

Caracterització de la funció del DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*) en cèl·lules epitelials en relació als processos de diferenciació i adhesió cel·lular.

Mercè Martín Peña

**Institut Municipal d'Investigació Mèdica
Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular**

Barcelona, Maig 2001

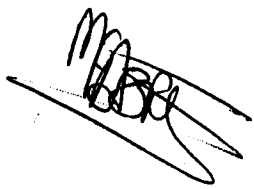
**Universitat de Barcelona
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

Memòria presentada per Na Mercè Martín Peña per a optar al grau de Doctor en Biologia per la Universitat de Barcelona.

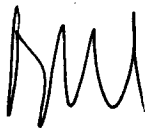
Tesi doctoral realitzada sota la direcció dels doctors Myriam Fabre i Francesc Xavier Real Arribas, a la Unitat de Recerca en Biologia Cel·lular i Molecular de l'IMIM (Institut Municipal d'Investigació Mèdica).

Tesi adscrita al departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, sota la tutoria del doctor Antonio Zorzano Olarte.

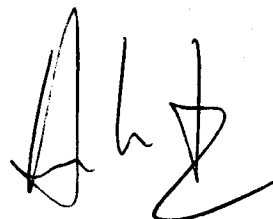
Vist i plau dels directors i del tutor,



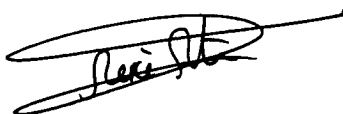
M. Fabre



F. X. Real Arribas



A. Zorzano Olarte



M. Martín Peña

A tots els que heu col·laborat de prop o de lluny
a la realització d'aquest treball.

AGRAÏMENTS

Ara que ja quasi aquesta etapa s'ha acabat, crec que és hora de dir-vos que us he enganyat a tots o quasi a tots al fer-vos creure que sóc gafe. Realment he de reconèixer que he tingut molta sort. Sort d'haver topat amb la Myriam, accessible al 100% que no només m'ha fet de "jefa" sino també de companya i amiga. Un Gros Merci Myriam. Sort de que malgrat no tenir temps ni per a respirar, en Paco ha trobat sempre el moment de discutir amb nosaltres i les ganes per a aportar idees. Sort de que aquells que van pensar que aquella nena antipàtica que arribà un dia a l'IMIM i de la que creien que no se'n podria treure cap profit fora del laboratori, van canviar aviat d'idea per esdevenir després, no només en uns excel·lents companys de feina, sino uns bons amics. Aquí faig referència especialment al Leo i a l'Edu però en l'apartat d'excel·lents companys, i en molts casos amics, hi són tots amb qui he compartit aquests anys de feina i hem passat tantes estones, de les quals en guardo molt bon record: Els cafés amb discussió inclosa, a vegades científica i a vegades filosòfica, amb el Fausto, el Santi, l'Olga, els Víctors. La franquesa de la Teresa. La noblesa del Nour. El caràcter formidable i la bona disposició del Toni. Els bons consells dintre i fora de la sala de cultius de la Carme Torns. Els "truquis" de la Marta per tallar al criostat i incloure tota mena de teixits, cèl·lules ó agregats per molt estranys que fossin. L'ajuda de la Sílvia dintre de l'estabulari. L'experiència de l'ex-Dr. Nude amb els ratolins, així com els bons moments passats fora de l'IMIM. L'energia dintre i fora del laboratori de l'Elena. L'espontaneïtat fantàstica de la Maria del Mont i els consells i el caràcter extraordinari d'en Jepi. Les xerrades amb l'Anna per sota de les estanteries que ens separaven les taules. El companyerisme d'en David. L'exemple a

seguir de l'Antonio. Crec que a molts ens agradaria portar una vida científica com al seva "quan siguem grans". L'ajut i l'amabilitat de la Montse, la Clara i la Carme en molts moments de la trajectòria d'aquesta tesi. Tampoc m'oblido de tots els que heu entrat més cap al final del meu pas per l'IMIM: l'Arrate, la Pilar, la Mercè, el Xavi, el Josep M^a, en Francesc i especialment l'Anouska i en Gabriel amb qui encara he estat a temps de discutir amb ells part del treball. I l'aire nou de la Clara, el Maurici, l'Isabel, la Sandra, el Micky, la Susanna, amb qui quasi només he pogut compartir la història del meu últim western.

Sort de la IMIMitable, que m'ha fet descobrir la passió pel teatre i amb qui he compartit tants bons moments i tantes estrenes memorables.

També he tingut sort de col·laborar amb grups amb qui ha estat un plaer treballar i que han enriquit els meus coneixements així com els resultats d'aquesta tesi. Gràcies a l'Eduardo Soriano, al Toni del Río, a la Soledad Alcántara i a en Ferran Burgaya per tot el material, idees i temps invertit. Un gros merci à tous les gens du group de recherche de la Dr. Kedingger qui m'ont si chaleureusement accueilli dedans et dehors du labo. C'était un vrai plaisir travailler avec vous. Aussi merci à Paul Mangeat et à Marianne Martin pour sa collaboration et son accueil dans son labo et dans le cas de Marianne aussi dans sa maison.

Sort de l'Alícia Gómez que no va deixar d'encoratjar-me mai a que fes una tesi si realment era el que em feia il·lusió, muchas gracias. Sort de continuar en contacte amb la gent de l'altre costat de l'Atlàntic, que malgrat la distància han estat tot lo propers que el mail i algunes escapades ens han permés d'estar.

Merci especialment à Éric, Cathérine et Jacques. Sort del recolzament de les amistats “de tota la vida”. Gràcies a la Carme, la Glòria, la Rosa, l'Esther, l'Aurora i els seus companys. Sort d'haver compartit paral·lelament aquesta tesi amb la del Jordi. “Vidas paralelas” deia el Ferran Sanz. Moltes gràcies pels bons moments que hem passat junts malgrat l'estrés que alguns cops ens ha acompanyat.

I sort, molta sort, de tenir uns pares com els que he tingut. Especialment gràcies a la meva mare i a la meva germana que han estat sempre al meu costat.

I per acabar, he de dir que fins i tot he tingut sort d'escriure aquesta tesi al mateix temps que treballar en el grup de recerca d'en Senén Vilaró. Gràcies a tot el grup per tota la comprensió que heu demostrat durant aquest any en que he tingut “la neurona” dividida en dos.

LLISTA D'ABREVIACIONS

ADP	<i>Adenosin diphosphate</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ARF	<i>Activin responsive factor</i>
ATP	<i>Adenosin triphosphate</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BP180	<i>Bullous pemphigoid antigen 180</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosin monophosphate</i>
cDNA	<i>Codificant desoxiribonucleix acid</i>
CEA	<i>Carcinogenic embryonic antigen</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane regulator</i>
cpm	Comptes per minut
DAB	Diaminobenzidina
DAL-1	<i>Differentially expressed in adenocarcinoma of the lung</i>
DCC	<i>Deleted in colorectal cancer</i>
DMEM	<i>Dulbeco's modified Eagle's medium</i>
DPC-4	<i>Deleted in pancreatic cancer 4</i>
DPP IV	Dipeptidilpeptidasa IV
EBP50	<i>Ezrin binding protein 50</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ERM	<i>Ezrin Radixin Moesin</i>
F-actin	<i>Filamentous actin</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FAP	<i>Familial adenomatous polyposis</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FGF	<i>Fibroblastic growth factor</i>
FN	Fibronectina
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDI	<i>GDP dissociation inhibitors</i>
GDP	<i>Guanosin diphosphate</i>
GEF	<i>GDP exchange factor</i>
GSK-3 β	<i>Glycogen synthase kinase</i>
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>
GTP	<i>Guanosin triphosphate</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HNPCC	<i>Hereditary non-Polyposis colorectal cancer</i>
HPMA	Hidroxipropil metacrilat

IGF	<i>Insuline-like growth factor</i>
IPTG	<i>Isopropyl b-D-Thiogalactopyranoside</i>
JNK	<i>Jun kinase</i>
LOH	<i>Loss of heterozigosity</i>
LPA	<i>Lysophosphatidic acid</i>
MAP	<i>Microtubule associated protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Min	<i>Multiple intestinal neoplasia</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
N-CAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
NF-2	<i>Neurofibromatosis-2</i>
NGF	<i>Neuronal Growth Factor</i>
PAK	<i>p21 activated kinase</i>
PanIN	<i>Pancreatic intraductal neoplasia</i>
PDGF	<i>Plateled derived growth factor</i>
PI(4,5)P ₂	<i>Phosphatidil inositol 4,5 biphosphate</i>
PKA	<i>Protein kinase AMPc dependent</i>
PKC	<i>Proteina kinasa C</i>
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase Polymerase chain reaction</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate polyacrilamide gel electrophoresis</i>
Sina	<i>Seven in absentia</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor b</i>
TPA	<i>12-O-tetradecanoylphorbo-13-acetate</i>

INTRODUCCIÓ	5
1. El còlon	5
2. El Pàncrees.	9
3. L'estructura dels epitelis	11
3.1. Adhesió cèl·lula-cèl·lula	12
3.2. Adhesió cèl·lula-matriu.	15
3.2.1 Les integrines.	16
3.2.2. Estructures d'adhesió a la matriu: Adhesions focals i Hemidesmosomes	17
3.2.3. El citosquelet.	19
3.2.4. La regulació de l'adhesió a la matriu	21
3.2.5. La família de proteïnes ERM (Ezrina, Radixina, Moesina): Altres connexions entre el citosquelet d'actina i la membrana plasmàtica	23
4. El càncer, una malaltia genètica	26
4.1. El càncer colorectal	26
4.2. El càncer de pàncrees	32
5. La regió 18q21	35
5.1. Smad2 i Smad4	36
5.2. El DCC	39
6. Funció del DCC	43
6.1 DCC en la diferenciació cel·lular	44
6.2 DCC en l'adhesió cel·lular	45
6.3 DCC en l'apoptosi i cicle cel·lular.	46
6.4 DCC en la guia axonal.	47
Objectius	50

MATERIALS I MÈTODES	53
1. Cultiu cel·lular	53
1.1. Línies cel·lulars	53
1.1.1. Línies cel·lulars derivades de càncer de còlon	53
1.1.2. Línies cel·lulars derivades de càncer de pàncrees	53
1.1.3. Altres línies cel·lulars: 293/EBNA, C9 i C20, COS 1	54
1.2. Obtenció de medis condicionats	54
1.3. Co-cultius	55
1.4. Cultius tridimensionals d'agregats cel·lulars en matriu de col·lagen. Tècnica de "Hanging drops"	55
2. Transfecció	56
2.1. Transfecció estable en HT-29: Obtenció de clons HT-29/DCC	56
2.2. Transfecció transitòria en cèl·lules COS 1	57
3. Semifins i microscopia electrònica	58
4. Assajos funcionals	58
4.1. Assaig de proliferació	58
4.2. Assaig de resistència a la tripsina	59
4.3. Assaig d'adhesió <i>de novo</i> a la matriu	59
4.4. Assaig de migració en transwells	60
5. Anàlisis dels nivells de RNA	60
5.1. Obtenció de les mostres de teixit	60
5.2. RT-PCR ("Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction")	61
5.3. Northern Blot	63
6. Generació de proteïnes de fusió	64
6.1 GST-DCC.I	65
6.2 GST-DCC.IT	66

7. Immunodetecció	67
7.1. Anticossos	67
7.1.1. Obtenció d'un anticòs policlonal de conill contra el domini intracel·lular del DCC (anti-DCC.I)	67
7.1.2. Anticossos monoclonals	68
7.1.3. Anticossos policlonals de conill	68
7.2. Immunohistoquímica	69
7.3. Immunocitoquímica	70
8. Altres tècniques de detecció	71
8.1. Tinció de les mucines amb Blau Alcà	71
8.2. Marcatge del citosquelet d'actina	72
9. Extracció de proteïnes i anàlisi per Western blot.	73
9.1. Obtenció de fraccions proteïques solubles en tampó T10/Tritó i en tampó RIPA	73
9.2. Fraccionament cel·lular	73
9.3. Biotinilació i extracció de proteïnes de membrana	73
9.4. Western blot	74
10. Assaig d'interacció <i>in vitro</i> . (Assaig de "pull-down")	75
10.1. Producció de l'Ezrina sencera i dels dominis N- i C-terminals de l'ezrina en cèl·lules Sf9	75
10.2. Assaig de "pull down"	75
11. Immunoprecipitació	75
12. Assajos <i>in vivo</i> en ratolins <i>nude</i> .	76
12.1. Assaig de tumorigenicitat	76
12.2. Assaig de disseminació	77

RESULTATS	81
1. L'expressió dels gens DCC i Smad4 es troba disminuïda en línies cel·lulars derivades de càncer de còlon, en tumors de còlon, i en línies cel·lulars derivades de càncer de pàncrees, respecte l'expressió d'aquests gens en teixit normal. Les alteracions en ambdós gens són esdeveniments independents.	81
2. DCC no està implicat en diferenciació epitelial intestinal	88
2.1. Anàlisi de la correlació entre el fenotip mucosecretor de les línies cel·lulars derivades de càncer de còlon i l'expressió del DCC.	88
2.2. Anàlisi immunohistoquímic de l'expressió del DCC en l'epiteli de còlon normal	91
2.3. Anàlisi de l'efecte de l'expressió ectòpica del DCC sobre el fenotip de les cèl·lules HT-29.	92
3 El DCC regula l'adhesió cel·lular <i>in vitro</i> i té un efecte antitumoral <i>in vivo</i> .	96
3.1. Morfologia	96
3.2. Proliferació	99
3.3. Adhesió cèl·lula-cèl·lula	101
3.4. Mobilitat	104
3.5. Adhesió cèl·lula-matriu	107
3.6. Disseminació	112
4 DCC interacciona amb les proteïnes de la família ERM.	114
4.1 DCC induïx la disrupció d'adhesions focals i hemidesmosomes de tipus II	114
4.2 La disrupció de les adhesions focals té lloc via fragmentació de les fibres d'estrés.	116
4.3 L'efecte del DCC sobre el citosquelet d'actina ve mediat per la seva interacció amb les proteïnes de la família ERM.	117

DISCUSSIÓ 129

La inactivació funcional dels gens DCC i Smad 4 té lloc per mecanismes independents en tumors de còlon i en línies cel·lulars derivades de càncer de còlon i de pàncrees. 129

- Possibles mecanismes d'alteració gènica 131

El DCC no afecta a la proliferació de les cèl·lules HT-29, però inhibeix el creixement tumoral. 133

El DCC no està implicat de forma directa en la diferenciació o no és suficient per promoure aquest procés 135

L'expressió del DCC en les HT-29 afecta a l'adhesió i a la migració cel·lular. 136

Les cèl·lules mesenquimals C9 i C20 només tenen un efecte específic del DCC sobre l'adhesió de les HT-29 a la matriu. 137

El DCC interacciona amb proteïnes de la família de les ERM. 138

Possibles vies de senyalització cel·lular del DCC a través de la seva associació amb proteïnes ERM. 142

- La unió DCC/Ezrina podria modificar l'acció de RhoGDI i/o PKA sobre RhoA. 142
- L'associació DCC/Ezrina podria regular negativament la polimerització dels filaments d'actina. 144

INDEX	_____
• La possible associació DCC/Talina com a mecanisme d'acció paral·lel i/o alternatiu al descrit via Ezrina.	_____145
El DCC podria inhibir els efectes de la PKC actuant directament sobre l'assemblatge dels desmosomes.	_____147
DCC: Partner d'ezrina i supressor tumoral.	_____148
CONCLUSIONS	_____151
BIBLIOGRAFIA	_____153
PUBLICACIONS	_____185

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

El sistema digestiu es desenvolupa a partir de l'endoderm, donant lloc a un tub continu resultat del creixement i migració d'aquesta capa embrionària. Durant el desenvolupament, la interacció del mesoderm amb l'endoderm és rellevant per a la correcta formació de l'epiteli intestinal mantenint-se la interacció epitelial/mesènquima durant tota la vida de l'individu (Gordon and Hemirston, 1994; Simon-Assmann et al., 1995; Kedinger et al., 1996; Simon-Assmann et al., 1998; revisat a Montgomery et al., 1999). Des de l'intestí anterior s'extenen gemmes que generaran el pàncrees i el fetge. Un cop desenvolupades, el producte d'aquestes glàndules es buidarà en el tub digestiu. Les cèl·lules epitelials de l'intestí, participen en el procés digestiu i en l'absorció dels productes finals de la digestió.

1. El còlon

L'intestí gruixut està format pel cec, l'apèndix vermiforme, el còlon ascendent, transvers, descendent i pelvià, i el recte. La principal funció de l'intestí gruixut és l'absorció de l'aigua i els electròlits. El camí realitzat per la matèria fecal fins al recte és facilitat per la secreció mucosa que revesteix la paret de l'epiteli facilitant el moviment i alhora actuant de protecció de les parets del còlon.

La paret del còlon consta de diverses capes connectades per teixit conjuntiu i pels elements neurals i vasculars de la paret. Anant cap a la llum intestinal trobem la serosa, la muscular pròpia, la submucosa, i la mucosa que inclou l'epiteli (Fig.1).

