v-Rel, l'oncogen del virus Rev-T, pertanyia a la família dels factors de transcripció NF- $\kappa$ B, va prendre importància l'estudi d'aquesta proteïna amb alta capacitat transformant [219]. Des de llavors, l'estudi de NF- $\kappa$ B ha anat clarificant el vincle entre aquesta via i el càncer. D'una banda, l'activació de NF- $\kappa$ B inhibeix l'apoptosi i promou la progressió del cicle cel·lular. De l'altra, augmenta la mobilitat, l'expressió de marcadors mesenquimals i redueix la dels epitelials, com l'E-cadherina. És per aquesta raó que se l'ha considerat essencial per la transició epitelio-mesènquima (EMT) [137, 138, 220-222]. L'EMT és un dels passos claus en la progressió del càncer, durant el qual les unions intercel·lulars i la polaritat de les cèl·lules epitelials es perden, desembocant, en molts casos, en la metastasi dels tumors [223].

### **2 Els components de les unions adherents i NF- $\kappa$ B, una regulació creuada.**

Les unions adherents són elements estructurals dels teixits. Els elements que les componen, però, són proteïnes multifuncionals. Com a exemple, la  $\beta$ -catenina té dos papers molt diferents. Està implicada en mantenir el vincle entre el citoesquelet d'actina i les cadherines i, apart, en determinades condicions actua de coactivador transcripcional al nucli. Quan la cèl·lula adopta un fenotip epitelial, la  $\beta$ -catenina roman unida a l'E-cadherina i l' $\alpha$ -catenina, estabilitzant les unions adherents. La pèrdua de les unions intercel·lulars comporta que la  $\beta$ -catenina lliure al citosol es degradi pel proteasoma. Si la cèl·lula, però, rep la senyalització adequada (com l'estímul de la via de Wnt) o

algun dels mecanismes de degradació falla, la  $\beta$ -catenina transloca al nucli, on pot actuar de coactivador transcripcional. Per tant, quan la  $\beta$ -catenina està unida als complexos de les unions adherents es considera un factor proepitelial. Quan actua, però, de coactivador transcripcional es tracta d'un element que fomenta la proliferació, la migració i el fenotip mesenquimal. A més, la  $\beta$ -catenina té un paper molt rellevant en la progressió del càncer colorrectal ja que a més de promoure l'EMT és capaç de provocar la reversió del fenotip per tornar a formar un tumor sòlid en el lloc de destí de la metàstasi, donant lloc a la transició mesènquima-epiteli (MET) [224].

La majoria de treballs que parlen d'una relació entre  $\beta$ -catenina i NF- $\kappa$ B descriuen una col·laboració entre aquestes dues vies per induir un fenotip mesenquimal. Aquest fet és rellevant ja que es considera que el procés d'EMT complet necessita de l'activació de més d'una via [218, 221, 225]. Un dels passos essencials per l'EMT i la metàstasi és la regulació negativa de la transcripció d'E-cadherina. Tant la  $\beta$ -catenina com NF- $\kappa$ B activen la transcripció de repressors del promotor d'aquesta cadherina, Slug, i Zeb i Snail1, respectivament [138, 139, 222]. A més, es creen bucles d'autoregulació positiva ja que  $\beta$ -catenina i NF- $\kappa$ B activen la transcripció de factors de creixement i els seus receptors (com per exemple EGF i VEGF), que promouen una activació encara major d'aquestes mateixes vies [226-229]. S'accentua, així, la progressió a un fenotip mesenquimal [230].

S'ha descrit també que membres de la via de NF- $\kappa$ B poden activar la transcripció de gens mesenquimals i promitogènics mitjançada per  $\beta$ -catenina a través de l'activació de la quinasa IKK $\beta$  [231, 232]. Un altre vincle de regulació creuada entre les vies de  $\beta$ -catenina i NF- $\kappa$ B és Akt (PKB). Aquesta quinasa estableix la  $\beta$ -catenina lliure al citosol a través de la inactivació de la GSK3 $\beta$  [233-235]. A més, Akt fosforila la  $\beta$ -catenina a la serina 552 incrementant la seva activitat transcripcional [236]. Akt també activa la via de NF- $\kappa$ B a través de dos mecanismes diferents. D'una banda, promovent la degradació de I $\kappa$ B $\alpha$  a través de IKK i d'altra, la fosforilació de p65 augmentant la seva activitat

transactivadora [139, 237-240]. Per tant, Akt promou l'EMT amb  $\beta$ -catenina i NF- $\kappa$ B com a efectors (revisat a [241]).

Clàssicament s'ha considerat l'E-cadherina com a repressora de l'activitat transcripcional dependent de la ruta  $\beta$ -catenina/TCF ja que reté  $\beta$ -catenina als complexos de les unions adherents [46, 242]. També es troben treballs que descriuen una regulació negativa d'E-cadherina sobre l'activitat de la via NF- $\kappa$ B en diferents models. Un exemple n'és el treball de Kuphal on es descriu que la re-expressió d'E-cadherina en melanoma provoca la davallada de l'activitat transcripcional de NF- $\kappa$ B [243, 244]. Un altre cas és el descrit pel grup de Fuchs on s'observa que la falta d'E-cadherina en la pell de ratolins provoca hiperplàsia progressiva i defectes en la diferenciació de les cèl·lules bassals, compatibles amb la hiperactivitat de la via NF- $\kappa$ B [245]. Com ja s'ha comentat, existeix una regulació en el sentit contrari, ja que NF- $\kappa$ B redueix l'expressió d'E-cadherina a través de l'activació dels seus repressors Snail, Zeb-1 i Zeb-2 [138, 139]. Per això es va plantejar un possible mecanisme que permeti a les cèl·lules epitelials mantenir nivells baixos d'activació de la via NF- $\kappa$ B, protegint-se de la inducció de l'EMT. En aquest treball es descriu un nou mecanisme de regulació de l'activitat de NF- $\kappa$ B vertebrat al voltant de l'E-cadherina, que presenta un cert paral·lelisme amb el que s'exerceix sobre l'activitat transcripcional de la  $\beta$ -catenina: el segrest a la membrana.

### **3 Els components de les unions adherents inhibeixen l'activitat de NF- $\kappa$ B.**

En aquest estudi s'han utilitzat tres models cel·lulars diferents. La línia epitelial SW480, d'adenocarcinoma de colon amb alta activació de la via de NF- $\kappa$ B, per tal d'estudiar-ne la seva inhibició. Les cèl·lules IEC-18, epitelials sanes d'intestí de rata, amb baixa activitat transcripcional de NF- $\kappa$ B per analitzar-ne l'activació. Per últim, es van fer servir els fibroblasts NIH3T3, que no expressen E-cadherina, per demostrar el requeriment d'aquesta cadherina pel segrest de p65 a la membrana.

En treballs de Hung i col·laboradors s'havia descrit la inhibició de NF- $\kappa$ B per interacció amb  $\beta$ -catenina a través d'algun altre cofactor, sense suggerir-ne cap candidat [217]. En el nostre estudi ens vam preguntar a quin dels compartiments on  $\beta$ -catenina és present (membrana, citosol o nucli) es produïa la formació d'aquests complexos. Es va començar per analitzar si la subunitat p65 podia interaccionar amb algun dels altres components de les unions adherents. El resultat va ser bastant clarificador ja que inicialment es va detectar interacció amb dues altres catenines, placoglobina i p120-catenina. Tot i que la placoglobina és un factor més específic dels desmosomes, totes dues poden trobar-se a les unions adherents (Figura 31). Com que la interacció de p65 amb placoglobina i p120-catenina no havia estat descrita, es va decidir mapejar els llocs de les proteïnes implicats en la interacció amb p65. Com ja s'ha comentat, el domini armadillo de placoglobina, com en el cas de  $\beta$ -catenina i p120-catenina, és la zona per on interaccionen la majoria de cofactors. En el cas de la placoglobina, la presència dels extrems terminals i la integritat del domini armadillo afavoreixen la interacció amb p65. Cap dels fragments de placoglobina conserva el mateix grau d'interacció quan es compara amb la proteïna sencera (Figura 33). La necessitat de la presència de més d'un domini de la placoglobina fa pensar que la unió de més d'un factor per mitjançar la correcta interacció amb p65 és essencial. És important destacar que el domini armadillo de placoglobina i p120-catenina són essencials per la unió a p65, com ho són per la unió a E-cadherina. És per això que ens vam plantejar estudiar la rellevància de l'E-cadherina en la interacció entre p65 i les catenines.

El més rellevant potser de la interacció de  $\beta$ -catenina i placoglobina amb p65 és que la sobreexpressió de placoglobina provoca la inhibició transcripcional de la via NF- $\kappa$ B en major mesura que la de la  $\beta$ -catenina en cèl·lules SW480 (Figura 32). Aquest fet es pot explicar perquè, tot i que l'afinitat *in vitro* de  $\beta$ -catenina i placoglobina per p65 és similar, l'acumulació de mutacions en les cèl·lules SW480 confereix a  $\beta$ -catenina un paper més transcripcional que estructural a la membrana. Ja s'ha comentat que el canvi entre aquestes dues



funcions de  $\beta$ -catenina es regula per fosforilació en les tirosines 142 i 654 de  $\beta$ -catenina [28, 31]. El fet que les SW480 expressin la forma oncogènica de K-ras activa tirosina quinases que promouen la fosforilació en tirosines de  $\beta$ -catenina i placoglobina. Mentre que aquestes fosforilacions promouen la translocació de  $\beta$ -catenina al nucli, en el cas de la placoglobina faciliten el canvi de localització de desmosomes a unions adherents [84].

Com que s'havia detectat interacció *in vitro* de p65 amb més d'una catenina,  $\beta$ -catenina, placoglobina i p120-catenina, i aquesta interacció requeria el domini armadillo de placoglobina i p120-catenina, que també és el domini per on E-cadherina interacciona amb tots aquests factors, vam pensar que la formació d'aquests complexos amb p65 podia tenir lloc a la membrana. Per això es van fer dues immunoprecipitacions consecutives d'E-cadherina i dels extractes cel·lulars restants es va immunoprecipitar la p120-catenina (fracció citosòlica) i la  $\beta$ -catenina (Figura 37 i Figura 38). El *pool* citosòlic de p120-catenina és estable i no es degrada pel proteasoma, a diferència del que passa amb  $\beta$ -catenina en les cèl·lules IEC-18. La p120-catenina té una funció al citosol com inhibidora de l'activitat de la GTPasa RhoA [108].

El resultat ens va aportar dues dades interessants pel desenvolupament del treball. La primera és que l'E-cadherina forma un complex amb p65 en cèl·lules epitelials i la segona és que cap de les catenines analitzades ( $\beta$ -catenina i p120-catenina,  $\alpha$ -catenina i placoglobina) no interaccionen amb p65 si no estan associades als complexos de les unions adherents (Figura 37, Figura 38 i Figura 42). Amb aquest resultat novedós, es va decidir analitzar més a fons la relació entre l'E-cadherina i la via de NF- $\kappa$ B.

### **3.1 La p120-catenina és un efector negatiu de la via de NF- $\kappa$ B.**

La p120-catenina, tot i compartir un alt grau d'homologia estructural amb  $\beta$ -catenina i placoglobina, difereix en la seva funcionalitat. Una de les principals diferències és la capacitat que té la p120-catenina per acoblar factors a les unions adherents i regular l'activitat de les GTPases de la família Rho. Aquestes GTPases controlen molts processos entre els que podem trobar la

formació [2] i estabilitat de les unions adherents [246-248]. També s'ha descrit el control que exerceixen sobre l'activitat de la via NF- $\kappa$ B [249]. Per això ens va semblar interessant estudiar aquest possible punt de confluència entre la regulació de les unions adherents i la via de NF- $\kappa$ B.

### 3.1.1 RhoA

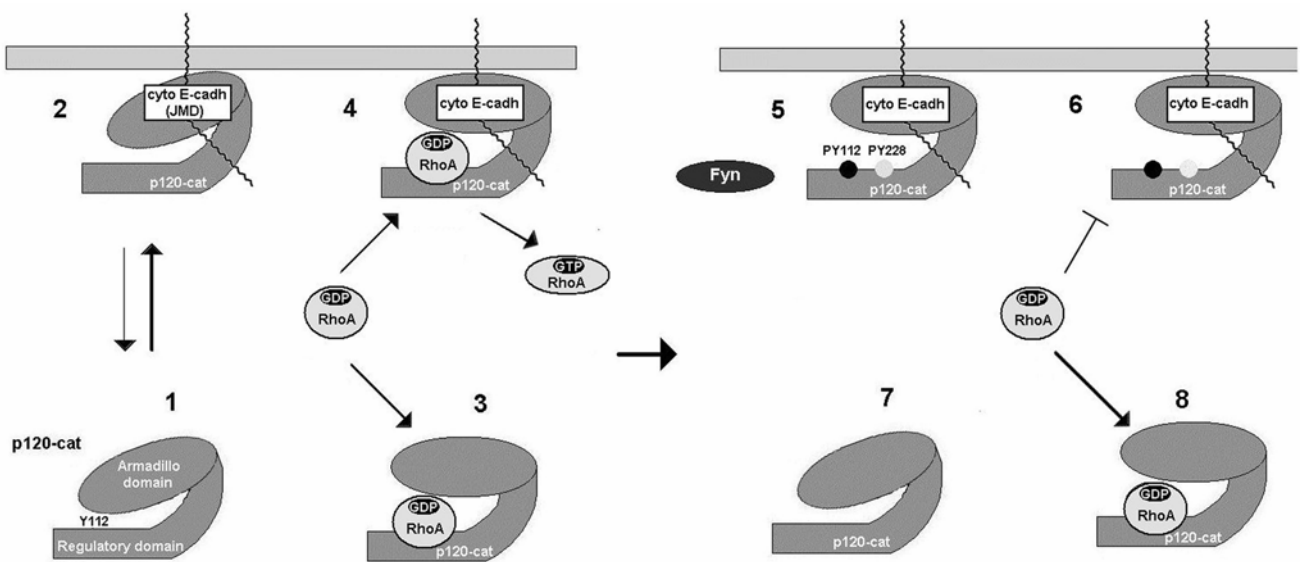
S'havia descrit que la sobreexpressió de p120-catenina en fibroblasts produïa un fenotip arboritzat (*branching*) en fibroblasts. Anys després es va descriure que aquest efecte es deu a la forta inhibició que la p120-catenina del citosol exerceix sobre l'activitat de RhoA [11, 110, 111]. La p120-catenina interacciona amb més afinitat amb la forma inactiva de RhoA, unida a GDP, que amb la forma unida a GTP. La fracció citosòlica de p120-catenina impedeix la seva activació, per tant, la p120-catenina citosòlica actua de GDI de RhoA [110]. En canvi, la fracció de p120-catenina associada a E-cadherina permet l'activació de RhoA, ja que l'apropa a la membrana on alguna proteïna amb activitat GEF pot facilitar l'intercanvi entre GDP i GTP.

En el nostre grup s'ha descrit que el domini de p120-catenina per on interacciona amb RhoA és el N-terminal. S'han identificat les fosforilacions en tirosines d'aquest domini regulador N-terminal de p120-catenina que modulen la interacció amb RhoA, i per tant la seva inhibició [108]. Les fosforilacions induïdes per Src i Fyn tenen efectes oposats en la interacció de p120-catenina amb RhoA. Fyn fosforila la tirosina 112 i inhibeix la interacció amb RhoA. En canvi, la fosforilació dels residus tirosina 217 i 228 de p120-catenina per Src augmenta la interacció amb RhoA.

A la Figura 59 es mostra com la p120-catenina es reparteix entre els seus dos *pools*: el citosòlic (1) i l'associat a E-cadherina (2). La p120-catenina citosòlica uneix RhoA i la manté en el seu estat inactiu (3), mentre que la p120-catenina associada a E-cadherina acosta la RhoA-GDP a la membrana on pot ser activada pels seus GEFs (4). És llavors quan l'afinitat de p120-catenina per la RhoA, ara unida a GTP, disminueix i l'allibera. D'altra banda, quan la quinasa Fyn està activa al compartiment de membrana, on resideix, fosforila p120-catenina (5) de tal manera que no pot interaccionar amb RhoA (6). Incrementa,

per tant, la proporció de RhoA inactiva unida a la p120-catenina del citosol, on sí li fa de GDI (8).

S'ha descrit que RhoA, a través del seu efector ROCK, provoca l'activació d'IKK i la subseqüent degradació d'I $\kappa$ B $\alpha$  i fosforilació de p65, provocant l'activació transcripcional dependent de NF- $\kappa$ B [249, 250]. D'altra banda, en un treball del grup de Fuchs s'observa que en pell de ratolins *Knock-out* (cKO) per p120-catenina, la hiperactivitat de RhoA produeix l'activació de NF- $\kappa$ B [209]. En aquest treball del grup de Fuchs es mostra el vincle directe entre RhoA, p120-catenina i NF- $\kappa$ B: la p120-catenina citosòlica, a través de la inhibició de l'activitat de RhoA, està disminuint la senyalització de la via de NF- $\kappa$ B.



**Figura 59: Esquema on es mostra el model de regulació de l'activitat de RhoA per la fosforilació en tirosines del domini N-terminal de p120-catenina proposat a [108].** Una fracció de la p120-catenina es troba unida a E-cadherina a través del domini juxtamembrana (JMD) (2). En aquest compartiment no pot exercir de GDI de RhoA, bé pel canvi conformational induït per E-cadherina o bé per la proximitat d'algun GEF de RhoA que l'activa. Quan p120-catenina uneix RhoA al citosol, inhibeix l'intercanvi de GDP per GTP (3). En canvi, RhoA-GDP unida a p120-catenina al compartiment de membrana, pot activar-se i alliberar-se (4). Quan s'activa Fyn, la tirosina 112 de p120-catenina associada a la membrana es fosforila (5), provocant la disminució de l'afinitat per RhoA (6). Això promou l'acumulació de RhoA al citosol, on p120-catenina sí actua de GDI, incrementant la proporció de RhoA inactiu (8).

En aquesta tesi s'ha descrit que la presència de RhoA unida a p120-catenina afavoreix la interacció *in vitro* amb la subunitat p65. D'acord amb això, la forma de p120-catenina que no uneix RhoA, perquè té la tirosina 112 mutada a glutàmic, mimetitzant la fosforilació per Fyn, interacciona amb menor afinitat amb p65 (Figura 34). Es va descartar, però, que RhoA fos el vincle directe entre els factors de les unions adherents i p65 ja que l'extrem N-terminal de p120-catenina (aà 1-234), que interacciona amb RhoA però no amb E-cadherina, uneix p65 amb molt poca afinitat (Figura 36). La poca interacció detectada amb l'extrem N-terminal de p120-catenina (aà 1-234) es pot deure a que aquest fragment podria interaccionar amb E-cadherina a través de RhoA i  $\alpha$ -catenina (resultats no publicats del nostre grup i [91]).

L'augment de l'afinitat de p120-catenina per p65 en presència de RhoA es pot deure a un canvi conformacional dels extrems terminals de p120-catenina induït per la unió de RhoA al domini N-terminal de p120-catenina. Aquest canvi podria afectar l'afinitat de p120-catenina per algun altre cofactor apropant p65 a les unions adherents. La construcció de p120-catenina que conté només el domini armadillo té una afinitat lleugerament superior per p65 que la proteïna sencera, tot i no contenir el lloc d'unió a RhoA. Aquest resultat contrasta amb els anteriors, on s'observava davallada de la interacció en absència de RhoA. Aquesta aparent contradicció es pot explicar pel mateix model proposat per la regulació d'unió a cofactors al domini armadillo de les catenines del primer capítol. La deleció dels extrems terminals de p120-catenina pot provocar la pèrdua d'especificitat d'unió a factors i augmentar l'afinitat de p120-catenina per algun dels seus cofactors, fent innecessària la unió de RhoA per induir el canvi conformacional.

En el treball de Kobiela i Fuchs es descriu que la depleció d' $\alpha$ -catenina en pell provoca hiperactivació de la via de NF- $\kappa$ B, acompanyada d'inflamació i hiperproliferació [95]. S'indica, per tant, una regulació per part d' $\alpha$ -catenina de la via de NF- $\kappa$ B. Del nostre estudi es deriva una possible explicació per aquests defectes en pell KO per  $\alpha$ -catenina deguts a l'activació de NF- $\kappa$ B. L'absència d' $\alpha$ -catenina provoca la inestabilitat de les unions adherents, promovent

l'alliberament del *pool* membranal de p65 i l'activació de la ruta de NF- $\kappa$ B. En el nostre grup s'ha descrit que la unió de cofactors a  $\beta$ -catenina es fa de manera coordinada: la unió prèvia d' $\alpha$ -catenina a  $\beta$ -catenina incrementa l'afinitat d'aquesta per E-cadherina [27]. Cal destacar que l' $\alpha$ -catenina interacciona amb RhoA [91] i que el complex  $\alpha$ -catenina-RhoA uneix amb més afinitat  $\beta$ -catenina que l' $\alpha$ -catenina sola, reforçant els complexos d'adhesió (resultats no publicats del nostre grup). Llavors, es pot suposar que la presència d' $\alpha$ -catenina, a més de promoure l'estabilitat de les unions adherents, podria apropar RhoA a l'entorn de les unions adherents, afavorint la presència de p65.

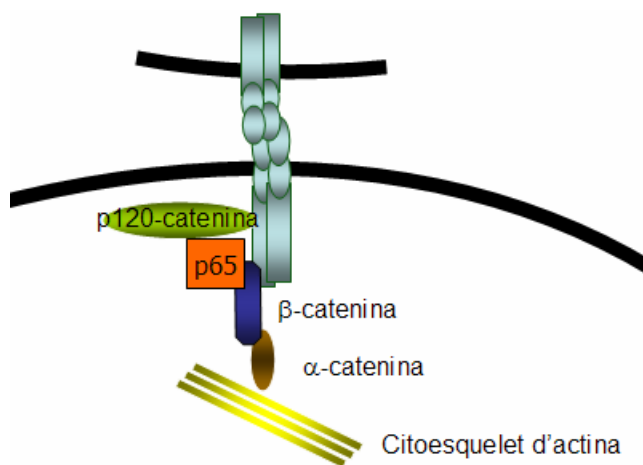
Es podria pensar, per tant, en un nou mecanisme de control de RhoA sobre l'activitat de NF- $\kappa$ B. Quan RhoA es troba a les unions adherents, ja sigui unida a p120-catenina o a  $\alpha$ -catenina, afavoreix la presència de p65 a les unions adherents i, per tant, la seva inactivació.

### **3.2 E-cadherina, l'eix vertebrador de la inhibició de NF- $\kappa$ B.**

En el nostre treball, una vegada s'havia demostrat que l'E-cadherina interacciona amb p65 en cèl·lules, es va estudiar la fracció de p65 associada a les membranes. És una fracció minoritària i, per tant, difícil de distingir de la citoplasmàtica. Per tal de poder detectar per immunofluorescència la fracció de p65 unida a les unions adherents, es va intentar reduir senyal de p65 al citosol. Amb aquest procediment es va aconseguir observar colocalització de p65 amb E-cadherina als contactes intercel·lulars (Figura 39).

S'havia descrit amb anterioritat que la re-expressió d'E-cadherina jugava un paper en la inhibició de la via de NF- $\kappa$ B en melanoma [243], per això vam decidir estudiar si en el nostre model de càncer de colon (SW480) l'expressió forçada d'E-cadherina podia reprimir l'activitat transcripcional mitjançada per p65. Es va analitzar l'activació del plàsmid reporter NF3 en cèl·lules SW480 control i transfectades establement amb E-cadherina i es va observar una davallada del 85% de l'activitat en aquestes últimes (Figura 40). L'expressió mantinguda d'E-cadherina promou la polarització cel·lular, l'estabilitat de les unions intercel·lulars i, per tant, un fenotip molt més epitelial quan es comparen

amb les control. Es va analitzar la localització de p65 i es va veure que la disminució dràstica de l'activitat transcripcional de la via de NF- $\kappa$ B anava acompanyada d'una disminució de p65 al nucli i d'un augment de la seva presència a les unions adherents (Figura 41, Figura 42 i Figura 43). Això, permetia pensar que almenys part de la inhibició transcripcional de NF- $\kappa$ B és deguda al segrest d'aquesta subunitat a les unions adherents per E-cadherina (Figura 60).



**Figura 60: Model proposat per la interacció de p65 amb els components de les unions adherents.** Els components de les unions, un cop formen part dels complexes d'adhesió, poden segrestar la subunitat p65, mantenint-la inactiva.

S'havia observat que en cèl·lules SW480 amb elevada activitat basal de la via NF- $\kappa$ B la sobreexpressió d'E-cadherina podia inhibir-la. Es va decidir llavors estudiar l'efecte contrari de la baixada dels nivells d'E-cadherina en cèl·lules epitelials que tinguessin baixa activitat de la ruta NF- $\kappa$ B, per analitzar si s'activava. Es va transfectar un RNA interferent per E-cadherina en cèl·lules IEC-18, aconseguint la davallada dels nivells de proteïna de fins al 70% (Figura 44). Es va analitzar la interacció de p65 amb les catenines en aquestes cèl·lules i es va corroborar la necessitat d'E-cadherina per poder formar el complex amb p65 (Figura 45). Quan es va estudiar la localització subcel·lular de p65 per fraccionament i immunofluorescència es va observar que la

presència de p65 a nucli és superior en les cèl·lules amb baixa expressió d'E-cadherina (Figura 46 i Figura 47). En les immunofluorescències, es va analitzar la localització nuclear de p65 tractant-les amb dosis molt baixes de Leptomomicina B (inhibidor de l'export nuclear mitjançat per CRM1) ja que l'export del nucli és molt ràpid. Aquest tractament va permetre veure diferències entre les cèl·lules control i les que presenten baixos nivells d'E-cadherina, observant un increment notable de la localització nuclear de p65 en les cèl·lules amb menys E-cadherina.

El més sorprenent d'aquesta sèrie d'experiments és que simplement amb la davallada d'E-cadherina s'aconsegueix activar la transcripció mitjançada per NF- $\kappa$ B unes 4 vegades respecte al control (Figura 48). Llavors ens vam plantejar si l'augment dels nivells de la  $\beta$ -catenina lliure al citosol, com a conseqüència de la reducció dels nivells d'E-cadherina, podria alterar l'estat d'activació de les MAPK i de retruc el de NF- $\kappa$ B [222, 244]. Per descartar aquesta possibilitat, es va transfectar un siRNA per  $\beta$ -catenina i es va observar un augment de la transcripció mitjançada per NF- $\kappa$ B (Figura 49). Confirmant, doncs, que l'efecte activador de l'activitat transcripcional de NF- $\kappa$ B per la disrupció de les unions adherents es deu a l'alliberació de p65 i no a la de  $\beta$ -catenina.

El fet que l'alliberament de p65 de les unions adherents provoqui activació de la via de NF- $\kappa$ B per sí mateix, suggereix que a les unions adherents potser està tenint lloc algun altre mecanisme inhibidor, apart del segrest. Aquest podria consistir en l'apropament de fosfatases perquè desfosforilin p65, mantenint-lo inactiu transcripcionalment, o l'impediment de l'accés de les quinases a p65.

Treballs recents posen de manifest que les unions intercel·lulars homotípiques d'E-cadherina aturen l'entrada a fase S i que el domini d'unió a catenines (CBD) és essencial per aquest fenomen. També es descriu que aquest mecanisme és independent de TCF-4 [251]. Com que NF- $\kappa$ B activa la progressió del cicle cel·lular activant la transcripció de Ciclina D1, implicada en la transició de G1 a S [252], el mecanisme de control de la ruta de NF- $\kappa$ B

proposat en aquesta tesi podria explicar la inhibició de la proliferació descrita per Perrais i col·laboradors. Així, quan les cèl·lules estableixen unions intercel·lulars mitjançades per E-cadherina, la subunitat p65 es segresta als contactes, inhibint la seva activitat transcripcional. Aquest treball de Perrais ens suggereix que el nostre model d'inhibició podria requerir, no només l'expressió d'E-cadherina, sinó també la presència d'unions adherents madures i estables. Aquest fet es va confirmar amb els resultats obtinguts en cèl·lules que sobreexpressen K-ras, en les que, tot i la presència d'E-cadherina, les unions adherents no són estables.

De tota manera, la disrupció de les unions adherents és necessària però no suficient per la inducció de l'EMT ja que els diferents efectors s'han de sotmetre a altres mecanismes de control abans d'actuar com a activadors de la transcripció. En els assaigs de gen reporter en cèl·lules IEC-18 transfectades amb el siRNA per E-cadherina, l'activació de NF- $\kappa$ B per TNF- $\alpha$  es potencia respecte a les cèl·lules control (Figura 57). Això demostra la necessitat de l'activació d'altres vies de senyalització intracel·lular per aconseguir una activació màxima de la via. La major sensibilitat a l'activació per TNF- $\alpha$  es pot atribuir a que l'activació de la ruta de NF- $\kappa$ B per la davallada d'E-cadherina provoca una major síntesi d'I $\kappa$ B $\alpha$ , augmentant els nivells de p65 citosòlic inactiu. Però, quan la cèl·lula rep la senyalització desencadenada per TNF- $\alpha$ , tot aquest *pool* citosòlic transloca al nucli i és actiu transcripcionalment. Per tant, en una cèl·lula epitelial en la que s'hagi desencadenat un procés d'EMT, la davallada dels nivells d'E-cadherina pot tenir un efecte potenciador de l'activació de la via de NF- $\kappa$ B per citoquines, fet que pot agreujar la situació patològica.

#### **4 La disrupció de les unions provoca la pèrdua de la interacció de p65 amb E-cadherina.**

En aquest treball hem observat que la disrupció de les unions provoca la davallada de la interacció de p65 amb E-cadherina i les catenines. Aquesta menor interacció s'acompanya de la deslocalització de p65 de les unions



adherents (Figura 52) i de la seva entrada a nucli i activació transcripcional (Figura 51 i Figura 53).

És sorprenent que, tot i l'augment de l'activitat de la ruta NF- $\kappa$ B en les cèl·lules K-ras, la quantitat d'I $\kappa$ B $\alpha$  que coimmunoprecipita amb p65 és la mateixa en els dos models cel·lulars. Com que un dels primers gens diana de la via de NF- $\kappa$ B que s'activa és el de I $\kappa$ B $\alpha$  [157, 253], podem estar davant d'un mecanisme compensatori per equilibrar l'excés de senyalització de la via.

En aquest treball, s'ha descrit que la disrupció de les unions impedeix la unió de p65 a E-cadherina i les catenines. Com que també s'ha demostrat que la dissolució de la interacció per sí mateixa provoca un efecte activador de la transcripció, pensem que l'efecte activador de K-ras sobre la via de NF- $\kappa$ B es podria deure, òbviament en conjunt amb els mecanismes ja descrits a la literatura, a l'alliberament del *pool* membranar de p65. L'activació que K-ras exerceix a través dels seus efectors, però, impossibilita saber quina proporció de l'increment d'activitat correspon a cadascun dels fenòmens.

## 5 Un *pool* de NF- $\kappa$ B regulat per E-cadherina.

El fet que l'inhibidor clàssic de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , no es trobi unit a E-cadherina (Figura 54), i que competeixin per la unió a p65 (Figura 55) fa pensar que es tracta de dues fraccions independents de p65.

L'afinitat de p65 per I $\kappa$ B $\alpha$  és molt major que pels complexos de les unions adherents. Això s'ha demostrat en els experiments de competició, on p65 s'uneix preferentment a I $\kappa$ B $\alpha$ , i en les immunofluorescències, on s'observa que la quantitat de p65 associada a les membranes és molt menor que l'associada a I $\kappa$ B $\alpha$  al citosol. Per això, creiem que perquè p65 s'uneixi als complexos amb E-cadherina ha de rebre prèviament un estímul activador que el separi d'I $\kappa$ B $\alpha$ . Quin pot ser aquest estímul activador no ho podem respondre amb certesa. Una possibilitat podria ser l'activació de NF- $\kappa$ B per l'EGFR a través de la fosforilació del residu tirosina 42 d'I $\kappa$ B $\alpha$ , que promou la dissociació dels complexos I $\kappa$ B $\alpha$ ·p65 [206, 229]. Aquest receptor de membrana es troba

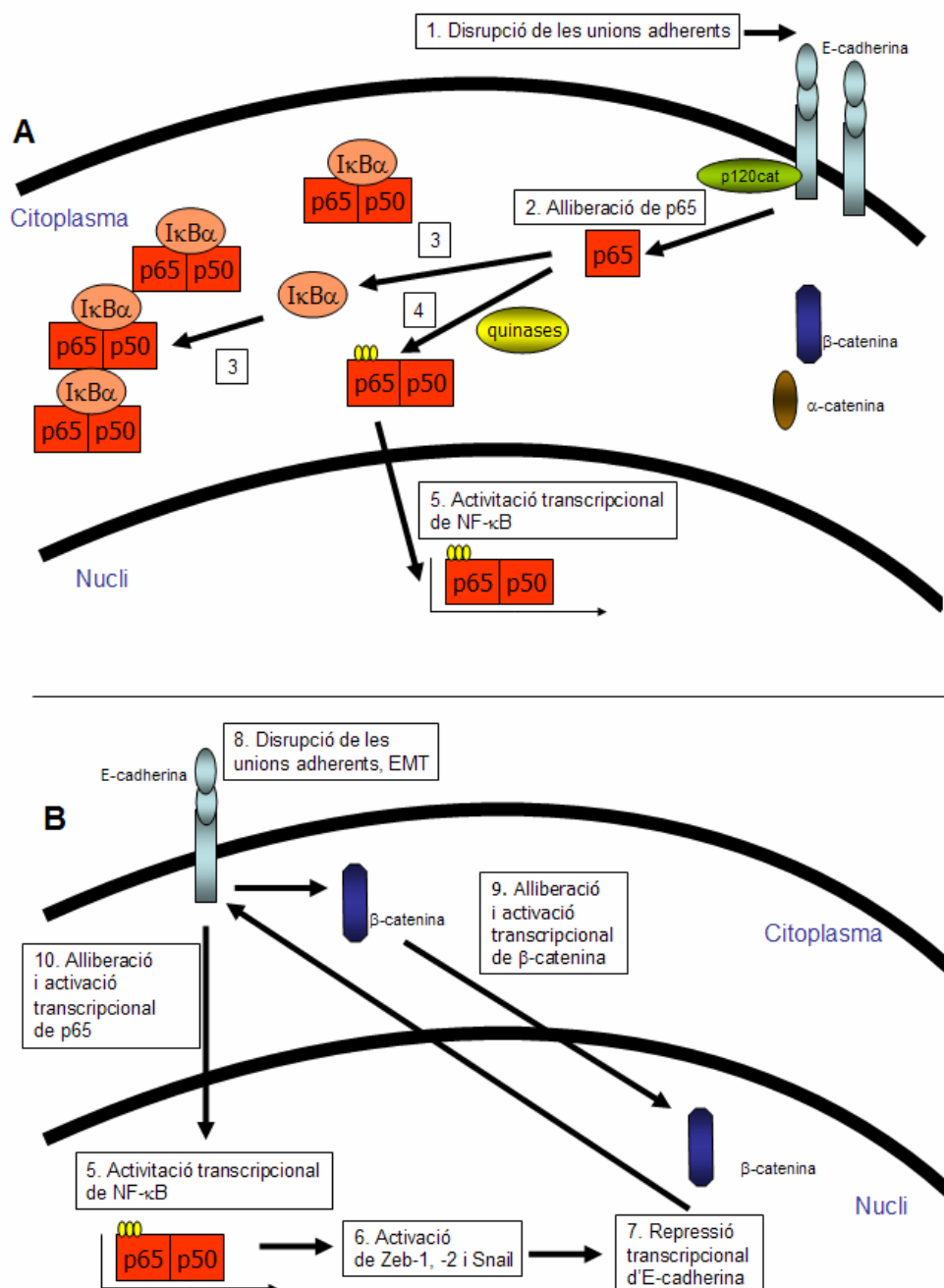
associat a les unions adherents a través de  $\beta$ -catenina i E-cadherina [251, 254]. Es podria pensar que la presència d'E-cadherina a la membrana podria reduir l'efecte activador de la via de NF- $\kappa$ B per EGFR de dues maneres: reduint l'activació del mateix receptor [251] i segrestant NF- $\kappa$ B, ara sí, lliure d'I $\kappa$ B $\alpha$ .

Una altra possibilitat és que quan les unions adherents es tornen a formar per frenar un estímul proliferatiu o migratori, com per exemple, durant la finalització de la curació d'una ferida o en un procés de MET, juntament amb el reclutament de les catenines, es porti NF- $\kappa$ B cap a la membrana. Així, a més d'aturar la senyalització de la ruta de  $\beta$ -catenina, que tenia un paper de coactivador transcripcional, es frenaria el senyal de NF- $\kappa$ B, que estava provocant, a més de la transcripció de gens mesenquimals i pro-proliferatius, una resposta inflamatòria amb infiltració del sistema immune.

Un altre interrogant que caldria resoldre és el vincle d'unió de p65 a les unions adherents. S'ha demostrat que la interacció entre p65 i  $\beta$ -catenina no és directa ([217] i resultats *in vitro* d'aquest treball). L'elevada capacitat que presenta p65 per interaccionar inespecíficament amb les reïnes utilitzades per les cromatografies d'afinitat dificulten la seva expressió en procarïotes i impossibiliten l'estudi mitjançant assaigs *in vitro* de proteïnes recombinants d'aquest punt. Probablement, resolent aquest últim interrogant podríem conèixer més a fons la regulació d'aquest mecanisme inhibidor de NF- $\kappa$ B.

La presència de p50 en els complexes de les unions adherents obre un nou interrogant (Figura 58), ja que ens suggereix que aquest mecanisme de regulació implica altres subunitats de NF- $\kappa$ B, aportant complexitat al tema.

En aquest treball es proposa un mecanisme de defensa de les cèl·lules epitelials davant d'una via de senyalització que posa en perill el seu fenotip, com és la de NF- $\kappa$ B. La integritat de les unions adherents provoca el segrest, no només de  $\beta$ -catenina, sinó també de la subunitat transactivadora de NF- $\kappa$ B fora del nucli, evitant la inhibició de l'expressió de l'E-cadherina per factors com Zeb i Snail (Figura 61).



**Figura 61: Regulació creuada de la via de NF-κB i l'E-cadherina. A) La disrupció de les unions adherents promou l'activació de NF-κB. 1 i 2:** La disrupció de les unions adherents provoca l'alliberació de p65 dels complexos que forma amb E-cadherina i les catenines. **3.** Una part de la subunitat p65 alliberada es reté per IκBα al citosol. **4.** Una altra part s'activa, provocant la transcripció de gens diana de la via NF-κB (**5**). **B) Alguns dels gens diana de NF-κB reprimeixen la transcripció d'E-cadherina, promovent un fenotip mesenquimal i un feedback positiu. 5 i 6:** L'activació de la via de NF-κB provoca la transcripció de gens repressors de l'E-cadherina. **7 i 8.** La repressió transcripcional de l'E-cadherina comporta la disrupció de les unions adherents **9:** Es produeix l'alliberació de la β-catenina, fins ara retinguda a la membrana, activant la transcripció dels seus gens diana. **10:** També s'allibera p65 d'aquestes unions ara dissoltes, provocant un bucle d'auto-regulació positiva de la via de NF-κB.



## **II.CONCLUSIONS**



## II.CONCLUSIONS

---

- ✓ La subunitat p65 de NF- $\kappa$ B interacciona amb components de les unions adherents, les catenines i E-cadherina. Aquesta interacció redueix la capacitat transcripcional de p65 .
- ✓ La integritat dels complexos d'adhesió és necessària per la correcta interacció amb p65. E-cadherina és essencial per la formació dels complexos.
- ✓ La disrupció dels complexos de les unions adherents provoca la davallada de la interacció de p65 amb les catenines i E-cadherina, a més d'un canvi en la localització de p65, permetent l'entrada al nucli i l'activació de la transcripció dependent de NF- $\kappa$ B.
- ✓ L'absència d'E-cadherina accentua l'activació de NF- $\kappa$ B per TNF- $\alpha$ , suggerint que part de la fracció de p65 alliberada de les unions roman al citosol unida a I $\kappa$ B $\alpha$ .
- ✓ La interacció de p65 amb E-cadherina i I $\kappa$ B $\alpha$  és mútuament excloient.





# **MATERIALS I MÈTODES**



### 1 Preparació de les construccions de DNA

El primer pas per obtenir expressió de proteïnes recombinants, tant en bacteris com en cèl·lules eucariotes en cultiu, és dissenyar els plàsmids que contindran el seu DNA codificant.

#### 1.1 Vectors

Són els vehicles d'expressió de les diferents proteïnes. Per preparar els vector pel posterior clonatge, es digereix (2-3 µg) en un volum final de 20-50 µl. amb els enzim/s (New England Biolabs) que haguem considerat adients. Es desfosforila el vector amb 0.5 U/µg de DNA de fosfatasa intestinal de vedella (CIP) i s'aïlla el DNA amb el *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). S'elueix amb 50 µl de TE.

Els vectors els podem separar en dos grans grups, els que expressen la proteïna en organismes eucariotes i els que tenen un origen de replicació per organismes eucariotes.

##### 1.1.1 D'expressió en procariotes.

Per tal d'obtenir proteïnes recombinants per la posterior realització dels assaigs *in vitro* d'interacció entre proteïnes es va optar per clonar els seus cDNAs en vectors **pGEX-6P** (Amersham). Aquest tipus de vectors expressen la proteïna d'interès fusionada a la Glutation-S-Transferasa (GST) a l'extrem aminoterminal i són induïbles per IPTG, ja que el gen està sota el control del promotor Tac. També confereixen resistència a l'ampicil·lina, fet que ens permet seleccionar les colònies positives en medi selectiu.

Amb aquesta estratègia podem purificar les proteïnes de fusió per cromatografia d'afinitat amb la *Glutathion-Sepharose 4B*. També podem escollir obtenir el producte final sense la GST gràcies a la seqüència de tall específica per la proteasa PreScission que conté entre el *tag* i l'inici de transcripció de la proteïna (veure punt 2).

### 1.1.2 D'expressió en eucariotes

D'aquest tipus n'hem fet servir tres famílies, segons el que desitgem en cada cas.

- **pcDNA 3.1 His (Invitrogen):** permeten un alt nivell d'expressió degut al seu promotor CMV, expressen la proteïna fusionada a un *tag* de poli-Histidines que permeten la seva detecció amb anticòs anti-His o anti-Xpress. També permeten la purificació de la proteïna per cromatografia d'afinitat amb níquel-agarosa.
- **phrGFP (Stratagene):** aquest vector expressa el gen d'interès fusionat a la proteïna verda fluorescent (GFP (de l'anglès *green fluorescent protein*)) humanitzada per evitar la toxicitat. Permet la visualització de la seva localització per microscopia de fluorescència.
- **pSUPER system:** permet la transcripció de RNA que simula els RNA interferents naturals. Expressa productes que es processen per a les cèl·lules un cop expressats, convertint els precursors (amb forma de *hairpin*) en RNA *sense* i *antisense*.

## 1.2 Preparació dels inserts

### 1.2.1 Per subclonatge.

És el mètode que s'ha fet servir quan la proteïna que desitgem expressar ja està clonada en un altre vector i les pautes d'expressió coincideixen. En aquest cas, es digereix amb enzims de restricció que alliberin la seqüència de la proteïna (insert) amb extrems compatibles amb els llocs de restricció del vector de destí.

Es fa un procés similar al descrit pel vector, amb digestió per endonucleases, però en el moment de la purificació s'ha de resoldre el producte de la digestió en un gel d'agarosa per separar la banda del vector on estava insertat de la de l'insert. Es purifica la banda desitjada amb el *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham). Finalment s'elueix amb TE.

### 1.2.2 Per PCR.

Quan l'insert s'ha de treure del vector d'origen per PCR, perquè els extrems no són compatibles o perquè s'hi vol introduir algun canvi (deleció o inserció d'una diana de restricció), el procediment seguit és aquest.

Les reaccions es feien en volum de 50  $\mu$ l amb 300 ng de DNA motlle, el tampó i reactius del *kit* de la polimerasa *Pfx* (Invitrogen), de la que n'afegíem 1-2 U. Es van addicionar 10 mM de la barreja de dNTPs (Invitrogen), 0.3  $\mu$ M d'oligonucleòtids encebadors i aigua fins al volum final.

Les condicions de la reacció van ser:

1. 95°C 3 minuts (*heat shock*)
2. 95°C 15 segons
3. 38-60°C (depenent de la  $T_m$  dels oligos encebadors) 30 segons
4. 68°C, durant 1 minut/1 Kb que es vulgui amplificar.
5. Dels passos 2, 3 i 4 es fan 25 cicles.
6. Extensió final de 2 minuts a 68°C.

### 1.3 Lligació

Quan ja tenim purificats el vector i l'insert, es resolen en un gel d'agarosa per corroborar que la mida i la quantitat són les adequades i es lliguen amb una relació molar 1:3 si els extrems generats són cohesius o 1:10 si són roms. El volum de la reacció és de 10  $\mu$ l, amb 1U de Lligasa T4 DNA (Roche), a 16°C tota la nit o a temperatura ambient (20-25°C) 1-2 hores.

### 1.4 Transformació en cèl·lules competents

En general, el producte de la lligació es transforma en DH-5 $\alpha$  competents generades pel mètode d'Inoue [255].

El procés de transformació consisteix en 30 minuts en gel, seguits del xoc tèrmic a 42°C durant 90 segons i posterior recuperació a 37°C amb 1 ml de LB. Es plaqueja el resultat en una placa de LB-agar amb l'antibiòtic de selecció.

### 1.5 Extracció i comprovació del DNA

L'extracció del DNA plasmídic es fa mitjançant el mètode de la lisi alcalina, amb el *kit* de *minipreps* de Promega. D'aquest DNA es fa una digestió per comprovar que el vector realment conté l'insert i, si la clonació era amb un sol enzim de restricció, si la direcció d'inserció és l'adequada.

### 1.6 Seqüenciació del DNA.

Per assegurar que el fragment clonat és totalment correcte es va fer servir el *dRhodamine terminator Cycle Sequencing Kit* (Perkin Elmer), amb uns oligonucleòtids pròxims al lloc d'interès (uns 500 pb).

## 2 Obtenció de proteïnes recombinants en *E.coli*.

Com ja s'ha esmentat, quan es van necessitar proteïnes recombinants pels assaigs *in vitro*, es van clonar els corresponents cDNAs en el vector d'expressió pGEX. A la Taula 4 es pot veure una llista de les construccions utilitzades. A continuació es detalla el procés de d'obtenció de proteïnes purificades d'*E. coli*.

**Taula 4: Detall de les construccions per expressió en procarïotes (pGEX) usades en aquest treball.**

Construcció	Insert	Vector pGEX
$\beta$ catenina (1-782)	cDNA cedit pel Dr.R.Kemler digerit amb BamHI	pGEX-6P-3 tallat amb BamHI i desfosforilat
$\beta$ catenina (120-683) repeticions arm	Per PCR amb encebadors amb dianes per BamHI i SmaI	pGEX-6P-1 obert amb BamHI i SmaI
$\beta$ catenina C-terminal (696-782)	Digestió de pGEX- $\beta$ catenina amb BglII i SmaI, purificació de la banda de 270 pb	pGEX-6P-2 obert amb SmaI i farciment amb la Klenow polimerasa

Construcció	Insert	Vector pGEX
placoglobina (1-745)	Digestió de placoglobina-pBKS cedida per Dr.A.Ben-Ze'ev amb EcoRI i purificació de la banda de 3.2kb.	pGEX-6P-2 obert amb EcoRI i desfosforilat
placoglobina (111-672) repeticions arm	Per PCR de pGEX-placoglobina amb dianes per BamHI i EcoRV	pGEX-6P-1 obert amb BamHI i SmaI
placoglobina (111-385) repeticions arm 1-6	Per PCR de pGEX-placoglobina amb dianes per BamHI i EcoRV	pGEX-6P-1 obert amb BamHI i SmaI
Placoglobina (380-672) repeticions arm 7-12	Per PCR de pGEX-placoglobina amb dianes per BamHI i EcoRV	pGEX-6P-1 obert amb BamHI i SmaI
placoglobina $\Delta$ N-terminal (111-745)	Per PCR del cDNA amb dianes per BamHI i XhoI (fragment 1.9 kb)	pGEX-6P obert amb BamHI i XhoI
placoglobina $\Delta$ C-terminal (1-672)	Per PCR del cDNA amb dianes per BamHI i EcoRV (fragment de 2.2 kb)	pGEX-6P-3 obert amb BamHI i EcoRV
placoglobina N-terminal (1-113)	Digestió de pGEX-placoglobina amb PstI i EcoRI, purificació de la banda de 460 pb i farciment amb la Klenow	pGEX-6P-2 obert amb EcoRI i SmaI
placoglobina C-terminal (667-745)	Digestió de pGEX-placoglobina amb EcoRI i purificació de la banda de 1100pb	pGEX-6P-1 obert amb SmaI
N-ter( $\beta$ cat)-arm(placo)-C-ter( $\beta$ cat) Quimera $\beta$ -p- $\beta$	De pGEX-placoglobina es creen per PCR dianes de restricció per Afl3 (aà 140) i KpnI (aà 698). Purificació de la banda de 1700pb.	pGEX- $\beta$ catenina modificada per PCR amb una diana per KpnI (aà 701). Digestió amb Afl3 i KpnI i purificació de banda de 5800pb.
N-ter( $\beta$ cat)-arm( $\beta$ cat)-C-ter(placo) Quimera $\beta$ - $\beta$ -p	pGEX- $\beta$ catenina modificada amb una diana per KpnI en el C-ter (aà 701) i digestió amb BamHI i KpnI (banda de 2400pb)	De pGEX-placoglobina es creen per PCR dianes de restricció per Afl3 (aà 140) i KpnI (aà 698), digestió amb BamHI i KpnI, banda de 5000pb

Construcció	Insert	Vector pGEX
N-ter(placo)-arm( $\beta$ cat)-C-ter(placo) Quimera p- $\beta$ -p	pGEX- $\beta$ catenina modificada amb una diana per KpnI en el C-ter (aà 701) i digestió amb Afl3 i KpnI. Purificació de la banda de 1700pb	De pGEX-placoglobina es creen per PCR dianes de restricció per Afl3 (aà 140) i KpnI (aà 698). Purificació de la banda de 1700pb.
p120-catenina (1-911)	Subclonatge de pcDNA-p120-catenina	pGEX-6P-3 obert amb EcoRI i NotI
p120-catenina (1-234)	Per PCR del cDNA amb dianes per EcoRI i BamHI	pGEX-6P-3 obert amb EcoRI i BamHI
p120-catenina (350-824) repeticions armadillo	Per PCR del cDNA amb dianes per EcoRI i EcoRV	pGEX-6P-2 obert amb EcoRI i SmaI
p120-catenina (1-911) Y112E	Per mutagènesi dirigida de pGEX-p120-catenina (1-911)	
RhoA	Digestió de RhoA pGEX-4T-3 (cedit per X.R. Bustelo) amb EcoRI y BamHI	pGEX-6P-3 abierto EcoRI y BamHI

## 2.1 Manipulació de les soques bacterianes.

Un cop la construcció està comprovada es retransforma en una soca de *E. coli* específicament dissenyada per l'expressió de proteïnes de mamífer, BL-21 RIL, corregida pel biaix d'ús de codons.

Per seleccionar els vectors els cultius es creixen en medi LB amb ampil·lina (per seleccionar el plàsmid pGEX la proteïna clonada) i cloramfenicol (per seleccionar els plàsmids que codifiquen pels tRNAs de l'Arginina, Isoleucina i Leucina) a 37°C i agitació de 220 rpm quan el medi és líquid.

Es pica una de les colònies, es creix en LB+Ampicil·lina+Cloramfenicol fins a saturació, i després de comprovar que el DNA plasmídic que contenen és el correcte, es guarda un *stock* al 50% de glicerol a -80°C.

A partir d'ara, tots els cultius que es facin han de contenir ampil·lina i cloramfenicol per evitar que els plàsmids es perdin al llarg dels passes.



## **2.2 Inducció, purificació i elució de proteïnes recombinants.**

### **2.2.1 Inducció.**

El procés d'inducció es porta a terme diluint un petit volum de cultiu saturat (2 ml) en uns 200 ml de LB+Ampicil·lina+Cloramfenicol. Quan aquesta dilució arriba a fase exponencial ( $Abs=0,6$  a  $\lambda=600$  nm) s'afegeix IPTG (0,1 mM) i es creix 2 hores més.

Es recullen les cèl·lules per centrifugació (10 minuts, a 4°C i 8000 rpm). A partir d'aquest pas es manté tot el procés a 4°C per evitar l'acció de les proteases i l'agregació de les proteïnes recombinants. El protocol escollit per purificar cada proteïna depèn de la seva solubilitat i la seva tendència a l'agregació.

### **2.2.2 Solubilització amb TX-100 1%.**

És el protocol escollit per les proteïnes solubles. Es resuspèn el pèl·let de cèl·lules en 10 ml de PBS, es separa en fraccions de 0.5 ml i es sonica cadascuna 15 segons. Es retornen les fraccions a un sol tub i s'afegeix l'1% de Tritó X-100. S'agita 30 minuts i es centrifuga 10 minuts a 10.000 rpm, a 4°C.

### **2.2.3 Solubilització amb N-Lauroilsarcosine.**

Els cultius de placoglobina i qualsevol constructe que contingui almenys un dels seus extrems (delecions o quimeres) s'han de realitzar en condicions més astringents per poder-les solubilitzar.

El pèl·let es resuspèn en 10 ml de STE amb 100 µg/ml de lisozim. es deixa incubar 15 minuts i es sonica també 15 segons en fraccions de 0.5 ml i es retornen les fraccions a un sol tub. S'afegeix DTT a 5 mM, N-Lauroilsarcosine resuspès en STE al 10% i Tritó X-100 a l'1%. S'homogeneïtza amb el vortex durant 1 minut i es centrifuga a 11.000 rpm 20 minuts, a 4°C.

S'afegeix un 2% més de Tritó X-100 en aquest moment.

### **2.2.4 Purificació amb *Glutathion-Sepharose 4B*.**

Per purificar la proteïna d'interès, s'incuba el sobrenedant de la centrifugació 1 hora a 4°C amb 400 µl de *Glutathion-Sepharose-4B* (GE Healthcare) diluïda al 50% amb PBS (200 µl efectius). Aquesta sefarosa té unida covalentment glutatona i permet la unió específica de la GST. D'aquesta manera, en un sol pas de cromatografia, la proteïna de fusió amb GST és retinuda, mentre que la resta de proteïnes es descarten.

Es renta la reïna amb PBS per eliminar unions no específiques. S'asseca la reïna i es procedeix a l'elució.

### **2.2.5 Elució amb glutatona reduïda, mantenint el *tag* GST.**

Si es desitja que la proteïna mantingui la GST s'ha d'eluir amb *Glutathion Elution Buffer* (GEB). La glutatona reduïda que conté el tampó competeix amb la glutatona de la sefarosa per la unió a la GST, alliberant així la proteïna.

S'afegeixen 200 µl de GEB a la reïna seca i es deixa incubar en agitació 10-20 minuts a temperatura ambient. Es centrifuga a 500 xg i es recull el sobrenedant que conté la proteïna. Es pot repetir el procés i comprovar en l'electroforesi si aquesta segona fracció encara conté proteïna.

La solució ha d'estar lliure de glutatona pels experiments posteriors, per tant s'ha de dialitzar contra tampó de diàlisi 16 h a 4°C.

### **2.2.6 Elució amb PreScission, tallant la GST.**

En el cas que es vulgui la proteïna sense *tag* s'ha de tallar amb 2 µl de pre-scission protease en un volum final de 200 µl de tampó de diàlisi. Es deixa incubar de 4 a 16 hores en agitació a 4°C. Es centrifuga a 500 xg i es recull el sobrenedant que conté la proteïna ja tallada.

## **2.3 Quantificació per electroforesi.**

Al llarg de tot el protocol s'agafen mostres de cada pas per controlar el procés. Al final, aquestes mostres i una alíquota de la proteïna es resolen en un gel SDS-PAGE (veure punt 4.1).

Es quantifica la proteïna segons un patró conegut de BSA que s'afegeix als carrils del gel. Es tenyeix amb Coomassie blue durant 30 minuts i es destenyeix amb solució destenyidora durant 2-16 hores. Es quantifiquen les bandes en un escàner GS-700 i es referencia cada valor als dels patrons de BSA.

### 3 Cultiu cel·lular i obtenció d'extractes proteics.

En el nostre cas, hem fet servir línies cel·lulars establertes en cultiu com a models cel·lulars pels nostres experiments.

#### 3.1 Línies cel·lulars utilitzades.

Taula 5: Enumeració i característiques de les línies cel·lulars utilitzades.

Línia	Procedència	Característiques
NIH3T3	Fibroblasts embrionaris de ratolí	No formen unions adherents per la falta d'expressió d'E-cadherina. Expressen N-cadherina.
RWP1	Carcinoma pancreàtic humà	Presenten contactes intercel·lulars ben formats.
SW480	Adenocarcinoma primari de colon humà	A baixa confluència presenten poca expressió d'E-cadherina, fenotip que reverteix quan es porten a alta confluència. APC truncat, alta activitat transcripcional de la via $\beta$ -catenina/TCF. K-ras oncogènic.
IEC-18	Epiteli intestinal sa de rata	Cèl·lules epitelials immortalitzades. No són d'origen tumoral.

##### 3.1.1 Clons estables.

Per tal d'aconseguir l'expressió de proteïnes ectòpicament ens vam fer ús de línies cel·lulars establement transfectades. La llista de les utilitzades es detalla a la Taula 6.

**Taula 6: Llista i detalls de les línies cel·lulars establiment transfectades fetes servir.**

Línia	Característiques
IEC-18 K-ras	Mutant Gli-12-Val del oncogen K-ras. Pèrdua dels contactes cel·lulars i del fenotip epitelial, fusiformes (Cedides per H.G. Pàlmer, CSIC).
SW480-Snail	Promoció de fenotip mesenquimal (Cedides pel Dr. A. García de Herreros, PRBB)
SW480-E-cadherina	Inducció d'un fenotip epitelial. (Cedides pel Dr. A. García de Herreros, PRBB)
SW480-Snail-E-cadherina	Reversió del fenotip mesenquimal induït per Snail. (Cedides pel Dr. A. García de Herreros, PRBB)

### 3.2 Manteniment, sembra i emmagatzematge de les línies.

Les línies cel·lulars es van créixer en ampolles de plàstic tractat, fent passes setmanals. Es van mantenir en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Life Technologies, Inc.) amb un suplement del 10% de sèrum de fetus boví (FCS) (Biological Industries). A aquest medi també se li afegeix piruvat sòdic, glutamina i penicil·lina/estreptomicina (Life Technologies, Inc.). Es van mantenir a 37°C amb una atmosfera amb 5% de CO<sub>2</sub>. Quan les cèl·lules van arribar a confluència es va aixecar amb tripsina 1% (Life Technologies) i ressebrades en plaques (per experiments) o ampolles (per manteniment).

Per determinar el nombre de cèl·lules es va recórrer a l'ajuda d'un microscopi òptic i una càmera de *Neubauer*. L'addició de *Trypan Blue* (Sigma) a la barreja va permetre controlar la integritat i supervivència cel·lular, descartant sempre els cultius que presentaven tincions positives superiors al 5%.

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

### 3.3 Transfecció.

El mètode utilitzat per la transfecció de les línies cel·lulars eucariotes és el *kit Lipofectamine 2000* (Invitrogen). Es sembra un nombre de cèl·lules en plaques tractades per tal d'assolir una confluència del 80% en el moment de la transfecció (normalment 24 hores després de la sembra). Seguint les instruccions del fabricant, s'ha fet servir una relació de 2 µl de reactiu/µg de DNA plasmídic en el volum final de medi *Optimem* (Invitrogen) indicat depenent de la mida de la placa. La barreja s'afegeix a la placa amb *Optimem* i es deixa entre 4 i 6 hores. Es canvia el medi a DMEM+10% FCS i deixa expressar durant 24-48 hores (si la proteïna és tòxica o s'expressa en grans quantitats és recomanable aturar a les 24 hores).

Les construccions de DNA que s'han transfectat es poden trobar a la Taula 7.

**Taula 7: Llista de les construccions que s'han transfectat en aquest treball.**

Construcció	Insert	Vector
β-catenina (1-782)	Digestió de pGEX-β-catenina amb BamHI	pcDNA3.1-His obert amb BamHI
Placoglobina (1-744)	Digestió de pGEX-placoglobina amb EcoRI. Purificació de la banda de ≈ 3200 pb.	pcDNA3.1/His(A) obert amb EcoRI i desfosforilat.
siRNA E-cadherina	<b>CCGATCAGAATGACAACAA GGCTAGTCTTACTGTTGTT</b>	pSUPER (cedida pel Dr. J. Baulida)
siRNA β-catenina	<b>GUGGGUGGUUAUAGAGGCUC CACCCACCAUAUCUCGAG</b>	pSUPER (cedida pel Dr. J. Baulida)
siRNA <i>scramble</i>	Seqüència aleatòria	pSUPER (cedida pel Dr. J. Baulida)
E-cadherina	Proteïna sencera wt	pBAT (cedida pel Dr. H.G. Palmer, CSIC)
IκBα-S32/36A	Mutades les Serines 32 i 36 a Alanina (no fosforilables), no es pot degradar pel proteasoma.	pCDNA-HA. (cedida per la Dra. A. Bigas, ICO)

### **3.4 Preparació de lisats cel·lulars.**

Un cop les cèl·lules han arribat a la confluència adequada o s'ha acabat el procés de transfecció, es continua lisant-les per extreure'n les proteïnes. Segons el tipus d'assaig que el vulgui realitzar a continuació s'haurà d'escollir un tipus de preparació d'extractes o un altre. També es pot optar per fraccionar diferents compartiments subcel·lulars.

Un cop solubilitzades les proteïnes, es quantifiquen els lisats amb l'assaig *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad), basat en el mètode de Bradford. La quantificació es realitza per interpolació en una recta patró de BSA.

#### **3.4.1 Extractes totals.**

Per obtenir un lisat cel·lular que contingui les proteïnes solubles, nuclears i transmembrana escollim els extractes tipus RIPA. Aquests es preparen rentant les plaques dues vegades amb PBS, assecant les plaques amb un pipeta, afegint un volum d'entre 300 i 700 µl de tampó de lisi RIPA sobre les plaques i rasant-les amb una rasqueta (*scraper*) (tot el procés es realitza en gel). Es recull el volum de lisat en un tub i es passa 10 vegades per una xeringa d'insulina (20-gauges). Es deixa incubar uns 15 minuts en gel i es centrifuguen els tubs a 20.000xg, 10 minuts a 4°C. El sobrenedant conté les proteïnes solubilitzades i el pèl·let es pot descartar.

#### **3.4.2 Fraccionament subcel·lular.**

Quan s'ha necessitat separar les proteïnes de dos compartiments subcel·lulars hem optat per un d'aquests tipus d'extractes.

##### **3.4.2.1 Compartiments soluble i insoluble**

El protocol que s'ha seguit per obtenir les proteïnes solubles i les insolubles en dues fraccions diferents és el següent:

Es van rascar les cèl·lules sobre la placa amb tampó de lisi de fracció soluble i es van lisar passant el volum recollit per una xeringa unes 10 vegades. Es centrifuga a 4°C i 20.000xg durant 10 minuts.

El sobrenedant són les proteïnes solubles i el pèl·let es resuspèn en *buffer* d'extractes RIPA i es torna a homogeneïtzar amb una xeringa. Es centrifuga a 4°C i 20.000xg 15 minuts i el sobrenedant es consideren les proteïnes insolubles.

#### 3.4.2.2 Citosol-membrana i nucli

Per tal de separar les proteïnes d'aquests dos compartiments subcel·lulars es va procedir de la següent manera:

Es van fer extractes tipus RIPA sobre les plaques de cèl·lules, canviant però les condicions de centrifugat de 20.000xg a 500xg i no es va homogeneïtzar amb xeringa per evitar el trencament dels nuclis.

Després es van separar els pèl·lets dels sobrenedants. Els primers es van sotmetre al procés dels extractes tipus RIPA, ara sí xeringant, i els segons es van considerar com a "citosol+membrana". Després de centrifugar els pèl·lets resuspesos es va recollir el sobrenedant i es va considerar com la fracció "nuclis". Es van quantificar com els extractes totals i es van carregar en un gel SDS-PAGE, seguit d'un *Western blot* contra els marcadors de cada compartiment per comprovar que les fraccions no estaven contaminades entre elles. El marcador de "citosol+membrana" va ser la Piruvat quinasa i el de "nucli" la LàminaB1.

## 4 Tècniques analítiques de proteïnes.

### 4.1 Electroforesi SDS-PAGE (Laemmli).

Per tal d'analitzar les proteïnes recombinants obtingudes en els cultius i els resultats dels experiments realitzats es va utilitzar l'electroforesi unidimensional en gels de poliacrilamida, seguint el mètode de Laemmli.

Es van fer gels d'1.5 mm de gruix amb el sistema *Mini-Protean III* (Bio-Rad) amb un percentatge d'acrilamida d'entre el 7.5 i el 16% en el gel separador. Al gel apilador la concentració d'acrilamida era del 4%. Es va mantenir una relació 37.5:1 de acrilamida:bis-acrilamida. Es va afegir a les mostres tampó de càrrega, es van bullir 4 minuts i es van córrer a voltatge constant.

Si es volia analitzar la puresa i concentració d'un cultiu de proteïnes es van tenyir amb *Coomassie blue*. Si per contra, es tractava del resultat d'un assaig d'interacció entre proteïnes es va realitzar electrotransferència a una membrana de nitrocel·lulosa i immunodetecció.

#### 4.2 Electrotransferència i immunodetecció (*Western blot*).

Les proteïnes resoltes al gel SDS-PAGE es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa (0.45 µm Protran, Schleicher & Schuell) en una cambra de transferència humida (Bio-Rad) plena de tampó de transferència a 400 mA durant 100-120 minuts.

**Taula 8: Llista dels anticossos primaris i els epítops que reconeixen.**

Anticòs primari	Organisme	Epítop	Dilució	Casa comercial
β-catenina	ratolí	696-750	1:500	BD Transduction Labs
β-catenina	ratolí	domini arm (422-685)	1:100	Alexis Biochemicals
placoglobina C-ter	ratolí	553-738	1:2000	BD Transduction Labs
placoglobina C-end (C-20)	cabra	698-745	1:200	Santa Cruz Biotech.
α-catenina	ratolí	729-906	1:1000	BD Transduction Labs
E-cadherina	ratolí	735-883	1:2500	BD Transduction Labs
p120-catenina, clon 98	ratolí	790-911	1:1000	BD Transduction Labs
p65	ratolí	136-224	1:250	BD Transduction Labs
p65 (A)	conill	No caracteritzat	1:200	Santa Cruz Biotech
IκBα (H-4)	ratolí	1-317	1:200	Santa Cruz Biotech



Anticòs primari	Organisme	Epítop	Dilució	Casa comercial
TBP	ratolí	No caracteritzat	1:250	BD Transduction Labs
LaminaB1	conill	400-500	1:1000	Abcam
Piruvat Quinasa	cabra	-	1:2000	Cedit pel Dr. García de Herreros
$\beta$ -Actina AC-15	ratolí	Pèptid del N-terminal	1:2000	Sigma
GST, 27-4577	cabra	No caracteritzat	1:2000	Amersham
HA	rata	-	1:1000	Roche

Un cop acabat el procés, les membranes es van bloquejar amb llet en pols desnatada al 5% o BSA a l'1% dissolts en TBS-T durant 1 hora a temperatura ambient en agitació.

**Taula 9: Anticossos secundaris conjugats a peroxidasa utilitzats**

Anticòs secundari	Dilució	Casa comercial
Immunopure Goat Anti-Mouse IgG-HRP	1:10000	Pierce
Peroxidase-conjugated Goat Anti-Rabbit IgGs	1:2000	Dako
Peroxidase-conjugated Rabbit anti-Goat IgGs	1:2000	Dako
Peroxidase-conjugated Rabbit anti-Rat IgGs	1:1000	Dako

Es van incubar les membranes amb la dilució adequada de cada anticòs (segons instruccions del fabricant) durant 1-4 hores a temperatura ambient o tota la nit a 4°C. Una llista detallada dels anticossos primaris fets servir es pot trobar a la Taula 8. Es van fer 3 rentats amb TBS-T de 10 minuts i es van incubar amb la dilució recomanada d'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa de rave (Taula 9). Després de rentar 3 cops més, es va incubar la

membrana amb luminol (*Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate* de Pierce) i es va detectar la luminiscència amb pel·lícules fotogràfiques (Kodak).

## 5 Assaigs d'interacció entre proteïnes.

En aquest apartat es poden trobar detallats els protocols de quatre tipus de tècniques per estudiar la interacció entre proteïnes:

- **Interacció directa** entre dues proteïnes recombinants purificades d'*E. coli*.
- **Over-lay**, que permet analitzar diferències d'interacció entre proteïnes transferides a una membrana de nitrocel·lulosa i una altra que està en solució.
- **Pull-down**: interacció directa o indirecta entre una proteïna recombinant utilitzada com a esquer i altres proteïnes provinents d'extractes cel·lulars.
- **Co-immunoprecipitació**: interaccions *in vivo* purificant amb un anticòs específic una proteïna endògena d'extractes cel·lulars juntament amb els complexos dels que formava part.

Tots els complexos formats i purificats en els assaigs es van analitzar per *Western blot*. Un cop tenim la pel·lícula revelada es quantifica amb un escàner GS-700 (Bio-Rad) i es tracten les dades amb el software de l'aparell. Cal referenciar les dades als patrons interns de l'experiment (*Input*).

### 5.1 Interacció directa de proteïnes recombinants.

Per estudiar canvis en l'afinitat de diferents mutants o quimeres respecte les proteïnes *wt* amb els seus cofactors es van realitzar aquest tipus d'assaig.

Es van incubar quantitats fixes de les proteïnes que es volien comparar fusionades a la GST amb la proteïna d'interès sense *tag*. Es va fer una condició amb la GST sola com a control de la possible agregació. El volum final de la reacció és de 200µl amb tampó de *binding* i el temps d'incubació, entre 20 i 25 minuts a 22°C en agitació.

Els complexes formats es purifiquen amb la *Glutathion-Sepharose 4B* (20  $\mu$ l) durant 25 minuts en les mateixes condicions d'incubació. Es va rentar la reïna 3 vegades amb tampó de *binding* (500  $\mu$ l) i es van eluir els complexes amb tampó de càrrega i bullint 4 minuts.

## 5.2 *Over-lay.*

Les proteïnes recombinants que es volen estudiar es van separar per SDS-PAGE i es van electrotransferir a una membrana de nitrocel·lulosa, que va bloquejar amb 1% de BSA en solució TBS-T durant 1 hora.

Tot seguit es va incubar la membrana amb una solució de la proteïna problema a una concentració de 5-10  $\mu$ g/ml en TBS-T amb 0,1% de BSA durant 90 minuts a temperatura ambient. Després de tres rentats amb TBS-T (de 10 minuts cadascun) s'incuba amb l'anticòs que reconegui la proteïna en solució, seguit del secundari que correspongui conjugat amb peroxidasa. Es detecta igual que un *Western blot* convencional.

## 5.3 *Pull-down.*

Aquests assaigs permeten estudiar la interacció d'una proteïna amb una mutació o deleció amb algun dels seus cofactors en cas que la interacció no sigui directa o es vulgui mantenir un ambient més fisiològic.