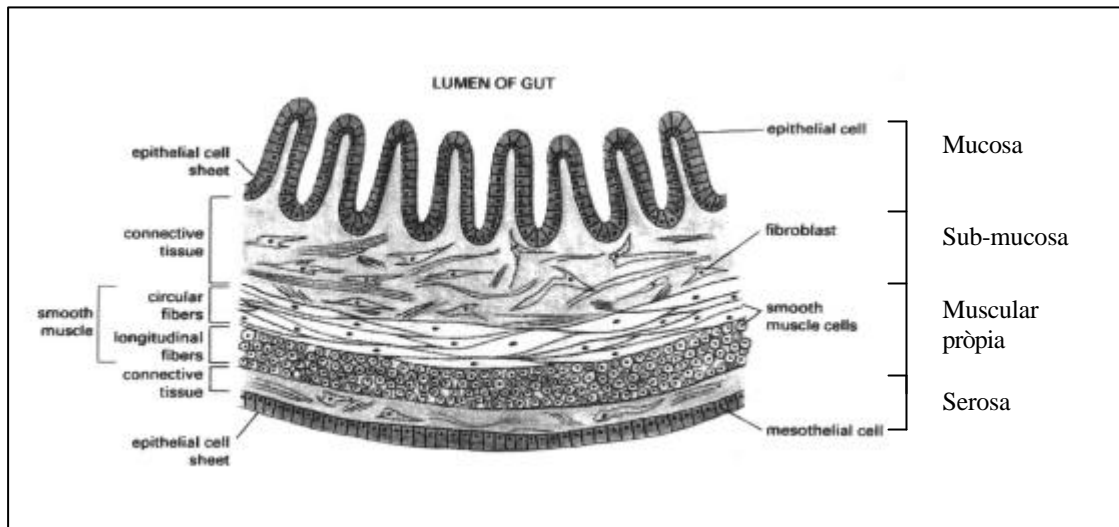


Figura 1: Esquema de les capes de la paret del còlon (Alberts et al., 1994)

L'epiteli de l'intestí gruixut és glandular, format per criptes o glàndules de Lieberkühn les quals són més profundes que en l'epiteli de l'intestí prim. Les criptes són les unitats funcionals de l'epiteli intestinal. Cada cripta és un compartiment organitzat on té lloc tant la proliferació com la diferenciació cel·lular de manera que l'epiteli intestinal és un teixit en regeneració constant. Les criptes dels nounats de ratolí són policlonals mentres que a partir del dia 14 post-naixement esdevenen monoclonals (Schmidt et al., 1988). Una cripta està formada d'una mitjana de 250 cèl·lules. Totes elles provenen d'un número desconegut de cèl·lules pluripotents ancorades a la seva base (Loeffler et al., 1993). L'epiteli de l'intestí prim està compost de 4 tipus cel·lulars: cèl·lules absortives, mucosecretores, neuroendocrines i cèl·lules de Paneth. Les tres primeres es diferencien durant el camí que transcorren cap a la llum intestinal. Al cap de 2-5 dies, les cèl·lules arriben a l'àpex de la vellositat on moren per apoptosi i són exfoliades. En canvi, les cèl·lules de Paneth migren cap a la base de la cripta on al cap d'uns 20 dies seran fagocitades. Al còlon, on no hi ha cèl·lules de Paneth, totes les cèl·lules migren cap a la superfície de la cripta i s'incorporen als agrupaments hexagonals de superfície que es troben rodejant els orificis de les criptes, ja que la mucosa colònica no presenta vellositats (Fig. 2). A diferència de l'intestí prim on cada vellositat reb cèl·lules de les diferents

criptes que l'envolten, aquests agrupaments hexagonals només reben cèl·lules de la cripta que rodejen. (Per a una revisió Gordon and Hermiston, 1994; Stappenbeck et al., 1998).

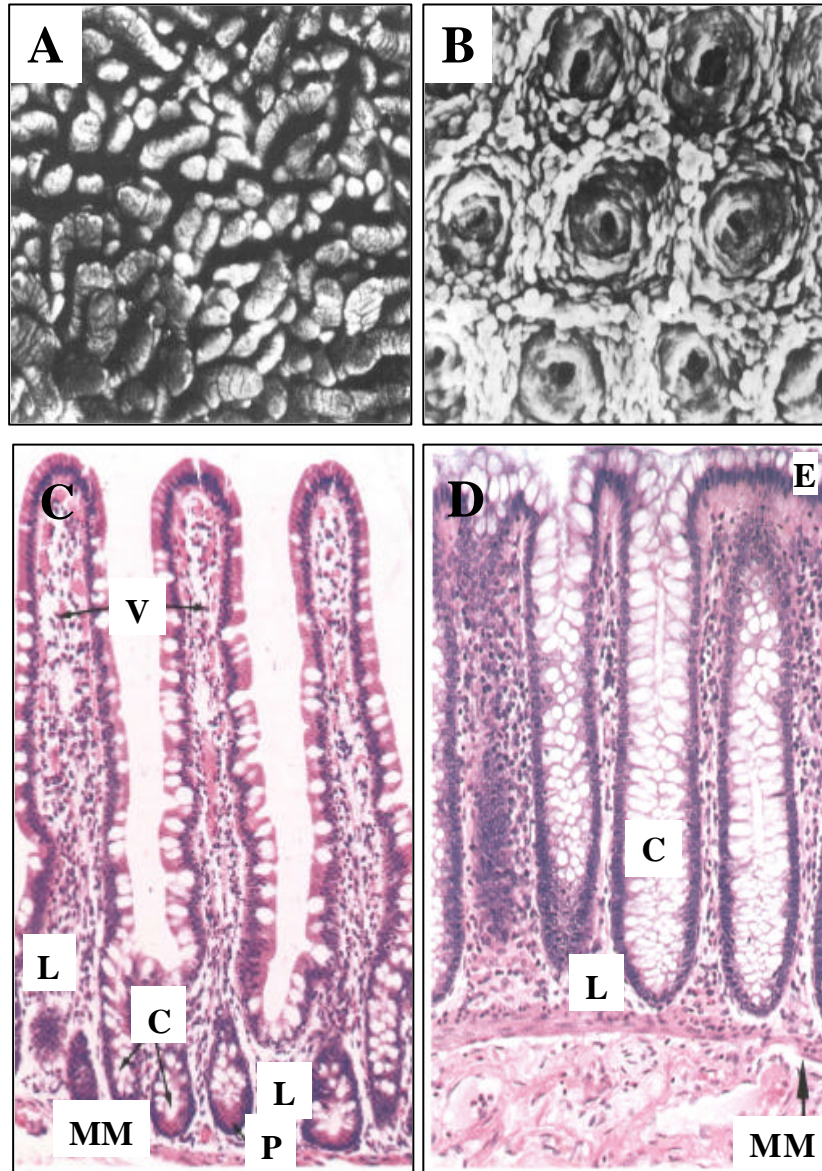


Figura 2: A i B: Imatges de microscopia d'escaneig (Fawcett, 1995)

S'observen les vellositats de l'intestí prim (A) que contrasten amb els agrupaments de les desembocadures de les criptes del còlon (B). C i D: Microfotografia de la mucosa de l'intestí prim i del còlon respectivament (Tinció d'hematoxilina-eosina) (Burkitt et al., 1996). (C: criptes; E: Epiteli de superfície; L: Làmina pròpia; MM: Muscular de la mucosa; P: Cèl·lules de Paneth; V: Vellositats).

Les característiques fenotípiques de les cèl·lules de l'epiteli intestinal venen descrites a continuació.

Les cèl·lules absortives columnars, també anomenades enteròcits, són cèl·lules polaritzades amb un nucli basal. Al còlon absorbeixen aigua i electròlits, mentre que a l'intestí prim absorbeixen els nutrients produïts durant la digestió (sucres, aminoàcids, lípids). A l'intestí prim, la superfície de la membrana apical dels enteròcits, exposada a la llum del budell, és molt elevada degut a la presència de microvellositats, que constitueixen la vora en raspall ("brush border") i on es distribueixen les hidrolases com la sucresa isomaltasa, la lactasa, l'aminopeptidasa N, la dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV) i la fosfatasa alcalina. Aquests enzims, implicats en els processos digestius, s'utilitzen com a marcadors moleculars propis d'aquest tipus cel·lular. Les microvellositats dels enteròcits del còlon són rudimentàries i no estan organitzades en forma de vora en raspall. Els enteròcits es troben units entre ells per unions intercel·lulars (unions estretes i adherents; veure secció 3.1 d'aquest capítol) que aïllen la llum del budell del compartiment subepitelial.

Les cèl·lules mucosecretores, també anomenades cèl·lules goblet o caliciformes, són, a l'igual que les absortives, cèl·lules polaritzades amb un nucli basal. Es caracteritzen per la secreció del moc lubricant i protector de l'epiteli. Aquest moc està compost principalment per mucines, glicoproteïnes altament glicosilades que oligomeritzen formant complexos macromoleculars de 2 000 a 10 000 kDa; el 50-80% de la seva massa molecular correspon a carbohidrats units per enllaços O-glicosídics. S'han identificat al menys 9 gens de mucines diferents (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7 i MUC8) cadascun dels quals presenta un patró de distribució tissular i cel·lular específic (Carrato et al. 1994; Lesuffleur et al., 1994; Gendler and Spicer, 1995). L'apomucina més abundant del còlon és MUC2, que s'expressa exclusivament en les cèl·lules caliciformes; d'altra banda, MUC1, MUC3 i MUC4 s'expressen també en les cèl·lules absortives suggerint altres papers fisiològics per aquestes

apomucines addicionals als de lubricació i protecció de l'epiteli (Chambers et al., 1994; Buisine et al., 1998). Les cèl·lules de Paneth només es troben a l'intestí prim. Secreten pèptids antimicrobians i factors de creixement.

Les cèl·lules neuroendocrines són una població heterogènia que comprèn al menys 15 tipus diferents. Es diferencien entre elles per la morfologia dels grànuls de secreció i els pèptids que aquests contenen. A mode d'exemple, les de tipus D contenen somatostatina, les de tipus L contenen glucagó, les de tipus PP contenen polipèptids pancreàtics. A diferència de l'intestí prim, en l'intestí gruixut les cèl·lules neuroendocrines es troben de forma aïllada en lloc de agrupades.

2. El Pàncrees

El pàncrees és una glàndula exocrina i endocrina formada per estructures lobulars delimitades per teixit connectiu (Bockman et al., 1993) (Fig. 3). Embriològicament, es desenvolupa a partir de dos gemmes que es formen a partir de les cares ventral i dorsal de l'epiteli del duodé. Al pàncrees exocrí es produeixen els enzims digestius i s'elabora el suc pancreàtic el qual és excretat al duodé i col·labora en la digestió dels aliments. El pàncrees endocrí està format pels illots de Langerhans, constituïts per cèl·lules productores d'hormones (i.e. insulina, glucagó, somatostatina i polipèptid pancreàtic).

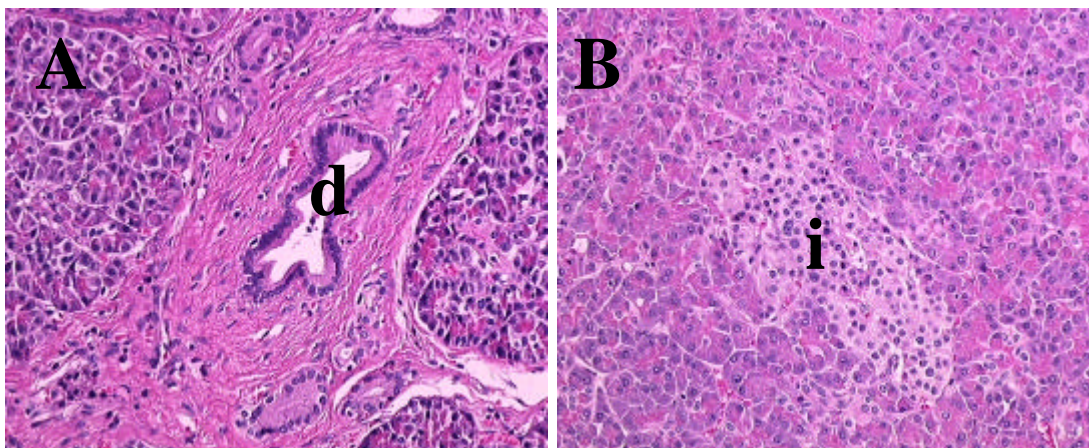


Figura 3: Microfotografies de talls histològics de pàncrees exocrí (A) i endocrí (B).
(i: Illots de Langerhans; d: Ductes).

La unitat bàsica del pàncrees exocrí és l'acinus (Fig. 4). Les cèl·lules acinars corresponen al 90% del total del pàncrees exocrí. Són piramidals i polaritzades i es caracteritzen per presentar un reticle endoplasmàtic rugós que ocupa gran part de la regió perinuclear, un complex de Golgi prominent i per la presència de grànuls de zimògen que contenen els enzims digestius. La majoria dels enzims són sintetitzats i secretats com a precursors inactius activant-se després de l'entrada al duodè. En la junció entre els acini i els ductes, trobem les cèl·lules centroacinars. La secreció del suc pancreàtic està regulada per estimulació hormonal, principalment per secretina, colecistoquinina i gastrina, i també per estímuls neurals.

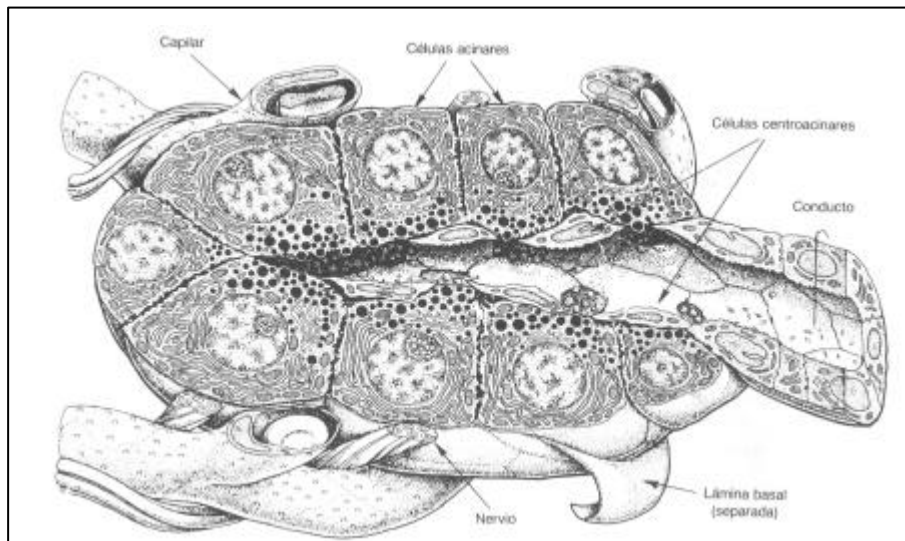


Figura 4: Esquema d'un acinus pancreàtic (Fawcett, 1995)

Els conductes estan formats per cèl·lules epitelials columnars, les cèl·lules ductals. Aquestes que no sintetitzen hormones i tampoc contenen grànuls de zimògen, participen en la secreció de bicarbonat i del moc que protegeix la superfície dels conductes. A diferència de les cèl·lules acinars, caracteritzades per la síntesi dels enzims digestius, que constitueixen excel·lents marcadors moleculars, no existeixen marcadors moleculars exclusius de cèl·lules ductals i es coneix molt poc sobre l'expressió de marcadors propis durant el desenvolupament. Els marcadors moleculars que permeten distingir entre cèl·lules ductals i acinars s'especifiquen en la taula següent:

Cèl·lules acinars	Cèl·lules ductals
Amilasa	Anhidrasa carbònica II
Carboxipeptidasa	CEA (“Carcinogenic Embryonic Antigen”)
Elastasa	CFTR (“Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator”)
Fosfolipasa	Citoqueratines 7 i 19
Lipasa	Dipeptidil peptidasa IV
Quimiotripsinogen	MUC3
Tripsinogen	MUC5B
GP-2	

En els conductes de major tamany també hi ha un petit nombre de cèl·lules mucosecretores i amb vora en raspall semblants a les que es troben a l'intestí.

Les cèl·lules endocrines s'originen a partir de l'epiteli ductal i en l'adult estan agrupades en els illots de Langerhans. Existeixen quatre tipus principals de cèl·lules endocrines. Les cèl·lules beta, secretores d'insulina i amilina, són la població majoritària dels illots. Les cèl·lules alfa secreten glucagó, les delta secreten somatostatina i els cèl·lules PP secreten el polipèptid pancreàtic. Una proporció de cèl·lules, a més de l'hormona específica que secreten, també produeixen el pèptid YY. Per altra banda, totes les cèl·lules dels illots també expressen productes característics de cèl·lules neuroendocrines tals que l'enolasa específica neural, el receptor de la toxina tetànica, l'antigen A2B5 i la proteïna islet-1 (revisat a Slack, 1995).

3. L'estructura dels epitelis

Els epitelis constitueixen el revestiment extern dels òrgans i teixits i la seva integritat és el resultat de les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular. La figura 5 mostra un esquema d'aquests tipus de contactes. Ambdós tipus d'unions participen en vies de senyalització que regulen la

proliferació i la diferenciació cel·lular (revisat per Kikuchi, 2000; Simon-Assmann et al., 1998) i estan lligats al citosquelet de la cèl·lula.

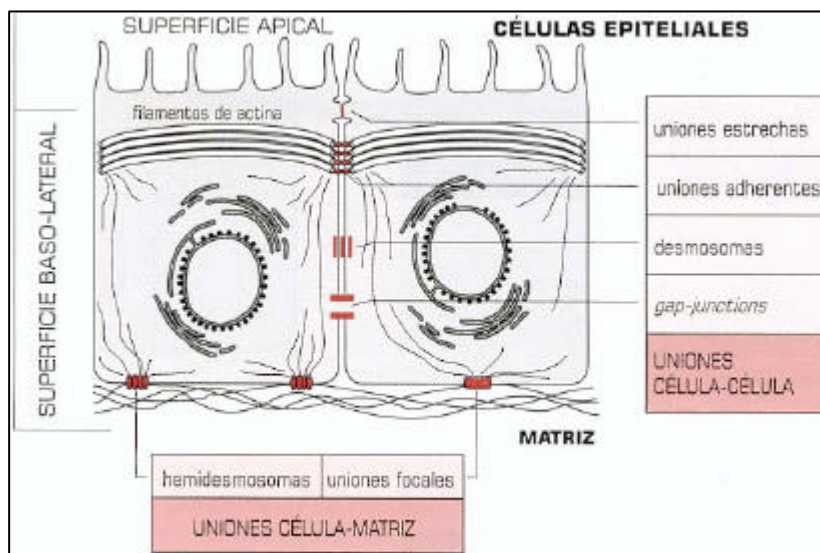


Figura 5: Esquema de les unions cel·lulars en els epitelis simples (Muñoz, 1997)

3.1. Adhesió cèl·lula-cèl·lula

Les interaccions intercel·lulars de les cèl·lules epitelials proporcionen la cohesió, la permeabilitat selectiva i la resistència característiques del teixit epitelial. Els tipus de contactes intercel·lulars que es troben en les cèl·lules epitelials són: les unions estretes (“tight junctions”), les unions adherents (“adherens junctions”), les unions “gap” i els desmosomes (Fig.5).

Les unions estretes són les responsables de la permeabilitat selectiva dels epitelis i delimiten els dominis apical i basolateral de la membrana plasmàtica (Gumbiner, 1996). Aquestes envolten, a mode de cinturó, la superfície apical i formen una barrera que impedeix el pas de molècules per l'espai paracel·lular i la mobilitat de proteïnes i lípids de la cara externa de la membrana plasmàtica.

Les unions adherents es localitzen en la part superior de la membrana plasmàtica lateral. Com es presenta en la figura 6, consten d'una proteïna transmembrana, l'E-cadherina, la regió extracel·lular de la qual interacciona amb una altra molècula d'E-cadherina d'una cèl·lula veïna formant dímers (unions homotípiques). La formació d'aquests complexos és dependent de calci. El domini intracel·lular de l'E-cadherina uneix la β -catenina i aquesta la α -catenina, la qual interacciona amb el citosquelet d'actina (Kemler, 1993). Experimentalment, aquest fet es tradueix en la co-purificació de l'E-cadherina amb les proteïnes associades al citosquelet, les quals són insolubles en Tritó X-100. Diversos autors han suggerit que la fosforilació en tirosines de les catenines té un paper important en la regulació de les unions adherents (revisat a Daniel and Reynolds, 1997).

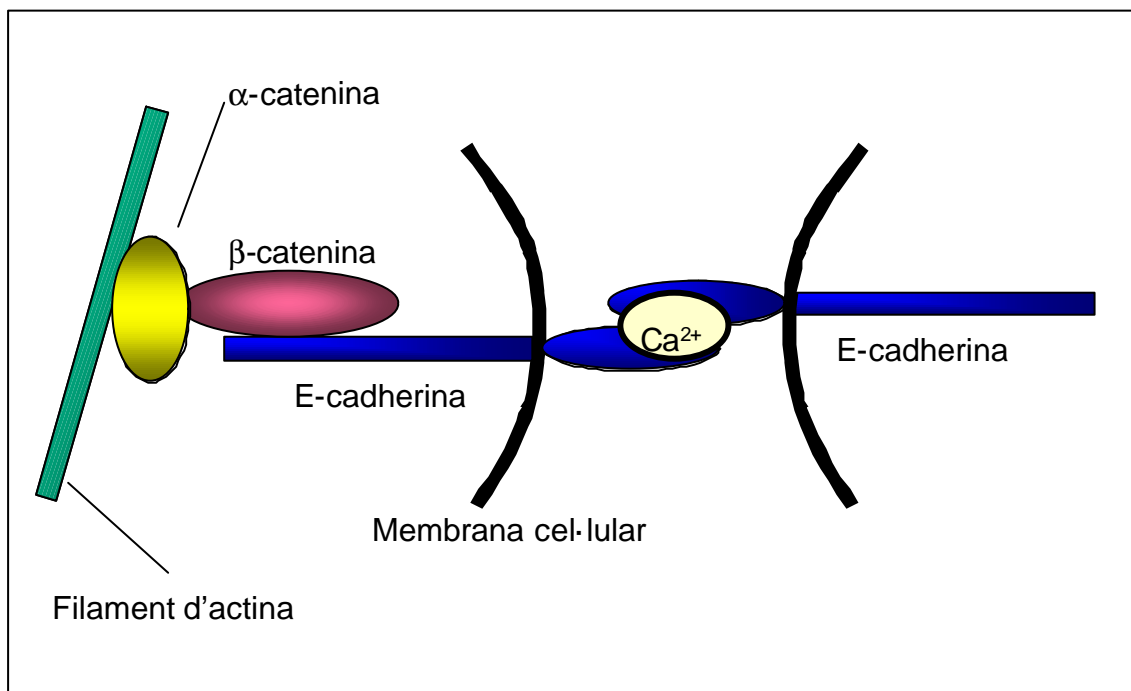


Figura 6: Esquema de l'estructura molecular de les unions adherents

En la majoria dels models cel·lulars estudiats, la disrupció de les unions adherents bé utilitzant EDTA com a quelant d'ions Ca^{2+} ó bé augmentant els nivells de fosforilació en tirosines, afegint VanO_4Na_3 o expressant pp60v-src, també provoca la disrupció de les unions estretes (Volberg T et al., 1992; Skoudy et al., 1996). Per aquestes raons s'assumeix que la funcionalitat

d'ambdós tipus d'unions està co-regulada i que la permeabilitat conferida per les unions estretes depen de la integritat de les unions adherents. No obstant, aquesta hipòtesi és encara objecte de controvèrsia ja que en altres sistemes, com són les cèl·lules Caco-2, les unions estretes no s'alteren ni amb quelants d'ions Ca^{2+} ni augmentant els nivells de fosforilació en tirosines (Gómez et al., 1999), suggerint que el desacoplament d'aquests dos tipus d'unions pot ser el resultat de la diferenciació de les cèl·lules intestinals.

Les unions "gap" es distribueixen en la membrana lateral de les cèl·lules i permeten l'intercanvi de petites molècules de manera a crear un "pool" comú de metabòlits en totes les cèl·lules del teixit, les quals mantindran així una activitat metabòlica comuna.

Els desmosomes són punts d'unió entre dues cèl·lules veïnes que s'observen al microscopi electrònic com a regions de la membrana plasmàtica denses als electrons. Estan compostos per diferents proteïnes transmembrana i citosòliques (esquematzat en la figura 7). Entre les primeres es troben les cadherines desmosomals (desmogleïna i desmocolina). Els dominis intracel·lulars d'aquestes interaccionen amb les proteïnes citosòliques desmosomals: la desmoplakina i la plakoglobina ó γ -catenina, les quals queden ancorades en la cara intracel·lular de la membrana i estableixen contactes amb els filaments intermediaris. La desmoplakina és un component exclusiu de desmosomes i ubícu en tots els models cel·lulars que presenten aquest tipus d'unió. D'altre banda, la plakoglobina és l'únic component comú amb les unions adherents (Cowin et al., 1986). La regió amino terminal de la desmoplakina s'associa amb ella mateixa i amb altres components dels desmosomes i la cua carboxi terminal s'associa a filaments intermediaris. Malgrat s'ha demostrat *in vitro* que la plakoglobina també uneix cadherines desmosomals i filaments intermediaris, no és suficient per a ancorar els filaments als desmosomes en absència de desmoplakina (Smith and Fuchs, 1998). Les cadherines desmosomals (Koch et al., 1997), la plakoglobina (Bierkamp et al., 1996) i la desmoplakina

(Gallicano et al., 1998) són necessàries per a la formació i estabilitat dels desmosomes.

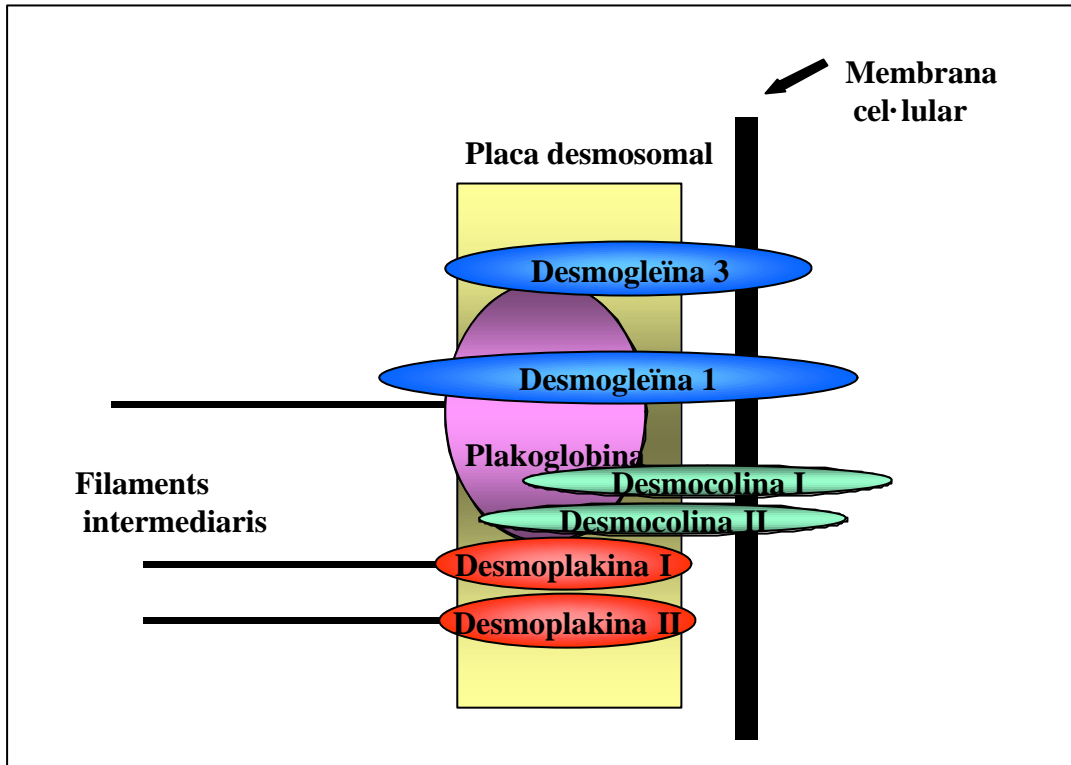


Figura 7: Esquema molecular d'una placa desmosomal

3.2. Adhesió cèl·lula-matriu

La interacció de les cèl·lules amb la matriu extracel·lular és de fonamental importància en molts processos biològics tals com són el desenvolupament, la proliferació i la diferenciació cel·lulars (revisat a Simon-Assmann et al., 1998). La membrana basal està composta majoritàriament per laminines, col·lagen de tipus IV, perlecà, nidogen, fibrinogen, fibronectina i proteoglicans. Les laminines són heterotrímers amb estructura de creu formats per una cadena α , una β i una γ . Algunes d'aquestes cadenes són sintetitzades per les cèl·lules epitelials i d'altres per les cèl·lules del mesènquima subjacent. L'expressió d'aquestes varia al llarg del desenvolupament i pot variar també en l'eix cripta-villus (revisat a Simon-Assmann et al., 1998).

3.2.1. Les integrines

Dintre dels receptors cel·lulars de les laminines identificats fins al moment, es troben les integrines (revisat a Hynes, 1992), les quals també actuen com a receptors d'altres components de la matriu. La majoria d'elles uneixen els respectius lligands mitjançant el domini d'unió a integrines RGD (arginina, glicina i aspàrtic) (Ruoslashti et al., 1987). Les integrines, són heterodímers de les subunitats α i β transmembrana formant el punt d'ancoratge a la matriu extracel·lular tant de les adhesions focals com dels hemidesmosomes. Fins al moment s'han identificat 18 subunitats α i 8 subunitats β , la combinació de les quals dona lloc a, al menys, 24 heterodímers diferents. La composició $\alpha\beta$ determina l'especificitat d'unió al lligand (revisat per Hynes, 1992). Tanmateix, darrerament s'ha proposat que les interaccions de les integrines amb altres proteïnes intracel·lulars poden modular aquesta especificitat d'unió als components de la matriu extracel·lular (revisat per Giancotti, 2000). En les cèl·lules epitelials es troben majoritàriament les integrines $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$ formant part de les adhesions focals, i la integrina $\alpha6\beta4$ que és específica d'hemidesmosomes. La subunitat $\alpha6$, doncs, és capaç d'associar-se tant a la subunitat $\beta1$ com la $\beta4$ donant lloc als dos receptors epitelials per a la laminina-1 (Sonnenberg et al., 1990), la laminina majoritària en la matriu extracel·lular de l'epiteli intestinal (revisat a Simon-Assman et al., 1995; Simon-Assman et al., 1998). La integrina $\alpha6\beta4$ també uneix les laminines 2, 4 i 5 (Lee et al., 1992), sent aquesta última a la que s'uneix amb major afinitat. Diversos estudis han demostrat que les integrines estan també implicades en la diferenciació cel·lular i la morfogènesi (DeArcangelis et al., 1996; Falk et al., 1996; Matter and Laurie., 1994).

3.2.2. Estructures d'adhesió a la matriu: Adhesions focals i Hemidesmosomes

Les adhesions focals són estructures especialitzades on la subunitat β de les integrines s'associa a les fibres d'estrés, via altres proteïnes citoplasmàtiques que inclouen la talina, la vinculina, la paxilina, la tensina i la α -actinina entre d'altres (Fig. 8).

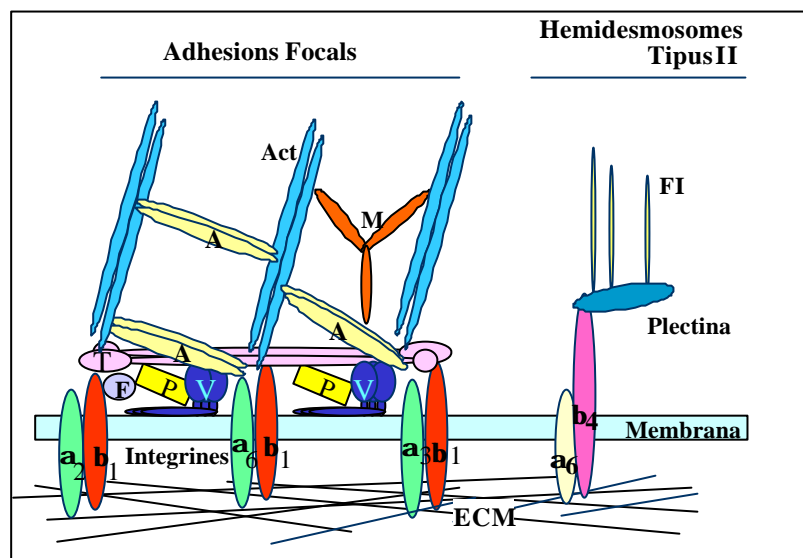


Figura 8: Esquema molecular de les unions al substrat en cèl·lules epitelials intestinals.

(A: α actinina; Act: Actina F; F: FAK; FI: Filaments Intermediaris; M: Miosina; P: Paxilina; T: Talina; V: Vinculina.)

Les fibres d'estrés són feixos de filaments d'actina que creuen la cèl·lula interconnectant les adhesions focals. Mitjançant la unió a la miosina, que confereix capacitat contràctil, aquests feixos són capaços de generar les forces d'unió (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Els filaments de miosina són molt efectius a entrecreuar ("crosslinking") els filaments d'actina i promouen la formació de les fibres d'estrés, provocant al mateix temps la contracció del citoesquelet i generant la força d'adhesió. En resposta a aquesta tensió, les integrines s'agrupen (fenomen de "clustering").

En la regulació de la formació de les adhesions focals participen proteïnes tirosina kinases com c-src, FAK ("Focal Adhesion Kinase"), i una família de serina/treonina kinases activades per proteïnes de la família de les GTPases Rho (principalment RhoA) (revisat a Hall, 1998). L'assemblatge de les integrines promou l'activació de la FAK (Kornberg et al., 1991), que s'autofosforila i s'uneix als dominis SH2 de c-src (Schaller et al., 1994). Com a resultat, són activats per fosforilació altres components de les adhesions focals com la tensina, la paxilina o la p130cas (revisat a Craig and Johnson, 1996). El PI(4,5)P₂ (Fosfatidilinositol-4,5-difosfat) està també implicat en la formació de les adhesions focals mitjançant la seva interacció amb la vinculina (Gilmore and Burridge, 1996).

Els hemidesmosomes deuen el nom a la seva aparença, per microscopia electrònica, de mig-desmosomes. Són plaques intracel·lulars electrodenses, punts d'ancoratge a filaments intermediaris. Els hemidesmosomes tenen un paper important en l'establiment i el manteniment de l'adhesió del teixit epitelial a la membrana basal. També se'ls ha atribuït un paper en transducció de senyal i en processos com la proliferació i/o diferenciació cel·lular, i regulació de l'expressió gènica (Mainiero et al., 1995; Clarke et al., 1995).

Els hemidesmosomes són un complex multiprotèic format per proteïnes transmembrana: integrina $\alpha 6\beta 4$ i BP180 ("Bullous Pemphigoid antigen 180"); i proteïnes citosòliques: BP230 i HD1/plectina/ARF300 ("Intermediate Filament Associated Protein"). Hi ha evidències que suggereixen que aquestes tres últimes proteïnes són el mateix producte (revisat a Borradori and Sonnenberg, 1999). En les cèl·lules epitelials intestinals es troba un tipus especial d'hemidesmosomes anomenat de tipus II (HDII) que manca de les proteïnes BP180 i BP230 (Uematsu et al., 1994) (Fig. 8). La plectina interacciona amb els filaments intermediaris però també s'ha descrit un domini d'unió a l'actina homòleg al de l'espectrina i la distrofina, en el seu extrem N-terminal (McLean et al., 1996). Aquest domini es solapa amb el domini d'unió a la subunitat d'integrina $\beta 4$ i s'ha demostrat que aquesta

competeix amb l'actina per la unió a la plectina (Geerts et al., 1999). A més, resultats recents suggereixen que en cèl·lules epitelials derivades de càncer intestinal, malgrat els HDII estan connectats als filaments intermediaris, la seva organització i el seu agrupament ("clustering") sembla dependent de filaments d'actina (Fontao et al., 1999).

3.2.3. El citosquelet

Les unions a les cèl·lules veïnes així com l'adhesió al substrat per part d'una cèl·lula, venen mediades per complexos protèics que es troben en estreta connexió amb el citosquelet, el qual està format per tres components principals: les fibres d'actina, els filaments intermediaris i els microtúbuls. En un principi, s'havia atorgat al citosquelet un paper exclusivament estructural però noves aproximacions moleculars han revelat el constant dinamisme del citosquelet i la seva participació en un gran nombre de processos cel·lulars.