Es necessita tenir les proteïnes amb un *tag*, en el nostre cas la GST. Aquestes (entre 6 i 12 picomols) s'incuben amb extractes cel·lulars (300-500  $\mu$ g) durant 45 minuts a 22°C en agitació. Els complexos formats es purifiquen i analitzen de la mateixa manera com s'ha descrit en el punt "Assaigs d'interacció directa entre proteïnes recombinants".

## 5.4 *Co-immunoprecipitació.*

Es preparen el tipus d'extractes desitjats i, d'aquests, 300-1000  $\mu$ g s'incuben amb l'anticòs contra la proteïna que es vol estudiar 1-2 hores a 4°C en agitació. S'afegeix tampó de lisi fins a portar els extractes a una concentració final de 1mg/ml.

Els complexes formats es purifiquen amb 40  $\mu$ l Proteïna G fusionada a *Sepharose* ( $\gamma$ -bind G-*Sepharose*, GE Healthcare). Es renta la reïna amb 1ml de t10+ 200 mM NaCl 3-4 vegades, i s'elueix amb tampó de càrrega i bullint. Es continua l'anàlisi de les mostres per *Western blot*.

### **6 Assaig de sensibilitat a la digestió amb tripsina.**

Els assaigs de sensibilitat a tripsina es van realitzar en un volum final de 100  $\mu$ l en tampó d'assaig de tripsinolisi. Es van incubar 5 pmol de placoglobina,  $\beta$ -catenina, quimeres o extrems C-terminal amb 50 ng de tripsina a 25°C. La reacció es va aturar als temps indicats (de 0.5 a 45 minuts) amb tampó de càrrega Laemmli i, un cop bullides 4 minuts, es van analitzar per electroforesi SDS-PAGE i *Western blot* revelant amb anticossos específics per l'extrem carboxi-terminal de cada proteïna. La reacció es va quantificar escanejant els films i representant a la gràfica la quantitat de proteïna sencera que quedava a cada temps respecte al temps inicial.

### **7 Anàlisi de l'activitat transcripcional: assaig del gen reporter.**

Com a gen reporter s'ha fet servir el plàsmid NF3, sensible a l'activació per NF- $\kappa$ B ja que conté el gen de la luciferasa sota el control de tres seqüències consens d'aquest factor de transcripció. Com a control intern, s'ha utilitzat el plàsmid pTK-renilla que conté el gen de la renilla sota el control d'un promotor constitutiu, el de la Timidina quinasa (Taula 10)

Es van sembrar 10.000 cèl·lules en cada pou d'una placa de microtitració. Es van deixar créixer durant 24 hores i es van transfectar, seguint el procés indicat pel fabricant, amb 50 ng de plàsmid reporter NF3, 2 ng de pTK-renilla i, si s'escau, la quantitat indicada d'una altra proteïna.

Després de 24-48 hores d'expressió, es van lisar les cèl·lules segons les instruccions del *kit* "Dual-Luciferase Reporter Assay System" (Promega) i es va llegir el senyal amb un luminòmetre FB-12 (Berthold Detection Systems) connectat a un PC que digitalitzava les dades. El senyal de la luciferasa va ser

relativitzat al de la renilla i els valors es van analitzar i tractar per obtenir les gràfiques mostrades. El valor és la mitjana dels triplicats de tres experiments independents i les barres d'error Y indiquen la desviació estàndard.

**Taula 10: Plàsmids que s'han fet servir pels assaigs de gen reporter**

Construcció	Gen reporter	Origen
NF3	Luciferasa sota el control de tres seqüències consens per NF- $\kappa$ B.	Cedit pel Dr. M. Fresno (Univ. Autònoma de Madrid)
pTK-Renilla	Renilla sota el control del promotor de la Timidina quinasa.	Cedit pel Dr. A. García de Herreros (PRBB)

## 8 Tractaments

### 8.1 TNF- $\alpha$ .

Pels assaigs de gen reporter, a les cèl·lules co-transfectades amb el plàsmid reporter, la renilla i el siRNA 24 hores abans, se les va privar de sèrum durant 16 hores. El medi que es va fer servir per la deprivació és Optimem (Gibco) per mantenir l'adherència i creixement de les cèl·lules IEC-18. Es va afegir el Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Sigma) a una concentració final de 20 ng/ml diluït en Optimem. En la condició control es va afegir Optimem sol. Després de 6 hores de tractament a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> es va continuar el procediment de la mateixa manera que en un assaig d'activitat transcripcional convencional.

Per la detecció per immunofluorescència de p65 es van tractar les cèl·lules sembrades sobre cobreobjectes amb TNF- $\alpha$  a 20 ng/ml durant 10 minuts en el medi convencional de creixement, DMEM 10% FCS, a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>, procedint a la fixació amb Paraformaldehid (Pfa) al 4% ràpidament.

### 8.2 Leptomicina B.

Per visualitzar amb més claredat la localització de p65 en els nuclis es va decidir tractar les cèl·lules amb dosis molt baixes de LeptomicinaB (LMB)

(Sigma) (1ng/ml) durant un temps curt (1h). Aquesta droga inhibeix l'export nuclear dependent de CRM-1. Amb aquest tractament vam aconseguir que les cèl·lules control no assolissin un nivell de p65 nuclear elevat i poguéssim diferenciar-les de les transfectades amb el siRNA d'E-cadherina.

### **9 Detecció per immunofluorescència de proteïnes.**

Es sembren les cèl·lules (entre 30 i 50.000) sobre cobreobjectes esterilitzats en una placa de 24 pous. S'ha d'esperar almenys 48 hores per continuar ja que sobre el cobreobjectes les cèl·lules triguen més temps a adherir-se.

En el cas que s'hagin de transfectar es farà segons el protocol del fabricant amb 0.3-2 µg de DNA plasmídic. Després de 24-48 hores d'expressió es pot procedir a la fixació.

Per reduir el senyal citoplasmàtic de p65 i remarcar l'associat a la membrana, rentem les cèl·lules en aquest moment amb PBS + 0,025% NP-40 per solubilitzar la membrana plasmàtica i no la nuclear. Amb dos rentats posteriors amb PBS enretirem part de les proteïnes solubles del citosol. Seguidament es fixen. Per fixar fem servir 4% Pfa, 20 minuts a temperatura ambient. Després es permeabilitzen amb 1% SDS 10 minuts. És molt important enretirar bé el SDS ja que pot interferir amb la unió posterior de l'anticòs. Per això fem entre 5 i 6 rentats exhaustius amb PBS.

Es bloquegen les mostres amb 3% BSA en PBS durant 1 hora a temperatura ambient. Mentre es bloquegen els cobreobjectes, preparem les dilucions dels anticossos primaris en solució de bloqueig (1/200 anti p65, Sta.Cruz; 1/40 anti E-cadherina, BD Transduction Labs). La incubació amb primari es fa sobre gota, així que tombem els cobreobjectes sobre una gota de 20 µl de solució de primari i deixem incubar tota la nit a 4°C en una cambra humida.

Per fer la incubació amb el anticòs secundari, s'han de rentar primer els cobreobjectes amb PBS 4-5 vegades. Els rentats es fan dins els pous de les plaques on han crescut les cèl·lules. Un cop rentats es tornen a posar sobre gotes de solució dels anticossos secundaris a una dilució final de 1/400 en solució de bloqueig. Els anticossos que hem fet servir són contra conill conjugat

amb fluorocrom Alexa 555 (vermell) i contra ratolí conjugat amb Alexa 488 (verd) (Molecular Probes, Invitrogen). Després d'una hora d'incubació a temperatura ambient protegint de la llum les mostres, es fan 4 rentats amb PBS i s'incuben sobre una gota de 20  $\mu$ l de DAPI per tenyir la cromatina. Es renten els cobreobjectes 3 vegades amb PBS i es munten sobre portaobjectes amb 7  $\mu$ l de Mowiol. Un cop assecats es guarden a 4°C protegits de la llum.

Un cop acabada la preparació, la detecció de la fluorescència es va fer al microscopi confocal Leica TCS SP2 AOBS.

## 10 Reactius i solucions.

**Agarosa:** Type I-A; Low EEO (Sigma), típicament 1% (p/v) en TAE

**Bromur d'etidi:** 10 mg/ml en TAE (Sigma)

**Coomassie blue:**

Solució tenyidora: 40 % Metanol (v/v), 10% Àcido acètic (v/v), 0.1 % (p/v) Brilliant Blue R (Sigma) en H<sub>2</sub>O

Solució destenyidora: 40 % Metanol (v/v), 10% Àcido acètic (v/v), en H<sub>2</sub>O

**Glutathiona reduïda** (*Glutathion Elution Buffer*): 50 mM Tris pH 8.5, 20 mM glutathiona reduïda

**IPTG:** 100 mM en H<sub>2</sub>O (Sigma)

**LB:** 10 g/l triptona, 5 g/l extracte de llevat, 5 g/l NaCl, pH 7. Quan es vol medi sòlid afegir agar bacterològic 1.5% (p/v).

Quan calgui medi selectiu afegir Ampicil·lina (150  $\mu$ g/ml) del *stock* 1000X en H<sub>2</sub>O i Cloramfenicol (50  $\mu$ g/ml) de *stock* 1000X en etanol.

**PBS:** 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3

**Ponceau:** 0.5 % (p/v) Ponceau S (Sigma), 1 % àcid acètic en H<sub>2</sub>O

**STE:** 10mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

**SOB:** 2 % (w/v) triptona, 0.5 % (w/v) extracte de llevat, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>

**t10:** 25 mM Tris pH 7.6, 10 mM NaCl, 1 mM EGTA

**TAE:** 50 mM Tris pH 8.5, 1 mM acetat, 2 mM EDTA

**Tampón d'assaig de tripsinolisi 5X:** 0.45 M Tris-HCl pH 8.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT

**Tampó de càrrega d'electroforesi de DNA 5X:** 0.25 % Blau de Bromofenol (p/v), 40 % glicerol en H<sub>2</sub>O

**Tampó de càrrega d'electroforesi de proteïnes (Laemmli) 5X:** 20 % glicerol (v/v), 10 % SDS (v/v), 500 mM Tris pH 6.8, 0.32 % (v/v) β-mercaptoetanol, 20 mg Blau de Bromofenol

**Tampó de diàlisi:** 25 mM Tris pH 7.8, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT

**Tampó d'electroforesi:** 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glicina, 0.1 % SDS (p/v)

**Tampó d'interacció de proteïnes (de *Binding*):** 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1mM DDT, 150 mM NaCl, 0.1 % (p/v) Tritón X-100

**Tampons de lisi:** afegint al t10 els productes detallats a contiuació. Tots contenen inhibidors de proteases i fosfatases (0.2 mM Na<sub>3</sub>VaO<sub>4</sub>, 10 mM NaF, 10 mg/ml aprotinina, 10 mg/ml leupeptina, 1 mM PMSF)

**RIPA:** 200 mM NaCl, 1 % (v/v) Nonidet P-40, 0.1% SDS (v/v), 0.5% deoxicolat sòdic (v/v)

**Fracció soluble:** 200 mM NaCl

**Tampó de *Stripping*:** 2 % (p/v) SDS, 62.5 mM Tris pH 6.8, 100 mM β-mercaptoetanol

**Tampó de transferència:** 20 mM Tris pH 8, 150 mM glicina, 20 % Metanol (v/v)



**TB:** 10 mM Pipes, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, pH 6.7-7  
antes de añadir el MgCl<sub>2</sub>

**TBS:** 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 136 mM NaCl, 4 mM KCl

**TBS-T:** TBS + 0.2 % (p/v) Tritón X-100



## **BIBLIOGRAFIA**



## BIBLIOGRAFIA

---

1. Gates J, Peifer M: **Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions.** *Cell* 2005, **123**:769-772.
2. Etienne-Manneville S, Hall A: **Rho GTPases in cell biology.** *Nature* 2002, **420**:629-635.
3. McNeill H, Ozawa M, Kemler R, Nelson WJ: **Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity.** *Cell* 1990, **62**:309-316.
4. Huber O, Bierkamp C, Kemler R: **Cadherins and catenins in development.** *Curr Opin Cell Biol* 1996, **8**:685-691.
5. Jou TS, Stewart DB, Stappert J, Nelson WJ, Marris JA: **Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:5067-5071.
6. Stappert J, Kemler R: **A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated.** *Cell Adhes Commun* 1994, **2**:319-327.
7. Huber AH, Weis WI: **The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin.** *Cell* 2001, **105**:391-402.
8. Lickert H, Bauer A, Kemler R, Stappert J: **Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion.** *J Biol Chem* 2000, **275**:5090-5095.

9. Huber AH, Stewart DB, Laurents DV, Nelson WJ, Weis WI: **The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover.** *J Biol Chem* 2001, **276**:12301-12309.
10. Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z: **Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes.** *Mol Cell Biol* 1994, **14**:8333-8342.
11. Reynolds AB, Daniel JM, Mo YY, Wu J, Zhang Z: **The novel catenin p120cas binds classical cadherins and induces an unusual morphological phenotype in NIH3T3 fibroblasts.** *Exp Cell Res* 1996, **225**:328-337.
12. Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM: **The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn.** *J Cell Biol* 1998, **141**:779-789.
13. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G: **A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma.** *Nature* 1998, **392**:190-193.
14. Thiery JP: **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:442-454.
15. Berx G, Becker KF, Hofler H, van Roy F: **Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene.** *Hum Mutat* 1998, **12**:226-237.

16. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A: **The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:84-89.
17. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA: **The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:76-83.
18. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A: **The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors.** *J Cell Sci* 2003, **116**:499-511.
19. Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F: **The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion.** *Mol Cell* 2001, **7**:1267-1278.
20. Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG: **Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression.** *J Biol Chem* 2000, **275**:2727-2732.
21. Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM: **E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner.** *J Cell Biol* 2001, **153**:1049-1060.

22. Kemler R: **From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion.** *Trends Genet* 1993, **9**:317-321.
23. Huber AH, Nelson WJ, Weis WI: **Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin.** *Cell* 1997, **90**:871-882.
24. Xing Y, Clements WK, Le Trong I, Hinds TR, Stenkamp R, Kimelman D, Xu W: **Crystal structure of a beta-catenin/APC complex reveals a critical role for APC phosphorylation in APC function.** *Mol Cell* 2004, **15**:523-533.
25. Graham TA, Ferkey DM, Mao F, Kimelman D, Xu W: **Tcf4 can specifically recognize beta-catenin using alternative conformations.** *Nat Struct Biol* 2001, **8**:1048-1052.
26. Pokutta S, Weis WI: **Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin.** *Mol Cell* 2000, **5**:533-543.
27. Castano J, Raurell I, Piedra JA, Miravet S, Dunach M, Garcia de Herreros A: **Beta-catenin N- and C-terminal tails modulate the coordinated binding of adherens junction proteins to beta-catenin.** *J Biol Chem* 2002, **277**:31541-31550.
28. Piedra J, Martinez D, Castano J, Miravet S, Dunach M, de Herreros AG: **Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation.** *J Biol Chem* 2001, **276**:20436-20443.
29. Castagnola E, Caviglia I, Pistorio A, Fioredda F, Micalizzi C, Viscoli C, Haupt R: **Bloodstream infections and invasive mycoses in children**



- undergoing acute leukaemia treatment: a 13-year experience at a single Italian institution.** *Eur J Cancer* 2005, **41**:1439-1445.
30. Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M: **Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation.** *J Biol Chem* 1999, **274**:36734-36740.
31. Piedra J, Miravet S, Castano J, Palmer HG, Heisterkamp N, Garcia de Herreros A, Dunach M: **p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:2287-2297.
32. Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W: **Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions.** *Genes Dev* 2004, **18**:2225-2230.
33. Sampietro J, Dahlberg CL, Cho US, Hinds TR, Kimelman D, Xu W: **Crystal structure of a beta-catenin/BCL9/Tcf4 complex.** *Mol Cell* 2006, **24**:293-300.
34. Bek S, Kemler R: **Protein kinase CKII regulates the interaction of beta-catenin with alpha-catenin and its protein stability.** *J Cell Sci* 2002, **115**:4743-4753.
35. Bonvini P, An WG, Rosolen A, Nguyen P, Trepel J, Garcia de Herreros A, Dunach M, Neckers LM: **Geldanamycin abrogates ErbB2 association with proteasome-resistant beta-catenin in melanoma cells, increases beta-catenin-E-cadherin association, and decreases beta-catenin-sensitive transcription.** *Cancer Res* 2001, **61**:1671-1677.

36. Cadigan KM, Nusse R: **Wnt signaling: a common theme in animal development.** *Genes Dev* 1997, **11**:3286-3305.
37. Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, Erdmann B, Birchmeier C, Birchmeier W: **Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice.** *J Cell Biol* 2000, **148**:567-578.
38. Bienz M, Clevers H: **Linking colorectal cancer to Wnt signaling.** *Cell* 2000, **103**:311-320.
39. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X: **Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism.** *Cell* 2002, **108**:837-847.
40. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R: **beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway.** *Embo J* 1997, **16**:3797-3804.
41. Willert K, Jones KA: **Wnt signaling: is the party in the nucleus?** *Genes Dev* 2006, **20**:1394-1404.
42. Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, 3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D: **Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway.** *Mol Cell* 2001, **7**:801-809.
43. Tolwinski NS, Wehrli M, Rives A, Erdeniz N, DiNardo S, Wieschaus E: **Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3beta activity.** *Dev Cell* 2003, **4**:407-418.

44. Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X: **A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation.** *Nature* 2005, **438**:873-877.
45. Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stannek P, Glinka A, Niehrs C: **Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction.** *Nature* 2005, **438**:867-872.
46. Gordon MD, Nusse R: **Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors.** *J Biol Chem* 2006, **281**:22429-22433.
47. Nusse R: **Cell biology: relays at the membrane.** *Nature* 2005, **438**:747-749.
48. Fagotto F, Gluck U, Gumbiner BM: **Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin.** *Curr Biol* 1998, **8**:181-190.
49. Townsley FM, Cliffe A, Bienz M: **Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:626-633.
50. Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H: **XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos.** *Cell* 1996, **86**:391-399.
51. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W: **Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1.** *Nature* 1996, **382**:638-642.

52. Daniels DL, Weis WI: **Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation.** *Nat Struct Mol Biol* 2005, **12**:364-371.
53. Tetsu O, McCormick F: **Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells.** *Nature* 1999, **398**:422-426.
54. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A: **The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:5522-5527.
55. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: **Identification of c-MYC as a target of the APC pathway.** *Science* 1998, **281**:1509-1512.
56. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T: **beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer.** *Am J Pathol* 1999, **155**:1033-1038.
57. Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C: **Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:1603-1608.
58. Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H: **Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB.** *Cell* 2002, **111**:251-263.

59. Gottardi CJ, Gumbiner BM: **Role for ICAT in beta-catenin-dependent nuclear signaling and cadherin functions.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, **286**:C747-756.
60. Kinzler KW, Vogelstein B: **Lessons from hereditary colorectal cancer.** *Cell* 1996, **87**:159-170.
61. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis AP, et al: **The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells.** *Cell* 2002, **111**:241-250.
62. Zorn AM, Barish GD, Williams BO, Lavender P, Klymkowsky MW, Varmus HE: **Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin.** *Mol Cell* 1999, **4**:487-498.
63. Billin AN, Thirlwell H, Ayer DE: **Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:6882-6890.
64. Hecht A, Litterst CM, Huber O, Kemler R: **Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro.** *J Biol Chem* 1999, **274**:18017-18025.
65. Takemaru KI, Moon RT: **The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression.** *J Cell Biol* 2000, **149**:249-254.

66. Barker N, Hurlstone A, Musisi H, Miles A, Bienz M, Clevers H: **The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation.** *Embo J* 2001, **20**:4935-4943.
67. Peifer M, McCrea PD, Green KJ, Wieschaus E, Gumbiner BM: **The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties.** *J Cell Biol* 1992, **118**:681-691.
68. Fouquet B, Zimbelmann R, Franke WW: **Identification of plakoglobin in oocytes and early embryos of Xenopus laevis: maternal expression of a gene encoding a junctional plaque protein.** *Differentiation* 1992, **51**:187-194.
69. Knudsen KA, Wheelock MJ: **Plakoglobin, or an 83-kD homologue distinct from beta-catenin, interacts with E-cadherin and N-cadherin.** *J Cell Biol* 1992, **118**:671-679.
70. Bierkamp C, Schwarz H, Huber O, Kemler R: **Desmosomal localization of beta-catenin in the skin of plakoglobin null-mutant mice.** *Development* 1999, **126**:371-381.
71. Simcha I, Shtutman M, Salomon D, Zhurinsky J, Sadot E, Geiger B, Ben-Ze'ev A: **Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin.** *J Cell Biol* 1998, **141**:1433-1448.
72. Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A: **Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:4238-4252.

73. Bierkamp C, McLaughlin KJ, Schwarz H, Huber O, Kemler R: **Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin.** *Dev Biol* 1996, **180**:780-785.
74. Ruiz P, Brinkmann V, Ledermann B, Behrend M, Grund C, Thalhammer C, Vogel F, Birchmeier C, Gunthert U, Franke WW, Birchmeier W: **Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart.** *J Cell Biol* 1996, **135**:215-225.
75. Miravet S, Piedra J, Miro F, Itarte E, Garcia de Herreros A, Dunach M: **The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin.** *J Biol Chem* 2002, **277**:1884-1891.
76. Aberle H, Bierkamp C, Torchard D, Serova O, Wagner T, Natt E, Wirsching J, Heidkamper C, Montagna M, Lynch HT, et al.: **The human plakoglobin gene localizes on chromosome 17q21 and is subjected to loss of heterozygosity in breast and ovarian cancers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:6384-6388.
77. Sommers CL, Gelmann EP, Kemler R, Cowin P, Byers SW: **Alterations in beta-catenin phosphorylation and plakoglobin expression in human breast cancer cells.** *Cancer Res* 1994, **54**:3544-3552.
78. Simcha I, Geiger B, Yehuda-Levenberg S, Salomon D, Ben-Ze'ev A: **Suppression of tumorigenicity by plakoglobin: an augmenting effect of N-cadherin.** *J Cell Biol* 1996, **133**:199-209.
79. Karnovsky A, Klymkowsky MW: **Anterior axis duplication in *Xenopus* induced by the over-expression of the cadherin-binding protein plakoglobin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:4522-4526.

80. Sadot E, Simcha I, Iwai K, Ciechanover A, Geiger B, Ben-Ze'ev A: **Differential interaction of plakoglobin and beta-catenin with the ubiquitin-proteasome system.** *Oncogene* 2000, **19**:1992-2001.
81. Kodama S, Ikeda S, Asahara T, Kishida M, Kikuchi A: **Axin directly interacts with plakoglobin and regulates its stability.** *J Biol Chem* 1999, **274**:27682-27688.
82. Miller JR, Moon RT: **Analysis of the signaling activities of localization mutants of beta-catenin during axis specification in Xenopus.** *J Cell Biol* 1997, **139**:229-243.
83. Raurell I, Castano J, Franci C, Garcia de Herreros A, Dunach M: **Presenilin-1 interacts with plakoglobin and enhances plakoglobin-Tcf-4 association. Implications for the regulation of beta-catenin/Tcf-4-dependent transcription.** *J Biol Chem* 2006, **281**:1401-1411.
84. Miravet S, Piedra J, Castano J, Raurell I, Franci C, Dunach M, Garcia de Herreros A: **Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:7391-7402.
85. Abe K, Takeichi M: **EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:13-19.
86. Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ: **Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex.** *Cell* 2005, **123**:889-901.



87. Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI: **Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly.** *Cell* 2005, **123**:903-915.
88. Weis WI, Nelson WJ: **Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum.** *J Biol Chem* 2006, **281**:35593-35597.
89. Pokutta S, Weis WI: **Structure and Mechanism of Cadherins and Catenins in Cell-Cell Contacts.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007.
90. Koslov ER, Maupin P, Pradhan D, Morrow JS, Rimm DL: **Alpha-catenin can form asymmetric homodimeric complexes and/or heterodimeric complexes with beta-catenin.** *J Biol Chem* 1997, **272**:27301-27306.
91. Magie CR, Pinto-Santini D, Parkhurst SM: **Rho1 interacts with p120ctn and alpha-catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in Drosophila.** *Development* 2002, **129**:3771-3782.
92. Giannini AL, Vivanco M, Kypta RM: **alpha-catenin inhibits beta-catenin signaling by preventing formation of a beta-catenin\*T-cell factor\*DNA complex.** *J Biol Chem* 2000, **275**:21883-21888.
93. Torres M, Stoykova A, Huber O, Chowdhury K, Bonaldo P, Mansouri A, Butz S, Kemler R, Gruss P: **An alpha-E-catenin gene trap mutation defines its function in preimplantation development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:901-906.
94. Vasioukhin V, Bauer C, Degenstein L, Wise B, Fuchs E: **Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of alpha-catenin in skin.** *Cell* 2001, **104**:605-617.

95. Kobiela A, Fuchs E: **Links between alpha-catenin, NF-kappaB, and squamous cell carcinoma in skin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:2322-2327.
96. Reynolds AB, Roesel DJ, Kanner SB, Parsons JT: **Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene.** *Mol Cell Biol* 1989, **9**:629-638.
97. Downing JR, Reynolds AB: **PDGF, CSF-1, and EGF induce tyrosine phosphorylation of p120, a pp60src transformation-associated substrate.** *Oncogene* 1991, **6**:607-613.
98. Reynolds AB, Herbert L, Cleveland JL, Berg ST, Gaut JR: **p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo.** *Oncogene* 1992, **7**:2439-2445.
99. Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M, et al.: **Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes.** *J Cell Biol* 1995, **128**:949-957.
100. Reynolds AB: **p120-catenin: Past and present.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1773**:2-7.
101. Kinch MS, Clark GJ, Der CJ, Burridge K: **Tyrosine phosphorylation regulates the adhesions of ras-transformed breast epithelia.** *J Cell Biol* 1995, **130**:461-471.

102. Keirsebilck A, Bonne S, Staes K, van Hengel J, Nollet F, Reynolds A, van Roy F: **Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms.** *Genomics* 1998, **50**:129-146.
103. Mo YY, Reynolds AB: **Identification of murine p120 isoforms and heterogeneous expression of p120cas isoforms in human tumor cell lines.** *Cancer Res* 1996, **56**:2633-2640.
104. Aho S, Levansuo L, Montonen O, Kari C, Rodeck U, Uitto J: **Specific sequences in p120ctn determine subcellular distribution of its multiple isoforms involved in cellular adhesion of normal and malignant epithelial cells.** *J Cell Sci* 2002, **115**:1391-1402.
105. Xiao K, Oas RG, Chiasson CM, Kowalczyk AP: **Role of p120-catenin in cadherin trafficking.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1773**:8-16.
106. Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, Ireton RC, Wheelock MJ, Johnson KR, Hummingbird DK, Reynolds AB: **Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion.** *J Cell Biol* 2000, **148**:189-202.
107. Calautti E, Cabodi S, Stein PL, Hatzfeld M, Kedersha N, Paolo Dotto G: **Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion.** *J Cell Biol* 1998, **141**:1449-1465.
108. Castano J, Solanas G, Casagolda D, Raurell I, Villagrasa P, Bustelo XR, Garcia de Herreros A, Dunach M: **Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**:1745-1757.

109. Xu G, Craig AW, Greer P, Miller M, Anastasiadis PZ, Lilien J, Balsamo J: **Continuous association of cadherin with beta-catenin requires the non-receptor tyrosine-kinase Fer.** *J Cell Sci* 2004, **117**:3207-3219.
110. Anastasiadis PZ, Moon SY, Thoreson MA, Mariner DJ, Crawford HC, Zheng Y, Reynolds AB: **Inhibition of RhoA by p120 catenin.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:637-644.
111. Noren NK, Liu BP, Burrige K, Kreft B: **p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases.** *J Cell Biol* 2000, **150**:567-580.
112. Grosheva I, Shtutman M, Elbaum M, Bershadsky AD: **p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion.** *J Cell Sci* 2001, **114**:695-707.
113. Anastasiadis PZ, Reynolds AB: **Regulation of Rho GTPases by p120-catenin.** *Curr Opin Cell Biol* 2001, **13**:604-610.
114. Gavard J, Marthiens V, Monnet C, Lambert M, Mege RM: **N-cadherin activation substitutes for the cell contact control in cell cycle arrest and myogenic differentiation: involvement of p120 and beta-catenin.** *J Biol Chem* 2004, **279**:36795-36802.
115. Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG: **Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior.** *J Cell Biol* 1999, **147**:1009-1022.

116. Braga VM, Machesky LM, Hall A, Hotchin NA: **The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts.** *J Cell Biol* 1997, **137**:1421-1431.
117. Sarrio D, Perez-Mies B, Hardisson D, Moreno-Bueno G, Suarez A, Cano A, Martin-Perez J, Gamallo C, Palacios J: **Cytoplasmic localization of p120ctn and E-cadherin loss characterize lobular breast carcinoma from preinvasive to metastatic lesions.** *Oncogene* 2004, **23**:3272-3283.
118. Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, Rimm DL, Mercurio AM: **Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease.** *Cancer Res* 2005, **65**:10938-10945.
119. Yanagisawa M, Anastasiadis PZ: **p120 catenin is essential for mesenchymal cadherin-mediated regulation of cell motility and invasiveness.** *J Cell Biol* 2006, **174**:1087-1096.
120. Titus B, Schwartz MA, Theodorescu D: **Rho proteins in cell migration and metastasis.** *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2005, **15**:103-114.
121. Daniel JM, Reynolds AB: **The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:3614-3623.
122. Kelly KF, Spring CM, Otchere AA, Daniel JM: **NLS-dependent nuclear localization of p120ctn is necessary to relieve Kaiso-mediated transcriptional repression.** *J Cell Sci* 2004, **117**:2675-2686.

123. Roczniak-Ferguson A, Reynolds AB: **Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity.** *J Cell Sci* 2003, **116**:4201-4212.
124. Kim SW, Park JI, Spring CM, Sater AK, Ji H, Otchere AA, Daniel JM, McCrea PD: **Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:1212-1220.
125. Park JI, Kim SW, Lyons JP, Ji H, Nguyen TT, Cho K, Barton MC, Deroo T, Vleminckx K, Moon RT, McCrea PD: **Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets.** *Dev Cell* 2005, **8**:843-854.
126. Daniel JM: **Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1773**:59-68.
127. Morisato D, Anderson KV: **Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo.** *Annu Rev Genet* 1995, **29**:371-399.
128. Pahl HL: **Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors.** *Oncogene* 1999, **18**:6853-6866.
129. Mayo MW, Norris JL, Baldwin AS: **Ras regulation of NF-kappa B and apoptosis.** *Methods Enzymol* 2001, **333**:73-87.
130. Finco TS, Westwick JK, Norris JL, Beg AA, Der CJ, Baldwin AS, Jr.: **Oncogenic Ha-Ras-induced signaling activates NF-kappaB transcriptional activity, which is required for cellular transformation.** *J Biol Chem* 1997, **272**:24113-24116.

131. Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ: **The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells.** *Clin Cancer Res* 1999, **5**:119-127.
132. Norris JL, Baldwin AS, Jr.: **Oncogenic Ras enhances NF-kappaB transcriptional activity through Raf-dependent and Raf-independent mitogen-activated protein kinase signaling pathways.** *J Biol Chem* 1999, **274**:13841-13846.
133. Gilmore TD: **The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction.** *Oncogene* 1999, **18**:6842-6844.
134. Leung TH, Hoffmann A, Baltimore D: **One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers.** *Cell* 2004, **118**:453-464.
135. Chen FE, Ghosh G: **Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views.** *Oncogene* 1999, **18**:6845-6852.
136. Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G: **Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA.** *Nature* 1998, **391**:410-413.
137. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grunert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T: **NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression.** *J Clin Invest* 2004, **114**:569-581.

138. Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, Morimiya A, Badve S, Nakshatri H: **NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2.** *Oncogene* 2007, **26**:711-724.
139. Julien S, Puig I, Caretti E, Bonaventure J, Nelles L, van Roy F, Dargemont C, de Herreros AG, Bellacosa A, Larue L: **Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition.** *Oncogene* 2007.
140. Whiteside ST, Israel A: **I kappa B proteins: structure, function and regulation.** *Semin Cancer Biol* 1997, **8**:75-82.
141. Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, Dargemont C: **Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm.** *J Cell Sci* 1997, **110 ( Pt 3)**:369-378.
142. Johnson C, Van Antwerp D, Hope TJ: **An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpa.** *Embo J* 1999, **18**:6682-6693.
143. Fan CM, Maniatis T: **Generation of p50 subunit of NF-kappa B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway.** *Nature* 1991, **354**:395-398.
144. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T: **The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B.** *Cell* 1994, **78**:773-785.



145. Huxford T, Huang DB, Malek S, Ghosh G: **The crystal structure of the I kappa B alpha/NF-kappa B complex reveals mechanisms of NF-kappa B inactivation.** *Cell* 1998, **95**:759-770.
146. Phelps CB, Sengchanthalangsy LL, Huxford T, Ghosh G: **Mechanism of I kappa B alpha binding to NF-kappa B dimers.** *J Biol Chem* 2000, **275**:29840-29846.
147. Jacobs MD, Harrison SC: **Structure of an I kappa B alpha/NF-kappa B complex.** *Cell* 1998, **95**:749-758.
148. Beg AA, Ruben SM, Scheinman RI, Haskill S, Rosen CA, Baldwin AS, Jr.: **I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention.** *Genes Dev* 1992, **6**:1899-1913.
149. Ganchi PA, Sun SC, Greene WC, Ballard DW: **I kappa B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF-kappa B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF-kappa B p65 DNA binding.** *Mol Biol Cell* 1992, **3**:1339-1352.
150. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A: **IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I kappa B kinases essential for NF-kappa B activation.** *Science* 1997, **278**:860-866.
151. Connelly MA, Marcu KB: **CHUK, a new member of the helix-loop-helix and leucine zipper families of interacting proteins, contains a serine-threonine kinase catalytic domain.** *Cell Mol Biol Res* 1995, **41**:537-549.

152. Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M: **IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I kappa B kinase complex.** *Nature* 1998, **395**:297-300.
153. DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, Suyang H, Ghosh S, Karin M: **Mapping of the inducible I kappa B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**:1295-1304.
154. Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U: **Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation.** *Science* 1995, **267**:1485-1488.
155. Traenckner EB, Wilk S, Baeuerle PA: **A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B.** *Embo J* 1994, **13**:5433-5441.
156. Rodriguez MS, Wright J, Thompson J, Thomas D, Baleux F, Virelizier JL, Hay RT, Arenzana-Seisdedos F: **Identification of lysine residues required for signal-induced ubiquitination and degradation of I kappa B-alpha in vivo.** *Oncogene* 1996, **12**:2425-2435.
157. Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC: **NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway.** *Science* 1993, **259**:1912-1915.
158. Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G: **Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module.** *Oncogene* 2006, **25**:6706-6716.

159. Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, Pahl HL, Traenckner EB, Mueller-Dieckmann C, Farahifar D, Rossi B, Auberger P, Baeuerle PA, Peyron JF: **Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha.** *Cell* 1996, **86**:787-798.
160. Perkins ND: **Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway.** *Oncogene* 2006, **25**:6717-6730.
161. Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A: **Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation.** *Trends Biochem Sci* 2005, **30**:43-52.
162. Yamamoto Y, Verma UN, Prajapati S, Kwak YT, Gaynor RB: **Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression.** *Nature* 2003, **423**:655-659.
163. Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P: **The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal.** *Immunity* 1998, **8**:297-303.
164. Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, Perrem K, Liou YC, Wulf G, Rottapel R, Yamaoka S, Lu KP: **Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA.** *Mol Cell* 2003, **12**:1413-1426.
165. Schwabe RF, Sakurai H: **IKKbeta phosphorylates p65 at S468 in transactivation domain 2.** *Faseb J* 2005, **19**:1758-1760.