Els filaments d'actina formen una xarxa intracel·lular implicada en el manteniment de la forma i la polaritat de la cèl·lula, i el transport intracel·lular de vesícules, entre d'altres. Com s'ha mencionat anteriorment, les fibres d'estrés creuen la cèl·lula interconnectant les adhesions focals, generant juntament amb la miosina, la tensió de les adhesions a la matriu. Aquests filaments es troben en constant polimerització i despolimerització en resposta a les senyals que arriben de l'exterior de la cèl·lula, durant la qual l'actina monomèrica (actina G) uneix ATP que serà hidrolitzat a ADP durant la polimerització. En una cèl·lula en repòs existeix un equilibri entre l'actina G-ATP que s'uneix a l'extrem (+), i l'actina G-ADP que es dissocia de l'extrem (-). Aquest equilibri està regulat per diversos tipus de proteïnes, les quals inclouen proteïnes que uneixen l'actina G, proteïnes d'unió a l'actina F ("capping proteins"), i proteïnes que tallen els filaments d'actina (revisat a Ayscough, 1998; Carlier, 1998). D'altra banda, les proteïnes de la família de Rho GTPases, capaces d'integrar senyals desde diferents tipus de receptors de membrana, també regulen el citosquelet d'actina de la cèl·lula.

Els microtúbuls són polímers constituïts per heterodímers de α i β tubulina. Un tercer tipus de tubulina (γ -tubulina) ha estat descrit en el centre organitzador de microtúbuls (MTOC). La majoria de cèl·lules eucariotes presenten diferents isoformes d'aquests tres tipus de tubulina, els quals són productes de diferents gens o de distintes modificacions postranscripcionals i postraduccionals (revisat a Ku et al., 1999). A l'igual que els filaments d'actina, els microtúbuls són polars i la seva polimerització depen de la hidròlisi de GTP. L'estabilitat dels microtúbuls ve determinada per l'associació de determinades proteïnes, les MAPs ("Microtubule associated proteins"). Les MAP motores, entre les que es troben la kinesina i la dineïna, són particularment importants pel transport de vesícules a través de la xarxa de microtúbuls de la cèl·lula i per a la segregació dels cromosomes en la mitosi.

Els filaments intermediaris contacten els desmosomes de les cèl·lules epitelials estabilitzant l'epiteli i són les majors proteïnes estructurals en cabell i pell. A diferència de l'actina i la tubulina, que es troben àmpliament distribuïdes en tots els tipus cel·lulars, les proteïnes components dels filaments intermediaris (proteïnes FI) són específiques segons el tipus de cèl·lula. Així, les citoqueratines són pròpies de les cèl·lules epitelials. Diferint de les altres proteïnes de filaments intermediaris, les quals són úniques, existeixen al menys 20 citoqueratines distintes i específiques per a cada tipus d'epiteli que es classifiquen en dos grups: (I): CK9 a CK20; (II): CK1 a CK8. En l'epiteli de l'intestí s'expressen les CK8, CK18, CK19 i CK20 (revisat a Ku et al., 1999). Les citoqueratines formen heterodímers entre una citoqueratina del grup I i una del grup II unint-se per parelles donant lloc a tetràmers, els quals s'associen pels extrems formant els protofilaments. Un filament intermediari està compost per vuit protofilaments.

3.2.4. La regulació de l'adhesió a la matriu

Durant la migració cel·lular, l'alternància de la creació i la destrucció de punts d'unió amb el substrat permet el desplaçament de la cèl·lula. En el templeig del substrat i l'extensió cel·lular, abans de formar les adhesions focals, es creen estructures riques en actina de tipus filopodi i lamel·lipodi. Els filopodis són digitacions de la membrana de 0.1 - 0.5 μm de gruix i de 5 - 50 μm de llargada. Quan són més curtes de 5 μm , s'anomenen microspines ("microspikes"). Els lamel·lipodis són projeccions en forma de làmina. La formació d'aquestes estructures està regulada per les proteïnes Rho GTPases Cdc42 i Rac respectivament.

La família de Rho GTPases pertany a la superfamília Ras formada per proteïnes citosòliques, relativament petites (ex. ras té un pes molecular de 21 kDa), amb la capacitat d'unir GTP i hidrolitzar-lo. Les proteïnes G són actives quan estan unides a GTP, llavors transmeten la senyal a un efector alhora que per la seva capacitat GTPasa hidrolitzen el GTP a GDP, quedant inactives. Aquestes proteïnes estan implicades en la transducció de senyal de receptors de membrana que porten associada activitat tirosina quinasa, molts dels quals són receptors de factors de creixement. La superfamília Ras, amb més de cinquanta membres, regula una extensa varietat de processos cel·lulars.

Hi ha tres tipus de proteïnes reguladores de les GTPases de la superfamília Ras segons sigui l'efecte que exerceixen sobre el cicle d'activació i desactivació: (1) Els factors GEF ("guanine nucleotide exchange factors") que promouen l'intercanvi de GDP per GTP; (2) Les proteïnes GAP ("GTPase activating protein") que són activadores de l'activitat GTPasa accelerant la hidròlisi del GTP; (3) Els factors GDI ("GDP dissociation inhibitors") que són inhibidors de la dissociació del GDP.

Segons els estudis realitzats en fibroblasts Swiss 3T3 de ratolí, s'ha proposat que la formació de filopodis està regulada per Cdc42, qui a la vegada activa Rac1, responsable de la formació de lamel·lipodis i activador de RhoA, l'inductor de la formació de les fibres d'estrés i les adhesions focals (revisat per Hall, 1998; Kjøller and Hall, 1999) (Fig.9).

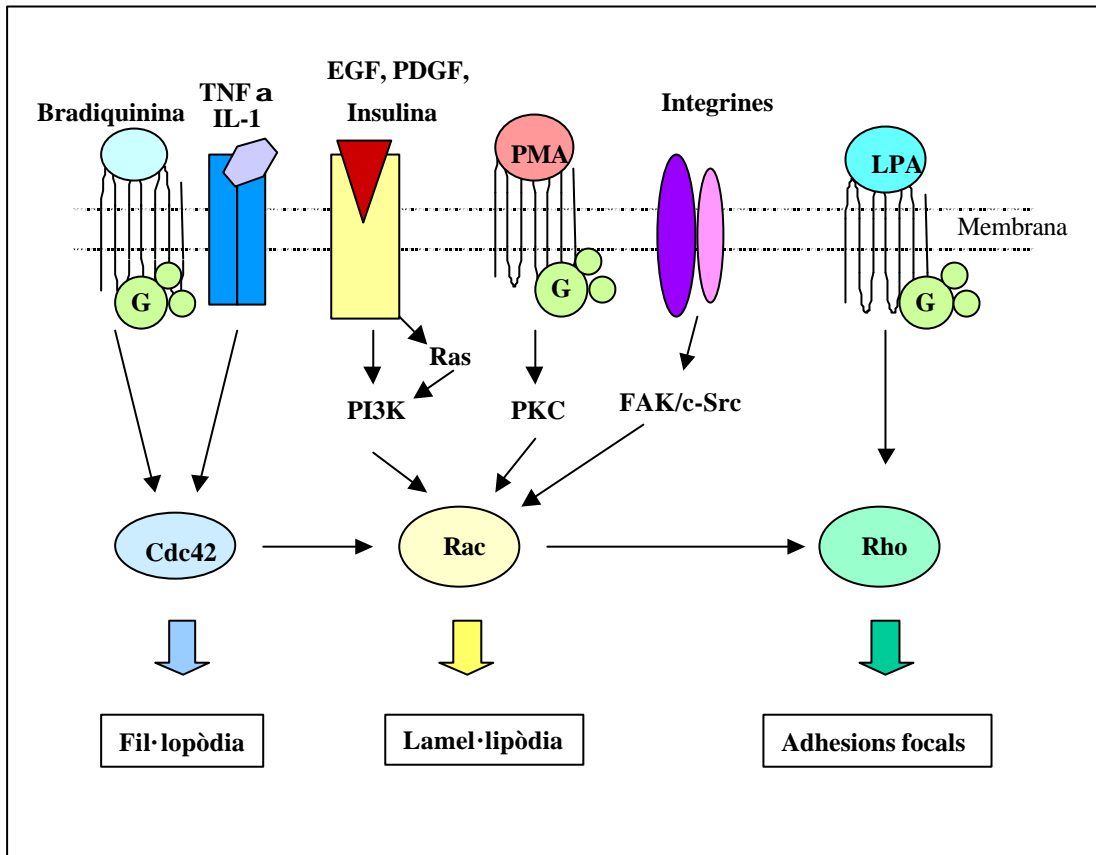


Figura 9: Relació entre els receptors de membrana cel·lular, els membres de la família RhoGTPases i l'adhesió cel·lular

No obstant, dades recents han demostrat que Rac inhibeix l'activitat de Rho i que el balanç de l'activitat d'aquestes dues proteïnes és qui determina la morfologia i la migració dels fibroblasts NIH3T3 (Sander et al., 1999b). S'ha proposat un mecanisme antagonista d'aquestes GTPases petites respecte a la formació de les adhesions focals. Així, RhoA promou a través de la Rho kinasa (RhoK), la contractibilitat actina/miosina la qual juga un rol fonamental en la formació de les adhesions focals i en l'ancoratge de les fibres de estrés, mentre que Rac1 i Cdc42, a través de PAK ("p21-activated

kinase”), dissocien les adhesions focals i les fibres d’estrés (revisat per Fukata et al., 1999a). L’activitat d’aquestes Rho GTPases, ve regulada per diferents receptors de la superfície de la cèl·lula com són els receptors acoplats a proteïnes G, receptors amb activitat tirosina kinasa, receptors de citoquines i molècules d’adhesió (revisat per Kjøller and Hall, 1999). Així doncs les Rho GTPases integren senyals de diferents tipus de receptors a la vegada que organitzen el citosquelet d’actina de la cèl·lula (Fig. 9).

3.2.5. La família de proteïnes ERM (Ezrina, Radixina, Moesina): Altres connexions entre el citosquelet d’actina i la membrana plasmàtica

Originalment l’ezrina s’havia descrit com a component estructural de les microvellositats i altres components del citosquelet d’actina (Bretscher, 1983), la radixina aïllada d’unions adherents, com una proteïna “capping” de l’actina-F (Tsukita et al., 1989) i la moesina com una proteïna que uneix heparina (Lankes and Furthmayr, 1991). L’elevada homologia en el domini N-terminal que presenten entre elles i amb la proteïna de la banda 4.1, proteïna d’eritròcits capaç d’unir filaments d’actina i proteïnes de la membrana plasmàtica (Cohen and Foley, 1982), va suggerir una funció comuna de connexió entre la membrana i el citosquelet d’actina per les proteïnes d’aquesta família. La merlina, producte del gen NF2 (“Neurofibromatosis 2”) (Rouleau et al., 1993; Trofatter et al., 1993), també pertany a les ERM. L’homologia entre els membres d’aquesta família de proteïnes està representada en la figura 10 A.

Actualment s’ha demostrat que les ERM’s actuen com a pont entre les proteïnes de membrana i el citosquelet a través del seu domini C-terminal que interacciona amb l’actina F (Turunen et al., 1994; Pestonjamas et al., 1995), i del domini N-terminal que ho fa amb proteïnes de membrana tals que CD43, CD44 i ICAM-1, -2 i -3 (Yonemura et al., 1993; Tsukita et al., 1994; Helander et al., 1996; Hirao et al., 1996; Serrador et al., 1997; Heiska et al., 1998).

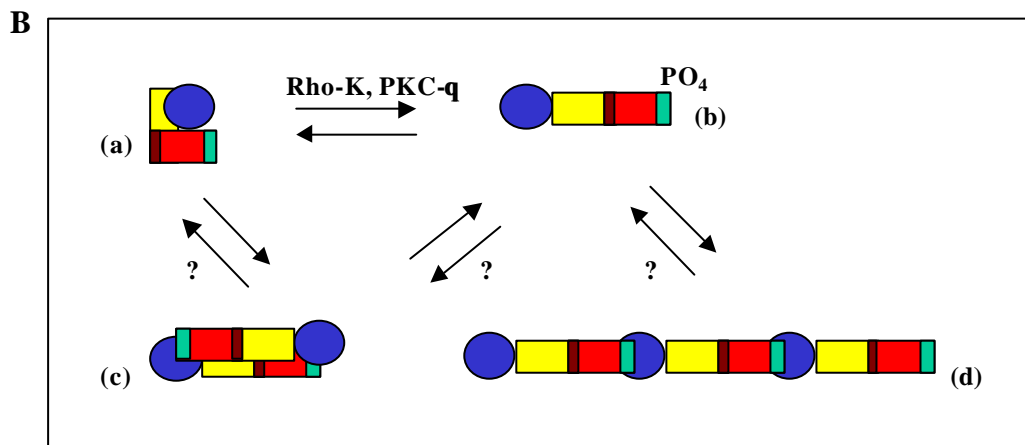
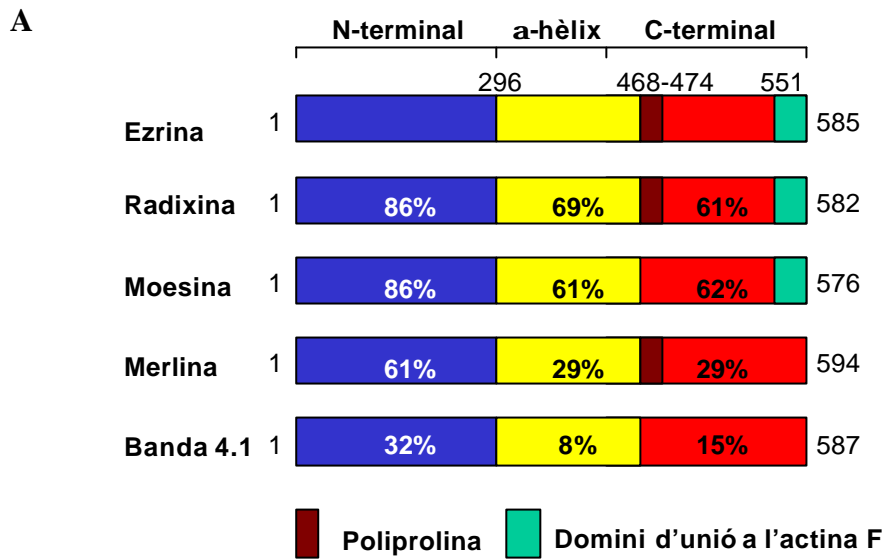


Figura 10: Anàlisi de l'estructura de les ERM's

(A) Anàlisi comparatiu de l'homologia dels dominis de les proteïnes de la família de les ERM's. Els percentatges indiquen l'homologia de cadascun dels dominis respecte l'ezrina. **(B) Conformacions i possibles interaccions entre les ERM's** (a) forma monomèrica, no fosforilada, plegada i inactiva; (b) forma monomèrica, fosforilada, desplegada i activa; (c): dímer antiparal·lel, no fosforilat i inactiu; (d): oligòmer, no fosforilat, parcialment actiu. (Mangeat et al., 1999).

S'han descrit altres proteïnes que interaccionen amb les ERM's com EBP50 ("Ezrin Binding Protein"), Rho-GDI i Dbl (revisat a Mangeat et al., 1999). EBP50 és una proteïna intracel·lular que conté un domini d'unió a l'ezrina i

dos dominis PDZ. L'EBP50 s'associa a totes les ERM's i actua com a adaptador entre aquestes i proteïnes de membrana. Així doncs la unió de les proteïnes de membrana a les ERM's pot ser directa o indirecta. La unió de les ERM's a Rho-GDI (reguladora de RhoA) i Dbl (reguladora de Cdc42), indica una connexió entre aquestes proteïnes i les Rho-GTPases i consegüentment una implicació de les ERM's en la mobilitat cel·lular.

El domini N-terminal de les ERM's també té afinitat pel domini C-terminal de la pròpia molècula, de manera que en la seva forma monomèrica les ERM's solen estar plegades i inactives i es despleguen com a conseqüència de la fosforilació d'un residu de Thr en la posició 566, 563 i 557 en l'ezrina, radixina i moesina, respectivament. Aquesta posició és una diana de fosforilació per la Rho-kinasa, malgrat alguns resultats qüestionen que aquesta kinasa activi les ERM's *in vivo* (Matsui et al., 1999), i la PKC theta (PKC- θ) (Matsui et al., 1998; Pietromonaco et al., 1998). *In vivo*, aquesta activació de les ERM's també és depenent de RhoA i PI(4,5)P₂ (Oshiro et al., 1998; Matsui et al., 1999). El desplegament de la proteïna permet la formació d'homodímers de forma antiparal·lela i d'oligòmers de diverses molècules en sèrie (Fig. 10 B).

Les ERM's tenen un paper pleiòtrop. Així, estan implicades en adhesió cel·lular, malgrat no són components majors de les unions adherents i les adhesions focals. L'ezrina i la moesina són candidates a controlar la nucleació i la polimerització de l'actina (Defacque et al., 2000); la radixina i la moesina estan implicades en el creixement dels axons en cultiu i en l'establiment de la polaritat neuronal (Paglini et al., 1998); l'ezrina és un substrat pel receptor del HGF ("Hepatocyte Growth Factor"), quedant d'aquesta manera implicada en processos de tubulogènesi i migració cel·lular induïdes per aquest factor (Crepaldi et al., 1997). Per altra banda, proteïnes com la merlina i la més recentment caracteritzada DAL-1 ("Differentially expressed in Adenocarcinoma of the Lung") (Tran et al., 1999), poden actuar també com a supressors tumorals.