166. Mattioli I, Geng H, Sebald A, Hodel M, Bucher C, Kracht M, Schmitz ML: **Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon.** *J Biol Chem* 2006, **281**:6175-6183.
167. Zhong H, Voll RE, Ghosh S: **Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300.** *Mol Cell* 1998, **1**:661-671.
168. Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S: **The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1.** *Mol Cell* 2002, **9**:625-636.
169. Bohuslav J, Chen LF, Kwon H, Mu Y, Greene WC: **p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1.** *J Biol Chem* 2004, **279**:26115-26125.
170. Sasaki CY, Barberi TJ, Ghosh P, Longo DL: **Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I{kappa}B{alpha}-independent NF- $\kappa$ B pathway.** *J Biol Chem* 2005, **280**:34538-34547.
171. Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W: **IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain.** *J Biol Chem* 1999, **274**:30353-30356.
172. Buss H, Dorrie A, Schmitz ML, Hoffmann E, Resch K, Kracht M: **Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- $\kappa$ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I{kappa}B kinase (IKK)- $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\epsilon$ ,**

- TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription.** *J Biol Chem* 2004, **279**:55633-55643.
173. Wang D, Baldwin AS, Jr.: **Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529.** *J Biol Chem* 1998, **273**:29411-29416.
174. Wang D, Westerheide SD, Hanson JL, Baldwin AS, Jr.: **Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II.** *J Biol Chem* 2000, **275**:32592-32597.
175. Bird TA, Schooley K, Dower SK, Hagen H, Virca GD: **Activation of nuclear transcription factor NF-kappaB by interleukin-1 is accompanied by casein kinase II-mediated phosphorylation of the p65 subunit.** *J Biol Chem* 1997, **272**:32606-32612.
176. Duran A, Diaz-Meco MT, Moscat J: **Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation.** *Embo J* 2003, **22**:3910-3918.
177. Chen LF, Mu Y, Greene WC: **Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB.** *Embo J* 2002, **21**:6539-6548.
178. Chen LF, Williams SA, Mu Y, Nakano H, Duerr JM, Buckbinder L, Greene WC: **NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:7966-7975.

179. Campbell KJ, Perkins ND: **Reprogramming RelA**. *Cell Cycle* 2004, **3**:869-872.
180. Kiernan R, Bres V, Ng RW, Coudart MP, El Messaoudi S, Sardet C, Jin DY, Emiliani S, Benkirane M: **Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65**. *J Biol Chem* 2003, **278**:2758-2766.
181. Liang MC, Bardhan S, Pace EA, Rosman D, Beutler JA, Porco JA, Jr., Gilmore TD: **Inhibition of transcription factor NF-kappaB signaling proteins IKKbeta and p65 through specific cysteine residues by epoxyquinone A monomer: correlation with its anti-cancer cell growth activity**. *Biochem Pharmacol* 2006, **71**:634-645.
182. Park SW, Huq MD, Hu X, Wei LN: **Tyrosine nitration on p65: a novel mechanism to rapidly inactivate nuclear factor-kappaB**. *Mol Cell Proteomics* 2005, **4**:300-309.
183. Yeh PY, Yeh KH, Chuang SE, Song YC, Cheng AL: **Suppression of MEK/ERK signaling pathway enhances cisplatin-induced NF-kappaB activation by protein phosphatase 4-mediated NF-kappaB p65 Thr dephosphorylation**. *J Biol Chem* 2004, **279**:26143-26148.
184. Buss H, Dorrie A, Schmitz ML, Frank R, Livingstone M, Resch K, Kracht M: **Phosphorylation of serine 468 by GSK-3beta negatively regulates basal p65 NF-kappaB activity**. *J Biol Chem* 2004, **279**:49571-49574.
185. Rocha S, Garrett MD, Campbell KJ, Schumm K, Perkins ND: **Regulation of NF-kappaB and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor**. *Embo J* 2005, **24**:1157-1169.

186. Li Q, Withoff S, Verma IM: **Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin.** *Trends Immunol* 2005, **26**:318-325.
187. Coussens LM, Werb Z: **Inflammation and cancer.** *Nature* 2002, **420**:860-867.
188. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA: **Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation.** *Nat Med* 2001, **7**:1291-1297.
189. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW: **Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation.** *Nat Rev Immunol* 2002, **2**:787-795.
190. Smalley WE, DuBois RN: **Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** *Adv Pharmacol* 1997, **39**:1-20.
191. Karin M: **NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets.** *Mol Carcinog* 2006, **45**:355-361.
192. Karin M: **Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression.** *Nature* 2006, **441**:431-436.
193. Perkins ND, Gilmore TD: **Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB.** *Cell Death Differ* 2006, **13**:759-772.
194. Duyao MP, Buckler AJ, Sonenshein GE: **Interaction of an NF-kappa B-like factor with a site upstream of the c-myc promoter.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**:4727-4731.

195. Duyao MP, Kessler DJ, Spicer DB, Sonenshein GE: **Binding of NF-KB-like factors to regulatory sequences of the c-myc gene.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1990, **166**:211-220.
196. Batra RK, Guttridge DC, Brenner DA, Dubinett SM, Baldwin AS, Boucher RC: **IkappaBalpha gene transfer is cytotoxic to squamous-cell lung cancer cells and sensitizes them to tumor necrosis factor-alpha-mediated cell death.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999, **21**:238-245.
197. Beg AA, Baltimore D: **An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death.** *Science* 1996, **274**:782-784.
198. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM: **Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB.** *Science* 1996, **274**:787-789.
199. Barkett M, Gilmore TD: **Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors.** *Oncogene* 1999, **18**:6910-6924.
200. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M: **IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer.** *Cell* 2004, **118**:285-296.
201. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y: **NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer.** *Nature* 2004, **431**:461-466.
202. Chono E, Kurokawa T, Oda C, Kawasaki K, Yamamoto T, Ishibashi S: **Expression of rac1 protein in the crypt-villus axis of rat small**



- intestine: in reference to insulin action. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **233**:455-458.
203. Sheehy AM, Schlissel MS: **Overexpression of RelA causes G1 arrest and apoptosis in a pro-B cell line.** *J Biol Chem* 1999, **274**:8708-8716.
204. Seitz CS, Lin Q, Deng H, Khavari PA: **Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:2307-2312.
205. Rayet B, Gelinas C: **Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer.** *Oncogene* 1999, **18**:6938-6947.
206. Pianetti S, Arsura M, Romieu-Mourez R, Coffey RJ, Sonenshein GE: **Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN.** *Oncogene* 2001, **20**:1287-1299.
207. Arlt A, Schafer H: **NFkappaB-dependent chemoresistance in solid tumors.** *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002, **40**:336-347.
208. Hardwick JC, van den Brink GR, Offerhaus GJ, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP: **NF-kappaB, p38 MAPK and JNK are highly expressed and active in the stroma of human colonic adenomatous polyps.** *Oncogene* 2001, **20**:819-827.
209. Perez-Moreno M, Davis MA, Wong E, Pasolli HA, Reynolds AB, Fuchs E: **p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin.** *Cell* 2006, **124**:631-644.

210. Yin T, Getsios S, Caldelari R, Kowalczyk AP, Muller EJ, Jones JC, Green KJ: **Plakoglobin suppresses keratinocyte motility through both cell-cell adhesion-dependent and -independent mechanisms.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:5420-5425.
211. Chitaev NA, Leube RE, Troyanovsky RB, Eshkind LG, Franke WW, Troyanovsky SM: **The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: patterns of binding sites and topogenic potential.** *J Cell Biol* 1996, **133**:359-369.
212. Palka HL, Green KJ: **Roles of plakoglobin end domains in desmosome assembly.** *J Cell Sci* 1997, **110 ( Pt 19)**:2359-2371.
213. Wahl JKr, Nieset JE, Sacco-Bubulya PA, Sadler TM, Johnson KR, Wheelock MJ: **The amino- and carboxyl-terminal tails of (beta)-catenin reduce its affinity for desmoglein 2.** *J Cell Sci* 2000, **113 ( Pt 10)**:1737-1745.
214. Daniel JM, Reynolds AB: **The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**:4819-4824.
215. van Hengel J, van Roy F: **Diverse functions of p120ctn in tumors.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1773**:78-88.
216. Spring CM, Kelly KF, O'Kelly I, Graham M, Crawford HC, Daniel JM: **The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin.** *Exp Cell Res* 2005, **305**:253-265.

217. Deng J, Miller SA, Wang HY, Xia W, Wen Y, Zhou BP, Li Y, Lin SY, Hung MC: **beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer.** *Cancer Cell* 2002, **2**:323-334.
218. Agarwal A, Das K, Lerner N, Sathe S, Cicek M, Casey G, Sizemore N: **The AKT/I kappa B kinase pathway promotes angiogenic/metastatic gene expression in colorectal cancer by activating nuclear factor-kappa B and beta-catenin.** *Oncogene* 2005, **24**:1021-1031.
219. Gilmore TD: **Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel.** *Oncogene* 1999, **18**:6925-6937.
220. Huber MA, Beug H, Wirth T: **Epithelial-mesenchymal transition: NF-kappaB takes center stage.** *Cell Cycle* 2004, **3**:1477-1480.
221. Huber MA, Kraut N, Beug H: **Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression.** *Curr Opin Cell Biol* 2005, **17**:548-558.
222. Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev A: **Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK.** *J Cell Biol* 2003, **163**:847-857.
223. Christofori G, Semb H: **The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene.** *Trends Biochem Sci* 1999, **24**:73-76.
224. Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T: **Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial**

- transition, stem cells and beta-catenin.** *Cells Tissues Organs* 2005, **179**:56-65.
225. Herzig M, Savarese F, Novatchkova M, Semb H, Christofori G: **Tumor progression induced by the loss of E-cadherin independent of beta-catenin/Tcf-mediated Wnt signaling.** *Oncogene* 2007, **26**:2290-2298.
226. Easwaran V, Lee SH, Inge L, Guo L, Goldbeck C, Garrett E, Wiesmann M, Garcia PD, Fuller JH, Chan V, et al: **beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer.** *Cancer Res* 2003, **63**:3145-3153.
227. Cohen AW, Carbajal JM, Schaeffer RC, Jr.: **VEGF stimulates tyrosine phosphorylation of beta-catenin and small-pore endothelial barrier dysfunction.** *Am J Physiol* 1999, **277**:H2038-2049.
228. Chilov D, Kukk E, Taira S, Jeltsch M, Kaukonen J, Palotie A, Joukov V, Alitalo K: **Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C.** *J Biol Chem* 1997, **272**:25176-25183.
229. Sethi G, Ahn KS, Chaturvedi MM, Aggarwal BB: **Epidermal growth factor (EGF) activates nuclear factor-kappaB through IkappaBalpha kinase-independent but EGF receptor-kinase dependent tyrosine 42 phosphorylation of IkappaBalpha.** *Oncogene* 2007, **26**:7324-7332.
230. Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W, Somcio R, Bauer TW, Wu Y, Hicklin DJ, Ellis LM: **Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells.** *Cancer Res* 2006, **66**:46-51.

231. Lamberti C, Lin KM, Yamamoto Y, Verma U, Verma IM, Byers S, Gaynor RB: **Regulation of beta-catenin function by the IkkappaB kinases.** *J Biol Chem* 2001, **276**:42276-42286.
232. Albanese C, Wu K, D'Amico M, Jarrett C, Joyce D, Hughes J, Hult J, Sakamaki T, Fu M, Ben-Ze'ev A, et al: **IKKalpha regulates mitogenic signaling through transcriptional induction of cyclin D1 via Tcf.** *Mol Biol Cell* 2003, **14**:585-599.
233. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA: **Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.** *Nature* 1995, **378**:785-789.
234. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P: **Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly.** *Science* 1996, **272**:1023-1026.
235. Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P: **Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta.** *Curr Biol* 1998, **8**:573-581.
236. Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z: **Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity.** *J Biol Chem* 2007, **282**:11221-11229.
237. Bachelder RE, Yoon SO, Franci C, de Herreros AG, Mercurio AM: **Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition.** *J Cell Biol* 2005, **168**:29-33.

238. Mayo MW, Denlinger CE, Broad RM, Yeung F, Reilly ET, Shi Y, Jones DR: **Ineffectiveness of histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis involves the transcriptional activation of NF-kappa B through the Akt pathway.** *J Biol Chem* 2003, **278**:18980-18989.
239. Mayo MW, Madrid LV, Westerheide SD, Jones DR, Yuan XJ, Baldwin AS, Jr., Whang YE: **PTEN blocks tumor necrosis factor-induced NF-kappa B-dependent transcription by inhibiting the transactivation potential of the p65 subunit.** *J Biol Chem* 2002, **277**:11116-11125.
240. Sizemore N, Leung S, Stark GR: **Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:4798-4805.
241. Larue L, Bellacosa A: **Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways.** *Oncogene* 2005, **24**:7443-7454.
242. Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R: **E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation.** *J Cell Sci* 1999, **112 ( Pt 8)**:1237-1245.
243. Kuphal S, Bosserhoff AK: **Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma.** *Oncogene* 2006, **25**:248-259.
244. Kuphal S, Poser I, Jobin C, Hellerbrand C, Bosserhoff AK: **Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma.** *Oncogene* 2004, **23**:8509-8519.

245. Tinkle CL, Lechler T, Pasolli HA, Fuchs E: **Conditional targeting of E-cadherin in skin: insights into hyperproliferative and degenerative responses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:552-557.
246. Fukata M, Kaibuchi K: **Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**:887-897.
247. Fukata M, Kuroda S, Nakagawa M, Kawajiri A, Itoh N, Shoji I, Matsuura Y, Yonehara S, Fujisawa H, Kikuchi A, Kaibuchi K: **Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin.** *J Biol Chem* 1999, **274**:26044-26050.
248. Fukata M, Nakagawa M, Itoh N, Kawajiri A, Yamaga M, Kuroda S, Kaibuchi K: **Involvement of IQGAP1, an effector of Rac1 and Cdc42 GTPases, in cell-cell dissociation during cell scattering.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**:2165-2183.
249. Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC: **Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins.** *Genes Dev* 1997, **11**:463-475.
250. Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Sauzeau V, Bourreille A, Hilaret G, Cario-Toumaniantz C, Pacaud P, Galmiche JP, Loirand G: **Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis.** *Gastroenterology* 2003, **124**:1180-1187.
251. Perrais M, Chen X, Perez-Moreno M, Gumbiner BM: **E-cadherin homophilic ligation inhibits cell growth and epidermal growth factor receptor signaling independently of other cell interactions.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**:2013-2025.

252. Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS, Jr.: **NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:5785-5799.
253. de Martin R, Vanhove B, Cheng Q, Hofer E, Csizmadia V, Winkler H, Bach FH: **Cytokine-inducible expression in endothelial cells of an I kappa B alpha-like gene is regulated by NF kappa B.** *Embo J* 1993, **12**:2773-2779.
254. Takahashi K, Suzuki K, Tsukatani Y: **Induction of tyrosine phosphorylation and association of beta-catenin with EGF receptor upon tryptic digestion of quiescent cells at confluence.** *Oncogene* 1997, **15**:71-78.
255. Inoue H, Nojima H, Okayama H: **High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids.** *Gene* 1990, **96**:23-28.
256. Solanas G, Miravet S, Casagolda D, Castano J, Raurell I, Corrienero A, de Herreros AG, Dunach M: **beta-Catenin and plakoglobin N- and C-tails determine ligand specificity.** *J Biol Chem* 2004, **279**:49849-49856.



**ANEXOS**



## Abreviatures

<b>aà</b>	aminoàcid
<b>ATP</b>	adenosintrifosfat
<b>BSA</b>	albúmina de sèrum boví
<b>CBD</b>	Domini d'unió a catenines
<b>CBP</b>	CREB binding protein
<b>CIP</b>	fosfatasa intestinal de vedella
<b>cyto-Ecad</b>	domini citosòlic de l'E-cadherina
<b>DMSO</b>	dimetilsulfòxid
<b>DNA</b>	àcid desoxiribonuclèic
<b>DTT</b>	ditiotreitòl
<b>EC</b>	Domini extracel·lular
<b>EDTA</b>	etilendiaminotetraacetat de sodi
<b>GAP</b>	GTPase activating proteins
<b>GDI</b>	Rho GDP dissociation inhibitors
<b>GDP</b>	Guanosina di-fosfat
<b>GEF</b>	GDP/GTP exchange factors
<b>GFP</b>	proteïna verda fluorescent
<b>GST</b>	Glutathion-S-transferasa
<b>GTP</b>	Guanosina tri-fosfat
<b>IPTG</b>	$\beta$ -D-isopropil-tiogalactopiranòsid
<b>JMD</b>	Domini juxtamembrana
<b>kDa</b>	kilodàlton
<b>LB</b>	medi de cultiu Luria-Bertani
<b>LEF-1</b>	<i>Lymphoid enhancer Factor-1</i>
<b>LMB</b>	Leptomomicina B
<b>mAb</b>	anticòs monoclonal
<b>NES</b>	Senyal d'export nuclear
<b>NLS</b>	Senyal de localització nuclear
<b>NP-40</b>	Nonidet P-40
<b>PAGE</b>	electroforesi en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	parell de bases
<b>PBS</b>	tampó fosfat salí
<b>PS</b>	proteasa PreScission
<b>RHD</b>	Domini d'homologia Rel
<b>SD</b>	Desviació estàndar
<b>SDS</b>	dodecilsulfat de sodi
<b>St</b>	estàndar
<b>TAD</b>	Domini de transactivació
<b>TAE</b>	tampó Tris/acetat/ EDTA
<b>TBP</b>	proteïna d'unió a caixes TATA

<b>TBS</b>	tampó Tris salí
<b>TCF-4</b>	<i>T-cell Factor-4</i>
<b>TE</b>	tampó Tris/EDTA
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
<b>TM</b>	Domini transmembrana
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil)-aminometà
<b>TX-100</b>	Tritó X-100
<b>wt</b>	estat natiu ( <i>wild type</i> )

## Agraïments

No sé per on començar a donar les gràcies a tota la gent que ha esta al meu costat aquests 4 anys i mig. Primer de tot, he d'agrair a la meva directora de tesi, la Mireia, el seu esforç i la seva dedicació. Va ser una molt bona idea seguir el consell de l'Antonio, el següent de la llista, al que he d'agrair totes les idees i les reunions inspiradores dels dijous a la tarda (ara dimecres).

Després estan els meus companys de grup, buff, els *cateninos*... quin equip! Els primers, el Julio i la Imma. Gràcies per tots els consells científics i consol quan els bindings es resistien. Qui us ho havia de dir, que això de revelar unia tant! Després va arribar el David, oh Deu meu! Com pot cabre tanta sapiència en un cervell humà! Em trobaràs a faltar, en el fons t'agrada que et martiritzi, no? I la següent a arribar va ser la Patri, inoblidables converses sobre qualsevol tema al cotxe, fent cua a la C-58. Hem compartit moltes coses, hem après moltes coses juntes i això és molt important. Ui, i la Neus, mi Marinieves!!! Amb tu va néixer l'estirp de Maris... Gràcies per la teva paciència amb les invasions territorials, amb l'aventura dels cristalls (jejeje). Més aviat, diria: què no t'he d'agrair! Després ja va venir la Montse, la meva post-doc, que ara ja té *pequeña saltamontes*... però sé que en el fons sempre seré la teva maripredoc... I la nova fornada, que aquest any hi ha *overbooking*! La Bea i la Gabri. Encara no hem passat molt temps juntes però ja n'he tingut prou per saber que ens ho passarem molt bé.

No puc deixar-me el Víctor, a l'exili, et trobem molt a faltar. Sé que estàs molt bé amb els francesos així que estic tranquil·la! El que passa és que allà els teus *xistes malos* no els entenen, bé, aquí tampoc, però ho fèiem veure per no ferir-te!

Després les nenes, l'Anna i l'Alba. Gràcies per fer la vida al laboratori més divertida. Ha estat un plaer treballar amb vosaltres!

Gràcies també a la resta de la Unitat, becaris, profes, Elòdia i secres.

Gràcies a la Maria i la Montse per la companyia en les mini-estades a l'IMIM.

Gràcies als meus amics. A la Marta i la Mònica, que després de 24 anys encara continuem sent amigues. Un dia ja us ho vaig dir, mai sabrem quant ens hem influït l'una a l'altra, però estic segura que sense les altres, no seriem el que som avui. I els de la Uni, que aquest any en fa 10 que ens coneixem: l'Anna (la millor companya de pràctiques, tens la banda que t'acredita! i la millor amiga també!), l'Ari (tu també ets la millor amiga que un pot somiar!), l'Àlex, el Gabriele i el Ramon. Nois, ens ho hem passat molt bé, i espero que, encara que comenceu aventures per separat lluny d'aquí, continuem sent amics com fins ara. Bé i els que ens quedem, ens farem companyia, no? Sort a tots, que estic segura que la tindrem!

I per últim, i més important: gràcies a la meva família. Els meus pares, que em van empènyer a continuar la meva formació, i m'han ajudat sempre en el que ha calgut. Gràcies per estimar-me tant. I clar, el Jordi, pobre, que ha hagut de fer de mur de les lamentacions més vegades de les que hagués volgut. Sort que en tinc de tu!!! No crec que hagués pogut arribar fins aquí sense tu. Ho ets tot per mi...

En definitiva gràcies per aguantar-me en els mals moments i disfrutar amb mi dels bons. Tanquem una etapa per agafar embranzida per una de nova!

*Hold on 'cause the world will turn if you are ready or not!*

## Publicacions

- Publicacions que han derivat d'aquesta tesi i que s'adjunten a continuació:

**Solanas G**, Miravet S, Casagolda D, Castaño J, Raurell I, Corrienero A, de Herreros AG, Duñach M:  **$\beta$ -Catenin and plakoglobin N- and C-tails determine ligand specificity.** *J Biol Chem* 2004, **279**:49849-49856. [256]

**Solanas G**, Porta de la Riva M, Agustí C, Casagolda D, Sánchez-Aguilera F, Larriba MJ, Pons F, Peiró S, Escrivà M, Muñoz A, Duñach M, García de Herreros A, Baulida J: **E-cadherin controls  $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B transcriptional activity in mesenchymal gene expression.** En segona revisió a *Journal of Cell Science*.

- Publicació en la que s'ha participat durant la realització d'aquesta tesi:

Castaño J, **Solanas G**, Casagolda D, Raurell I, Villagrasa P, Bustelo XR, García de Herreros A, Duñach M: **Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**:1745-1757. [108]





## $\beta$ -Catenin and Plakoglobin N- and C-tails Determine Ligand Specificity\*<sup>§</sup>

Received for publication, July 30, 2004, and in revised form, September 17, 2004  
Published, JBC Papers in Press, September 20, 2004, DOI 10.1074/jbc.M408685200

Guiomar Solanas<sup>‡§</sup>, Susana Miravet<sup>‡</sup>, David Casagolda<sup>‡¶</sup>, Julio Castaño<sup>‡¶</sup>, Imma Raurell<sup>‡¶\*</sup>,  
Ana Corrienero<sup>‡</sup>, Antonio García de Herreros<sup>‡‡</sup>, and Mireia Duñach<sup>‡§§</sup>

From the <sup>‡</sup>Unitat de Biofísica, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra and the <sup>¶</sup>Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Universitat Pompeu Fabra, E-08003 Barcelona, Spain

$\beta$ -Catenin and plakoglobin are related proteins involved in the regulation of adherens junctions and desmosomes. Moreover, by binding to Tcf-4, they can act as transcriptional modulators of genes involved in embryonic development and tumorigenesis. However, they associate to distinct Tcf-4 subdomains causing opposing effects on Tcf-4 binding to DNA: whereas  $\beta$ -catenin does not affect this binding, plakoglobin prevents it. Both proteins are composed by two N- and C-tails and a central armadillo repeat domain. Interaction of Tcf-4, as well as other desmosomal or adherens junction components, with  $\beta$ -catenin or plakoglobin takes place through the central armadillo domain. Here we show that, as reported for  $\beta$ -catenin, plakoglobin terminal tails also interact with the central domain and regulate the ability of this region to bind to different cofactors. Moreover the specificity of the interaction of  $\beta$ -catenin and plakoglobin with different subdomains in Tcf-4 or with other junctional components resides within the terminal tails and not in the armadillo domain. For instance, a chimeric protein in which the central domain of  $\beta$ -catenin was replaced by that of plakoglobin presented the same specificity as wild-type  $\beta$ -catenin. Therefore, the terminal tails of these proteins are responsible for discerning among binding of factors to the armadillo domain. These results contribute to the understanding of the molecular basis of the interactions established by these key regulators of epithelial tumorigenesis.

$\beta$ -Catenin is a multifunctional protein involved in a wide range of cell processes. Although these processes may appear to

be unrelated, they form an interdependent network of events.  $\beta$ -Catenin has a structural role at cell-cell junctions and acts as a transcription factor in a signaling pathway. In adherens junctions,  $\beta$ -catenin links the cytosolic domain of the transmembrane protein E-cadherin to  $\alpha$ -catenin, which in turn binds to the actin cytoskeleton (1–3). When released from E-cadherin and  $\alpha$ -catenin, the cytosolic pool of  $\beta$ -catenin is tightly controlled by formation of a complex that includes the product of the tumor suppressor adenomatous polyposis coli (APC)<sup>1</sup> gene, axin, and the Thr/Ser protein kinases CKI $\alpha$  and glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (4, 5). In the absence of Wnt stimulation, this complex facilitates phosphorylation of the  $\beta$ -catenin N-terminal region. Initially  $\beta$ -catenin is first phosphorylated by CKI $\alpha$  on Ser-45 and then sequentially by glycogen synthase kinase 3 $\beta$  on Thr-41 and Ser-37, Ser-33, and Ser-29. Upon phosphorylation,  $\beta$ -catenin is polyubiquitinated and degraded by the proteasome system. The activity of the complex is controlled by a signaling pathway triggered by Wnt factors that inhibit the activity of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  and stabilize cytosolic  $\beta$ -catenin (4).

$\beta$ -Catenin can also translocate to the nucleus in a process that requires binding to pygopus and legless proteins (6, 7). Nuclear  $\beta$ -catenin binds to members of the Tcf family of transcription factors and promotes activation of a number of target genes involved in embryonic development and tumorigenesis (for reviews, see Refs. 4 and 8). In this complex Tcf binds to the DNA, and  $\beta$ -catenin provides the transactivation domain. In various types of tumors  $\beta$ -catenin degradation is frequently blocked as a consequence of inactivating mutations affecting proteins of the degradation complex. As a result, aberrant activation of  $\beta$ -catenin/Tcf downstream genes is enhanced (4, 8).

$\beta$ -Catenin also interacts with factors of the basal transcription machinery, such as the TATA box-binding protein (TBP) (9) and p300/CBP (10, 11). p300/CBP may relax chromatin structure through its histone acetyltransferase activity, facilitating access of other factors to target gene promoters. However,  $\beta$ -catenin interaction with TBP and p300/CBP does not fully explain how  $\beta$ -catenin stimulates transcription of particular Tcf-regulated genes because some transactivating elements at the C terminus of  $\beta$ -catenin stimulate gene expression without binding to TBP or p300/CBP (9, 12). Therefore, to promote the activation  $\beta$ -catenin may interact with additional factors such as Brg-1 (13) or TIP49 (known as pontin52 or reptin52) (14, 15), an ATP-dependent DNA heli-

\* This work was supported in part by Ministerio de Ciencia y Tecnología Grants BMC2003-00410 and SAF2003-02324 (to M. D. and A. G. H., respectively) and by Direcció General de Recerca Grants 2001SGR00410 and 2001SGR00197. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>§</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains Supplemental Tables 1–3.

<sup>‡</sup> Recipient of a predoctoral fellowship awarded by Universitat Autònoma de Barcelona.

<sup>¶</sup> Recipient of a predoctoral fellowship awarded by Ministerio de Educación y Ciencia.

<sup>\*</sup> Recipient of a predoctoral fellowship awarded by Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad).

<sup>‡‡</sup> To whom correspondence may be addressed: Inst. Municipal d'Investigació Mèdica, c/ Dr. Aiguader 80, E-08003 Barcelona, Spain. Tel.: 34-93-221-1009; Fax: 34-93-221-3237; E-mail: [agarcia@imim.es](mailto:agarcia@imim.es).

<sup>§§</sup> To whom correspondence maybe addressed: Unitat de Biofísica, Dept. Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain. Tel.: 34-93-581-1870; Fax: 34-93-581-1907; E-mail: [mireia.dunach@uab.es](mailto:mireia.dunach@uab.es).

<sup>1</sup> The abbreviations used are: APC, adenomatous polyposis coli; Tcf-4, family of the T cell transcription factors; arm, plakoglobin or  $\beta$ -catenin armadillo domain; GST, glutathione S-transferase; mAb, monoclonal antibody; TBP, TATA box-binding protein; CBP, cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein.

case found in complexes with chromatin-remodeling and histone-modifying proteins.

Plakoglobin (also known as  $\gamma$ -catenin) is closely related to  $\beta$ -catenin and can replace  $\beta$ -catenin in adherens junctions. It is also a component of the desmosomes where it mediates the link of desmosomal cadherins desmocollin and desmoglein to desmoplakin and the intermediate filament cytoskeleton (16, 17). This role of plakoglobin is specific and cannot be exerted by  $\beta$ -catenin even though both proteins are structurally similar. Moreover plakoglobin has also been implicated in the regulation of the Wnt pathway. Kolligs *et al.* (18) observed that plakoglobin can induce transformation of RK3E cells with a higher efficiency than  $\beta$ -catenin. However, data from other laboratories, including ours, indicated that binding of plakoglobin decreases the affinity of Tcf-4 for DNA (19, 20), suggesting that the positive effect of plakoglobin on Tcf-mediated transcription can be explained by increased transport of  $\beta$ -catenin to the nucleus (21). It has been observed that  $\beta$ -catenin and plakoglobin bind to different sites on Tcf-4 (20). Moreover other data (for a review, see Ref. 21) indicate that plakoglobin overexpression is normally associated with tumor suppression contrary to what happens with  $\beta$ -catenin.

As mentioned above, the physiological roles of  $\beta$ -catenin and plakoglobin involve interactions with many factors. In some cases, these interactions are modulated by post-translational modifications. For instance, we have described that phosphorylation of  $\beta$ -catenin residues Tyr-654 and Tyr-142 specifically decreases its interaction with E-cadherin and  $\alpha$ -catenin, respectively (22, 23). Structural data support these results because these two Tyr residues are involved in E-cadherin binding (Tyr-654 by establishing an ionic pair with E-cadherin Asp-667) (24) and in the stabilization of the  $\beta$ -catenin structure implicated in  $\alpha$ -catenin binding (Tyr-142) (25). The Tyr kinases that catalyze these modifications have been identified with Fer and Fyn being responsible for  $\beta$ -catenin Tyr-142 phosphorylation (23), whereas Tyr-654 is modified by epidermal growth factor receptor or related proteins. A similar modulation has been proposed for plakoglobin action on desmosomes and adherens junctions. Tyrosine phosphorylation of plakoglobin after epidermal growth factor receptor activation has been related with loss of association with desmoplakin but not with desmoglein (26). Addition of the inhibitor of Tyr(P) phosphatases peroxyvanadate inhibits the interaction of plakoglobin with  $\alpha$ -catenin and E-cadherin, an effect that can be reverted by Tyr(P) phosphatase (27). Data from our group indicate that, although  $\beta$ -catenin and plakoglobin are closely related, the same kinases phosphorylate different residues in each. Moreover phosphorylation of equivalent residues has different effects on the interaction of plakoglobin and  $\beta$ -catenin with their cellular partners (28).

Both plakoglobin and  $\beta$ -catenin can be structurally divided into three subdomains. The central domain is composed of 12 repetitions of 42 amino acids each, named the armadillo repeat domain after the  $\beta$ -catenin ortholog in *Drosophila*, *armadillo*. This region, very similar in both proteins (with 83% identity) (29), has a basic pI, and its structure has been determined; it folds into a super helix composed of 36 small  $\alpha$ -helices (three per armadillo repeat) (30). Tyr-654 lies on the last repeat of this domain, and Tyr-142 lies at the limit of this domain and the N-terminal tail. The armadillo repeat domain is flanked by more divergent N- and C-terminal regions, mainly acidic. The similarity between  $\beta$ -catenin and plakoglobin tails is low, especially for the C-tail (57 and <15% respectively, for the N- and C-tails) (29). The structure of the entire protein with the two  $\beta$ -catenin terminal domains is still unknown. In previous re-

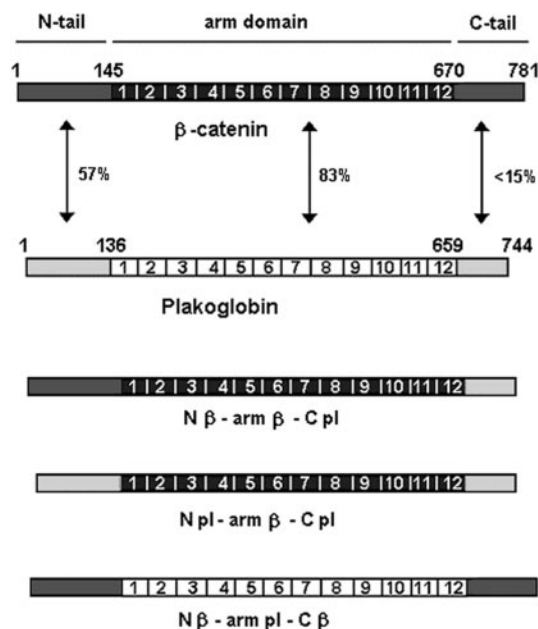


FIG. 1. Diagram of plakoglobin,  $\beta$ -catenin, and chimeras. The three different regions that form these proteins are shown together with the amino acid similarity for each domain. The chimeras used in this study are depicted; the diagram indicates which parts of the molecules they comprise.

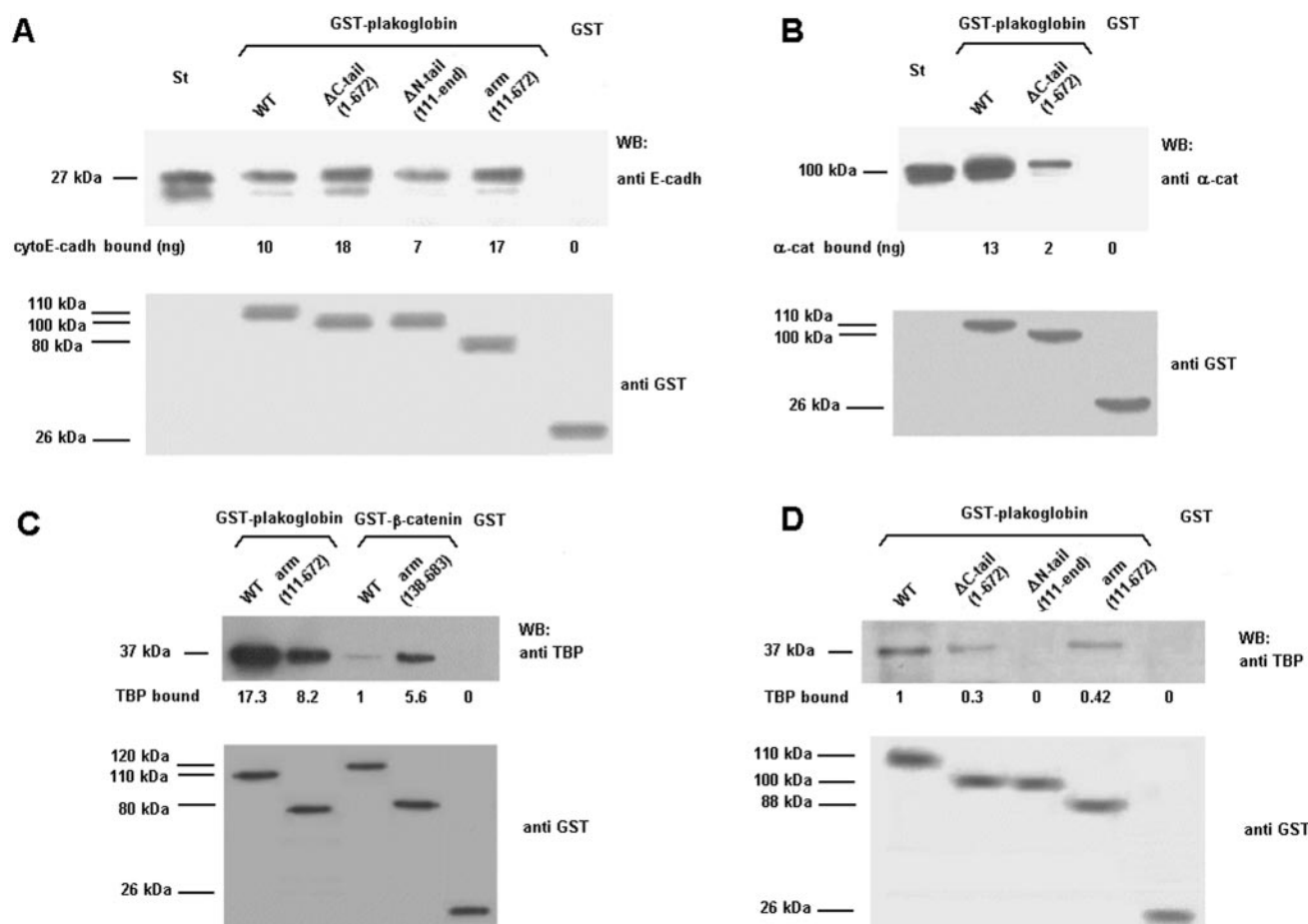
ports we have described that the  $\beta$ -catenin N- and C-tails interact with the armadillo domain and limit its ability to bind E-cadherin and other cofactors (31). Moreover binding of the two  $\beta$ -catenin tails is mutually dependent because the C-tail is necessary for the association of the N-tail to the armadillo domain. As a consequence of the interconnection of the tails, different cofactors interact coordinately with distant binding sites on the  $\beta$ -catenin molecule (32).

Here we report that the terminal tails of plakoglobin also interacted with its armadillo domain and restricted binding of interacting factors to this domain. The general organization of  $\beta$ -catenin and plakoglobin seems to be similar, although the plakoglobin C-tail bound to the armadillo domain more tightly than the  $\beta$ -catenin C-tail did. Moreover we demonstrated that the tails determine the differential specificity and affinity of each protein for different cofactors. Therefore, specificity was unaffected when the armadillo domain of  $\beta$ -catenin was replaced by that of plakoglobin, whereas it was totally altered when the tails were swapped.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Reagents**—The following monoclonal antibodies were used:  $\beta$ -catenin C terminus (the epitope recognized by this antibody has been mapped to residues 696–750), plakoglobin C terminus (epitope recognized, residues 553–745), E-cadherin,  $\alpha$ -catenin, and TATA box-binding protein (all from BD Transduction Laboratories, Lexington, KY);  $\beta$ -catenin armadillo core (epitope recognized, residues 422–685) (from Alexis Biochemicals, San Diego, CA); plakoglobin C-end (epitope recognized, residues 698–745) (from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); and Tcf-4 (clone 6H5-3, from Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Antibody against glutathione *S*-transferase (GST) was from Amersham Biosciences.

**Generation of  $\beta$ -Catenin-Plakoglobin Chimeras**—The  $\beta$ -catenin and plakoglobin chimeras used in this study are presented in Fig. 1, which indicates which part of the molecule they comprise. N $\beta$ -armpl-C $\beta$  contained the N-terminal amino acids 1–150 of  $\beta$ -catenin fused to the armadillo domain of plakoglobin (amino acids 140–698) and C-terminal amino acids 701–781 of  $\beta$ -catenin. N $\beta$ -arm $\beta$ -Cpl contained amino acids 1–701 of  $\beta$ -catenin fused to the C-terminal amino acids 698–745 of plakoglobin. Npl-arm $\beta$ -Cpl contained N-terminal amino acids 1–140 of plakoglobin fused to the armadillo domain of  $\beta$ -catenin (amino acids 150–701) and the C-terminal amino acids 698–745 of plakoglobin.



**FIG. 2. Effect of plakoglobin tails on E-cadherin,  $\alpha$ -catenin, and TBP binding.** *A*, the cytosolic domain of E-cadherin (*cytoE-cadh*) (4 pmol) was incubated with 1 pmol of either GST-plakoglobin, GST-plakoglobin deletion mutants, or GST as a control as indicated under "Experimental Procedures." Protein complexes were affinity-purified with glutathione-Sepharose and analyzed by Western blot with a mAb against E-cadherin and reblotted with an antibody against GST. The numbers below the lanes indicate the amount of bound protein; these values were calculated by comparing the results of the scanning of the corresponding lanes with a known amount of the cytosolic domain of E-cadherin, 0.5 pmol (12 ng), that was included as internal reference (*St*) in the same blot. *B*,  $\alpha$ -catenin (2 pmol) was incubated with 2 pmol of GST-plakoglobin, GST-C-terminal deleted plakoglobin ( $\Delta$ C-tail), or GST as a control. The binding assay was performed using the conditions described in *A*. The amount of associated  $\alpha$ -catenin was determined using a mAb specific for this protein. 0.1 pmol (9 ng) of  $\alpha$ -catenin was included as internal reference (*St*). *C* and *D*, 6 pmol of the different GST-plakoglobin or GST- $\beta$ -catenin fusion proteins were incubated with 200  $\mu$ g of total protein extract from SW-480 cells. Protein complexes were pelleted down with glutathione-Sepharose, and TBP bound to the complex was analyzed by Western blot with an anti-TBP mAb. The numbers below the lanes corresponded to bound TBP relative to the value obtained for wild-type  $\beta$ -catenin (*C*) or wild-type plakoglobin (*D*). The figure shows a representative experiment of three performed in each case in duplicate. The average  $\pm$  S.D. of these data is presented in Supplemental Table 1. *WT*, wild type; *WB*, Western blot; *E-cadh*, E-cadherin; *cat*, catenin.

Chimeras were obtained as follows. First KpnI restriction sites were introduced close to the end of armadillo domains both in  $\beta$ -catenin (amino acid 701) and in plakoglobin (amino acid 698) using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and oligonucleotides 5'-GACTGGACATTGGTACCACGGGAGAAG-3' (sense) and 5'-CTTCTCCCTGGGTACCAATGTCCAGTC-3' (antisense) for  $\beta$ -catenin and oligonucleotides 5'-ATGACATGGATGGTACCTACCGCCCCA-3' (sense) and 5'-TGGGGCGGTAGGTACCATCCATGTCAT-3' (antisense) for plakoglobin. After verifying that the KpnI sites had been produced, an additional AflIII site was generated at the beginning of the armadillo domain in plakoglobin (amino acid 140).  $\beta$ -Catenin has a restriction site for this enzyme in the nucleotide sequence corresponding to amino acid 150. The same procedure as that described above was followed using oligonucleotides 5'-ATGCCGAGCTGGCCACACGTGCCCTGTC-3' (sense) and 5'-GCAGGGCACGTGTGGCCAGCTCGGCAT-3' (antisense).  $N\beta$ -armpl-C $\beta$  and  $Npl$ -arm $\beta$ -Cpl chimeras were obtained by exchanging the armadillo domains, *i.e.* digesting pGEX-plakoglobin or  $\beta$ -catenin with KpnI and AflIII, purifying the fragments corresponding to each armadillo domain, and cloning them in pGEX plasmid containing the two tails obtained by digesting the inverse catenin with the same enzymes.  $N\beta$ -arm $\beta$ -Cpl chimera was produced by replacing the BamHI-KpnI fragment obtained from pGEX- $\beta$ -catenin in pGEX-plakoglobin cut with the same enzymes. All the chimeras were sequenced to verify the absence of additional mutations.

**Generation and Expression of Recombinant Proteins**—The preparation of all the plasmids encoding the different plakoglobin,  $\beta$ -catenin,

and Tcf-4 deletion mutants as GST fusion proteins has been described previously (20, 22, 32) except for the following cases: GST- $\Delta$ C-tail-plakoglobin-(1-672) and GST- $\Delta$ N-tail-plakoglobin-(111-745). The DNA fragment corresponding to amino acids 1-672 was amplified from the entire human plakoglobin cDNA by PCR using oligonucleotides corresponding to the nucleotide sequences 1-18 and 2016-1999 and containing BamHI and XhoI sites at their ends. The 1.9-kbp amplification fragment was digested with BamHI and XhoI and cloned in the same sites of pGEX-6P plasmid. GST- $\Delta$ N-tail-plakoglobin-(111-745) was prepared identically using oligonucleotides corresponding to the nucleotide sequences 331-348 and 2235-2217 and containing BamHI and EcoRV sites at their ends. The 2.1-kbp amplification fragment was digested with these enzymes and cloned in pGEX-6P3 cut with BamHI/SmaI. GST fusion proteins expressed in *Escherichia coli* were prepared and purified as described previously (22). When indicated, GST was removed by cleaving with PreScission protease (Amersham Biosciences).

**Protein Binding Assays**—*In vitro* binding assays using purified proteins were as described elsewhere (22, 31). Pull-down assays were performed using cytosolic extracts from SW-480 cells, an intestinal cell line that contains  $\beta$ -catenin and plakoglobin. Protein complexes bound to glutathione-Sepharose were analyzed by Western blot using specific mAbs against plakoglobin,  $\beta$ -catenin (see above),  $\alpha$ -catenin, E-cadherin (cytosolic domain), TBP, or GST as a control. Overlay assays were performed as described in Castaño *et al.* (32). Briefly, recombinant proteins were separated by SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Free membrane binding sites were blocked in

TTBS buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 135 mM NaCl, 0.2% Triton X-100) plus 1% bovine serum albumin. Membranes were incubated with 2–0.15 nmol/ml recombinant protein in TTBS with 0.1% bovine serum albumin for 90 min at room temperature. After extensive washing in TTBS, the nitrocellulose membranes were incubated with the corresponding specific antibody followed by a peroxidase-conjugated secondary antibody. Immunoblots were developed with peroxidase-conjugated secondary antibody followed by enhanced chemiluminescence detection (Pierce). The autoradiograms were scanned, and the values were compared with known amounts of recombinant proteins included as reference in the same gel. In pull-down assays the scanned values were referred to either wild-type  $\beta$ -catenin or plakoglobin. Duplicate samples were always introduced in the gels, and each experiment was performed at least three times. After quantitation the results did not vary more than 15%.

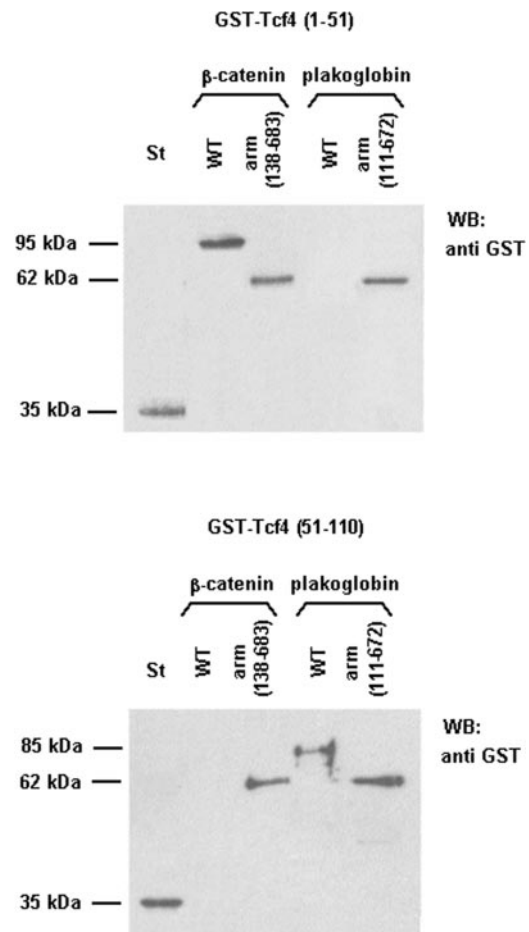
**Protease Sensitivity Assays**—5 pmol of either wild-type plakoglobin,  $\beta$ -catenin, chimeras, or the C-terminal tails was incubated in the presence of 50 ng of trypsin at 25 °C in a final volume of 100  $\mu$ l in a buffer containing 90 mM Tris-HCl, pH 8.5, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, and 4 mM dithiothreitol. Reactions were stopped at the indicated digestion times (from 0.5 to 45 min) with electrophoresis loading buffer and boiled for 4 min. The extent of the digestion was measured by SDS-PAGE and Western blot with mAbs against  $\beta$ -catenin or plakoglobin C terminus. The reaction was quantified by scanning the autoradiograms and representing the amount of full-length protein remaining at the different times of incubation relative to the initial time. The experiments, performed in duplicate, were repeated twice, and the average  $\beta$ -catenin ( $\pm$ range) remaining at different times was plotted.

## RESULTS

To study whether the plakoglobin tails are also involved in modulating the interaction of the protein with different partners as occurs for  $\beta$ -catenin (31, 32), we generated several deletion mutants. As shown in Fig. 2A, deletion of the C-tail of plakoglobin increased E-cadherin interaction with the armadillo domain (compare results for full-length and  $\Delta$ C-tail proteins (lanes 2 and 3), suggesting that the C-tail limits the ability of the armadillo domain of plakoglobin to bind to the cytosolic domain of E-cadherin. These results, as well as the rest of the results presented below, were reproducible and representative of those obtained in the several experiments performed. Thus, in this case, after quantitation the  $\Delta$ C-tail mutant showed 1.8-fold higher binding to E-cadherin than the wild-type form. Deletion of both the N- and the C-tails (resulting in the armadillo protein, lane 5) did not modify this binding. Moreover, compared with full-length plakoglobin, a mutant protein lacking only the N-tail (lane 4) presented a very slightly decreased association to the cytosolic domain of E-cadherin. Therefore, plakoglobin-C-tail restricts the interaction of E-cadherin to the armadillo repeats similarly to what we reported for  $\beta$ -catenin (although to a lower extent) (32), and the N-tail does not appear to exert a major effect on this binding.

The tails play a role also in the interaction of plakoglobin with  $\alpha$ -catenin, another component of the adherens junctions. The region of plakoglobin involved in  $\alpha$ -catenin binding has been located at the end of the N-tail and the first armadillo repeat between amino acids 109 and 137 (33). Since the integrity of this sequence was not preserved in the armadillo domain or in the  $\Delta$ N-tail mutant, these constructions did not show binding to  $\alpha$ -catenin (not shown). Deletion of the distant C-tail strongly decreased the binding of  $\alpha$ -catenin to plakoglobin (Fig. 2B). This result points to an interconnection between the two tails and indicates that the C-tail modulates the ability of  $\alpha$ -catenin to bind to the other end of the molecule.

Binding of plakoglobin to its nuclear partner TBP was also analyzed (Fig. 2, C and D). Full-length plakoglobin interacted with TBP much more strongly than with  $\beta$ -catenin (Fig. 2C). Whereas in  $\beta$ -catenin the tails appeared to hinder the interaction domain, the plakoglobin armadillo domain bound TBP to a lower extent than the full-length protein (Fig. 2C). However, with respect to the bare armadillo domain, a plakoglobin mu-

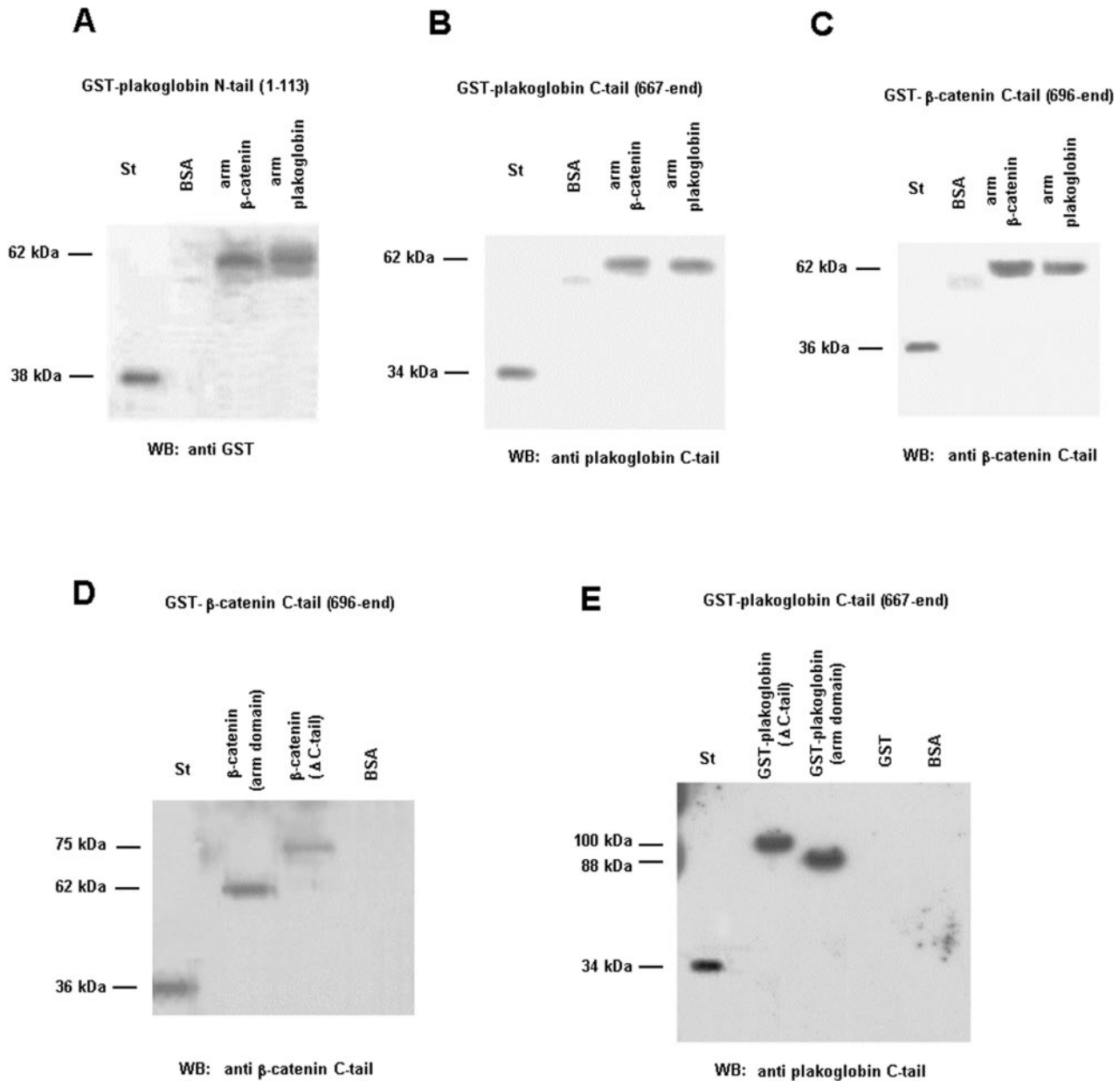


**FIG. 3.  $\beta$ -Catenin and plakoglobin N- and C-tails determine binding to different TCF-4 domains.** Recombinant full-length  $\beta$ -catenin, plakoglobin, or the corresponding armadillo domains (6 pmol) were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Binding to Tcf-4 was determined by overlay assays in which the membranes were incubated with 0.15 nmol/ml GST-Tcf-(1–51) (upper panel) or GST-Tcf-(51–110) (lower panel). Binding was analyzed by incubating with anti-GST mAb. 2.5 pmol of GST-Tcf-(1–51) (upper panel) or GST-Tcf-(51–110) (lower panel) was included as internal references (St). To verify that equal amounts of proteins were loaded, the membranes were previously stained with phenol red (not shown). WT, wild type; WB, Western blot.

tant that also contained the C-tail ( $\Delta$ N-tail mutant) presented a lower binding to TBP (Fig. 2D).

More striking results were obtained when the interaction to Tcf-4 was analyzed. The armadillo repeats of  $\beta$ -catenin and plakoglobin contain the binding domains for Tcf-4 (19, 34). As reported previously (20), only  $\beta$ -catenin, but not plakoglobin, interacts with the most amino-terminal sequence of Tcf-4 (amino acids 1–51); whereas plakoglobin binds to the Tcf-4 sequence comprised of amino acids 51–80. However, removal of the N- and C-terminal tails of both proteins completely abolished this specificity: the armadillo domains of plakoglobin and  $\beta$ -catenin bound indistinctly to both Tcf-4 sequences (Fig. 3).

All these results indicate that, as previously reported for  $\beta$ -catenin, plakoglobin tails also restrict the ability of the protein to bind other cofactors and determine its specificity. We next asked whether, as in the case of  $\beta$ -catenin, plakoglobin tails interact with the central armadillo domain. Overlay binding assays between the plakoglobin N- or the C-tails and the armadillo domain showed that both plakoglobin tails interacted with the armadillo domain of plakoglobin (Fig. 4, A and B). Furthermore they also interacted with a similar affinity with the armadillo domain of  $\beta$ -catenin. Reciprocally  $\beta$ -catenin

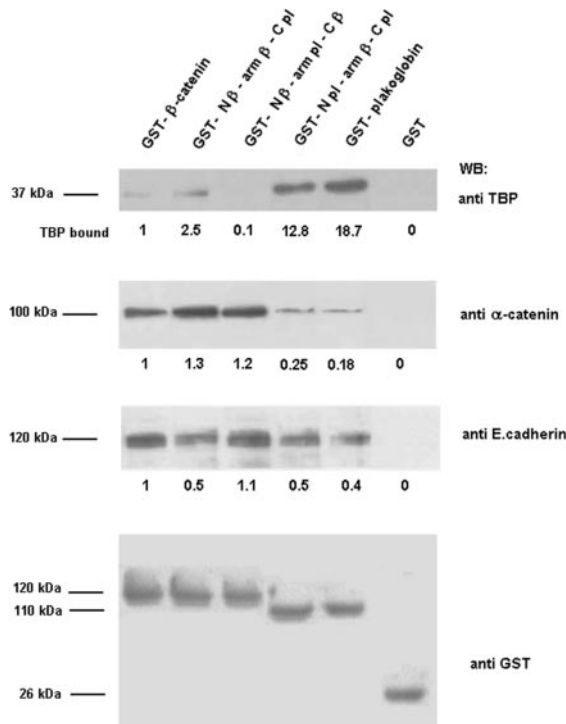


**FIG. 4. Interaction of the N- and C-terminal tails with the plakoglobin and  $\beta$ -catenin armadillo domains.** 8 pmol of the armadillo domains of  $\beta$ -catenin or plakoglobin was separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. *A*, binding of recombinant proteins was determined by overlay assays as described under "Experimental Procedures" in which blots were incubated with recombinant GST-plakoglobin-N-tail (amino acids 1–113) (0.25 nmol/ml). Binding was analyzed by incubating with a mAb against GST that tagged the overlaid N-tail domain. *B* and *C*, the same procedure was repeated, incubating the membrane with a 0.25 nmol/ml concentration of either GST-plakoglobin-C-tail (667–end) and blotted with a mAb against this plakoglobin C-tail (*B*) or GST- $\beta$ -catenin-C-tail (696–end) and blotted with a mAb against this  $\beta$ -catenin C-tail (*C*). *D* and *E*, 8 pmol of the armadillo domain of  $\beta$ -catenin and  $\beta$ -catenin- $\Delta$ C-tail (amino acids 1–683) (*D*) or of plakoglobin and plakoglobin- $\Delta$ C-tail (amino acids 1–672) (*E*) was separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The same overlay assay as described above was performed, incubating the blot with recombinant GST- $\beta$ -catenin-C-tail (*D*) or GST-plakoglobin-C-tail (*E*) (0.25 nmol/ml). Binding was analyzed with a mAb against the corresponding C-tail of each catenin. 25 ng of the corresponding terminal tails that were included as internal reference in the blots (*St*). To verify that equal amounts of proteins were loaded in the gel, membranes were stained with phenol red to detect the proteins used as baits (not shown). The figure shows a representative experiment of three performed in each case. BSA, bovine serum albumin; WB, Western blot.

C-tail bound to plakoglobin armadillo domain with a similar affinity as that to  $\beta$ -catenin armadillo domain (Fig. 4C). However, the mutual dependence on binding of the two tails to the armadillo domain was not the same in  $\beta$ -catenin and plakoglobin. As we have reported previously (32), the presence of the N-tail decreased the affinity of  $\beta$ -catenin C-tail for its armadillo domain (Fig. 4D). This effect was not observed for the binding of the plakoglobin C-tail: it interacted equally with the armadillo domain and with a form also comprising the N-terminal domain of plakoglobin ( $\Delta$ C-plakoglobin) (Fig. 4E). The same

results were obtained when binding of plakoglobin C-tail was analyzed on the heterologous proteins  $\beta$ -catenin armadillo domain and  $\Delta$ C- $\beta$ -catenin. Both proteins interacted similarly with the C-tail (data not shown). These results suggest that although plakoglobin terminal tails also interact with the armadillo domain, the interconnections established between these tails are not the same as those occurring in  $\beta$ -catenin, and this difference is caused by the different properties of both C-tails.

To further identify the role of terminal tails, chimeric pro-

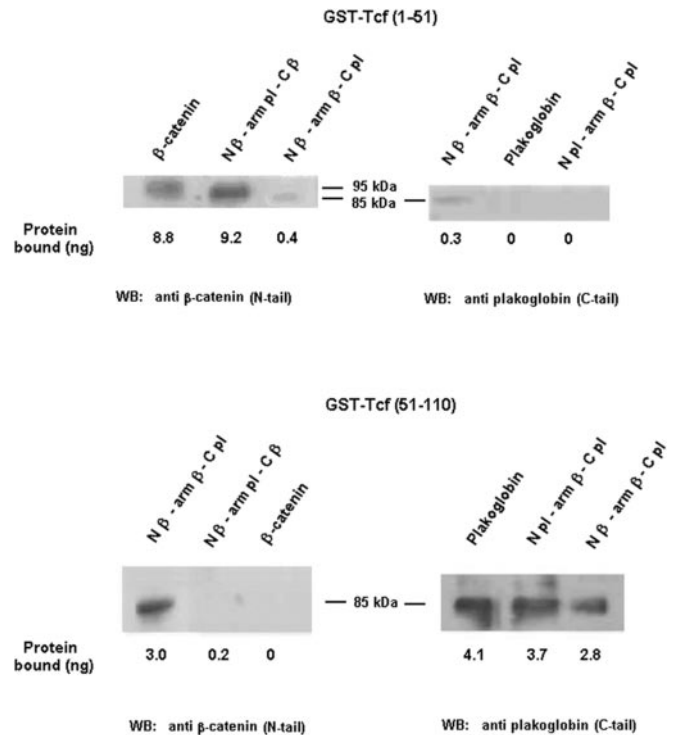


**FIG. 5. Binding of chimeras to E-cadherin,  $\alpha$ -catenin, and TBP.** 7 pmol of recombinant plakoglobin,  $\beta$ -catenin, or the indicated chimera fused to GST was incubated with 200  $\mu$ g of RWP1 total cell extracts. The complexes were purified with glutathione-Sepharose and analyzed by Western blot with a mAb against TBP,  $\alpha$ -catenin, or E-cadherin. The numbers below the lanes correspond to the amount of bound protein relative to the value obtained for wild-type  $\beta$ -catenin. The membranes were reblotted using an antibody against GST, and similar quantities of each protein were found (lower panel). The figure shows a representative experiment of three performed in each case in duplicate. The average  $\pm$  S.D. of these data is presented in Supplemental Table 2. WB, Western blot.

teins were generated in which the armadillo domain of one protein was fused to the terminal tails of the other catenin (Fig. 1). Analysis of the binding ability of the corresponding fusion proteins rendered results totally compatible with the above mentioned assumption. As shown in Fig. 5, substitution of the armadillo domain of plakoglobin with the equivalent region of  $\beta$ -catenin decreased only slightly the affinity for TBP (compare binding of TBP to plakoglobin and to the chimera Npl-arm $\beta$ -Cpl, upper panel, lanes 4 and 5). However, when the two tails of plakoglobin were replaced by those of  $\beta$ -catenin (in the chimera N $\beta$ -armpl-C $\beta$ ), binding of TBP was barely detectable (lane 3). More precisely, the N-terminal tail seems to be the key determinant of the TBP binding specificity since the swapping of the N-tail between the chimeras Npl-arm $\beta$ -Cpl and N $\beta$ -arm $\beta$ -Cpl resulted in a dramatic inhibition of the association in the latter (upper panel, lanes 4 and 2).

We next examined the interaction with  $\alpha$ -catenin. In this case,  $\beta$ -catenin presented a higher affinity than plakoglobin (Fig. 5, second upper panel, lanes 1 and 5), and again the specificity was conferred by the protein tails. Thus, the N $\beta$ -armpl-C $\beta$  and full-length  $\beta$ -catenin presented a similarly high affinity for  $\alpha$ -catenin, whereas  $\alpha$ -catenin bound to Npl-arm $\beta$ -Cpl as weakly as full-length plakoglobin. Also in this case, the N-tail was the major contributor to this specificity: substitution of the N-tail between Npl-arm $\beta$ -Cpl and N $\beta$ -arm $\beta$ -Cpl resulted in a more than 5-fold increase in the affinity for  $\alpha$ -catenin in the latter (second upper panel, compare lanes 4 and 2).

Similar specificity results were obtained for E-cadherin, although the difference in the affinity for this protein between plakoglobin and  $\beta$ -catenin was smaller (Fig. 5, second bottom



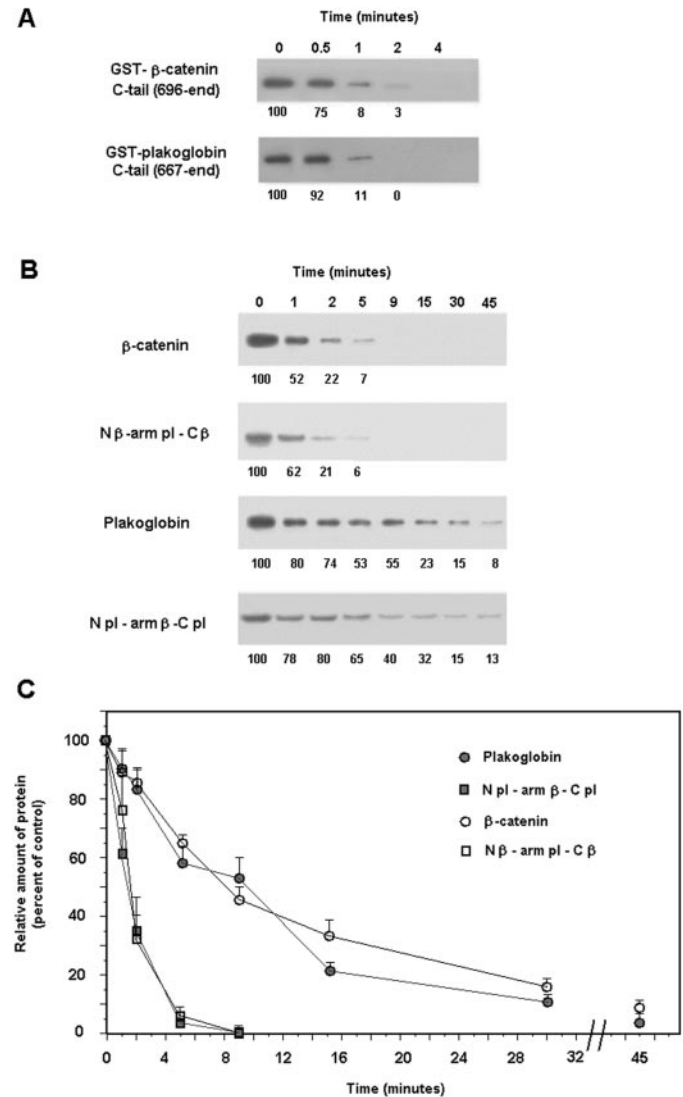
**FIG. 6. Binding of chimeras to different N-terminal domains of Tcf-4.** 1 pmol of GST, GST-Tcf-4(1–51) (upper panels), or GST-Tcf-4(51–110) (lower panels) was incubated with 1 pmol of  $\beta$ -catenin, plakoglobin, or the indicated chimeras. The amount of bound  $\beta$ -catenin, plakoglobin, or chimeras N $\beta$ -armpl-C $\beta$ , N $\beta$ -arm $\beta$ -Cpl, and Npl-arm $\beta$ -Cpl was determined using mAbs specific for  $\beta$ -catenin N-tail (left panels) or plakoglobin C-tail (right panels). In all panels, the autoradiograms were scanned, and the results were referred to known amounts of wild-type  $\beta$ -catenin (10 ng) or plakoglobin (5 ng) included in the gels, respectively, for the left or right panels. The numbers below the lanes indicate the amount of bound protein (ng) estimated by this method. The figure shows a representative experiment of three performed in each case in duplicate. The average  $\pm$  S.D. of these data is presented in Supplemental Table 3. WB, Western blot.

panel). However, in this case the C-tail played a more relevant role since replacement of the plakoglobin C-tail for that of  $\beta$ -catenin originated a chimera that presented an affinity for E-cadherin close to that of plakoglobin and lower than that of  $\beta$ -catenin (compare lanes 1, 2, and 5).

To further explore the role of the C-tails, we next studied the affinity of the chimeras for the two different binding domains present in Tcf-4. We took advantage of the high specificity that  $\beta$ -catenin and plakoglobin show for these sites with the former binding only to the Tcf-4(1–51) amino acids and the latter binding only to the Tcf-4(51–110) (see Fig. 3). While replacement of the armadillo domain of  $\beta$ -catenin with that of plakoglobin did not modify association to the Tcf-4(1–51) sequence, substitution of the C-tail abolished this interaction almost completely (Fig. 6, left upper panel). On the other hand, the Tcf-4(51–110) sequence, which contains the plakoglobin binding site, interacted similarly with full-length plakoglobin, with the Npl-arm $\beta$ -Cpl chimera, and even with N $\beta$ -arm $\beta$ -Cpl (right bottom panel), further supporting that the C-tail is responsible for conferring the binding specificity. Accordingly substitution of the  $\beta$ -catenin armadillo domain by that of plakoglobin did not increase the affinity of the protein for Tcf-4(51–110) (left bottom panel).

To study in more detail the molecular basis of the different C-tail specificity between  $\beta$ -catenin and plakoglobin, we next carried out experiments of limited trypsinolysis. Fig. 7A shows that both  $\beta$ -catenin and plakoglobin C-tails were digested at almost identical rates when they were expressed as a fusion to

**FIG. 7. N- and C-tails modulate  $\beta$ -catenin and plakoglobin sensitivity to proteolysis.** 5 pmol of either plakoglobin,  $\beta$ -catenin, the chimeras N $\beta$ -arm pl-C $\beta$  and Npl-arm  $\beta$ -Cpl (A), or GST- $\beta$ -catenin-C-tail and GST-plakoglobin-C-tail (B) were incubated with 50 ng of trypsin at 25 °C. Trypsin digestion was stopped with electrophoresis sample buffer at the indicated times. Samples were analyzed by Western blot with mAbs against  $\beta$ -catenin C-tail or plakoglobin C-tail. The numbers below the lanes correspond to the percentage of  $\beta$ -catenin or plakoglobin epitopes remaining after digestion at different times. Numbers were calculated by scanning the autoradiograms. The experiment, performed in duplicate, was repeated twice, and the average ( $\pm$ S.D.) of protein remaining at different times is represented in C.



GST. On the other hand, degradation of the C-terminal epitope was faster in  $\beta$ -catenin than in plakoglobin, suggesting that in the entire protein plakoglobin C-tail was less accessible to the protease (Fig. 7, B and C). Remarkably the protein chimeras containing the heterologous armadillo domains, N $\beta$ -armpl-C $\beta$  and Npl-arm $\beta$ -Cpl, presented identical sensitivity to the wild-type proteins  $\beta$ -catenin and plakoglobin, respectively (Fig. 7B).