4. El càncer, una malaltia genètica

El càncer és conseqüència de l'acumulació de canvis o mutacions en el DNA de les cèl·lules. Així, els tumors s'originen a partir d'una única cèl·lula (origen monoclonal del càncer) que ha acumulat les suficients mutacions com per escapar al control de proliferació al qual una cèl·lula normal està sotmesa. La divisió cel·lular és un procés altament regulat. Algunes cèl·lules diferenciades no es divideixen mai més durant tota la vida de l'individu: és el cas de les neurones. No obstant, altres teixits, com l'epiteli intestinal o la pell, mantenen la capacitat de proliferació durant tota la vida, per poder substituir les cèl·lules que es perden (veure l'exemple de les criptes a l'epiteli intestinal, secció 1).

Les mutacions oncogèniques tenen lloc en tres tipus principals de gens: 1) proto-oncogens, els quals presenten mutacions que activen de forma constitutiva els seus productes i tenen caràcter dominant (guany de funció); 2) gens supressors de tumor, la inactivació dels quals, bé per mutació o per delecció, implica una pèrdua de funció i generalment té caràcter recessiu; i 3) gens implicats en la reparació del DNA que, en general, es comporten com els gens supressors de tumors des del punt de vista genètic.

4.1. El càncer colorectal

Al menys el 50% de la població occidental desenvolupa un tumor colorectal abans dels 70 anys, i en un de cada 10 d'aquests individus, un d'aquests tumors progressarà cap a una neoplàssia maligna. Com a resultat, el càncer colorectal és la segona causa de mort per càncer al món occidental.

Els tumors colorectals constitueixen un excel·lent model per a estudiar la natura seqüencial del desenvolupament del càncer ja que les dades histopatològiques indiquen que la majoria dels carcinomes, o tumors malignes, provenen d'adenomes o tumors benignes preexistents (Sugarbaker et al, 1985). A més, es poden estudiar tumors a diferents

estadis de desenvolupament, des de petits adenomes fins a carcinomes metastàsics, tots ells ben caracteritzats histològicament, gràcies a la fàcil accessibilitat del teixit colònic mitjançant el colonoscop flexible, el qual ha permès correlacionar els diferents estadis de progressió amb l'aparició i acumulació seqüencial d'alteracions en gens concrets, els quals inclouen supressors de tumor, oncogens i gens implicats en la reparació del DNA. Així, s'ha proposat un model genètic (seqüencial), esquematitzat en la figura 11, per a aquest tipus de càncer (Fearon and Vogelstein, 1990; Kinzler and Vogelstein, 1996; Chung, 2000).

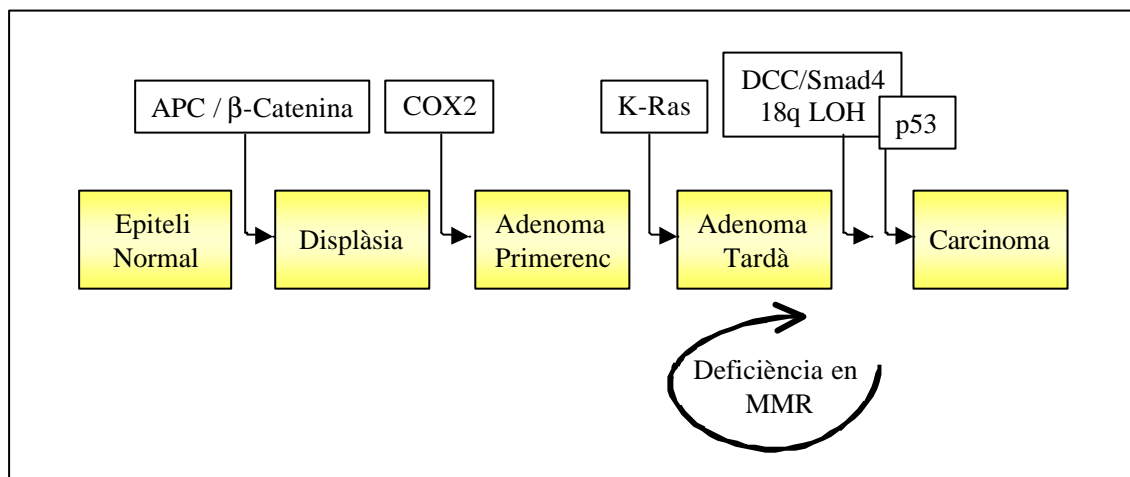


Figura 11: Model multietapes del càncer colorectal (Kinzler and Vogelstein, 1996; Chung, 2000)

APC. El gen APC (“Adenomatous Polyposis Coli”) va ser identificat com el responsable de la Poliposi Adenomatosa Familiar (FAP, “Familial Adenomatous Polyposis”), malaltia hereditària autosòmica dominant que afecta a 1 de cada 7000 individus. Els pacients amb FAP desenvolupen de centenars a mil·lers de pòlips colorectals benignes durant els primers 20-30 anys de vida. Totes les cèl.lules somàtiques dels individus amb FAP tenen un al·lel del gen APC inactivat, en la majoria dels casos com a conseqüència de mutacions que comporten la síntesi d’una proteïna APC truncada. La progressió de l’epiteli histològicament normal a un adenoma és conseqüència de la pèrdua de l’al·lel normal del gen APC. Els pòlips

benignes poden progressar de forma espontània a estadis més avançats donant lloc a carcinomes malignes i la totalitat dels individus amb APC desenvolupa un càncer colorrectal si no es fa tractament preventiu. El gen APC també juga un paper fonamental en els càncers de còlon anomenats esporàdics: el 75-85% dels adenomes en individus sense història de FAP presenten la pèrdua d'un al·lel del gen APC a la vegada que mutacions del gen en l'altre al·lel, la majoria de les quals donen lloc a una proteïna truncada (Miyoshi et al., 1992; Powell et al., 1992; Miyake et al., 1994). Existeix un model animal en ratolins que presenta una patologia comparable a la dels pacients amb FAP. Es tracta dels ratolins Min ("Multiple intestinal neoplasia"), els quals tenen una mutació en un dels al·lells del gen *Apc* que dona lloc a una proteïna APC truncada (Su et al., 1992).

L'APC forma complexos amb varis membres de la via de transducció de senyal de Wnt, entre els quals es troba la β -catenina, la Gsk-3 β ("Glycogen synthase kinase"), l'axina i la conductina. Aquests tres últims, juntament amb l'APC, estàn implicats en la degradació de la β -catenina citosòlica (revisat a Brown and Moon, 1998; Stappenbeck et al., 1998; Chung, 2000). Mutacions en APC que bloquegen la seva interacció amb la β -catenina, o mutacions en la β -catenina que impedeixen la seva fosforilació per Gsk-3 β , augmenten l'estabilitat i els nivells de la β -catenina al citosol. Com a conseqüència, la β -catenina es transloca al nucli (Korinek et al., 1997) on pot formar complexos amb factors de transcripció de la família Tcf/Lef i regular la transcripció de gens com *c-myc*, *c-jun*, ciclina D1, PPAR δ , MMP-7 i *Cdx-1* (Lickert et al., 2000; revisat a Smalley and Dale, 1999; Chung, 2000; Kikuchi, 2000). La majoria de tumors colorectals esporàdics que no presenten alteracions en APC (un 15%) presenten mutacions estabilitzants de la β -catenina recolzant el seu paper com a oncogen (Morin et al., 1997; Sparks et al., 1998; revisat a Polakis, 1999). Aquest fet indica un paper essencial d'aquest regulador transcripcional en la fisiologia de l'epiteli colorrectal, que ve substantiat pel fet que en els ratolins en els quals s'ha inactivat el gen *Tcf4* hi ha una depleció de cèl·lules mare intestinals i una maduració

accelerada de l'epiteli (Korinek et al., 1998).

Malgrat la indiscutible importància de la via de la β -catenina / TCF-4 en el procés de transformació mediat per les mutacions en APC, altres possibles vies de senyalització poden participar en el càncer colorectal riu aball de l'APC mutat. Així la Ciclooxygenasa-2 (COX-2), enzim implicat en la síntesi de prostaglandines, està sobreexpressada en el 43% dels adenomes i en el 86% dels carcinomes (Eberhart et al., 1997). Els nivells de COX-2 estan relacionats amb la regulació de l'apoptosi i l'angiogènesi (DuBois et al., 1996; Tsujii et al., 1998). A més, la inhibició de COX-2 atura la proliferació de cèl·lules derivades de càncer de còlon en cultiu (Sheng et al., 1997) i redueix en un 85% el número de pòlips intestinals en ratolins Min (Oshima et al., 1996) (revisat a Chung, 2000; Mayol and Real, 2000). No obstant, i malgrat que no s'ha trobat cap correlació entre la pèrdua de l'activitat d'APC i l'expressió de COX-2, no s'han pogut establir lligams bioquímics entre les dues vies de senyalització (revisat a Mayol and Real, 2000).

K-ras. Aproximadament un 50% dels carcinomes colorectals (Bos et al., 1987; Forrester et al., 1987) així com dels adenomes més de 1 cm de tamany, presenten mutacions en l'oncogen K-ras (Vogelstein et al., 1988). Només un 10% dels adenomes menors de 1 cm presenten mutacions en aquest gen, suggerint que les mutacions no tenen un efecte iniciador del procés tumorigènic. El gen K-ras està implicat en molts altres tipus de càncer a més del colorrectal, sent en el de pàncrees on es presenta una prevalença més alta de mutacions en K-ras. Per altre banda, hi ha altres tipus de càncer on les mutacions en els gens de la família ras són poc freqüents (i.e. càncer de mama i estòmac). Les proteïnes Ras són el prototip de la família de les proteïnes petites amb activitat GTPasa, l'activitat de les quals ve regulada per la unió i hidròlisi de nucleòtids de guanina. Aquestes proteïnes estan implicades en la transducció de senyal de receptors de membrana que porten associada activitat tirosina quinasa, molts dels quals són receptors de factors de creixement. La via de transmissió de senyal de ras implica l'activació de Raf i de la via de MAPK, activant factors de

transcripció que regulen l'expressió de gens implicats en la proliferació cel·lular. Mutacions en ras que incrementin els nivells de ras-GTP, augmentaran la senyal mitogènica dels factors de creixement. Les mutacions més freqüents en càncer de còlon són canvis puntuals al codó 12, originant una forma constitutivament activa de l'enzim (Vogelstein et al., 1988).

Els gens de la regió 18q21. El 70% dels carcinomes colorectals, així com un 50% d'adenomes avançats, presenten pèrdues al·lèliques en la regió 18q21 on per clonatge posicional s'han identificat tres gens candidats amb potencial activitat supressora de tumors: DCC ("Deleted in Colorectal Cancer") (Fearon et al., 1990), Smad2 i Smad4 (Eppert et al., 1996; Hahn et al., 1996; Riggins et al., 1996; revisat a White et al., 1998). Aquests gens estan àmpliament tractats en la secció 5 d'aquest capítol d'introducció.

p53. Més del 75% de carcinomes colorectals presenten pèrdues al·lèliques de la regió cromosòmica 17p que conté el gen p53, mentres que la seva prevalença és molt menor en estadis menys avançats de la progressió tumoral (Baker et al., 1990). Diversos estudis correlacionen les pèrdues al·lèliques en 17p amb la progressió d'adenoma a carcinoma (Fearon et al., 1987; Vogelstein et al., 1988). Un 50% de tots els càncers presenten el gen p53 inactivat, de manera que p53 és el gen supressor de tumors més freqüentment inactivat en càncer humà. Els càncers de mama (Mackay et al., 1988; Devilee et al., 1989), pulmó (Yokota et al., 1987; Weston et al., 1989), bufeta (Tsai et al., 1990) i cervell (James et al., 1989) són alguns exemples.

La proteïna p53 és un factor de transcripció que, com a conseqüència de presentar una vida mitjana molt curta, es troba en nivells molt baixos en la cèl.lula normal. En resposta a danys al DNA, i a través de mecanismes poc coneguts, els nivells de p53 en la cèl.lula augmenten degut a l'estabilització de la proteïna a la vegada que s'activa per fosforilació. Aquests canvis indueixen l'expressió d'altres proteïnes que provoquen un arrest en la divisió cel·lular i permeten la reparació del dany al DNA. En cas de que aquest

dany no pugui ser reparat, p53 iniciarà la resposta apoptòtica. D'aquesta manera s'elimina la cèl·lula danyada i s'evita que les mutacions passin a les cèl·lules filles. La proteïna p53 consta d'un domini N-terminal transactivador, un domini d'unió al DNA, i una regió C-terminal formada per un domini d'oligomerització i dominis d'interacció amb altres proteïnes. El domini d'unió al DNA situat en la regió central de la proteïna (AA: 90-295) està altament conservat entre els vertebrats i és el domini on es concentren el 90% de les mutacions descrites en càncers humans. A més, en aquesta regió hi ha 5 codons "hotspot" (175, 245, 248, 249 i 273) que representen el 20% de totes les mutacions descrites fins al moment (revisat a Hollstein et al., 1996; Hainaut et al., 1997; Hupp et al., 2000). S'han descrit mutacions del gen p53 en la línia germinal d'individus amb la síndrome de càncer hereditària de Li-Fraumeni, que s'associa a una alta incidència de tumors epitelials i sarcomes (Li et al., 1988; Birch et al., 1994).

Els tumors amb mutacions en la p53 presenten un elevat nombre d'alteracions genètiques (revisat a Hansen and Oren, 1997) i s'ha suggerit que presenten una pitjor resposta front a la quimioteràpia o la radioteràpia.

Els gens implicats en la reparació del DNA. L'estudi del càncer colorectal familiar no polipòsic ó HNPCC ("Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer") va permetre la caracterització de mutacions en 3 gens MMR ("mismatch repair"): hMSH2, hMLH1 i hPMS2. Els dos primers són els principals responsables del desenvolupament d'aquesta malaltia en la majoria de famílies amb HNPCC (revisat a Kinzler and Vogelstein, 1996). Per a generar la malaltia és necessari que ambdós al·lels del gen es trobin alterats. La inactivació d'aquests acostuma a ser per LOH ("Loss of Heterozygosity") en un dels al·lels acompanyat d'una mutació puntual en l'altre. Aquestes mutacions puntuals presenten una àmplia distribució a tot al llarg del gen (Peltomaki and Vasen, 1997). Per altra banda, el gen hMLH1 també pot inactivar-se per hipermetil·lació del promotor, malgrat aquest mecanisme d'inactivació sembli ser més comú en els casos de càncer esporàdic que en els casos de HNPCC (Herman et al., 1998).

Els gens hMSH2, hMLH1 i hPMS2, juntament amb hMSH6 i hPMS1, codifiquen per a proteïnes que formen els complexos de reparació del DNA durant la transcripció (revisat a Chung, 2000). Aquests complexos reconeixen i reparen els nucleòtids mal aparellats ("mismatch") i les insercions o delecions d'un o més parells de bases en la seqüència de DNA novament sintetitzada. Les cèl·lules amb un sistema de reparació del DNA defectuós presenten un fenotip mutador associat a l'acumulació de mutacions. Aquestes mutacions afecten principalment a seqüències curtes repetides en regions no codificadores, però també poden quedar afectats gens que contenen aquest mateix tipus de seqüències en els seus exons codificants. Aquest és el cas del receptor del TGF β (Markowitz et al., 1995) el qual és un potent inhibidor de la proliferació cel·lular en l'epiteli colònic (Kurokawa et al., 1987), del regulador de l'apoptosi BAX, del receptor de l'IGF-II ("Insulin-like growth factor II"), els factors de transcripció E2F-4 i TCF-4, la caspasa 5, el factor homeobox Cdx2, i inclús els mateixos gens MMR: hMSH3 i hMSH6 (revisat a Chung, 2000).

4.2. El càncer de pàncrees

El càncer de pàncrees constitueix aproximadament la quarta causa de mortalitat per càncer en el món occidental en homes i la cinquena en dones. És el càncer amb pitjor pronòstic i en el qual s'han produït menys avenços clínics en els darrers 30 anys. Menys del 5% dels pacients sobreviuen un any després del diagnòstic (generalment són càncers que es diagnostiquen quan ja estan en un estadi molt avançat) i la supervivència mitjana és de 4 a 6 mesos. Aquest fet, junt amb la seva presentació en pacients d'edat avançada i les dificultats per a accedir al teixit, fan que, a diferència del càncer de còlon, hagi estat més difícil d'estudiar les causes moleculars responsables del seu desenvolupament. Tanmateix, en els darrers anys s'han produït importants avenços en els coneixements sobre la seva genètica molecular que han permès elaborar el model següent (Fig. 12) sobre la progressió tumoral en pàncrees.

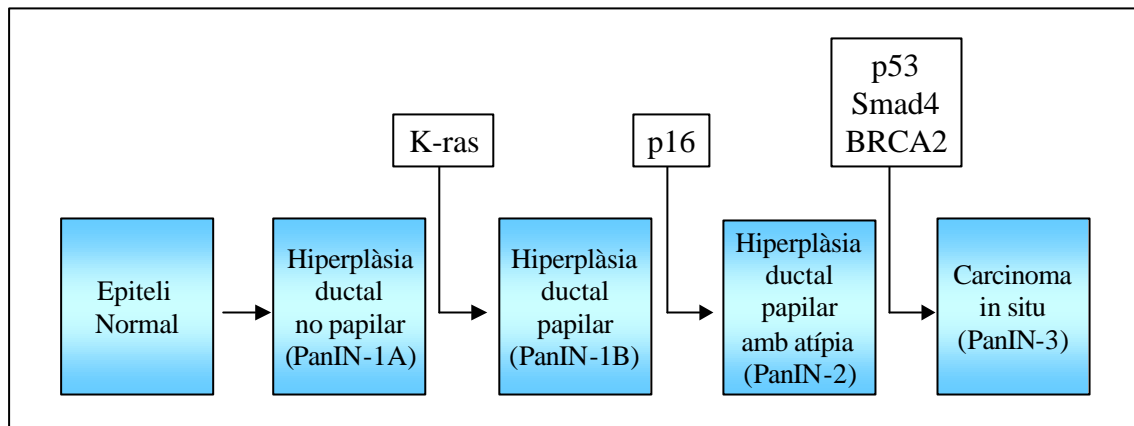


Figura 12: Model genètic de la progressió tumoral en pàncrees en relació amb les alteracions genètiques associades (adaptat de Hruban et al., 2000)

(PanIN: "Pancreatic Intraductal Neoplasia")

La majoria (90%) de càncers de pàncrees exocrí són classificats com a adenocarcinomes ductals i només 1-2% dels tumors tenen fenotip acinar. No obstant, el tipus cel·lular a partir del qual s'originen no està totalment establert. Diverses evidències recolzen que aquests adenocarcinomes s'originen a partir de cèl·lules ductals però no es pot descartar la possibilitat de que les cèl·lules acinars, com a resultat de la transformació neoplàstica, perdin les seves característiques per transdiferenciar cap a un fenotip ductal (Scarpelli et al., 1991; Real, 1995). D'acord amb aquesta última hipòtesi, el cultiu *in vitro* de pàncrees exocrí de donants (Hall and Lemoine, 1992; Vilà et al 1994) ha permès observar que les cèl·lules acinars, en aquestes condicions, transdiferencien a fenotip ductal demostrant la plasticitat fenotípica d'aquestes cèl·lules. Per altra banda, les displàsies severes (un factor de risc important pel desenvolupament posterior de neoplàsia), s'observen rarament en cèl·lules acinars, inclús en pacients que ja han desenvolupat càncer de pàncrees, mentres que s'identifiquen comunment en cèl·lules ductals de pacients amb aquest tipus de càncer. A més, resultats recents han demostrat que es detecten les mateixes alteracions genètiques en lesions preneoplàsiques i en hiperplàsies de cèl·lules ductals suggerint que, en la majoria dels casos, són aquestes i no les acinars, les cèl·lules diana del procés carcinogènic (Caldas et al., 1994b; Wilentz et al., 1998; Luttges et al., 1999).