#### DISCUSSION

As indicated in the introduction,  $\beta$ -catenin and plakoglobin are two closely related proteins required for the formation of adherens junctions and desmosomes. Moreover, through its binding to Tcf-4,  $\beta$ -catenin can act as a transcriptional activator. The activity of the  $\beta$ -catenin/Tcf-4 complex is required for the initial steps of epithelial tumor development (8). Probably for this reason,  $\beta$ -catenin is normally found to be overexpressed in epithelial tumors (8). The role of plakoglobin as a transcriptional regulator is still a matter of discussion, but experiments using transgenic animals suggest that plakoglobin acts as an inhibitor of tumorigenesis (21). A plausible explanation for this contrary effect of plakoglobin and  $\beta$ -catenin comes from its different binding to Tcf-4; plakoglobin interacts with a different sequence of Tcf-4 than  $\beta$ -catenin and precludes binding of the complex to DNA (20). Surprisingly, as we will discuss below, the amino acids of  $\beta$ -catenin involved in the interaction with Tcf-4 (present in the armadillo domain) (34) are almost totally conserved in plakoglobin. The results presented in this article

may explain why both proteins interact with different regions of Tcf-4: although both sites are present in both proteins, they are hidden by the N- and C-tails. The different folding of these tails in the conformation of the native proteins is the reason that only one of the sites is accessible in each protein.

In addition to Tcf-4, many other proteins that interact with  $\beta$ -catenin and plakoglobin do so through the central armadillo repeat domain (19). We now show here, as we previously reported for  $\beta$ -catenin, that the protein tails also determine the specificity of the interactions of plakoglobin with different cofactors. In all the cases studied, deletion of one of the tails in plakoglobin resulted in alterations in the binding of factors directly associated to the central armadillo domain. These results are in accordance with our previous observations, indicating that the two tails interact with the central armadillo domain in a way that deletion of one of the tails affects the association of the other (32). Therefore, our model is not limited to  $\beta$ -catenin and can be extended to at least another armadillo repeat protein, plakoglobin. It is possible, and worth investigating, that interaction of cofactors with other proteins containing this protein-protein interaction domain, such as p120-catenin and APC (35), may also be regulated in a fashion similar to that which occurs in  $\beta$ -catenin and plakoglobin.

Moreover, our results suggest that, at least in the case of  $\beta$ -catenin and plakoglobin, the armadillo domains are totally exchangeable without modifying their specificity of interaction

for the different Tcf-4 sequences or their distinct affinity for TBP,  $\alpha$ -catenin, or E-cadherin. Thus, the binding site for the Tcf-4-(51–110) sequence, *i.e.* the plakoglobin binding site, is also present in  $\beta$ -catenin but held cryptic in the full-length protein. However, the role of the N- and C-terminal tails in determining the specificity of interaction is different for the distinct cofactors. For instance, for the binding of TBP and  $\alpha$ -catenin, the N terminus seems to be the key determinant of the difference of affinity displayed by plakoglobin and  $\beta$ -catenin. In this sense, substitution of the N-tail between N $\beta$ -arm $\beta$ -Cpl and Npl-arm $\beta$ -Cpl dramatically affected the affinity for these cofactors, whereas the equivalent exchange of C-tails did not. On the other hand, in the case of binding to E-cadherin or to the different sequences in Tcf-4, the C-tail plays the more relevant role. Replacement of the C-tail in  $\beta$ -catenin by that of plakoglobin in the N $\beta$ -arm $\beta$ -Cpl chimera conferred the ability to interact with the plakoglobin binding site of Tcf-4-(51–110) and practically abolished the interaction with the  $\beta$ -catenin binding site (Tcf-4-(1–51)).

In all cases, our results showed that the armadillo domain was not responsible for the specificity of binding of plakoglobin and  $\beta$ -catenin, although many factors physically interact through this domain. Moreover differences between the interaction of the tails and the armadillo domains of both proteins were due to the different properties of the tails and not of the armadillo domains. To this respect, the study of the interaction of  $\beta$ -catenin and plakoglobin with Tcf-4 is particularly illustrative. Both proteins bound Tcf-4, but  $\beta$ -catenin bound to Tcf-4 amino acids 1–51, and plakoglobin bound to amino acids 51–110. The complex formed by the armadillo repeat domain of  $\beta$ -catenin and the Tcf-4 region that binds to it (amino acids 1–49) has been crystallized (34). It is remarkable that practically all the  $\beta$ -catenin amino acids involved in this interaction are conserved in plakoglobin, and the only variations are conservative changes: substitutions of Pro-606 and Ile-607 by Ser and Ala, respectively. This model validates the prediction that the binding site for Tcf-4-(1–49) is present in plakoglobin, but it is held cryptic by the tails. Likewise the same reasoning applied to Tcf-4-(51–110) binding that takes place through the first six armadillo repeats of plakoglobin.

One difference that we have detected in the armadillo sequences of  $\beta$ -catenin and plakoglobin is their different ability to act as substrates for tyrosine kinases. As we reported previously (28), equivalent residues are not phosphorylated by the same tyrosine kinases in each armadillo domain. This is rather surprising considering the results presented here. To this regard, it must be stressed that the difference in the activity of Fer kinase between  $\beta$ -catenin Tyr-142 (specifically phosphorylated by Fer) and the equivalent residue in plakoglobin, Tyr-133 (not phosphorylated by this kinase), could be accounted for by the change of a His for an Asn placed at –4 and an Ile for a Met at –6 from  $\beta$ -catenin to plakoglobin. Also, in the case of  $\beta$ -catenin Tyr-654 (phosphorylated by epidermal growth factor receptor) and the equivalent position in plakoglobin, Tyr-643 (not phosphorylated by this tyrosine kinase receptor), the only differences are Val to Thr at –3 and Met to Ile at +8 in plakoglobin. Finally plakoglobin contains an additional phosphorylation site by the Fer kinase, Tyr-549, a Phe in  $\beta$ -catenin. In all, these results suggest that, whereas the interaction sites for different cofactors have been conserved between  $\beta$ -catenin and plakoglobin, the two proteins have diverged to allow a distinct regulation by phosphorylation.

Our results put forward a model for the regulation of the activity of these proteins as regulators of junctional complexes and transcriptional cofactors. The N- and C-tails are responsi-

ble for the specificity, acting by hiding potential interaction sites present in the armadillo domains. This effect probably requires the interaction of the two tails with the armadillo domain. As shown above, the interaction with the armadillo domain and the general organization of the tails are not the same in  $\beta$ -catenin and plakoglobin. In particular, the N-tail of  $\beta$ -catenin hinders binding of the C-tail to the armadillo domain, whereas in plakoglobin the N-tail does not affect this interaction. Possibly, due to this, the C-tail of plakoglobin is less accessible to proteolysis, suggesting that this protein has a more compact structure. It will be interesting to determine which amino acids, probably in the C-tail, are relevant for binding to the armadillo domain and responsible for this different structure. In summary, our results support the conclusion that despite the armadillo domains constitute the binding site for  $\beta$ -catenin and plakoglobin cofactors, they are not responsible for the specificity of those interactions and act merely as docking elements.

**Acknowledgments**—We thank Dr. Jose Piedra for help in the preparation of DNA constructions used in this work. The technical assistance of Elodia Serrano and Alex Fernández is greatly appreciated. We also thank Dr. David Garcia Quintana for helpful comments on the manuscript.

#### REFERENCES

- Adams, C., and Nelson, J. W. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 572–577
- Provost, E., and Rimm, D. L. (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 567–572
- Nagafuchi, A. (2001) *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 600–603
- Polakis, P. (2000) *Genes Dev.* **14**, 1837–1851
- Liu, J., Stevens, J., Rote, C. A., Yost, H. J., Hu, Y., Neufeld, K. L., White, R. L., and Matsunami, N. (2001) *Mol. Cell* **7**, 927–936
- Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., Chatterjee, S., Murone, M., Züllig, S., and Basler, K. (2002) *Cell* **109**, 47–60
- Townsend, F. M., Cliffe, A., and Bienz, M. (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 626–633
- Bienz, M., and Clevers, H. (2000) *Cell* **103**, 311–320
- Hecht, A., Litterst, C. M., Huber, O., and Kemler, R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 18017–18025
- Hecht, A., Vleminkx, K., Stemmler, M. P., van Roy, F., and Kemler, R. (2000) *EMBO J.* **19**, 1839–1850
- Takemaru, K. I., and Moon, R. T. (2000) *J. Cell Biol.* **149**, 249–254
- Van de Wetering, M., Cavallo, R., Doojies, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., Peifer, M., Mortin, M., and Clevers, H. (1997) *Cell* **88**, 789–799
- Barker, N., Hurlstone, A., Musisi, H., Miles, A., Bienz, M., and Clevers, H. (2001) *EMBO J.* **20**, 4935–4943
- Bauer, A., Chauvet, S., Huber, O., Usseglio, F., Rothbacher, U., Aragnol, D., Kemler, R., and Pradel, J. (2000) *EMBO J.* **19**, 6121–6130
- Feng, Y., Lee, N., and Fearon, E. (2003) *Cancer Res.* **63**, 8726–8734
- Green, K. J., and Gaudry, C. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 208–216
- Jamora, A., and Fuchs, E. (2002) *Nat. Cell Biol.* **4**, 101–108
- Kolligs, F., Kolligs, B., Hajra, K., Hu, G., Tani, M., Cho, K., and Fearon, E. (2000) *Genes Dev.* **14**, 1319–1331
- Zhurinsky, J., Shtutman, M., and Ben-Ze'ev, A. (2000) *Mol. Cell Biol.* **20**, 4238–4252
- Miravet, S., Piedra, J., Miró, F., Itarte, E., García de Herreros, A., and Duñach, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 1884–1891
- Zhurinsky, J., Shtutman, M., and Ben-Ze'ev, A. (2000). *J. Cell Sci.* **113**, 3127–3139
- Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., García de Herreros, A., and Duñach, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 36734–36740
- Piedra, J., Miravet, S., Castaño, J., Pálmer, H., Heisterkamp, N., García de Herreros, A., and Duñach, M. (2003) *Mol. Cell Biol.* **23**, 2287–2297
- Huber, A. H., and Weis, W. I. (2001) *Cell* **105**, 391–402
- Pokutta, S., and Weis, W. I. (2000) *Mol. Cell* **5**, 533–543
- Gaudry, C. A., Palka, H. L., Dusek, R. L., Huen, A. C., Khandekar, M. J., Hudson, L. G., and Green, K. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 24781–24880
- Hu, P., O'Keefe, E. J., and Rubinstein, D. S. (2001) *J. Invest. Dermatol.* **117**, 1059–1067
- Miravet, S., Piedra, J., Castaño, J., Raurell, I., Francí, C., Duñach, M., and García de Herreros, A. (2003) *Mol. Cell Biol.* **23**, 7391–7402
- Williams, B., Barish, G., Klymkowsky, M., and Varmus, H. (2000) *Oncogene* **19**, 5720–5728
- Huber, A. H., Nelson, W. J., and Weis, W. I. (1997) *Cell* **90**, 871–882
- Piedra, J., Martínez, D., Castaño, J., Miravet, S., Duñach, M., and García de Herreros, A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 20436–20443
- Castaño, J., Raurell, I., Piedra, J., Miravet, S., Duñach, M., and García de Herreros, A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 31541–31550
- Aberle, H., Schwartz, H., Hoschuetzky, H., and Kemler, R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 1520–1526
- Graham, T., Weaver, C., Mao, F., Kimelman, D., and Xu, W. (2000) *Cell* **103**, 885–896
- Peifer, M., Berg, S., Reynolds, A. B. (1994) *Cell* **76**, 789–791



## **E-cadherin controls $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B transcriptional activity in mesenchymal gene expression**

**Guiomar Solanas<sup>1,5</sup>, Montserrat Porta-de-la-Riva<sup>2,5</sup>, Cristina Agustí<sup>2,5</sup>, David Casagolda<sup>1</sup>, Francisco Sánchez-Aguilera<sup>2</sup>, María Jesús Larriba<sup>3</sup>, Ferran Pons<sup>2</sup>, Sandra Peiró<sup>2</sup>, Maria Escrivà<sup>2</sup>, Alberto Muñoz<sup>3</sup>, Mireia Duñach<sup>1,5</sup>, Antonio García de Herreros<sup>2,4,6</sup> and Josep Baulida<sup>2,6</sup>.**

1. Unitat de Biofísica-CEB, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

2. Programa de Recerca en Càncer, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain.

3. Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

4. Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain.

Running head: E-cadherin controls mesenchymal gene transcription

Word count: Total 8,744; excluding references 7,741

5. These authors made equivalent contributions to this research.

6. Address correspondence to either Dr. Josep Baulida or Dr. Antonio García de Herreros, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, c/Doctor Aiguader, 88; E-08003, Barcelona, Spain. Tel: 34-93-3160433, Fax: 34-93-3160410; or to Dr. Mireia Duñach, Unitat de Biofísica-CEB, Departament Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain. Phone: 34-93-581-1870; Fax: 34-93-581-1907; E-mails: [jbaulida@imim.es](mailto:jbaulida@imim.es); [agarcia@imim.es](mailto:agarcia@imim.es); [mireia.dunach@uab.cat](mailto:mireia.dunach@uab.cat).

## SUMMARY

E-cadherin and its transcriptional repressor Snail1 are two factors that control epithelial phenotype. Expression of Snail1 promotes the conversion of epithelial to mesenchymal cells, concomitantly with E-cadherin down-regulation and the up-regulation of mesenchymal genes such as Fibronectin and LEF1. We have studied here the molecular mechanism controlling the expression of these genes in mesenchymal cells. Forced expression of E-cadherin strongly down-regulated Fibronectin and LEF1 RNA levels, indicating that E-cadherin-sensitive factors are involved in the transcription of these genes. E-cadherin over-expression decreases the transcriptional activity of the Fibronectin promoter and reduces the interaction of  $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B with this promoter. Like  $\beta$ -catenin, NF- $\kappa$ B was found to be associated with E-cadherin and other cell adhesion components by co-immunoprecipitation and pull-down assays. Interaction of NF- $\kappa$ B p65 subunit with E-cadherin or  $\beta$ -catenin is reduced by conditions that disrupt the adherens junctional complex in IEC-18 intestinal cells, such as K-ras over-expression or E-cadherin depletion using siRNA. These conditions do not affect the association of p65 with I $\kappa$ B $\alpha$ . The functional significance of these results is stressed by the stimulation induced by the E-cadherin siRNA of the NF- $\kappa$ B-transcriptional activity, both basal and TNF- $\alpha$ -stimulated. Therefore, these results indicate that E-cadherin not only controls the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin but that of NF- $\kappa$ B as well, and that binding of this factor to the adherens junctional complex prevents the transcription of mesenchymal genes.

## INTRODUCTION

Epithelial cells have a high degree of plasticity, since they experience a conversion towards a mesenchymal phenotype in a process known as epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (Savagner, 2001; Huber et al., 2005). This phenomenon, essential for embryo development, is also required for the acquisition of invasive properties by cancer cells. EMT is also reversible and conversion of mesenchymal to epithelial cells happens during some processes of organogenesis and in micrometastasis (Thiery, 2002). As expression of E-cadherin protein is the classic feature of epithelial cells, E-cadherin is down-regulated during EMT and up-regulated in MET. A transcriptional consequence of the presence of E-cadherin in epithelial cells can be inferred from that E-cadherin is normally associated with  $\beta$ -catenin, preventing its translocation to the nucleus and its role as transcriptional activator through its interaction mainly with the TCF/LEF family of transcription factors, but also with other DNA-binding proteins (Gordon and Nusse, 2006). Accordingly, the involvement of  $\beta$ -catenin signalling in EMTs during tumour invasion is established (Brabletz, 2005).

Evidence from our and other laboratories indicates that the E-cadherin repressor Snail1 is essential for triggering EMT (Huber et al., 2005; Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; De Craene et al., 2005). Over-expression of Snail1 induces the repression of E-cadherin and other epithelial markers and the activation of mesenchymal markers, such as Fibronectin or LEF1 (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Guaita et al., 2002). In the case of E-cadherin and other Snail1 epithelial targets, repression is caused by the direct interaction of Snail1 C-terminal domain with specific 5'-CACCTG-3' core sequences present in the promoters (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). However, the mechanisms leading to the activation of mesenchymal genes are not yet known. Here we have investigated the molecular pathways controlling the expression of Fibronectin and LEF1. Our results indicate that E-cadherin prevents the transcription of these genes and causes the association with the adherens junctional complex, not only of  $\beta$ -catenin as expected, but also of NF- $\kappa$ B, another transcriptional factor associated with EMT (Huber et al., 2004).

## METHODS AND MATERIALS

*Cultured cells* - LS174T is a colon cancer cell line that although presents E-cadherin mRNA levels comparable to other epithelial cells lines, is deficient for E-cadherin protein expression. This cell line presents high transcriptional activity of  $\beta$ -catenin/TCF4 complex (van de Wetering et al., 2003). LS174T inducible clones obtained from Dr. H. Clevers (Hubrecht Laboratories, Utrecht, The Netherlands) were grown in selective medium as reported (van de Wetering et al., 2003), and transfected with a pcDNA3-Snail-IRES-neo or pSnail-IRES-hrGFP-2a by means of a Lipofectamine Plus kit from GIBCO. Transfected cells were selected in medium containing 300  $\mu$ g/ml of G-418 (GIBCO) or using a Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS), and individual clones were isolated and grown on standard conditions. Clones expressing Snail1 were named S and control plasmid C. Other cell lines used in these studies were MiaPaca-2, a pancreas cell line deficient in E-cadherin (Batlle et al., 2000); intestinal IEC-18 cells either transfected with a control plasmid or with K-ras oncogene (Piedra et al., 2003); and SW-480-ADH (Palmer et al., 2001), a cell population expressing low levels of E-cadherin prior to confluence. To obtain SW-480 double transfectants, SW-480-ADH cells were transfected with E-cadherin cDNA in the eukaryotic vector pBATEM2 (Nose et al., 1988) (kindly provided by Dr. M. Takeichi, Kyoto University, Kyoto, Japan), using Lipofectamine Plus (Invitrogen). Stable transfectants were obtained after selection with 2 mg/ml G-418 and screened by Western blot and immunofluorescence. The clones with higher E-cadherin expression were selected for subsequent experiments. Next, cells were retrovirally transduced with the mouse Snail1 cDNA tagged at the 3'-end with the sequence encoding the influenza haemagglutinin twelve-amino acid peptide cloned into the pRV-IRES/GFP retroviral vector (ECADH-SNAIL-HA cells) or with the empty pRV-IRES/GFP vector (ECADH cells). Retroviral infection was performed as previously described (Peiró et al., 2006). Transduced (GFP+) cells were sorted by an Epics Altra HSS (Beckman-Coulter) and the pool of infected cells was used for further studies. The generation and characteristics of cell clones of intestinal epithelial cell line HT29-M6, showing doxycycline-regulated expression of Snail1-HA, were reported in Batlle et al. (2000).

### *DNA constructs and promoter assays*

An expression plasmid containing a small interfering RNA (siRNA) for human E-cadherin was prepared as indicated. Briefly, two complementary oligonucleotides were annealed and cloned in the pSUPER basic vector at BglII/XhoI sites. Forward oligonucleotide was 5'-GATCCCCCGATCAGAATGACAACAATTCAAGAGATTGTTGTCATTCTGATCGGTTTTTC, where tandem sense-antisense 19 b sequences from the human E-cadherin cDNA are

marked in bold. This sequence was conserved in rat E-cadherin with the exception of two bases, placed at positions 2 and 18. A scrambled sequence was used as control. The construction was verified by sequencing.

Generation of pGL3 Luciferase reporter vector (Promega) containing human LEF1 promoter (-735/+1077) has been described (Domínguez et al., 2003). A -341/+265 fragment of human Fibronectin promoter was obtained by PCR using sense 5'-CCCCACGCGTACACAAGTCCAGCCACTCCC-3' and antisense 5'-GTTGAGACGGTGGGGAGAG-3' oligonucleotides. NF3 plasmid, a NFκB-sensitive plasmid containing three binding sequences for this transcriptional factor upstream from a Luciferase reporter gene, was kindly provided by Dr. M. Fresno (Univ. Autónoma de Madrid, Spain). Reporter assays were performed as described elsewhere (Batlle et al., 2000; Barberà et al., 2004). When indicated, cells were deprived of serum for 16 hours and supplemented with TNF-α (kindly provided by Dr. C. de Bolós, IMIM), resuspended at 10 μg/ml in PBS + 0.1% BSA to a final concentration of 20 ng/ml for 6 hours. The use of plasmids encoding VP16-Rel and VP16-TCF-4 fusion proteins and ΔTCF-4 mutant has been reported elsewhere (Tan et al., 2001; Barberà et al., 2004).

#### *RNA Analysis*

mRNA was obtained following a standard protocol (Guaita et al., 2002) or using GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Normally, 500 ng of purified mRNA were analysed with Super-Script One-Step RT-PCR with Platinum Taq Polymerase (GIBCO). RT-PCR products were separated on 1.5% agarose/Tris-Acetate-EDTA gels. For E-cadherin, Fibronectin, LEF1, murine Snail1 and Cyclophilin analysis, the primers used are indicated in Supplementary Table I or in Guaita et al. (2002).

For quantitative mRNA detection, 250 ng of total RNA extracted with the RNA kit (Sigma) were analysed using QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Qiagen) in triplicate. RT-PCR and data collection were performed on ABI PRISM 7900HT. All quantifications were normalized with either endogenous Cyclophilin or HPRT. The relative value of each target gene compared to the calibrator for that target is expressed as  $2^{-(Ct-Cc)}$ , where Ct and Cc are the mean threshold cycle differences after normalizing to control. For primer sequences, see Supplementary Table 1.

#### *Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays*

ChIP assays were performed on SW-480, SW-480-Snail1, SW-480-Ecadherin or SW-480-Snail1-Ecadherin cells, essentially as described (Peiró et al., 2006).  $15 \times 10^6$  cells were cross-linked with 1% formaldehyde, and lysated in SL buffer (50 mM Tris pH 8.2 mM EDTA, 0.1%

NP40, 10% Glycerol), incubated 10 minutes on ice and centrifuged for 5 minutes at 5,000 rpm. Supernatant was discarded and pellet resuspended in SDS lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8) for 10 min at room temperature. Cell lysates were sonicated to generate fragments of DNA from 200 to 1500 bp. Protein concentration was determined by Bradford and equal amounts of protein in 100 µl of SDS-lysis buffer extract were diluted 1/10 with IP buffer (0.001% SDS, 1.1% Triton X-100, 16.7 mM Tris pH 8, 2 mM EDTA, 1.2 mM EDTA, 167 mM NaCl). Immunoprecipitation was carried out with β-catenin mab (BD Biosciences), p65-NF-κB polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) or mouse IgG (Dako) as a control. Samples were treated with elution buffer (100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1% SDS) and incubated at 65°C overnight to reverse formaldehyde cross-linking. Samples were digested with proteinase K and RNase, and DNA was purified by the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences). Fibronectin promoter regions (GeneBank AC012462) were detected by PCR using two specific primers that amplify the proximal region (5'-GTTGAGACGGTGGGGGAGA-3', corresponding to sequence 70304-286, and 5'-CCGTCCCCTTCCCCA-3', corresponding to 70423-37) or, as control, two primers that amplify a fragment -2kb upstream of the Fibronectin proximal promoter (5'-TCCTTCCCCCAGAATCAATGAA-3', 72512-491; and 5'-GGGAAGCCGAGTGTCTTCTTCC-3', 72404-24).

*Electrophoretic mobility shift assays (EMSA).*

Assays were performed essentially as described elsewhere (Batlle et al, 2000). Nuclear extracts were prepared by suspending pelleted cells with two volumes of buffer I (10 mM Hepes pH 7.6, 1.5 mM Cl<sub>2</sub>Mg, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5% NP-40 and a cocktail of proteases and phosphatase inhibitors). After an incubation of 10 minutes on ice and 10 minutes of centrifugation at 5,000 rpm the resulting pellet was resuspended in 2 volumes of buffer II (20 mM Hepes pH 7.6, 1.5 mM Cl<sub>2</sub>Mg, 840 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol and a cocktail of protease and phosphatase inhibitors). Subsequently the samples were kept on ice for 20 minutes and centrifuged 30 minutes at 5,000 rpm. The supernatants obtained were dialyzed 5 hours at 4°C in buffer III (20 mM Hepes pH 7.6, 100 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol), the protein concentration analysed by Bradford and used as a nuclear extracts. A <sup>32</sup>P-labelled double stranded oligonucleotide including a DNA binding consensus for NF-κB (5'-agtgaGGGGACTTTCCcagge) (Gustems et al., 2006) was used as a radioactive probe. When mentioned, binding of the radioactive probe was competed with a 10 or 50-fold excess of wild-type or mutated double stranded oligonucleotides (5'-agttgaGGAGATCT**GG**Ccagc-3', where mutated nucleotides are in bold).

*Preparation of cell extracts and immunoprecipitation.*

Total cell extracts were prepared by homogenizing cells in RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 200 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40), supplemented with protease inhibitors (0.3  $\mu$ M Aprotinin, 1  $\mu$ M Leupeptin, 1  $\mu$ M Pepstatin, 1 mM Pefabloc) and phosphatase inhibitors (10 mM NaF, 0.1 mM sodium orthovanadate). After passing cells ten times through a 20-gauge syringe, extracts were left on ice for 20 minutes and centrifuged at 20,000 xg for 5 minutes at 4°C. To separate nucleus from membrane and cytosol, cells were lysed in RIPA buffer and resuspended carefully with a micropipette. Integrity of the nuclei was verified staining with DAPI and visualizing them in the microscope. After centrifuging at 300 xg for 10 minutes, the supernatant was considered to be the cytosol and membrane fraction. As shown below, this fraction was free of nuclear markers. The pellet was resuspended in the same volume of RIPA buffer and passed 10 times through a 20-gauge syringe and centrifuged at 20,000 xg for 10 minutes. The supernatant was considered to be the nuclear fraction. Equivalent amounts of protein extract were loaded in each condition. Cell fractions were analyzed by Western blot using a specific polyclonal antibody against fibronectin (Abcam) or monoclonal antibodies (mAbs) against NF- $\kappa$ B p65 subunit, E-cadherin,  $\beta$ -catenin, TATA binding protein (TBP) (all from BD Biosciences), Lamin B1 (Abcam),  $\alpha$ -tubulin, actin or pyruvate kinase (Pyr kinase) (Sigma).

Proteins were immunoprecipitated from cell extracts (300 to 500  $\mu$ g), using 4  $\mu$ g/ml of antibody to p65 (sc-109, Santa Cruz) or E-cadherin (from BD Biosciences), for 16 h at 4°C and then collected using 30  $\mu$ l of  $\gamma$ -bind G-Sepharose (GE Healthcare). Immunoprecipitates were washed three times with lysis buffer and eluted with electrophoresis sample buffer. Immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blot using specific antibodies against p65, E-cadherin,  $\beta$ -catenin,  $\alpha$ -catenin, p120-catenin, I $\kappa$ B $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology) or HA (Roche 3F10). 3% of cell extracts used for IP were loaded into the input lane as control. Serial immunoblots were performed after stripping the membranes.

#### *Protein-binding assays.*

Pull-down assays were performed using 5 pmols of purified recombinant proteins fused to GST and 500  $\mu$ g of cell extracts from SW-480 and NIH3T3, as reported by Solanas et al. (2004). Glutathione-Sepharose bound proteins were analysed by Western blotting with specific mAbs against NF- $\kappa$ B p65 subunit or E-cadherin. The polyclonal antibody to the GST protein was from GE Healthcare.

#### *Immunofluorescence.*

SW-480 cells, plated on coverslips, were washed with PBS, fixed with 4% PFA for 15 minutes, washed twice with PBS, permeabilized with 0.2% Triton for 10 minutes and washed

exhaustively with PBS (5 times) to ensure rinsing. Cells were blocked with 5% non-fat milk diluted in TBS for 1 hour. A dilution of the primary antibodies in 3% BSA-TBS (1/400 for anti-p65 from Sta. Cruz Biotechnology and 1/40 for anti E-cadherin from BD Biosciences) was used to incubate the coverslips overnight at 4°C. After washing with PBS, cells were incubated with secondary antibodies (diluted 1/500 in PBS) for 1 h at RT. Cells were washed again and coverslips were mounted on glass slides with Mowiol.



## RESULTS

### *E-cadherin interferes with the induction of Fibronectin and LEF1 transcription.*

Increased expression of mesenchymal markers has been detected in epithelial cells that have undergone EMT. This is the case of Fibronectin and LEF1 mRNA up-regulation during Snail1-induced EMT in HT-29 M6 (Guaita et al., 2002, Supplementary Fig. 1). Activation of these genes by Snail1 was also reproduced in other intestinal epithelial cell lines, such as LS174T (see below) and to a lesser extent in SW-480 cells (Figs. 1A and B), probably because these cells already express these markers when grown at low confluence. Since down-regulation of ectopic Snail1 expression in HT-29 M6 Snail1 transfectants restores E-cadherin levels concomitantly with the repression of Fibronectin and LEF1 (Supplementary Fig. 1), we checked whether E-cadherin modulates the expression of these two genes. SW-480 cells were transfected with E-cadherin under the control of a constitutive promoter and the RNA levels of Fibronectin and LEF1 were analysed. As shown in Figure 1B, E-cadherin expression severely down-regulates Fibronectin and LEF1 RNA levels, which could not be restored by Snail co-expression. Neither Snail1 nor E-cadherin expression induced significant changes in HPRT RNA, used as control. Ectopic expression of E-cadherin in SW-480 cells also repressed the activity of Fibronectin and LEF1 promoters. Both a -341/+265 fragment of Fibronectin promoter and a -735/+1077 LEF1 promoter were potently down-regulated in SW-480 cells expressing E-cadherin (Fig. 1C), in either presence or absence of Snail.

To discard that the ectopic overexpression of E-cadherin interfered artefactually on mesenchymal gene expression, we cultured SW-480 ADH cells at higher cell density. This cell line is used for studying epithelial plasticity, since sub-confluent sparse cultures mimic invasive tumour cells and show low levels of E-cadherin, whereas confluent cultures resemble a more differentiated epithelium with higher E-cadherin (Conacci-Sorell et al., 2003). As seen in Figure 1D, the levels of E-cadherin were increased after confluence. This up-regulation in endogenous E-cadherin levels was accompanied by a 50% decrease in Fibronectin and LEF1 RNAs (Fig 1E).

E-cadherin levels were also modulated in another cell system. IEC-18 is an epithelial cell line with high E-cadherin and very low expression of Fibronectin and LEF-1. Transfection of this cell line with a specific siRNA for E-cadherin reduced the levels of this protein (Fig 1F). Concomitantly, Fibronectin and LEF1 RNAs were up-regulated as determined by semi quantitative RT-PCR (Fig 1G).

These results suggest that E-cadherin is controlling the expression of mesenchymal markers. Therefore we investigated the molecular details of this negative control.

*β-catenin is required for the activation of mesenchymal genes.*

Our results suggest that an E-cadherin-dependent factor is required for transcription of these target genes. Therefore, we tested whether the E-cadherin-associated protein β-catenin, was involved in the transcription of Fibronectin and LEF-1. Both Fibronectin and LEF1 promoter contain putative binding sites for TCF-4. However, whereas LEF1 promoter was stimulated by an activated form of TCF-4 (VP16-TCF-4) and inhibited by a dominant negative mutant (ΔTCF-4), Fibronectin was not (Supplementary Fig 2), indicating that TCF-4 binding sites in Fibronectin promoter were not functional.

To check the relevance of β-catenin in Fibronectin and LEF-1 gene expression, we used cell clones in which down-regulation of β-catenin protein levels or TCF-4 transcriptional activity could be achieved. We took advantage of previously established LS174T cell clones, in which ΔTCF-4 mRNA or β-catenin siRNA is induced by doxycycline treatment (van de Wetering et al., 2002, 2003). In this cell line, expression of Snail1 increased the mRNA levels of LEF1 and especially Fibronectin, which was not detected in control LS174T cells (Fig 2A). As expected, E-cadherin mRNA was down-regulated after expression of Snail1 (Fig 2A). Similar modulations of the expression of these three genes were observed when Snail1 was transfected either to control or to LS174T cells transfected with ΔTCF-4 or β-catenin siRNA in the absence of doxycycline. As shown in Figure 2B, the increase in Fibronectin RNA after Snail1 transfection was higher than that of LEF1 probably reflecting the lower expression of the latter in control cells.

Treatment with doxycycline down-regulated β-catenin protein levels only in β-catenin siRNA and not in control clones not expressing this siRNA (Fig 2C). The remaining β-catenin detected in these doxycycline-treated β-catenin siRNA clones was present at the cell membrane as seen by immunofluorescence (Supplementary Fig 3A). As expected, ΔTCF-4 mRNA increased specifically only in ΔTCF-4 mRNA clones. Since the primer set used for detecting ΔTCF-4 mRNA also amplifies full-length endogenous TCF-4 mRNA, we performed a RT-PCR with a primer set amplifying only the full length. We found no changes in the endogenous TCF-4 mRNA in response to doxycycline, confirming a specific increase of the ectopic expression of ΔTCF-4 mRNA in these clones (Fig 2C). In control clones, doxycycline did not induce changes in either β-catenin or ΔTCF-4 levels (Fig 2C). The induction of both β-catenin siRNA and ΔTCF-4 repressed the activity of a β-catenin-sensitive promoter, TOP-Flash, by 75 to 80 % in the different cell clones expressing Snail1 (Supplementary Fig 3B). Moreover, the expression of a well-characterized target of β-catenin/TCF-4 complex, c-Myc, was also affected by the expression of β-catenin siRNA or ΔTCF-4 (Fig 2D) confirming that β-catenin siRNA and ΔTCF-4 were affecting the transcriptional activity of this complex.

We checked the requirement of  $\beta$ -catenin and TCF-4 activity for the transcription of Fibronectin and LEF1. In cells with expression of these genes, down-regulation of  $\beta$ -catenin markedly decreased Fibronectin RNA levels, whereas over-expression of  $\Delta$ TCF-4 did not (Fig 2D). Doxycycline interference with RNA levels was irrelevant in these experiments, as shown by the small effect of doxycycline treatment on Fibronectin levels in control clones (Fig 2D). Therefore, the results indicate that a  $\beta$ -catenin-dependent and TCF-4-independent mechanism mediates the transcription of Fibronectin gene. Similar results were obtained for LEF1 RNA in  $\beta$ -catenin siRNA clones: LEF1 RNA levels were decreased by doxycycline treatment in  $\beta$ -catenin siRNA clones, but not in control cells not expressing this siRNA (Fig 2D, lane LEF1). Thus, a  $\beta$ -catenin-dependent signal controls the transcription of LEF-1. A small decrease in LEF1 levels was detected when  $\Delta$ TCF-4 was induced suggesting that expression of this gene is also sensitive to a TCF-4-dependent mechanism (Fig 2D). A similar modulation of LEF1 gene expression was also observed in control LS174T cells since, contrarily to Fibronectin, these cells show significant expression of LEF1 (data not shown). Therefore, these results indicate that the expression of mesenchymal genes is under the control of  $\beta$ -catenin through TCF-4-dependent or -independent complexes.

*E-cadherin controls the association of  $\beta$ -catenin with Fibronectin promoter.*

Since  $\beta$ -catenin was required for the expression of the mesenchymal genes, we checked whether the transcriptional activity of this protein was affected by ectopic E-cadherin. As shown in Figure 3A, the activity of  $\beta$ -catenin/TCF-4-dependent-TOP promoter was potently down-regulated by expression of E-cadherin either in SW-480 or SW-480 Snail1 cells. We also analysed the association of  $\beta$ -catenin with Fibronectin promoter by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. As shown in Figure 3B,  $\beta$ -catenin was detected bound to Fibronectin proximal promoter. This association was increased (two-fold) in SW-480 cells transfected with Snail1 and totally down-regulated in SW-480 cells over-expressing E-cadherin, in either the presence or absence of Snail1, reproducing the changes detected in Fibronectin RNA in these four conditions (see Figure 1B). Binding of  $\beta$ -catenin to Fibronectin promoter correlated with the presence of this protein in the nucleus, as determined after cell fractionation (see below).