Entre els gens implicats en el desenvolupament del càncer de pàncrees destaquen:

K-ras. K-ras es troba mutat entre el 75 i el 95% dels càncers pancreàtics estudiats. Com en el còlon, la mutació més freqüent recau en el codó 12 (Grunewald, 1989; Smit, 1988; Capellà et al., 1991; Malats et al., 1997) encara que també s'han detectat mutacions en els codons 13 i 61 (Motojima et al., 1993). El fet que mutacions en el codon 12 de K-ras s'hagin identificat en hiperplàssies ductals i en algunes lesions preneoplàsiques, com és el cas de la pancreatitis crònica, suggereix que les alteracions en aquest gen són un esdeveniment precoç en el desenvolupament del càncer de pàncrees però també indiquen que el potencial de malignització de lesions que presenten mutacions amb K-ras és relativament limitat (Almoguera et al., 1988; Lemoine et al., 1992; Cerny et al., 1992; Malats et al., 1993; Caldas et al., 1994b; Caldas and Kern, 1995; Luttes et al., 1999).

p53. Similarment a altres tipus de càncer, hi ha mutacions en la seqüència del gen p53 en un 40-70% dels càncers de pàncrees. L'espectre mutacional és relativament similar al descrit en altres tumors epitelials i les dades actuals suggereixen que les mutacions en p53 són un esdeveniment relativament tardà en el desenvolupament del tumor. En alguns dels estudis realitzats (Weyrer et al., 1996), encara que no en tots, les mutacions en p53 correlacionen amb una pitjor supervivència. Per altra banda mutacions en ras i p53 semblen tenir un efecte cooperatiu que mena cap a un fenotip maligne (Scarpa et al., 1993; Hinds et al., 1990).

La regió 9p21. Estudis de pèrdues d'heterozigositat van posar en evidència una freqüent alteració de la regió 9p21 en els tumors pancreàtics, regió on s'hi ha identificat el gen INK4A. En el 38% dels càncers de pàncrees hi ha mutacions en aquest gen juntament amb una pèrdua d'heterozigositat. Si a aquests casos hi afegim els de delecions homozigòtiques, el percentatge de tumors de pàncrees que presenta inactivació funcional del gen INK4A és d'aproximadament 80% (Caldas et al., 1994a). Malgrat les delecions

homozigòtiques no són gaire freqüents i són un mecanisme d'inactivació gènica difícil de demostrar en mostres de tumors primaris, sembla que són un mecanisme d'inactivació força usual pel gen INK4A en càncer de pàncrees. Per altra banda, estudis recents demostren la inactivació del gen INK4A per metilació del promotor en els tumors pancreàtics en els quals no hi ha delecions homozigòtiques o mutacions (Song et al., 2000), recolzant un paper essencial d'aquest en la majoria dels tumors. El gen INK4A codifica per dues proteïnes: p16 i p19/p14ARF. p16 pertany a la família INK i regula negativament la progressió G1-S del cicle cel·lular per la seva capacitat d'inhibir les quinases cdk4 i cdk6. p19/p14ARF està implicada en la via de p53 modulant la seva estabilitat. En la mateixa regió gènica es localitza el gen p15, que pertany a la família de la p16 i també té com a funció l'arrest de la cèl·lula en G1. No obstant, p15, per si sol, sembla no tenir un efecte important en la carcinogènesi del pàncrees.

La regió 18q21. A l'igual que en el càncer colorectal, aquesta regió també juga un paper important en el càncer de pàncrees (Veure secció 5).

5. La regió 18q21

El 70% dels càncers colorectals presenten pèrdues d'heterozigositat en la regió 18q (Vogelstein et al., 1989) i en més del 90% d'aquests casos, aquesta pèrdua inclou el locus 18q21. De forma similar, la pèrdua del cromosoma 18q s'ha observat en el 80% dels càncers de pàncrees (Hahn et al., 1995). A més, el cromosoma 18q ha estat també relacionat amb altres tipus de càncer com el de pròstata (Gao, X., et al., 1993), esòfag (Miyake S et al., 1994) i bufeta (Brewster et al., 1994).

La proporció de càncers colorectals amb pèrdues al·lèliques de la regió 18q21, augmenta en relació amb la progressió d'aquests càncers, de manera que les pèrdues en 18q21 s'associen a tumors invasius i metastàsics (Kern et al., 1989; Miyaki et al., 1990; Iino et al., 1994). Diversos

treballs demostren una correlació entre la pèrdua del 18q21 i un pitjor pronòstic dels pacients amb càncer colorectal (Jen et al., 1994; Martínez-Lopez et al., 1998; revisat a Chung et al., 1998; De Angelis et al., 2001).

Aquestes dades, juntament amb experiments que demostren que la introducció del cromosoma 18 en cèl·lules de càncer de còlon suprimeix, encara que parcialment, la seva capacitat tumorigènica (Tanaka et al., 1991; Goyette et al., 1992), suggereixen l'existència de com a mínim un gen supressor de tumor en la regió 18q21. Per clonatge posicional s'hi han identificat fins al moment, tres gens candidats: Smad2 (Eppert et al., 1996; Riggins et al., 1996), Smad4 (Hahn et al., 1996) i DCC ("Deleted in colorectal cancer") (Fearon et al., 1990).

5.1. Smad2 i Smad4

Smad2 (Eppert et al., 1996; Riggins et al., 1996) i Smad4 (també anomenat DPC4 de l'anglès "Deleted in Pancreatic Cancer") (Hahn et al., 1996) són membres de la família de proteïnes transductores de senyal del TGF- β . El TGF- β ("Transforming Growth Factor") és el prototip d'una àmplia família de citoquines que inclouen també les activines, inhibines i BMP's ("Bone Morphogenetic Proteins"). Els membres d'aquesta família actuen sobre diferents processos tals que proliferació i diferenciació cel·lulars, apoptosi, reparació de teixits i modulació del sistema immunològic.

La via de transducció de senyal del TGF β (revisat a Heldin et al., 1997; Massagué et al., 1997; Massagué i Chen, 2000; Massagué i Wotton, 2000) (Fig. 13) s'inicia a la membrana on la presència de lligand permet la interacció de dos tipus de receptors de membrana: els de tipus I (T β R-I) i els de tipus II (T β R-II), donant lloc a un tetràmer contenint dos T β R-I i dos T β R-II (Yamashita et al., 1994). El domini citosòlic dels T β R-II té activitat serin/treonin quinasa i, a l'activar-se per la unió del lligand, s'autofosforila i fosforila els receptors de tipus I, els quals donen l'especificitat de les senyals

intracel·lulars. Els Smads interaccionen amb els $\text{T}\beta\text{R-I}$ fent de mediadors citoplasmàtics d'aquesta senyal generada a la membrana.

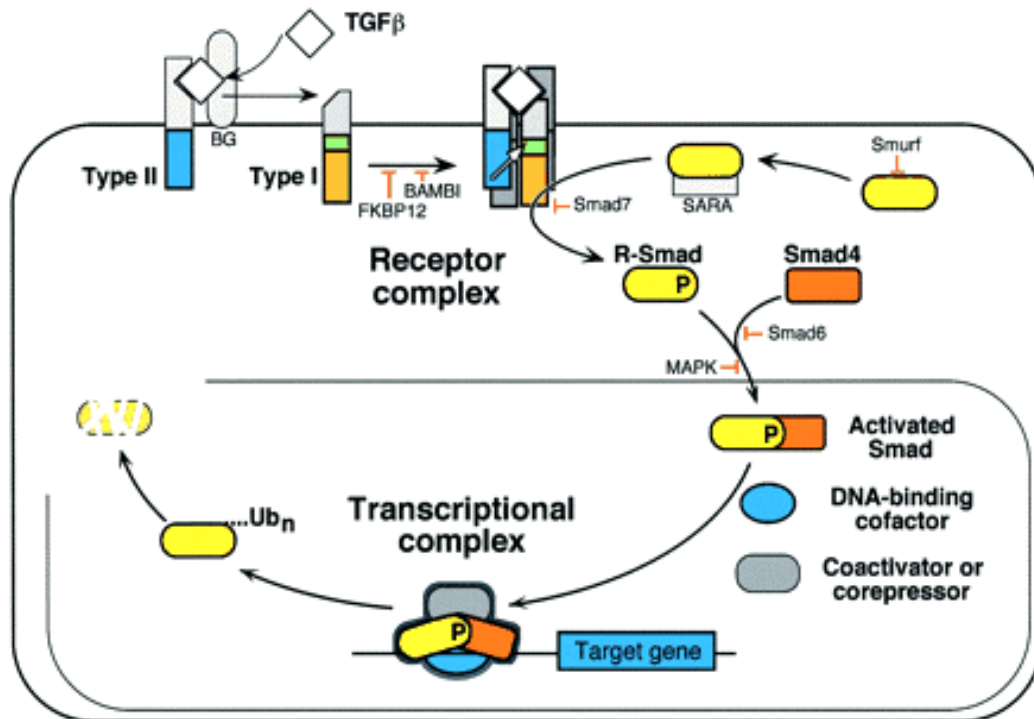


Figura 13: Esquema de la via de transducció de senyal del TGF- β (Massagué & Wotton, 2000). R-Smad: Receptor-regulated Smads

S'han descrit 9 proteïnes Smad a vertebrats. Estructuralment presenten uns dominis altament conservats als extrems N- i C-terminal (dominis MH1 i MH2 respectivament), connectats per una regió rica en prolins que està menys conservada. A la regió MH2 hi ha una seqüència SSXS que és fosforilada pels $\text{T}\beta\text{R-I}$. Hi ha Smads específics de determinades vies de transducció. Així els Smad1 i Smad5 són transductors de senyal de BMP (Liu et al., 1996), i els Smad2 i Smad3 ho són de la via TGF β /activina (Chen et al., 1996). En canvi Smad4, que manca del motiu SSXS a MH2, és comú a totes les vies: Smad4 forma complexos amb Smad1 (Lagna et al., 1996; Kretschmar et al., 1997) i possiblement amb Smad5 i 9, després de l'activació dels receptors BMP o amb Smad2 i 3 després de l'activació dels receptors TGF β /activina (Lagna, G., et al., 1996; Nakao et al., 1997).

En la cèl·lula, els Smads són citosòlics i la seva activació provoca l'heterotrimerització i la translocació al nucli on actuen com a activadors transcripcionals.

El domini MH2 és un domini efector, activador de la transcripció, que sembla estar reprimint pel domini MH1. La fosforilació a MH2 en el domini SSXS inhibeix aquesta repressió. L'exemple més clar de que els Smads estan implicats en l'activació de la transcripció és l'activació del gen homeobox Mix.2 a *Xenopus* (Chen et al., 1996). Aquest gen s'indueix per la via TGF- β durant les primeres etapes del desenvolupament a *Xenopus*. El factor ARF ("Activin responsive factor"), que interacciona amb el promotor de Mix.2, està compostat per Smad2, Smad4 i FAST-1 (Chen et al., 1997). Aquest últim és el principal responsable de la unió al DNA. La fosforilació de Smad2 favoreix la interacció amb FAST-1 i Smad4 no interacciona amb aquest en absència de Smad2. Smad4 pot estabilitzar la unió Smad2-FAST-1 donant un complex actiu d'unió al DNA.

Els Smads 6 i 7 divergeixen estructuralment dels altres Smads sobretot en la regió N-terminal. Aquests actuen com a inhibidors de la senyalització per BMP i TGF β /activina unint-se als T β R-I i interferint amb la fosforilació dels altres Smads.

El gen Smad4 està estructuralment alterat en una elevada proporció de carcinomes pancreàtics (Hahn et al., 1996; Villanueva et al., 1998) i en carcinomes colorectals (Takagi et al., 1996; Thiagalingam et al., 1996; MacGrogan et al., 1997; Hoque et al., 1997) on s'ha associat al potencial metastàtic del tumor (Miyaki et al., 1999). S'han generat ratolins heterozigots en els quals s'hi ha inactivat els gens Smad4 i APC en un dels dos cromosomes (en aquesta espècie ambdós gens es localitzen en el cromosoma 18). Aquests ratolins presenten una taxa major de progressió tumoral dels pòlips colorectals que els ratolins que només manquen d'APC, confirmant el paper de Smad4 en la progressió del càncer (Takaku et al., 1998). En el 50% dels càncers de pàncrees es troben pèrdues

d'heterozigositat en la regió que conté aquest gen (18q21.1) (Nagatake et al., 1996; Schutte et al., 1996) i s'ha descrit una regió (entre l'exó 8 i l'exó 11) on es concentren el 80% de les mutacions descrites en aquest gen (Hahn et al., 1996; Kim et al., 1996; Nagatake et al., 1996; Schutte et al., 1996; Takagi et al., 1996). En canvi, les mutacions en Smad2 només s'han trobat en un baix nombre de càncers de còlon (Eppert et al., 1996) i són aparentment absents en els càncers de pàncrees (Villanueva et al., 1998). En càncer, no són freqüents les mutacions en Smad1, Smad3 i Smad5.

5.2. EI DCC

El primer candidat a supressor de tumor descrit en la regió 18q21 fou el gen DCC ("Deleted in Colorectal Cancer") (Fearon et al., 1990). L'expressió del gen DCC està disminuïda o absent en tumors de còlon (Itoh, 1993), pàncrees (Hohne et al., 1992; Hahn et al., 1995) i també en altres tipus de càncer com el de estòmac (Uchino et al., 1992), esòfag (Huang et al. 1992), mama (Thompson et al., 1993), endometri (Gima et al. 1994), ovari (Chenevix-Trench et al., 1992), pròstata (Gao et al., 1993), gliomes (Scheck & Coons, 1993) i leucèmies (Miyake et al., 1993). No obstant diversos estudis el situen com a bon candidat a supressor de tumor (revisat a Fearon et al., 1996), la seva implicació en càncer colorectal ha estat qüestionada (Gotley, 1996; Fazeli et al., 1997; Takaku et al., 1998).

La freqüència de les alteracions en DCC augmenta en els tumors més avançats suggerint que les alteracions en aquest gen tenen lloc en les fases tardanes del procés tumorigènic. Així, s'ha trobat una correlació entre la pèrdua del DCC i les etapes tardanes de la progressió tumoral, no només en càncer colorectal (revisat a Fearon and Vogelstein, 1990; Kinzler and Vogelstein, 1996) sino també en gliomes (Reyes-Mugica et al., 1997), i neuroblastomes, on la pèrdua d'expressió del DCC s'ha associat a la capacitat de disseminació del tumor (Reale et al., 1996).

El gen DCC conté 29 exons que s'extenen sobre 1.4 megabases (Cho et al, 1994; Reale et al., 1994) (Fig. 14). Segons Reale et al. (1994) els exons 17 i 26 presenten processament ("splicing") alternatiu específic de teixit, però no es coneix la conseqüència funcional d'aquest processament diferencial. El gen DCC s'expressa en la majoria de teixits adults malgrat els nivells d'expressió són tan baixos que, en general, es requereix de RT-PCR per a la seva detecció (Reale et al., 1994). No obstant, determinades zones del sistema nerviós com ara el còrtex del cerebel i particularment les cèl·lules de Purkinje, presenten nivells més elevats (Hedrick et al. 1994).

El RNA missatger del DCC, d'aproximadament 12 Kb, conté una pauta de lectura oberta de 4341 pb (Hedrick, 1994) que codifica per una proteïna transmembrana de 1447 aminoàcids, de 180 kDa de pes molecular, prototip d'una nova subfamília dintre de la superfamília de les Immunoglobulines (Fig. 14). S'han clonat homòlegs del DCC humà en ratolí (Cooper et al., 1995), pollastre (Chuong et al., 1994), *Xenopus* (Pierceall et al., 1994b), *D. melanogaster* (Kolodziej et al., 1996) i *C. elegans* (Chan et al., 1996).