*E-cadherin inhibits NF- $\kappa$ B transcriptional activity on Fibronectin promoter*

Fibronectin gene expression is dependent on the activity of NF- $\kappa$ B transcriptional factor (Chen et al., 2003). Indeed, in SW-480 cells the activity of Fibronectin and LEF1 promoters was up-regulated by co-expression of VP16-Rel (Supplementary Fig 4), a fusion chimera containing the Rel DNA binding domain of NF- $\kappa$ B-p65 and the transactivator domain of VP-16. We

checked whether binding of NF- $\kappa$ B to Fibronectin promoter was also modulated by Snail1 and E-cadherin over-expression using CHIP experiments. Association of the p65 subunit of NF- $\kappa$ B to Fibronectin promoter was observed in SW-480 cells and severely down-regulated by E-cadherin expression, in the presence or absence of Snail1 (Fig 4A). Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) performed with a NF- $\kappa$ B consensus binding sequence confirmed these results. Two retarded bands were detected in these assays when nuclear extracts from SW-480 Snail1 cells were used. These specific bands were competed with an excess of oligonucleotide and were not detected with a probe corresponding to a mutated consensus binding element. The formation of these bands was not observed when SW-480-Snail1-E-cadherin nuclear extracts were used (Fig 4B).

The activity of a synthetic NF- $\kappa$ B-sensitive promoter was also determined. The activity of this promoter in SW-480 cells mirrored the results obtained with mesenchymal gene promoters or with a  $\beta$ -catenin-sensitive one: it was slightly (two-fold) but consistently induced by Snail1 expression and was totally repressed by E-cadherin (Fig 4C). Similar results were obtained by transient transfection in another cell line, MiaPaca-2 cells deficient in E-cadherin expression. In this case, activation by Snail1 was higher than in SW-480 cells and E-cadherin did not totally block the activity of this promoter (Fig 4C). Thus, these data corroborate that E-cadherin expression inhibits NF- $\kappa$ B-transcriptional activity.

The subcellular localization of NF- $\kappa$ B was also determined. Cell extracts from a cytoplasmic plus membrane and nuclear fractions were prepared. As shown in Figure 5A, cytoplasmic and membrane proteins (pyruvate kinase and E-cadherin) were effectively separated from nuclear markers (Lamin B and TBP). Although most of p65 subunit of NF- $\kappa$ B was detected in the cytosol, a significant fraction was present in the nucleus in SW-480 or SW-480-Snail1 cells. This fraction was estimated to be between 10 to 20% of the total p65 quantifying the different experiments performed (not shown). Over-expression of E-cadherin prevented the detection of NF- $\kappa$ B in this fraction. Similar results were obtained when the presence of  $\beta$ -catenin localization was determined in these two fractions: E-cadherin down-regulated the amount of  $\beta$ -catenin present in the nuclear fraction.

Immunofluorescence analysis also demonstrated that E-cadherin expression relocalized NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -catenin to the cytosol. As shown in Figure 5B,  $\beta$ -catenin presented a diffuse distribution in SW-480-Snail1 cells, labelling the nucleus and the cytosol. Expression of E-cadherin eliminated the nuclear immunoreactivity of this protein. Similar results were obtained when p65 was analyzed although in this case only a small signal was detected in the nucleus in SW-480 Snail1 cells. This result confirm our data from the analysis of cell fractions (Fig 5A) indicating that most of p65 is detected out of the nucleus in these cells. As expected, in cells expressing E-cadherin,  $\beta$ -catenin was mainly detected in the cell-to-cell contacts. Surprisingly,

p65 presented a similar distribution. These studies were repeated co-analysing p65 and E-cadherin (Fig 5C). Although p65 was mainly detected in the cytosol, it also presented a significant colocalization with E-cadherin in the membrane. Therefore, these results suggest that NF- $\kappa$ B might interact with components of the junctional complex.

*NF- $\kappa$ B associates with E-cadherin and other junctional components.*

It has been reported that the p65 subunit of the NF- $\kappa$ B heterodimer can associate with  $\beta$ -catenin (Deng et al., 2002). We checked in our cell systems whether p65 interacted with E-cadherin or other components of the adhesion complex. As shown in Figure 6A, in SW-480 cells transfected with E-cadherin and Snail1, p65 was associated with E-cadherin in co-immunoprecipitation experiments. In these cells, NF- $\kappa$ B also interacted with other components of the adhesion complex, such as  $\beta$ -catenin,  $\alpha$ -catenin and p120-catenin (Fig 6A). Co-immunoprecipitation of p65 with  $\beta$ -catenin correlated with the expression of E-cadherin, since  $\beta$ -catenin was not detected in p65 immunoprecipitates in SW-480-Snail1 cells, which had very low levels of E-cadherin (Fig 6A). Similar results were obtained in SW-480 E-cadherin cells (not shown).

Association of p65 with junctional components was also determined by pull-down assays using as bait GST-fusion proteins containing the cytosolic domain of E-cadherin (cytoE-cadh),  $\beta$ -catenin or p120-catenin (Fig 6B). The interaction was higher with GST-cytoE-cadh than with the other two fusion proteins. Moreover, association of p65 to GST- $\beta$ -catenin was stimulated by addition of cytoE-cadherin (Fig 6B), suggesting that this protein, or an E-cadherin bound protein, is mediating the interaction of p65 to the junctional complex.

Co-immunoprecipitation of p65 with endogenous  $\beta$ -catenin and E-cadherin was also detected in IEC-18 cells (Fig 6C and 7A and B). Immunofluorescence analysis of p65 subunit showed the presence of this protein in the cytosol; nuclei were free of immunoreactivity (Supplementary Fig 5). This diffuse distribution of p65 in the cytosol made difficult to observe an extensive co-localization with E-cadherin. However, assays performed treating the cells with TNF $\alpha$ , in order to translocate the cytosolic pool of p65, and washing out with NP-40 prior to fixation revealed the existence of p65 immunoreactivity in the membrane (Supplementary Fig 5). In any case our results suggest that only a small part of p65 presents this membrane localization.

We used IEC-18 cells to verify that only the E-cadherin-associated  $\beta$ -catenin was interacting with p65. For this purpose, we depleted E-cadherin from IEC-18 cell lysates by two successive rounds of immunoprecipitation. Immunodepletion of E-cadherin greatly decreased the levels of  $\beta$ -catenin (Fig 6C), whereas it only slightly affected p65 levels, which again suggests that most of p65 is not associated with E-cadherin. p65 was immunoprecipitated with

mAbs against  $\beta$ -catenin and E-cadherin before to immunodepletion and not by control IgGs (Fig 6C). However, we found no association between  $\beta$ -catenin not bound to E-cadherin ( $\beta$ -catenin resistant to immunodepletion) and p65 (Fig 6C), which corroborates that only the membrane-associated pool of  $\beta$ -catenin interacted with p65.

Association of p65 with  $\beta$ -catenin or p120-catenin was also observed in NIH-3T3 cells transfected with E-cadherin, but not in control cells (Fig 6D). To determine whether this pool of E-cadherin-associated p65 was the same as that bound to  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (Thanos and Maniatis, 1995), a stabilized form of this protein (S32,36A mutant) was also over-expressed in fibroblasts. As shown in Figure 6D, ectopic expression of  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  prevented the co-immunoprecipitation of p65 with components of the adhesion complex, suggesting that both associations are exclusive.

*Disruption of adherens junctions affects the association of NF- $\kappa$ B with E-cadherin and  $\beta$ -catenin.*

We also examined whether interaction of p65 with adherens junction components was affected by the disruption of the E-cadherin junctional complex. Transfection of the K-ras oncogene to IEC-18 cells has been reported to promote tyrosine phosphorylation of  $\beta$ - and p120-catenin and disruption of the intercellular adherens junctional complex (Piedra et al., 2003). We detected the interaction of endogenous p65 and E-cadherin or  $\beta$ -catenin, as assayed by co-immunoprecipitation in intestinal epithelial IEC cells. The levels of E-cadherin or  $\beta$ -catenin present in p65 immunoprecipitates were lower in K-ras transfectants (Fig 7A).

To further verify the involvement of E-cadherin in the control of NF- $\kappa$ B activity and p65- $\beta$ -catenin interaction, IEC-18 cells were transfected with a siRNA specific for E-cadherin or an irrelevant siRNA as control. Besides down-regulated E-cadherin levels, this E-cadherin siRNA increased the cellular content in Fibronectin and LEF-1 RNA (see Figure 1). As shown in Figure 7B, cells with decreased E-cadherin levels showed diminished interaction between p65 and  $\beta$ -catenin or p120-catenin. Interestingly, the interaction of p65 with  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  was not modified by E-cadherin siRNA, as it was not either by expression of K-ras. As extensively described (Thanos and Maniatis, 1995), this association happens in the cytosol and prevents translocation of p65 to the nucleus. Therefore, E-cadherin siRNA only affects to the activity of the membrane-associated pool of p65 and not that of the cytosolic pool.

E-cadherin siRNA up-regulated the nuclear levels of p65 (Fig. 7C), as determined by cell fractionation and Western blot. Activity of the NF- $\kappa$ B-dependent promoter was also significantly increased by E-cadherin siRNA (Fig. 7D) although not that much as by incubation with TNF- $\alpha$  (Fig 7E). In any case, transfection with E-cadherin siRNA enhanced the response to TNF- $\alpha$  (Fig. 7E), further corroborating that E-cadherin works as a negative effector of this pathway.

## DISCUSSION

In recent years, the inverse role of Snail1 and E-cadherin in the control of epithelial plasticity has been supported by new evidence (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005). We have previously reported that Snail1-induced EMT is associated to the repressive activity of this transcriptional factor since non-functional Snail mutants, unable to repress E-cadherin gene expression, failed to promote EMT and to activate the transcription of mesenchymal-related genes such as Fibronectin and LEF-1 transcription (Domínguez et al., 2003). In this study we have analyzed the molecular mechanisms involved in the control of mesenchymal gene expression by E-cadherin. Our results indicate that Fibronectin and LEF1 gene expression is dependent on the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B, two activities that are controlled by the presence of E-cadherin-dependent cell contacts in epithelial cells.

We detected binding of  $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B to the Fibronectin promoter, which correlates with the expression of this gene and the activity of its promoter. Previous reports indicate that Fibronectin is sensitive to the transcriptional activity of both proteins (Gradl et al., 1999; Chen et al., 2003). However, our results show that factors of the TCF family do not mediate the interaction of  $\beta$ -catenin to Fibronectin promoter. Therefore, the identification of the factor that makes the interaction of  $\beta$ -catenin with the Fibronectin promoter possible, as well as other molecular requirements controlling  $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B binding to this promoter is an interesting line of research that deserves to be investigated.

Our results indicate that E-cadherin expression negatively controls the transcriptional activity of both  $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B and the transcription of mesenchymal genes. Curiously, NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -catenin have been shown to be involved in the activation of ZEB1/2 and Slug, respectively, two E-cadherin repressors also activated during EMT (Conacci-Sorrell et al., 2003; Chua et al., 2007), further stressing the mutual opposition between these transcriptional factors and E-cadherin. Therefore, E-cadherin through the elimination of NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -catenin transcriptional activity might be stimulating its own synthesis. This hypothesis would be supported by data of other authors (Conacci-Sorrell et al., 2003) that have evidences the high degree of plasticity of the epithelial phenotype.

The interference by E-cadherin in  $\beta$ -catenin-dependent gene expression has been extensively studied by many authors. It is well accepted that, while  $\beta$ -catenin/E-cadherin interaction allows the maintenance of a protein complex which constitutes the structural core of the adherens contacts, it impedes  $\beta$ -catenin translocation to the nucleus and its transcriptional activity (Orsulic et al., 1999). However, additional factors are also involved in the control of gene transcription by E-cadherin, since the effects of the loss of this protein on tumour progression are not entirely  $\beta$ -catenin-dependent (Herzig et al., 2007). At this respect, an inverse

correlation between E-cadherin levels and NF- $\kappa$ B activity has been reported in several systems (Huber, et al., 2004; Kuphal et al., 2004; Kuphal and Bosserhoff, 2006; Shin et al., 2006), although the mechanism underlying this effect has not yet been clarified. The results given in this article are the first evidence that NF- $\kappa$ B, like  $\beta$ -catenin, is regulated by E-cadherin-dependent immobilization at the membrane. Although this interaction explains the negative effect of E-cadherin on NF- $\kappa$ B-dependent transcription we can not discard additional E-cadherin depending regulation, for instance decreasing the levels of co-activators of this transcriptional factor.

Competition between NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -catenin transcriptional pathways has been reported (Deng et al., 2002). Their conclusion was based on the indirect interaction detected between the two proteins. However, our results showing that  $\beta$ -catenin and p65 are both bound to the Fibronectin promoter during gene activation are compatible with the hypothesis that the simultaneous activation of both pathways is required for the activation of specific genes during EMT (Brabletz, 2005; Huber et al., 2005). According to our data, NF- $\kappa$ B transcriptional activity is mainly inhibited by the adherens junction-associated pool of  $\beta$ -catenin and not by the transcriptional nuclear pool. Since the interaction between NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -catenin does not seem to be direct, it is likely that the factor mediating this binding is not present in the nucleus and only acts when  $\beta$ -catenin is associated with the junctional complex, where this putative factor might be located. Moreover, this indirect interaction with the cadherin-catenin complex would help to explain why the differences between disruption of the complex by E-cadherin depletion or Kras-triggered phosphorylation of catenins affect distinctly the association of NF- $\kappa$ B with the components of the junctional complex.

Our results suggest that the pool of NF- $\kappa$ B bound to E-cadherin is much smaller than the pool bound to I $\kappa$ B $\alpha$ . However, this membrane pool has a functional relevance, since disruption of the junctional complex, for instance caused by depletion of E-cadherin, up-regulates NF- $\kappa$ B transcriptional activity. This effect is specific since this siRNA does not alter the association of p65 with I $\kappa$ B $\alpha$  that precludes the translocation to the nucleus and activation of the cytosolic pool. Our results suggest that this membrane-associated pool is the one mobilized during EMT and relevant for the expression of mesenchymal genes.

Given the results in this study, we propose a model to explain how E-cadherin inhibits mesenchymal gene expression and, in consequence, EMT. In epithelial cells with mature adherens junctions, p65 and  $\beta$ -catenin are stabilized in a membrane structure including E-cadherin. Disruption of contacts by E-cadherin repression, as it happens during EMT, releases these signalling molecules to the cytosol and, therefore, enables its translocation to the nucleus. According to this model, de-assembly of E-cadherin-mediated contacts would be necessary, but not sufficient for full mesenchymal gene expression, since before reaching the nucleus  $\beta$ -catenin



and NF- $\kappa$ B have to bypass additional regulatory mechanisms. These mechanisms might also be affected by EMT inducers such as Snail1. Once in the nucleus, p65 and  $\beta$ -catenin would mediate the activation of specific mesenchymal genes. Gene target specificity, how both signals cooperate and the possible additional effects of Snail1 are subjects for future studies. However, the synchronic binding of  $\beta$ -catenin and p65 to the Fibronectin promoter upon down-regulation of E-cadherin might be a requirement for the specific activation of Fibronectin, and possibly other mesenchymal genes, during EMT.

*Abbreviation list*

ChIP, Chromatin Immunoprecipitation; EMT, Epithelial-to-Mesenchymal Transition; G-418, geneticin; HPRT, Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; LEF, Lymphoid Enhancer Factor; mAb, monoclonal antibody; si RNA, short interfering RNA; TCF, T-Cell Factor.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Drs. H. Clevers and M. Van de Wetering for providing LS-174T-siRNA  $\beta$ -catenin and control cells and to Dr. M. Takeichi for reagents. GS was supported by a fellowship from the UAB; ME and DC, from the Ministerio de Educación; CA, from the FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias) and MP, from the DURSI (Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació). SP was supported by a La Cierva contract. This research was funded by FIS grants 01/3060 and 03/0925 to JB, SAF2006-00339 to AGH, BFU2006-03203 to MD, and SAF2004-01015 to AM. Partial support through grants from the Instituto Carlos III (RTICCC, C03710) and the Generalitat de Catalunya (2005SGR00970) is also appreciated.

## REFERENCES

- Barberà MJ, Puig I, Domínguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, Peiró S, et al.** (2004). Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene* **23**: 7345-7354.
- Barrallo-Gimeno A, and Nieto MA.** (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* **132**: 3151-3161.
- Battle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, et al.** (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **2**: 84-89.
- Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, and Kirchner T.** (2005). Migrating cancer stem cells: an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat. Rev Cancer* **5**: 744-749.
- Cano A, Pérez-Moreno A, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al.** (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* **2**: 76-83.
- Chen S, Mukherjee S, Chakraborty C, and Chakrabarti S.** (2003). High glucose-induced, endothelin-dependent fibronectin synthesis is mediated via NF-kappa B and AP-1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* **284**: 263-272.
- Chua CL, Bhat-Nakshatri, P, Clare, SE, Morimiya, A, Bavde, S., and Nakshatri, H.** (2007). NF- $\kappa$ B represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* **26**: 711-724.
- Conacci-Sorel M, Simcha I, Ben-Yedida T, Blechman J, Savagner P, and Ben-Ze'ev A** (2003). Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of b-catenin signalling, Slug and MAPK. *J. Cell Biol.* **163**: 847-857.
- De Craene B, Van Roy F, and Berx G.** (2005). Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal* **17**: 535-547.
- Domínguez D, Montserrat-Sentís B, Virgos-Soler A, Guaita S, Grueso J, Porta M, et al.** (2003). Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol. Cell Biol.* **23**: 5078-5089.
- Deng J, Miller SA, Wang HY, Xia W, Wen Y, Zhou BP, et al.** (2002).  $\beta$ -catenin interacts with and inhibits NF- $\kappa$ B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell* **2**: 323-333.
- Gordon MD, and Nusse R.** (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol. Chem.* **281**: 2429-2433.
- Gradl, D, Kuhl, M, and Wedlich, D.** (1999). The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Mol Cell Biol.* **19**: 5576-5587.

- Guaita S, Puig I, Francí C, Garrido M, Domínguez D, Batlle E, et al.** (2002). Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem* **277**: 39209-39216.
- Gustems, M., Borst, E., Benedict, C.A., Pérez, C., Messerle, M., Ghazal, P. and Angulo, A.** (2006). Regulation of the transcription and replication cycle of human cytomegalovirus is insensitive to genetic elimination of the cognate NF- $\kappa$ B binding sites in the enhancer. *J. Virol.* **80**: 9899–9904
- Herzig M, Savarese F, Novatchkova M, Semb H, and Christofori G.** (2007). Tumor progression induced by the loss of E-cadherin independent of  $\beta$ -catenin/TCF-mediated Wnt signaling. *Oncogene* **26**: 2290-2298.
- Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grunert S, Sommer A, Pehamberger H, et al.** (2004a). NF- $\kappa$ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* **114**: 569-581.
- Huber M A, Kraut N, and Beug H.** (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression *Curr Opin Cell Biol.* **17**, 548-558.
- Kuphal S, and Bosserhoff AK.** (2006). Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma. *Oncogene* **25**: 248-259.
- Kuphal S, Poser I, Jobin C, Hellerbrand C, and Bosserhoff AK.** (2004). Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma. *Oncogene* **23**: 8509-8519.
- Nose A, Nagafuchi A, and Takeichi M.** (1988). Expressed Recombinant Cadherins Mediate Cell Sorting in Model Systems. *Cell* **54**: 993-1001.
- Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, and Kemler R.** (1999). E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J. Cell Sci.* **112**: 1237-1245.
- Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, et al.** (2001). Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol.* **154**: 369-87.
- Pálmer HG, Larriba MJ, García JM, Ordúñez-Morán P, Peña C, Peiró S, et al.** (2004). The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nat Med* **10**: 917-919.
- Peiró S, Escrivà M, Puig I, Barberà MJ, Dave N, Herranz N, et al.** (2006). Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression. *Nucl. Acids Res.* **34**: 2077-2084.
- Piedra J, Miravet S, Castano J, Pálmer HG, Heisterkamp N, García de Herreros A, et al.** (2003). p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol* **23**: 2287-2297.

- Savagner P. (2001).** Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved in epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* **23**: 912-923.
- Shin SR, Sanchez-Velar N, Sherr DH, and Sonenshein GE. (2006).** 7,12-dimethylbenz(a)anthracene treatment of a c-rel mouse mammary tumor cell line induces epithelial to mesenchymal transition via activation of nuclear factor-kappaB. *Cancer Res* **66**: 2570-2575.
- Solanas G, Miravet S, Casagolda D, Castaño J, Raurell I, Corrienero A, et al. (2004).**  $\beta$ -catenin and plakoglobin N-and C-tails determine ligand specificity *J. Biol. Chem.* **279**:49849-49856.
- Tan C, Costello P, Sanghera J, Dominguez D, Baulida J, Garcia de Herreros A, and Dedhar S. (2001).** Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses  $\beta$ -catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, Snail, in APC  $-/-$  human colon carcinoma cells. *Oncogene* **20**: 133-136.
- Thanos D, and Maniatis T. (1995).** NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* **80**: 529-532.
- Thiery JP. (2002).** Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**: 442-454.
- van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. (2002).** The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* **111**: 241-250.
- van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Fong MTP, Brantjes H, van Leenen D, et al. (2003).** Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* **4**: 609-615.

## LEGENDS OF FIGURES

**Figure 1. E-cadherin represses Fibronectin and LEF1 gene expression.** Panel **A**: *Levels of E-cadherin and Snail1 proteins in SW-480 transfectants.* SDS-protein extracts obtained from SW-480 cells stably transfected with the indicated genes and grown until 50-60% confluence were analysed by Western blot with the indicated antibodies. Panel **B**: *E-cadherin expression down-regulates Fibronectin and LEF1 RNA levels.* Fibronectin and LEF1 RNAs were determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) in SW-480 cell lines. Values in these two genes are given in relation to the value in control SW-480 cells. Graphics show the average  $\pm$  standard deviation (SD) of three values obtained for every sample. Panel **C**: *E-cadherin expression down-regulates Fibronectin and LEF1 promoter activity.* Activities of -341/+265 Fibronectin promoter and -735/+1077 LEF1 promoter were determined after transfection to subconfluent SW-480 stable transfectants of these promoters inserted in pGL3 plasmid as described. The Figure gives the average  $\pm$  SD of two experiments performed in triplicate samples, and is referred to the value obtained in control SW-480 cells. Panel **D**: *Cell culture confluence regulates SW-480 E-cadherin levels.* SW480 ADH cells were grown at standard conditions till 50-60% confluence (subconf) or 3 days after 100% confluence (conf). 1% SDS total protein extracts were obtained and analysed by Western blot with anti-E-cadherin or anti-pyruvate kinase mAbs. Panel **E**: *Fibronectin and LEF1 expression decrease in confluent SW-480 cells.* Fibronectin and LEF1 RNAs were determined by qRT-PCR and values (average  $\pm$  SD) referred to the value obtained in the sub-confluent cells. Panels **F** and **G**: *Interference in E-cadherin expression up-regulates Fibronectin and LEF1 RNA levels.* Cells expressing a short interfering RNA specific to E-cadherin or a scrambled control were cultured till confluence and E-cadherin or Actin levels were determined by Western blot (**F**). In parallel, Fibronectin, LEF1 or HPRT RNA content were determined in these cells by semi-quantitative RT-PCR (**G**).

**Figure 2.  $\beta$ -catenin depletion down-regulates Fibronectin and LEF1 transcripts levels.** Panels **A** and **B**: *Snail1 increases Fibronectin and LEF1 genes in LS174T cells.* RNAs were extracted from LS174T control cells transfected with Snail1 in an eukaryotic expression vector and analysed by semi-quantitative (Panel **A**) or qRT-PCR (Panel **B**) with specific oligonucleotides for the indicated genes. Representative clones are shown in **A**; the average of the results obtained with three different clones in **B**. Panel **C**: *Inducible repression of  $\beta$ -catenin in LS-174T clones.* Total cell protein extracts or RNAs were obtained from clones expressing Snail1 (clones S) or controls (clones C). When indicated, doxycycline (1  $\mu$ g/ml) was added for 6 days prior to the preparation of the extracts.  $\beta$ -catenin and Snail1 expression were analyzed by Western blot with specific mAbs. Anti  $\alpha$ -tubulin was used as a loading control. Endogenous full-length TCF-4 mRNA and exogenous  $\Delta$ TCF-4 plus endogenous TCF-4 mRNA were also

analysed by RT-PCR. As control, HPRT levels were determined. Panel **D**: *siRNA  $\beta$ -catenin decreases Fibronectin and LEF1 transcript levels*. RNA was obtained from the above-mentioned cell clones and levels of Fibronectin, LEF1 and c-Myc were determined by qRT-PCR. As control, HPRT RNA levels were determined. The Figure shows the ratio plus/minus doxycycline of the three genes indicated. The average  $\pm$  SD of two independent experiments performed in duplicate with two representative clones is shown.

**Figure 3. E-cadherin controls the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin on Fibronectin promoter.** Panel **A**: *Snail1 and E-cadherin modulate  $\beta$ -catenin/TCF4 transcriptional activity*. The activity of a  $\beta$ -catenin/TCF4-dependent promoter (TOP) was determined in SW-480 cells stably transfected with Snail-HA, E-cadherin or both. The results are the average  $\pm$  SD of three experiments performed. Panel **B**: *Binding of  $\beta$ -catenin to Fibronectin promoter is sensitive to E-cadherin*. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were carried out as described in Methods, immunoprecipitating crosslinked nuclear extracts from SW-480 cells stably transfected with the indicated genes. The figure shows the average  $\pm$  SD of two experiments performed.

**Figure 4. E-cadherin inhibits NF- $\kappa$ B transcriptional activity on Fibronectin promoter** Panel **A**: *Binding of NF- $\kappa$ B to Fibronectin promoter is sensitive to E-cadherin*. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were carried out as described in Methods, immunoprecipitating crosslinked nuclear extracts from SW-480 cells stably transfected with the indicated genes. The figure shows semi-quantitative analysis from one experiment of the three performed (right) or the average  $\pm$  SD of quantitative analysis of three experiments (left). Panel **B**: *E-cadherin controls p65 association to DNA*. Gel shift assays were performed as described in Methods with an oligonucleotide containing a NF- $\kappa$ B consensus binding element or a mutated form of this element. Nuclear extracts from SW-480-Snail1 or SW-480-Snail1 E-cadherin cells were used. When indicated, binding of the radioactive probe was competed with a 10 or 50-fold excess of non-radioactive probe. Arrows show the two specific bands detected with this assay; black arrowheads, non-specific bands; and the open arrowhead, the migration of the free probe. Panel **C**: *Snail1 and E-cadherin modulate NF- $\kappa$ B transcriptional activity*. The activity of an NF- $\kappa$ B-dependent promoter (NF3) was determined in SW-480 cells stably transfected with Snail-HA, E-cadherin or both. The same experiment was done in MiaPaca-2 cells transiently transfected with these two cDNAs. The results correspond to the average  $\pm$  SD of three experiments performed.



**Figure 5. E-cadherin prevents  $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B nuclear localization.** Panel **A**: *Cell fractionation of p65 and  $\beta$ -catenin.* Subcellular fractions were prepared from the indicated cells and analyzed by Western blot. Lamin B1 and TBP expression were used as nuclear markers; pyruvate kinase and E-cadherin, as markers for the cytosolic plus membrane fraction. Panel **B**: *Immunolocalization of p65 and  $\beta$ -catenin in the presence of E-cadherin.* Analysis of  $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B subcellular localization was carried out in SW-480 Snail1 or SW-480-Snail1 + E-cadherin cells by immunofluorescence using mAbs against these two proteins. No signal was obtained when the same analysis was performed in the absence of primary antibody. Panel **C**: *Colocalization of p65 and E-cadherin.* The subcellular distribution of NF- $\kappa$ B p65 subunit and E-cadherin was determined by immunofluorescence in SW-480 E-cadherin cells as mentioned above using specific mAbs against these two proteins. The upper row shows an amplified area selected from the panels presented below. A xz section is shown in the bottom row.

**Figure 6. NF- $\kappa$ B associates with E-cadherin and other components of the junctional complex.** Panel **A**: *NF- $\kappa$ B co-immunoprecipitates with E-cadherin and  $\beta$ -catenin.* p65-NF- $\kappa$ B was immunoprecipitated from whole-cell extracts of SW-480 cells stably transfected with Snail1-HA and E-cadherin. The associated proteins were analysed with specific mAbs against E-cadherin  $\beta$ -,  $\alpha$ - and p120-catenin. Panel **B**: *NF- $\kappa$ B associates with E-cadherin and E-cadherin-associated proteins.* Pull-down assays were performed by incubating 5 pmol of the different GST-fused proteins with 500  $\mu$ g of whole-cell extracts from confluent SW-480 cells. Protein complexes were affinity-purified with glutathione-Sepharose and analysed by Western blotting with anti-p65 mAb. Blots were re-analyzed with anti-GST antibodies to ensure equal loading of samples. 3% of the total cell extracts used for the assay was loaded in the input lane. When indicated, 25 pmols of cytoE-cadherin recombinant protein were added to the binding assays. Panel **C**: *NF- $\kappa$ B interacts only with E-cadherin-associated  $\beta$ -catenin.* Extracts prepared as in **A** from IEC-18 cells expressing E-cadherin were immunoprecipitated with a mAb specific to E-cadherin in two successive rounds. Presence of p65 and  $\beta$ -catenin was analyzed in both immunocomplexes by Western blot. The supernatant of the second E-cadherin immunoprecipitation was incubated with a  $\beta$ -catenin mAb; analysis of the immunoprecipitate, as well as the input, was performed with mAbs specific to E-cadherin or p65. Panel **D**: *I $\kappa$ B $\alpha$  prevents association of NF- $\kappa$ B with E-cadherin.* NIH3T3 fibroblasts were transfected with 7.5  $\mu$ g of pcDNA3 control or with E-cadherin and I $\kappa$ B $\alpha$  S32/36A mutants (a kind gift from Dr. A. Bigas, IDIBELL, Barcelona, Spain). After 48 h., cell extracts were prepared and p65-NF- $\kappa$ B was immunoprecipitated. The presence of E-cadherin, catenins and I $\kappa$ B $\alpha$  in the complexes was analysed by Western blot with specific mAbs. The results in this Figure correspond to an experiment representative of at least three performed.

**Figure 7. Disruption of E-cadherin-mediated contacts activates NF- $\kappa$ B transcriptional activity.** Panel **A**: *K-ras* expression down-regulates E-cadherin interaction with p65. p65-NF- $\kappa$ B was immunoprecipitated from total cell extracts prepared from IEC or IEC-Kras cells. Immunocomplexes were analysed by Western blot with mAbs against E-cadherin  $\beta$ -,  $\alpha$ - and p120-catenin. The results given in this Figure correspond to an experiment representative of at least three performed. Panel **B**: *E-Cadherin siRNA affects association of p65 to junctional complex components.* IEC cells were transfected with a siRNA specific to E-cadherin or with an irrelevant siRNA as control. Total extracts were prepared, p65-NF- $\kappa$ B was immunoprecipitated and immunocomplexes were analyzed by Western blot with mAbs against E-cadherin  $\beta$ -,  $\alpha$ - and p120-catenin. The results given in this Figure correspond to an experiment representative of at least three performed. Panel **C**: *E-Cadherin siRNA increases the p65 nuclear levels.* Presence of p65 in the nucleus was determined by Western blot analysis of cell fractions prepared from cells transfected with E-cadherin siRNAs or irrelevant siRNAs, as indicated above. Lamin B1 and TBP or pyruvate kinase were used as nuclear and cytosolic markers, respectively. Panels **D** and **E**: *E-Cadherin siRNA increases NF- $\kappa$ B transcriptional activity.* IEC cells were transfected with irrelevant or E-cadherin siRNAs and NF3 reporter plasmid. Luciferase activity was determined after 48 hours and shown as average  $\pm$  SD of three experiments performed in triplicate. In **E**, cells were deprived of serum for 16 hours and incubated with TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) for 6 hours before analysis of NF3 promoter activity.