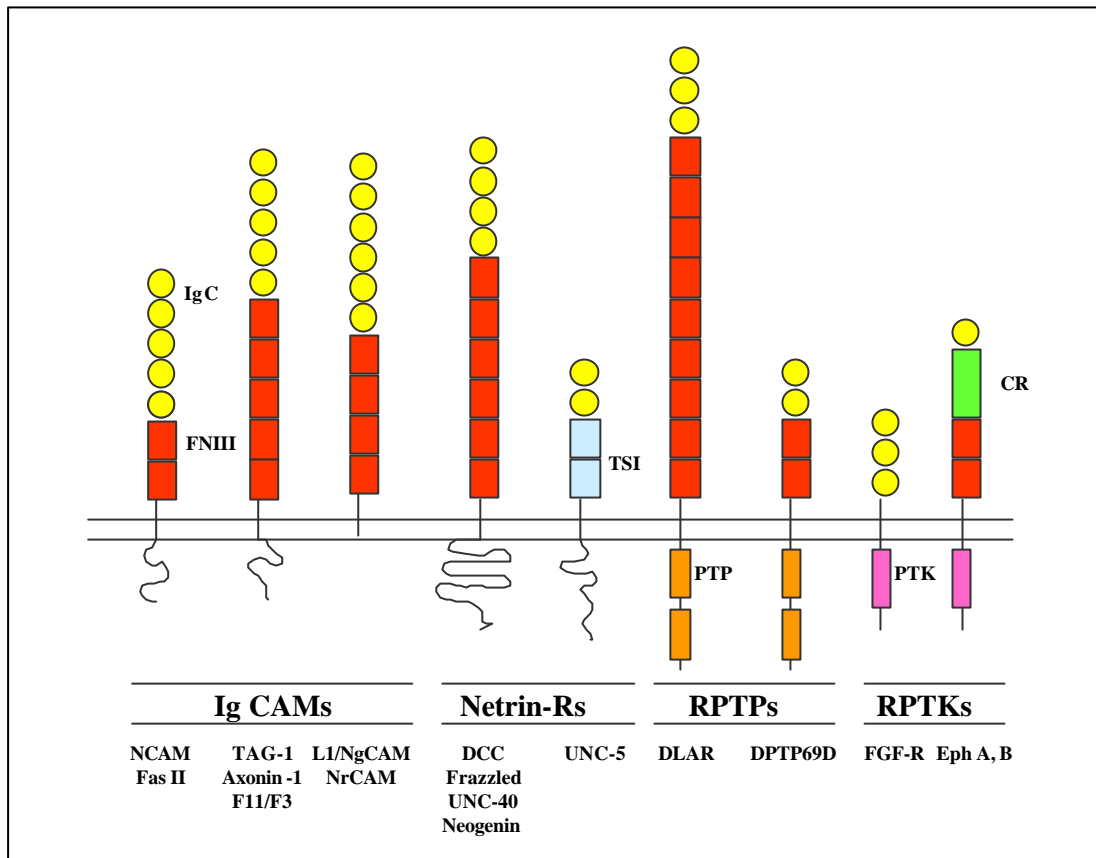


Figura 14: Esquema de diverses proteïnes de la superfamília de les immunoglobulines on s'hi inclou el DCC dintre de la subfamília dels receptors de netrines.⁴

(IgC: Immunoglobulina C; FNIII: Fibronectina tipus III; TSI: "Thrombospondin type I domain"; PTP: Proteïna Tirosina Fosfatasa; PTK: Proteïna Tirosina Kinasa; CR: Regió rica en Cisteïnes).

INTRODUCCIÓ

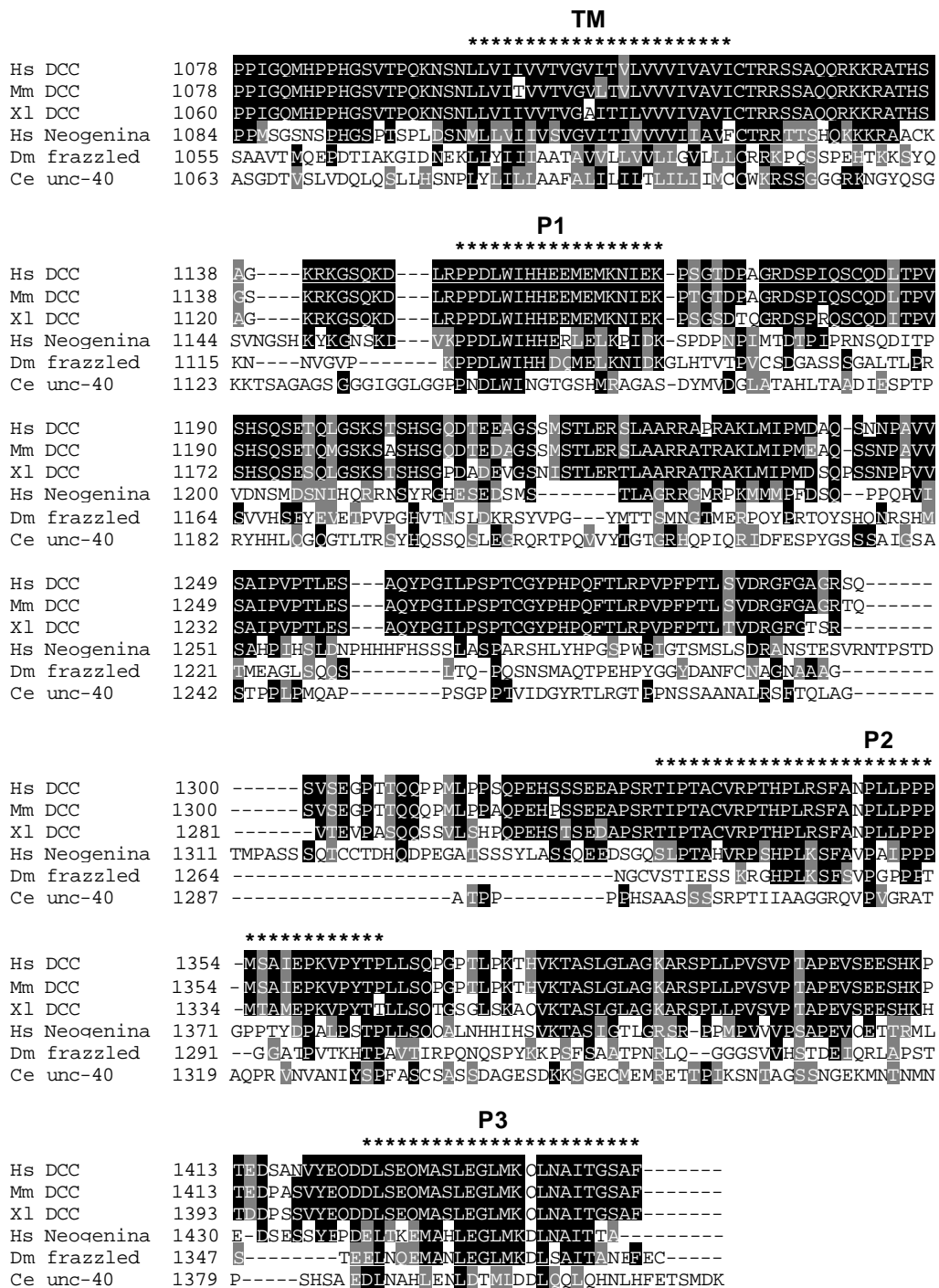


Figura 15: Alineament de la regió N-terminal del DCC

Dominis transmembrana (TM) i intracel·lular del DCC humà (Hs DCC), dels homòlegs clonats a diferents espècies (Mm: *Mus musculus*; Xl: *Xenopus laevis*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Ce: *Caenorhabditis elegans*) i de la Neogenina humana. Els residus idèntics al menys en 3 proteïnes estan marcats en negre. Els residus conservats estan marcats en gris. Hi ha 3 dominis altament conservats entre els diferents homòlegs del DCC: P1, P2 i P3, dels quals P2 és un domini ric en prolines.

La regió extracel·lular del DCC, altament glicosilada, consta de 4 subdominis de tipus IgC₁ i 6 subdominis de tipus III de fibronectina. En canvi, la regió intracel·lular de la proteïna no presenta homologies amb cap altre proteïna coneguda fora de la Neogenina (Vielmetter et al., 1994), membre de la subfamília de DCC, el domini intracel·lular de la qual, presenta un 39% d'identitat amb el del DCC. En aquest domini, destaquen alguns llocs potencials de fosforilació (4 tirosines, 4 serines susceptibles a fosforilació per proteïna quinasa C i 10 serines susceptibles a fosforilació per Caseïna quinasa II) (Reale et al., 1994), i tres regions (P1, P2, P3) altament homòlogues entre totes les proteïnes de les diferents espècies (Fig. 15). Una d'aquestes regions (P2), és rica en prolines. Fins la data d'aquest treball no s'hi ha trobat dominis consensus d'altres tipus.

S'ha demostrat que el domini intracel·lular de DCC pot unir, *in vitro*, un homòleg humà de la proteïna Sina ("Seven in Absentia") (Hu et al., 1997). A *Drosophila*, Sina està implicada en la degradació de proteïnes ubiquïtinades per la via del proteasoma. És per això que s'ha proposat que la degradació del DCC té lloc via ubiquïtinació i proteasoma.

6. Funció del DCC

En el moment d'iniciar aquest treball, diversos assajos funcionals publicats suggerien que DCC podia actuar com supressor de tumors. Així, fibroblasts de rata que expressen un RNA antisentit del DCC adquireixen propietats tumorigèniques, sent llavors capaços de formar colònies en agar tou i d'induir tumors subcutanis en ratolins nude (Narayanan et al. 1992). Per altra banda, cèl·lules tumorigèniques derivades de queratinòcits humans transformats en les quals no s'expressa DCC (Klingelutz et al., 1995), perden la capacitat tumorigènica en ratolins nude quan són transfectades amb el cDNA complert d'aquest gen. La transfecció d'una forma truncada sense la regió citoplasmàtica no té cap efecte sobre la tumorigenicitat

(Klingelhutz et al., 1995), indicant que aquest domini és imprescindible per la funció com a supressor tumoral del DCC.

Per a determinar els mecanismes a través dels quals DCC podria exercir aquests efectes de supressor tumoral, es van realitzar diversos estudis que han proposat la implicació del DCC en diversos processos cel·lulars entre els quals es troben la diferenciació (Lawlor and Narayanan, 1992; Hedrick et al., 1994; Pirceall et al., 1994a) i l'adhesió cel·lulars (Narayanan et al., 1992; Chuong et al., 1994). Més recentment, DCC ha estat descrit com a un receptor de la netrina-1 (Keino-Masu et al., 1996), molècula implicada en la guia axonal, éssent en el sistema nerviós, on l'estudi de la funció del DCC ha avançat més ràpidament. Altres observacions han suggerit, un paper en apoptosi (Mehlen et al., 1998; Velcich et al., 1999). Tots aquests aspectes sobre la funcionalitat d'aquesta proteïna venen descrits amb més detall a continuació.

6.1. DCC en la diferenciació cel·lular

Malgrat DCC fou descrit inicialment com a supressor tumoral en tumors colorectals, els nivells d'expressió més alts del DCC en teixit normal es troben en el teixit nerviós. A més, el seu domini extracel·lular és altament homòleg a les proteïnes de la família de les N-CAM (Fig. 14). Així, els primers treballs realitzats *in vitro* sobre la funcionalitat del DCC, foren realitzats en les cèl·lules de feocromocitoma PC-12, les quals són capaces de diferenciar cap a un fenotip neuronal quan es cultiven en presència de NGF ("Neuronal Growth Factor"), bFGF ("basic Fibroblast Growth Factor") o Interleucina-6 (Greenberg et al., 1985; Sukhatme et al., 1987). El tractament de les cèl·lules PC-12 amb NGF induïx un augment d'adhesió al substrat, una aturada de la proliferació i l'adquisició d'una morfologia neuronal caracteritzada pel creixement de neurites. Els treballs de Lawlor i Narayanan (1992) i de Pierceall et al. (1994a) demostraren que el DCC induïx la formació de neurites en les cèl·lules PC-12, tant si aquestes

cèl·lules són transfectades amb el cDNA complet del DCC o es mantenen en cocultiu amb cèl·lules NIH 3T3 que expressen DCC. En aquest últim cas, és necessària la interacció cèl·lula-cèl·lula, no aconseguint-se el mateix efecte amb el medi condicionat de les cèl·lules NIH 3T3/DCC sobre les PC-12. No s'obté cap efecte si el cDNA del DCC manca de la part citoplasmàtica de la proteïna, demostrant que aquesta és imprescindible per la seva funcionalitat. A més, cèl·lules PC-12 que expressen un mRNA antisentit del DCC, no es diferencien en resposta a NGF, suggerint que el DCC és necessari per la inducció de la diferenciació per NGF.

Els treballs que fan referència al paper del DCC en la diferenciació de les cèl·lules epitelials intestinals han donat lloc a resultats més controvertits. A partir d'estudis d'expressió per immunohistoquímica en teixit de còlon humà, Hedrick et al. (1994) varen suggerir una correlació entre l'expressió del DCC i la diferenciació mucosecretora. D'altra banda, estudis en pollastre han demostrat que DCC s'expressa en tots els tipus cel·lulars durant el desenvolupament embrionari mentres que només és detectat en les zones proliferatives de l'epiteli intestinal adult (Chuong et al. 1994). Així, mentres que el treball de Hedrick i col. (1994) suggeria un paper del DCC en la diferenciació terminal de les cèl·lules mucosecretores, el treball de Chuong col. (1994) proposava un paper del DCC en les etapes primerenques de la diferenciació.

6.2. DCC en l'adhesió cel·lular

L'estructura del domini extracel·lular del DCC suggereix un paper en l'adhesió cel·lular que s'ha confirmat en diferents treballs realitzats en cèl·lules PC-12 i fibroblasts NIH 3T3 (Narayanan et al., 1992; Chuong et al., 1994). Així, quan s'inhibeix l'expressió de DCC utilitzant una estratègia antisentit, aquestes cèl·lules presenten una reducció de l'adhesió al plàstic; l'efecte es reverteix si les plaques han estat prèviament recobertes amb laminina. D'altra banda, els fibroblasts transfectats amb el cDNA complet del DCC presenten un augment de l'adhesió cèl·lula-cèl·lula i aquest efecte

s'accentua si les cel·lules són cultivades en gels tridimensionals de matrigel, suggerint que, en aquest tipus cel·lular, el DCC augmenta l'adhesió cèl·lula-cèl·lula en detriment de l'adhesió a la matriu. A partir d'aquests resultats es proposà que DCC exercia un efecte sobre l'adhesió mitjançant una interacció heterotípica amb un lligand desconegut (Chuong et al., 1994).

6.3. DCC en l'apoptosi i cicle cel·lular

Els resultats recents de Mehlen et al. (1998) realitzats en cèl·lules embrionàries de ronyó 293T i en les cèl·lules derivades de càncer de còlon Caco-2 suggereixen que DCC pot actuar com a supressor de tumor induint apoptosi en cèl·lules que no estan exposades a la Netrina-1 (ligand del DCC en el sistema nerviós; veure la secció a continuació). La presència de lligand bloqueja l'apoptosi induïda per DCC. Així, la netrina-1 actuaria com a factor de supervivència cel·lular en els teixits en els quals s'expressa. En canvi, les cèl·lules invasives o metastàsiques en un ambient diferent del propi, deprivades de netrina-1, activarien aquest procés de mort cel·lular. DCC també ha estat relacionat amb processos d'apoptosi en cèl·lules derivades de càncer de còlon HT-29, transfectades amb el cDNA complet del DCC i que expressen nivells alts d'aquesta proteïna (Velcich et al., 1999). No obstant, l'expressió ectòpica del DCC, induïda per adenovirus, en un total de 22 línies cel·lulars derivades de diferents tipus de càncer, no promou l'apoptosi en cap d'aquestes cèl·lules induint però, en algunes d'elles, una aturada transitòria del cicle cel·lular (Chen et al., 1999). Aquests autors no van observar cap efecte de la netrina-1 sobre la inducció d'apoptosi o aturada del cicle cel·lular per part del DCC en aquestes línies cel·lulars. Donada la contradicció d'aquestes dades aquest aspecte del DCC haurà de ser objecte de més estudi. A més, el mecanisme pel qual DCC actuaria com a inductor apoptòtic o en l'aturada del cicle cel·lular encara està per caracteritzar.

6.4. DCC en la guia axonal

En el període durant el qual s'ha dut a terme aquest treball, s'ha demostrat la implicació del DCC en la guia axonal en el desenvolupament, com a receptor o com a component d'un complexe-receptor per a la netrina-1 (Keino-Masu et al., 1996; Chan et al., 1996; Kolodziej et al., 1996).

Durant l'embriogènesi, els axons migren fins a connectar amb els teixits diana seguint llargs recorreguts i formant una complexe i precisa xarxa nerviosa, essencial pel correcte funcionament del sistema nerviós. Els cons de creixement de les neurones són guiats per molècules que els atrauen o els repel·len, i que poden actuar a curta o llarga distància de manera que podem parlar d'atracció i repulsió per contacte i de quimioatracció i quimiorrepulsió (revisat a Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Drescher, 1996; Varela-Echevarría and Guthrie, 1997; Mueller, 1999).

Les netrines són una família de molècules difusibles, relacionades amb les laminines, implicades en la guia axonal que poden actuar com a quimioatractants o com a quimiorrepel·lents. S'ha demostrat que la netrina-1 s'uneix a la membrana de cèl·lules 293-EBNA transfectades que expressen ectòpicament DCC i que un anticòs que reconeix el domini extracel·lular del DCC bloqueja el creixement axonal dependent de la netrina-1 en explants de medul·la espinal en cultiu de forma dosi dependent (Keino-Massu et al., 1996). A *C. elegans*, el fenotip dels mutants deficientes en *unc-40* (homòleg de DCC) i *unc-6* (homòleg de netrina-1) és semblant (Hedgecock et al., 1990). A vertebrats, els ratolins deficientes per DCC (Fazeli et al., 1997) o per netrina-1 (Serafini et al., 1996) tenen unes alteracions a nivell de sistema nerviós similars: el nombre d'axons comissurals és reduït i no presenten una trajectòria dorso-ventral normal, la comissura de l'hipocamp és absent, així com la comissura anterior (en alguns casos hi és, però reduïda) i el nucli pontí és absent a la base del cervell anterior. Totes aquestes dades recolzen que DCC i netrina es troben en la mateixa ruta molecular i que DCC és un receptor, o forma part del complexe-receptor, per a la netrina-1.