**Figure 1 :**

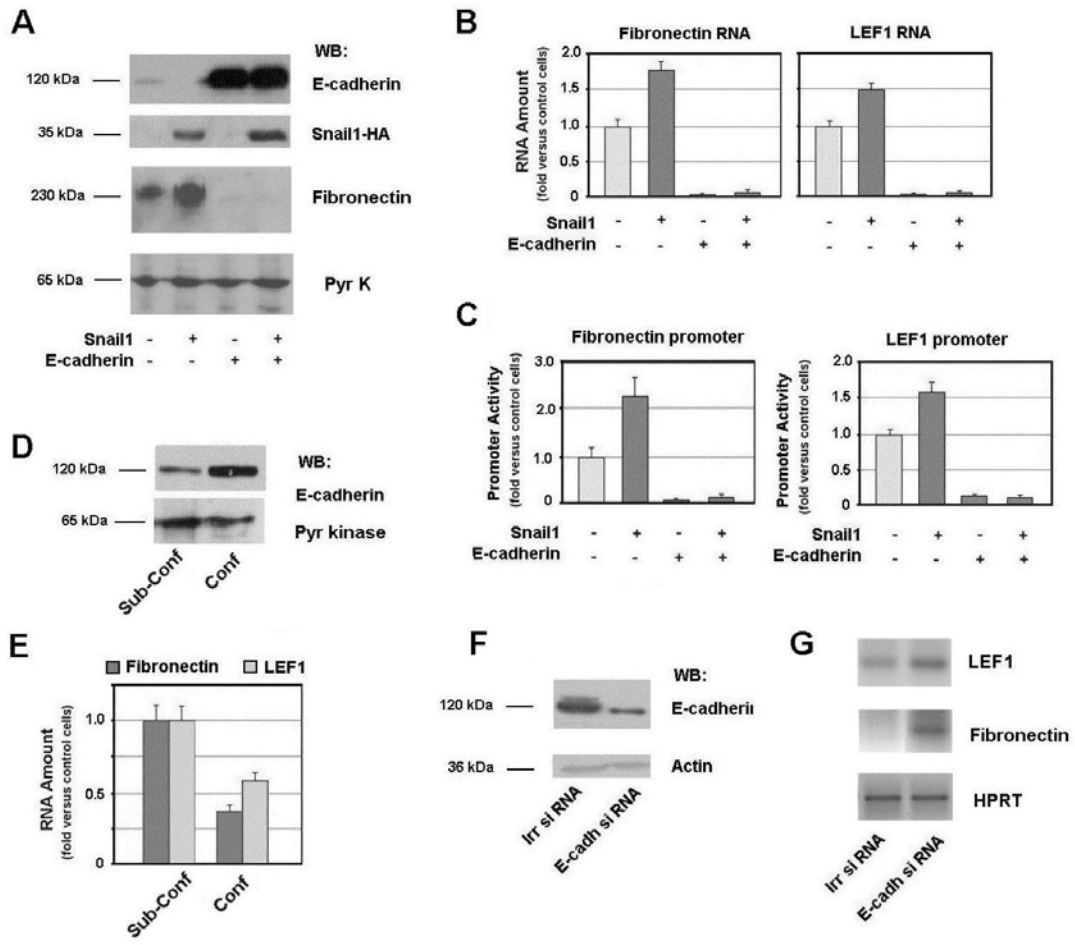


Figure 2 :

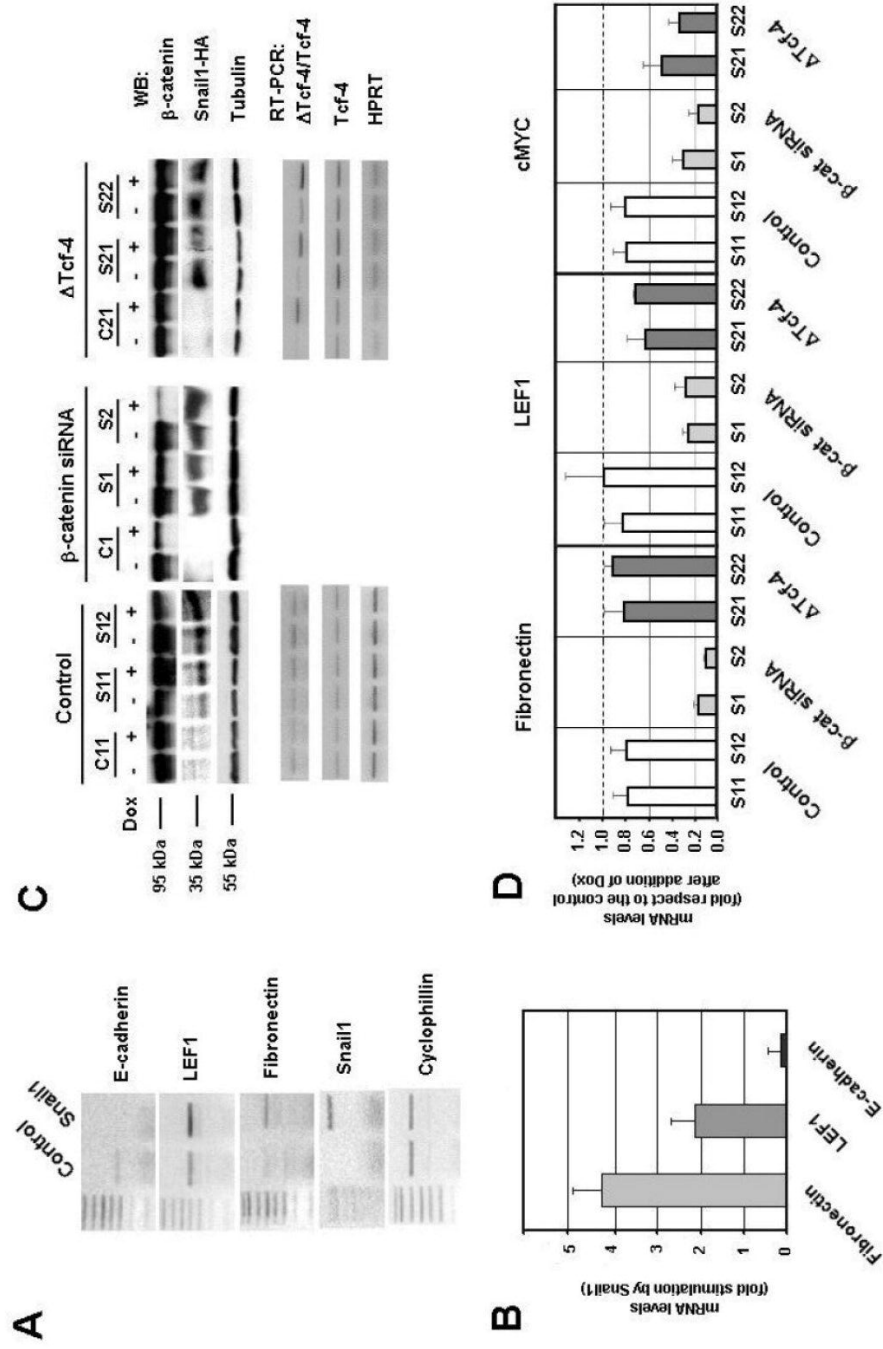


Figure 3 :

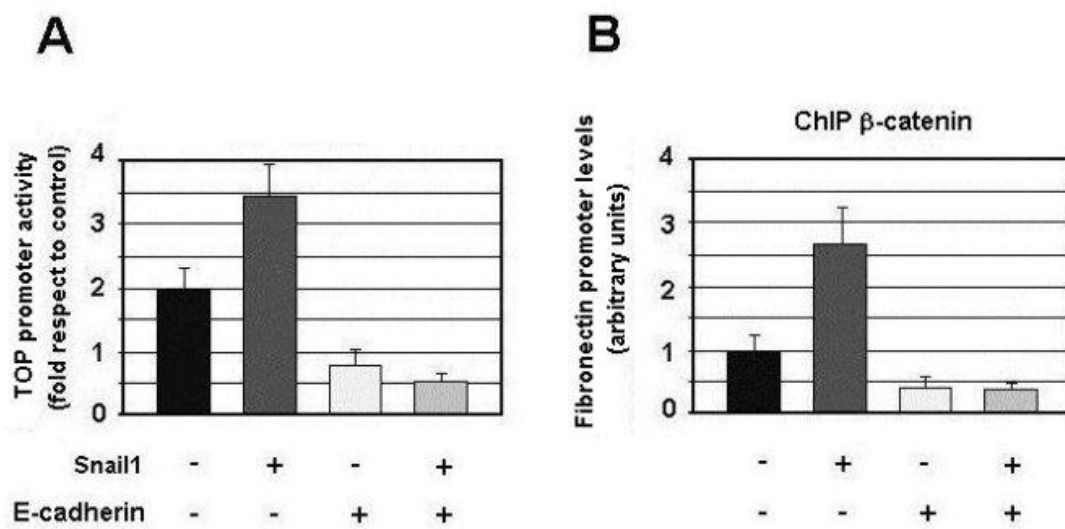


Figure 4 :

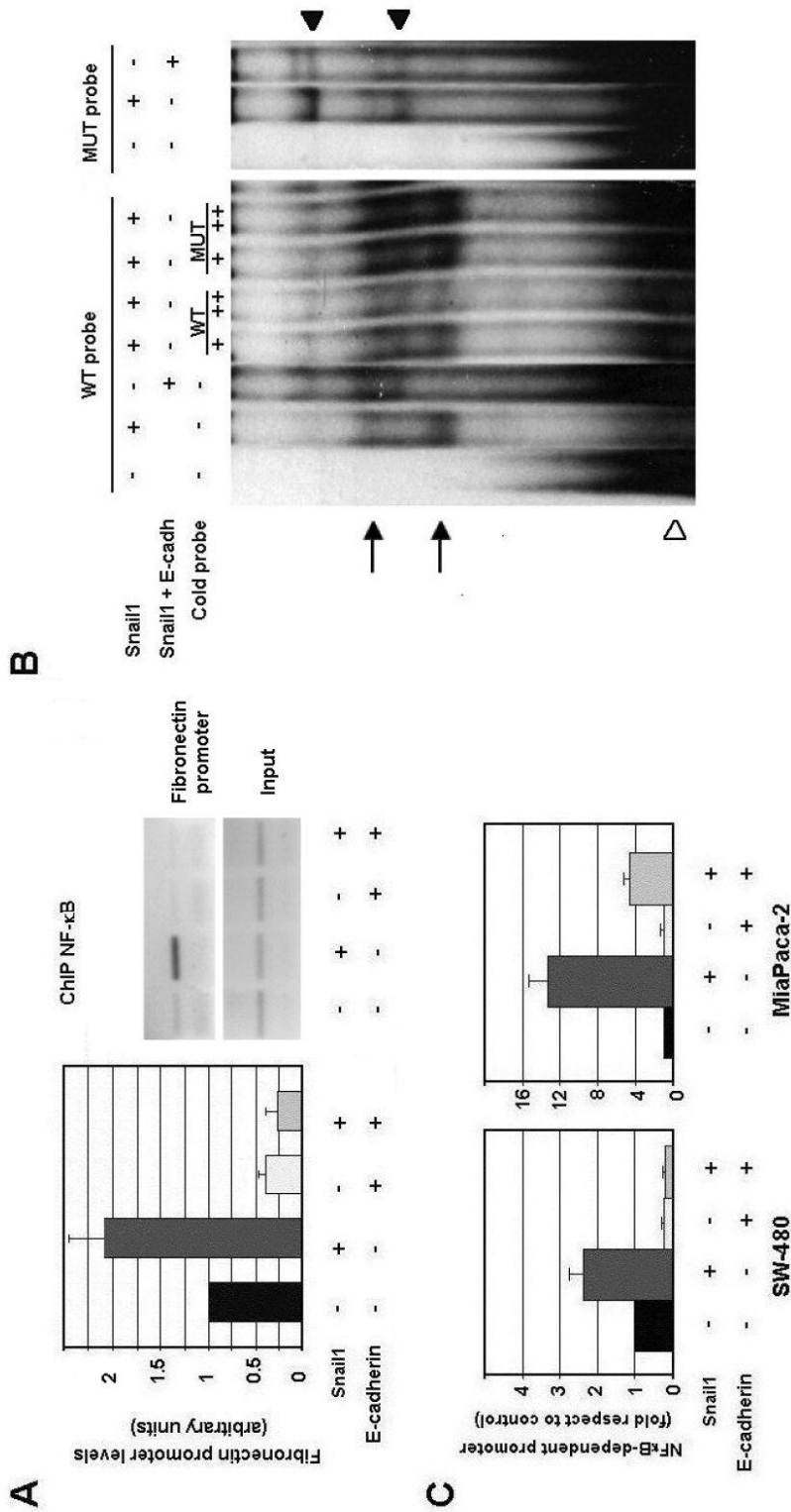
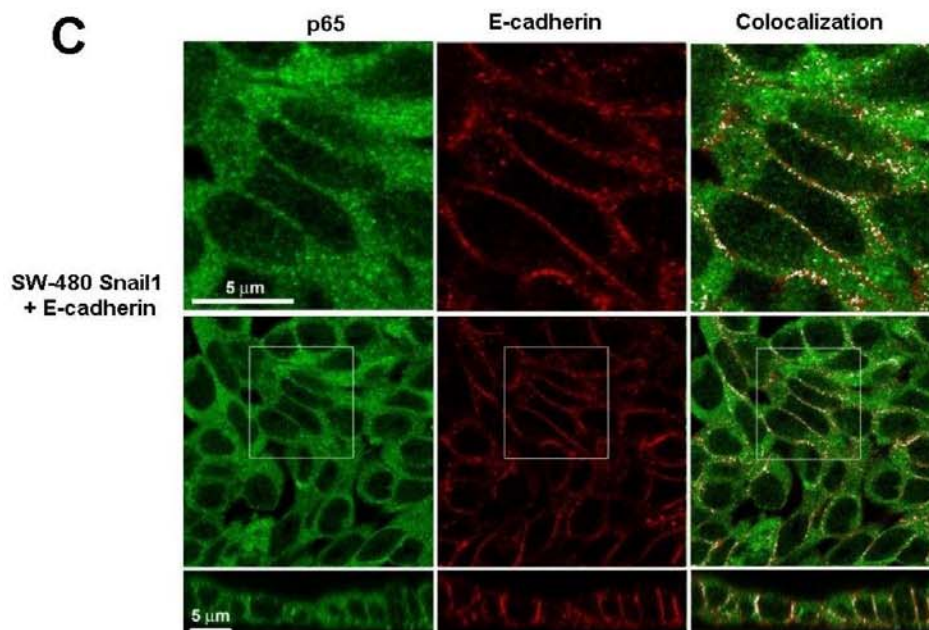
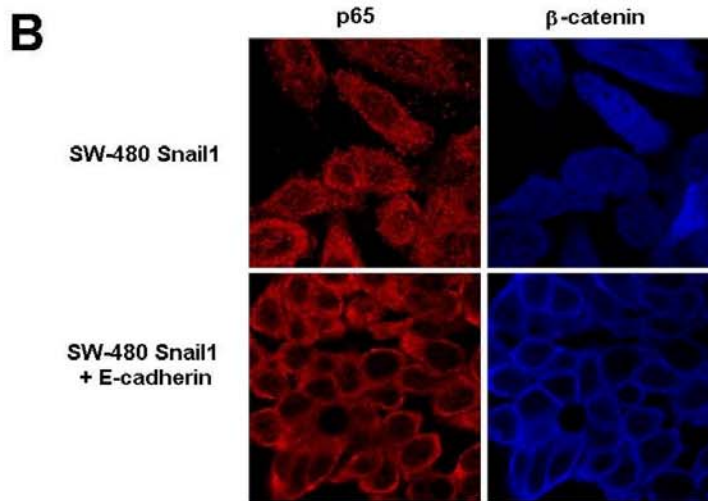
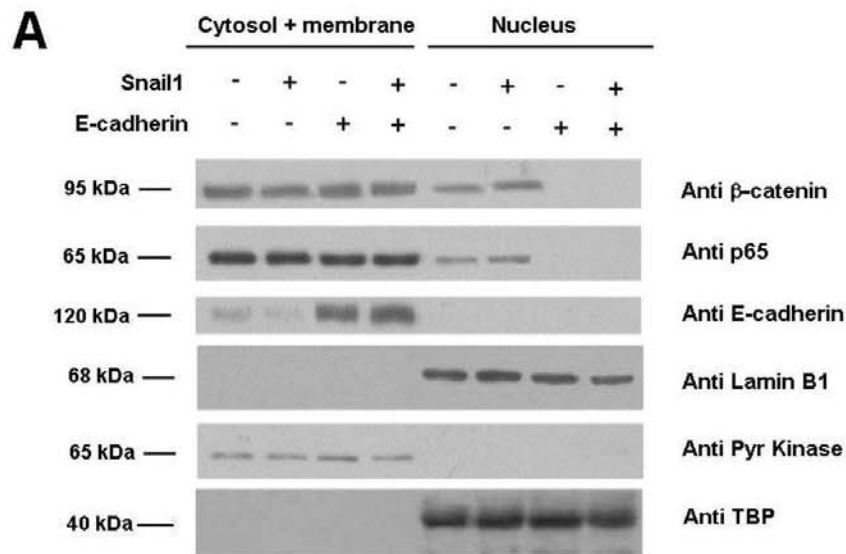
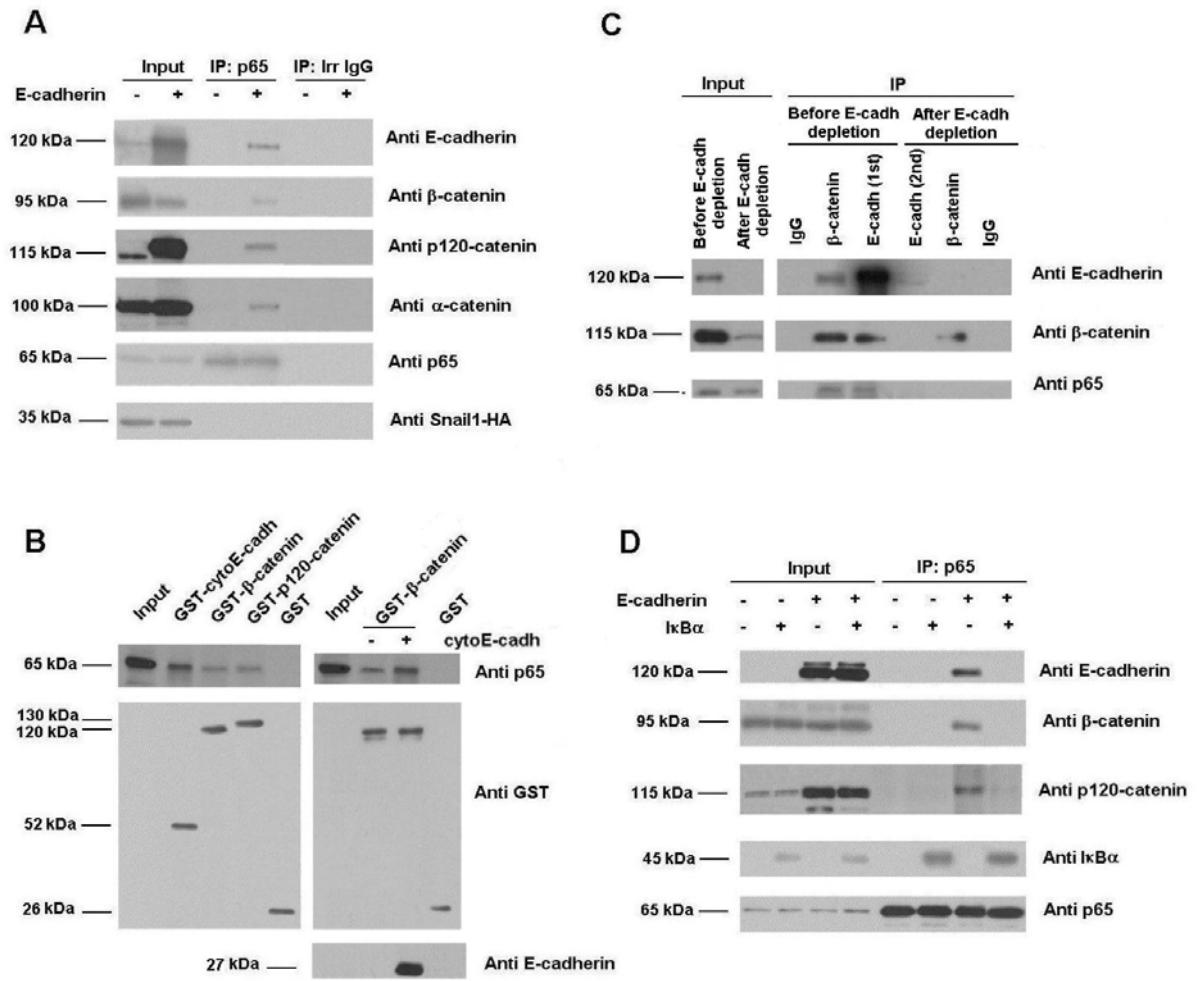


Figure 5 :

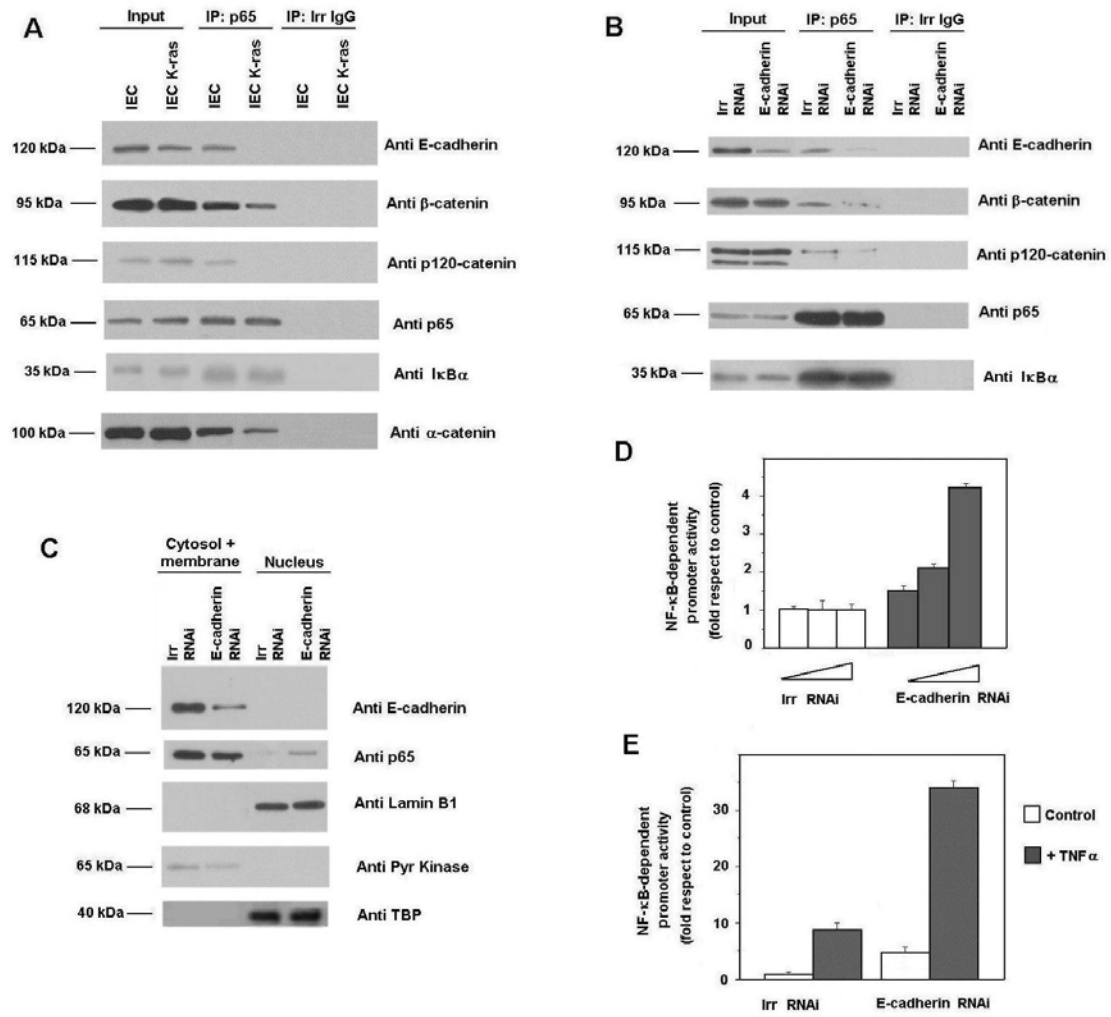


**Figure 6 :**





**Figure 7 :**



## **Supplementary information to:**

E-cadherin controls  $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B transcriptional activity on mesenchymal gene expression.

Guiomar Solanas, Montserrat Porta-de-la-Riva, Cristina Agustí, David Casagolda, Francisco Sánchez-Aguilera, Ferran Pons, Sandra Peiró, Maria Escrivà, María Jesús Larriba, Alberto Muñoz, Mireia Duñach, Antonio García de Herreros and Josep Baulida.

## **Figure legends**

**Supplemental Figure 1. Concomitant induction of Fibronectin and repression of E-cadherin by ectopic Snail1 expression.** RNAs were extracted from HT-29 M6 cells transfected with Snail1 under the control of tet-off system (Batlle et al., 2000), and analyzed by RT-PCR and Southern blot. Incubation of these cells without doxycycline (dox) induces the expression of the Snail1 transgene. At day zero, 2  $\mu$ g/ml of doxycycline was added to the medium to turn-off Snail expression. The figure shows a representative experiment of three performed.

**Supplemental Figure 2. Activity of LEF1 promoter, but not Fibronectin promoter, is sensitive to TCF-4/ $\beta$ -catenin activity.** RWP1 cells were cotransfected with TOP plasmid (25 ng), pGL3-LEF1 promoter (100 ng) or pGL3-Fibronectin promoter (100 ng) and pcDNA3 containing VP16-TCF-4 (5 ng),  $\Delta$ TCF-4 (250 ng), or empty vector as a control, and 1 ng of pRL-SV40. Luciferase activity was assayed after 48h of expression. Graphics show the promoter activity induced by the indicated Wnt pathway effectors relative to the basal promoter activity in presence of empty pcDNA3. The error bars indicate standard deviation.

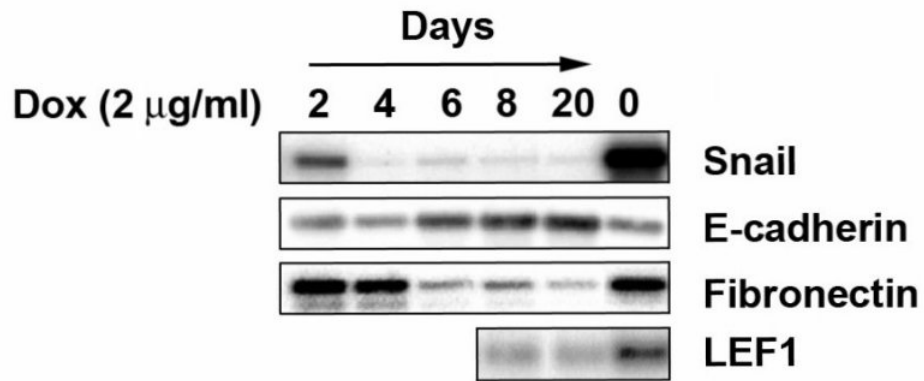
**Supplemental Figure 3.  $\beta$ -catenin-depletion affects  $\beta$ -catenin dependent signalling in Ls174T cells.** Panel **A**: Ls174T siRNA  $\beta$ -catenin cells grown on glass coverslips were treated with or without doxycycline (1 $\mu$ g/ml) for 6 days. Cells were fixed with 4% PFA and analysed by immunofluorescence with a  $\beta$ -catenin mab. Panel **B**: Ls174T Control,  $\beta$ -catenin siRNA and  $\Delta$ TCF4 mRNA teton clones were cotransfected with 250 ng of TOP plasmid and 1 ng of pRL-SV40. Luciferase activity was assayed after 48h of expression in the presence or absence of 2 $\mu$ g/ml of Doxycycline. Graphics show the promoter activity relative to the basal promoter

activity in the absence of Doxycycline. The error bars indicate standard deviation. Equivalent results were obtained in the same clones cotransfected with 25 ng of a pcDNA-Snail-HA vector.

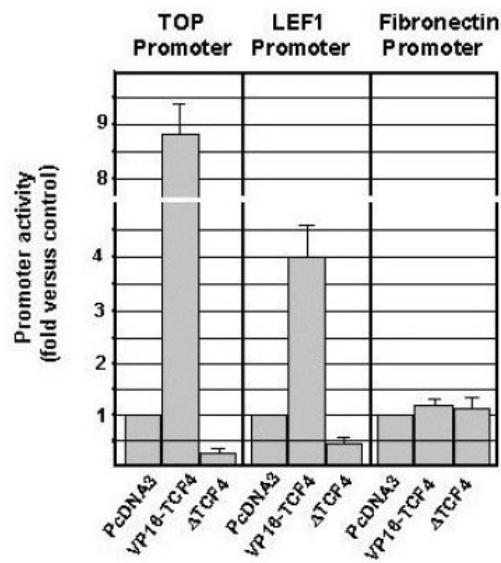
**Supplemental Figure 4. Fibronectin and LEF1 promoters are sensitive to VP16-Rel.** The activity of Fibronectin and LEF1 promoters was assayed in SW-480 cells cotransfected with increasing amounts (10 and 25 ng) of VP16-Rel expression plasmid. The figure shows the average  $\pm$  SD of three experiments performed in triplicate.

**Supplemental Figure 5: Localization of p65 and E-cadherin in IEC-18 cells.** The cellular distribution of p65 and E-cadherin was determined by immunofluorescence as previously described. When indicated cells were treated with TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) for 6 hours prior to the analysis, and washed with PBS plus 0,025% NP-40 prior to fixation to decrease cytosolic staining. A detail of the area indicated is shown at right panels. The arrows point to areas where presence of p65 in the membrane was more clearly shown.

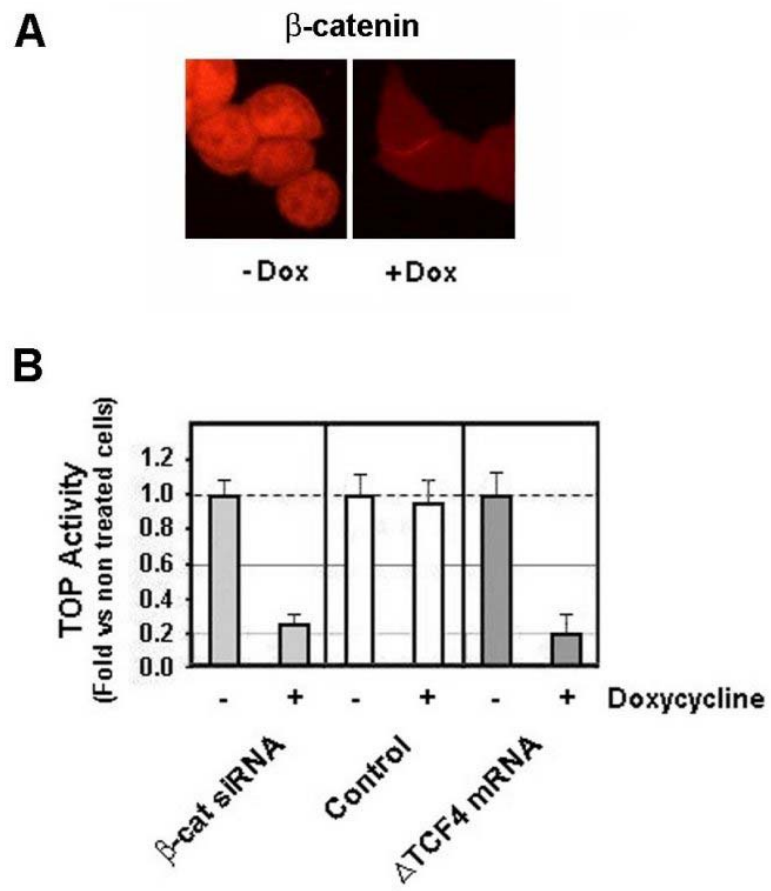
Supplemental Figure 1:



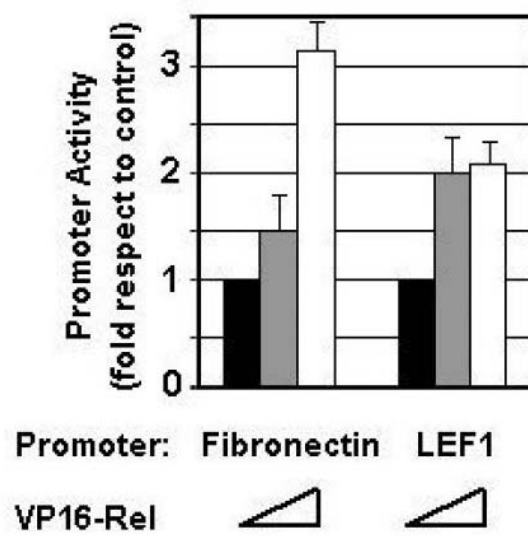
Supplemental Figure 2:



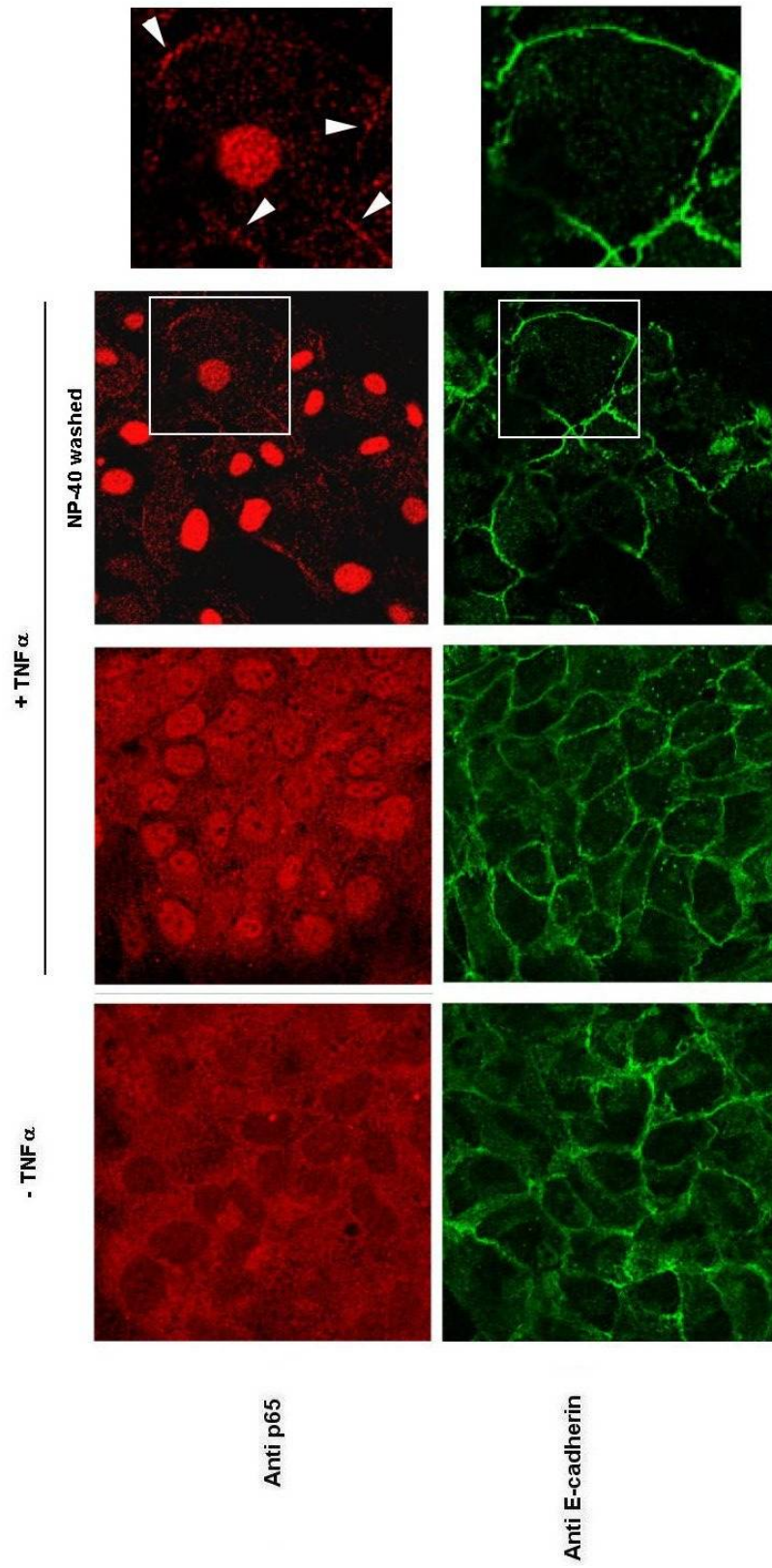
Supplemental Figure 3:



Supplemental Figure 4:



Supplemental Figure 5:



**Supplementary Table 1: Oligonucleotides used for quantitative and semiquantitative RT-PCR and PCR.**

Oligonucleotide Sequences (Foward/Reverse)	Figures	Template DNA
5'-AGCAAGCCCGGTTGTTATG/ 5'-AACCAACGCATTGCCTAGGT/	1B, 1E, 2B, 2D	Fibronectin
5'-GTGCCTGGGCAACGGA/ 5'-CCCGACCCTGACCGAAG	2A	Fibronectin
5'-CGAAACCGGGAAGAGCAA/ 5'-AACAGCCAGGCTTGCTCTGAC	1F	Fibronectin (Rat)
5'-CGAAGAGGAAGGCGATTTAG/ 5'-GTCTGGCCACCTCGTGTC	1B, 1D, 2B, 2D	LEF1
5'-CTGCGCCACGGACGAG/ 5'-GAGAGGATGGACCGCATGG	2A	LEF1
5'-CGAAGAGGAGGGCGACTTAG/ 5'-GTCTGACCACCTCATGCC	1F	LEF1 (Rat)
5'-ATGGTCAACCCACCGTG/ 5'-TGCAATCCAGCTAGGCATG	1B, 2A	Cyclophilin
5'-GGCCAGACTTTGTTGGATTTG/ 5'-TGCGCTCATCTTAGGCTTTGT	1D, 2C, 2D	HPRT
5'-CAGGACCCGCTTCTCTGAAA/ 5'-ATAGTTCCTGTTGGTGAAGCTAACG	2D	c-MYC
5'-TTCCTCCAATACATCTCCCTTCACAGCAG/ 5'-CGAAGAAACAGCAAGAGCAGCAGAATCAGA	2A, 2B	E-cadherin
5'-GGCGGATCCACCATGCCGCGCTCCTTCCTGGTC/ 5'-CCGGATATCCGCGAGGGCCTCCGGAGCA	2A	Snail1 (mouse)
5'-CCACCATGGAAAACCTCCTCGGCAGAG/ 5'-CATCTGGAGATAGGTTCCGGGCGGTGGGCGT	2C	$\Delta$ TCF-4/TCF-4
5'-CCACCATGCCGCGAGCTGAACGGCGGT/ 5'-CATCTGGAGATAGGTTCCGGGCGGTGGGCGT	2C	TCF-4