La netrina-1 pot donar lloc a un efecte d'atracció ó de repulsió en funció del receptor present en l'axó en creixement. A més del DCC s'han escrit altres receptors per a la netrina-1 a vertebrats: UNC-5 H1 i UNC-5 H2, homòlegs al gen *Unc-5* de *C. elegans* (Leonardo et al., 1997), estan implicats en la quimiorrepulsió induïda per la netrina-1 en certs tipus d'axons (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995a; 1995b). La regió intracel·lular d'UNC-5 interacciona amb la regió intracel·lular de DCC de forma depenent de la presència de netrina-1. S'han identificat les seqüències implicades en la unió d'ambdues proteïnes. A UNC-5 es tracta d'una seqüència de 18 aminoàcids anomenada domini DB (de l'anglès: "DCC Binding"). La seqüència d'unió del DCC a UNC-5 són els 18 aminoàcids que componen el domini P1 (veure figura 15). La interacció dels dominis citosòlics aïllats té lloc independentment de netrina-1, suggerint que la interacció de les molècules senceres es troba d'alguna manera reprimida en absència del lligand extracel·lular (Hong et al., 1999). L'expressió del domini intracel·lular d'UNC-5, converteix la resposta front la Netrina-1 d'atracció a repulsió, essent aquesta última també depenent de l'expressió de DCC (Hong et al., 1999; Bashaw et al., 1999). S'ha proposat, doncs, un model de receptor multimèric on UNC-5 actuaria com un "interruptor" convertint una resposta atractant a repel·lent degut la seva associació amb DCC la qual només és possible en presència de netrina-1.

Recentment també s'ha descrit com a receptor de la netrina-1 el receptor A2b de l'adenosina (Corset et al., 2000). Aquest activa l'adenilat ciclase en resposta a la unió del lligand. Se sap que el creixement dels cons axonals està modulats per la concentració intracel·lular del cAMP (Ming et al., 1997) i que la netrina-1 indueix un augment de cAMP intracel·lular en els cons de creixement (Hopker et al., 1999). El treball de Corset i col. (2000) proposa el receptor A2b de l'adenosina com a bon candidat per a la modulació del cAMP en els cons de creixement en resposta a la Netrina-1. Per altra banda, a l'igual que UNC-5 aquest receptor també interacciona amb el domini intracel·lular del DCC de forma depenent de netrina-1.

Les netrines clonades en diferents espècies: a vertebrats (Netrina-1 i Netrina-2) (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994), a *D. melanogaster* (Netrina A i Netrina B) (Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996) i a *C. elegans* (unc-6) (Ishii et al., 1992), presenten homologies entre elles i amb les cadenes $\beta 1$ i $\beta 2$ de les laminines, components essencials de la matriu extracel·lular (veure secció 3.2 d'aquest capítol). La relació entre netrina-1 i les laminines no només és estructural. Interessantment, el treball de Höpker i col. (1999) demostra que la resposta d'atracció vers la netrina-1 que presenten els axons de retina en cultiu, passa a ésser de repulsió en presència de laminina-1. Aquests experiments demostren que les molècules de la matriu extracel·lular no només promouen el creixement axonal sino que poden també estar implicades en la guia dels cons de creixement en resposta a les molècules d'atracció i repulsió com és el cas de la netrina-1.

Objectius

1. Estudi de la implicació dels gens DCC i Smad4 en els càncers de còlon i de pàncrees: Anàlisi de l'expressió gènica en línies cel·lulars derivades de càncer de còlon i de pàncrees, en tumors de còlon i en teixits normals de còlon i pàncrees.

2. Caracterització de la funció del DCC en el cèl·lules epitelials intestinals

2.a Generació d'un model de cèl·lules de càncer de còlon HT-29 transfectades establement amb el cDNA complet del DCC, per l'anàlisi dels aspectes cel·lulars en que aquest gen podia estar implicat.

2.b Anàlisi de les propietats tumorigèniques i disseminatives *in vivo* d'aquests transfectants utilitzant el model de ratolí nude.

2.c Estudi dels possibles mecanismes de transducció de senyal en que DCC podria participar. Caracterització de molècules que interactuen amb el domin intracel·lular del DCC.

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

1. Cultiu cel·lular

Excepte alguns casos, on s'especificarà, les cèl·lules sembrades a una densitat de 2×10^4 cèl·lules/cm², es fan créixer en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (4.5 g/l de glucosa) suplementat amb 2 mM de glutamina, 56 U/ml de penicil·lina i 56 µg/ml d'estreptomicina respectivament i 10% (20% en el cas de les cèl·lules Caco-2) de sèrum fetal boví (FBS de l'anglès "Fetal Bovine Serum") (GIBCO) a 37°C, en una atmòsfera humida contenint 5% de CO₂ i 95% d'aire.

1.1. Línies cel·lulars

1.1.1. Línies cel·lulars derivades de càncer de còlon

Caco-2, HT-29 i línies derivades d'aquesta, seleccionades amb 10^{-6} M (M6) ó 10^{-3} M (M3) de metotrexat, han estat donades pels Drs. A. Zweibaum i T. Lesuffleur (INSERM U505, Paris, França); SK-CO-1, -17 i -20 pel Dr. L.J. Old (Ludwig Institute for Cancer Research, New York Branch, New York, NY); SW480, SW620, SW1116, SW1417, HRT-18 i LS174T han estat comprades a ATCC (Manassas, VA).

1.1.2. Línies cel·lulars derivades de càncer de pàncrees

IMIM-PC-1, IMIM-PC-2, SK-PC-1 i SK-PC-3 han estat obtingudes en el nostre laboratori (Vilà et al., 1994); MZPC-1, MZPC-2 i MZPC-4 han estat donades pel Dr. A. Knuth (Nordwestern Krankenhaus, Frankfurt, Alemanya); CFPAC-1 pel Dr. R. Frizzel (University of Alabama, Birmingham, AL) (Schoumacher et al., 1990); Capan-1, Capan-2, Hs766T, RWP-1, RWP-2, MIA PaCa-2, AsPc-1 i HPAF han estat comprades a ATCC (Manassas, VA).

1.1.3. Altres línies cel·lulars: 293/EBNA, C9 i C20, COS 1

Les 293/EBNA són cèl·lules humanes de ronyó transformades per l'expressió de forma constitutiva de la proteïna EBNA del virus d'Epstein Barr. El gen de l'EBNA es manté de forma extracromosòmica per selecció amb 250 µg/ml de geneticina (Sigma). Les cèl·lules de la línia 293/EBNA parental o transfectades amb el vector pCEP4 (Invitrogen) contenen el gen de resistència a la higromicina i el cDNA sencer de la Netrina-1 de ratolí (293/EBNA-Net-1), així com les cèl·lules transfectades amb el vector pCEP4 sense l'insert (293/EBNA control), han estat donades pel Dr. Tessier-Lavigne (Howard Hughes Medical Institute, University of California San Francisco, USA) (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995b). Els transfectants 293/EBNA-Net-1 i control es cultiven en presència de 200 µg/ml higromicina B (GIBCO).

Les línies C9 i C20 corresponen a clons de miofibroblasts subepitelials provinents de biòpsies d'intestí proximal humà. Aquestes línies han estat donades per la Dra. Kedingger (INSERM U381, Strasbourg, France) (Fritsch et al., 1997). Creixen en medi RPMI 1640 suplementat amb 10% de FBS.

COS 1 és una línia cel·lular estable de fibroblasts de ronyó de simi verd africà. Les cèl·lules COS 1 utilitzades en aquest treball provenen del laboratori del Dr. Vilaró (Universitat de Barcelona). Creixen en medi DMEM, 10% FBS.

1.2. Obtenció de medis condicionats

Els medis condicionats de les cèl·lules 293/EBNA control, 293/EBNA-Net-1, C9 i C20, recollits durant una setmana de cultiu es concentren 20 vegades amb els filtres Centricon 10 (Amicon, INC) de límit de porus de 10 kDa. Els medis concentrats es guarden congelats fins a ser utilitzats, moment en que es reconstitueixen amb DMEM-10% FBS fresc.

1.3. Co-cultius

Els transfectants HT-29/Control i /DCC (veure secció 2.1) es sembren sobre una capa confluent de cèl·lules C9 o C20 (a dia 5 de cultiu) i creixen en DMEM suplementat amb 10% de FBS.

1.4. Cultius tridimensionals d'agregats cel·lulars en matriu de col·lagen. Tècnica de "Hanging drops"

Per formar els agregats cel·lulars, 20 μ l d'una suspensió cel·lular contenint 10^5 cèl·lules, es col·loquen a la cara interior de la tapa d'una placa de petri contenint PBS o medi de cultiu, de manera a crear una atmòsfera humida. En les gotes que penjen de la tapa (Fig.1), les cèl·lules s'agreguen per gravitació formant agregats després de 12-16 hores. Aquests es recullen aspirant amb una micropipeta automàtica i es sembren en una matriu de col·lagen de cua de rata tipus I (Becton Dickinson) (0.2 mg de col·lagen/ml de DMEM-10% FBS). Per tal de que aquests agregats quedin completament envoltats d'aquesta matriu, 200 μ l de matriu es fan gelificar a 37°C durant 1 h abans de depositar-hi l'agregat. Un cop depositat, s'afegeixen 250 μ l de col·lagen.

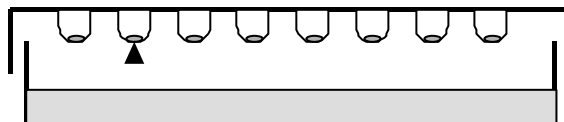


Figura 1: Esquema de la tècnica de "hanging drops" (Redfield et al., 1997). El cap de fletxa indica la posició de l'agregat en la gota que penja de la tapa de la placa de petri.

2. Transfecció

2.1. Transfecció estable en HT-29: Obtenció de clons HT-29/DCC

Un milió de cèl·lules HT-29 es sembren en una placa de 100 mm (Nunclon), i es transfecten 24 hores després amb 5 µg de DNA (pCMVneo sense insert o pCMVneo-cDNA complet de DCC (Fig. 2)) utilitzant 60µl de lipofectamina (GIBCO-BRL), seguint el protocol recomanat per la casa comercial. Al cap de 48 h, les cèl·lules transfectades són seleccionades amb 500 µg/ml de geneticina (GIBCO-BRL). Els clons resistents s'aïllen mitjançant cilindres de clonatge i s'amplifiquen individualment. L'expressió del DCC en els clons seleccionats s'analitza per Western blot, tal com s'explica més endavant (veure secció 9.4 d'aquest capítol).

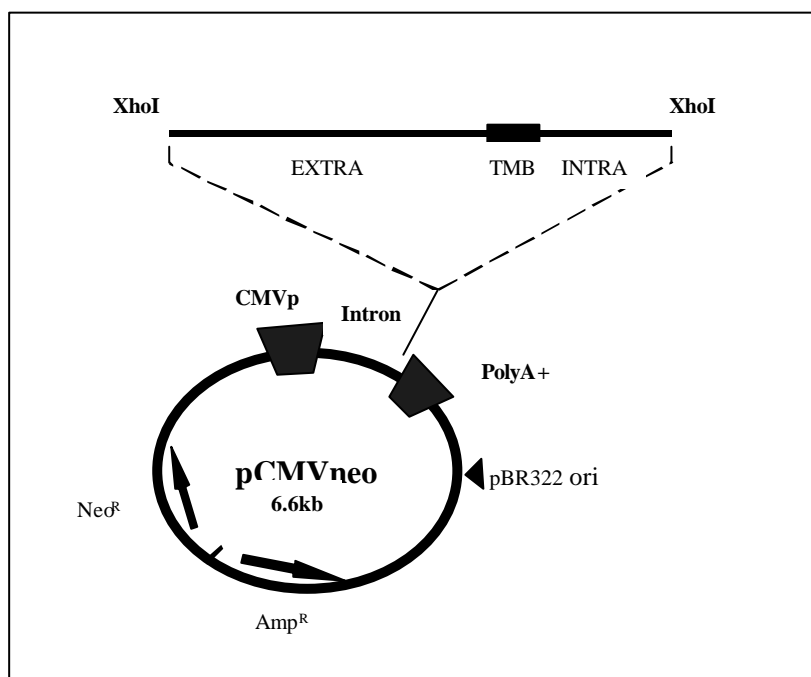


Figura 2: Esquema de la construcció pCMVneo-DCC. EXTRA, TM i INTRA: Regions del cDNA del DCC que codifiquen pels dominis extracel·lular, transmembrana i intracel·lular respectivament. CMVp: promotor del citomegalovirus. Neo^R i Amp^R: Resistència a la neomicina i a l'ampicil·lina respectivament. pBR322ori: origen de replicació del pBR322. PolyA+: codifica per la cua de poliA.

2.2. Transfecció transitòria en cèl·lules COS 1

Les cèl·lules COS 1, sembrades a una densitat de 10^5 cèl·lules/cm², es transfecten 24 hores després, utilitzant 5 µg de DNA i LipofectAMINE PLUS Reagent (GIBCO-BRL) seguint el protocol recomanat per la casa comercial. L'eficiència de la transfecció s'ha determinat per fluorescència utilitzant el plàsmid pEGFP el qual codifica per la proteïna EGFP ("Enhanced Green Fluorescent Protein") (Clontech) obtenint un 40% de cèl·lules positives.

A part del pEGFP, utilitzat com a control de la transfecció, les COS 1 s'han transfectat amb les següents construccions: pCMVneo-DCC (Fig. 2), pEGFP-N-erz (AA: 1-310), i pEGFP-Ezr-i (Fig. 3). Per alguns experiments s'han fet co-transfeccions amb les parelles pCMVneo-DCC / pEGFP-N-erz i pCMVneo-DCC / pEGFP-Ezr-i. Per aquests assajos s'ha transfectat 2.5 µg de cadascuna de les construccions. El protocol de transfecció és el mateix que per la transfecció d'un sol plàsmid.

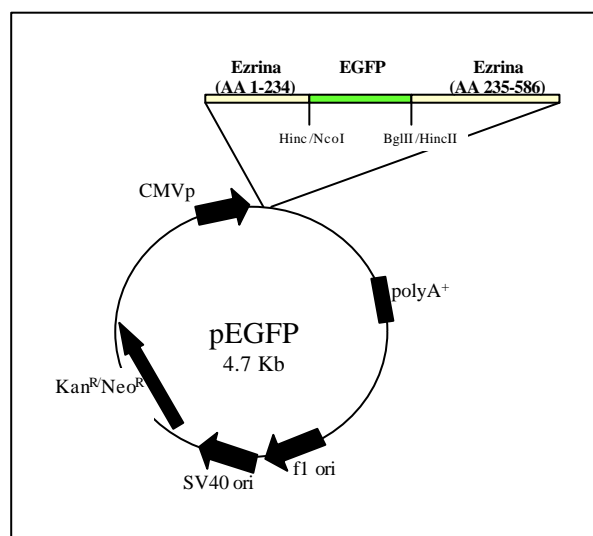


Figura 3: Esquema de la construcció pEGFP-Ezr-i. La seqüència de l'EGFP ("Enhanced green fluorescent protein") es troba interna en el cDNA de l'ezrina dividint-la en dues parts (AA: 1-234; AA: 235-585). El producte proteïc resultant és incapaç de plegar-se sobre si mateix esdevenint, per tant, una forma d'ezrina constitutivament activa (veure secció 3.2.5 de la introducció). CMVp: promotor del citomegalovirus. Kan^R i Amp^R: Resistència a la kanamicina i a l'ampicil·lina respectivament. SV40 ori i f1 ori: origen de replicació del SV40 i f1 respectivament. PolyA+: codifica per la cua de poliA.

3. Semifins i microscopia electrònica

Les cèl·lules en cultiu es renten amb PBS i es fixen amb 2.5% de glutaraldèhid en PBS. Després es post-fixen amb OsO₄ al 2% durant 1 h a temperatura ambient i resguardat de la llum. Es renten amb ddH₂O i es deshidraten incubant-les en banys seriatos d'etanol: una vegada en 30% d'etanol, una vegada en 50% d'etanol, una vegada en 70% d'etanol, dues vegades en 95% d'etanol i 5 vegades en 100% d'etanol (5 min per incubació). La deshidratació es completa amb 3 incubacions de 5 min seguides de 2 incubacions de 15 min amb Hidroxipropil Metacrilat (HPMA) (MERCK). Llavors, les mostres s'inclouen en resina Epon (Bio-Rad) incubant-les a temperatura ambient, en Epon:HPMA (1:2) 15 min, Epon:HPMA (1:1) 15 min, Epon:HPMA (2:1) 30 min, i Epon al 100% 3 vegades de 10 minuts cadascuna, seguit d'una incubació de 16-18 h a 37 °C i una darrera de 24 h a 60°C.

Els semifins són tallats en seccions de 0.5 µm amb un ultramicrotom LKB, tenyits amb blau de toluidina i observats per microscopia de contrast de fases. Per a microscopia electrònica, s'obtenen seccions de 500 a 800 Å que són col·locades sobre reixetes de coure, tenyides amb acetat d'uranil (5% en etanol absolut) i citrat de plom. S'analitzen a 5 000 - 45 000 augmentos en un microscopi electrònic de transmissió Phillips a 75 kV.

4. Assajos funcionals

4.1. Assaig de proliferació

Les cèl·lules es sembren en plaques de 24 pous (Nunclon) i la proliferació s'analitza comptant el número de cèl·lules per pou cada 2-3 dies durant 20 dies de cultiu. Per a cada temps els comptatges s'han fet per triplicat. Les corbes de creixement s'estableixen utilitzant la mitjana del número de cèl·lules per pou, per cadascun dels temps. Els resultats presentats corresponen a dos experiments independents.

4.2. Assaig de resistència a la tripsina

Les cèl·lules es sembren en plaques de 24 pous bé sobre plàstic bé sobre diferents substrats (BSA, laminina, col·lagen tipus I i tipus IV, fibronectina i matriu extracel·lular de cèl·lules HT-29 M6 i de fibroblasts humans). Pel recobriment dels pous amb BSA, laminina, col·lagen tipus I i IV, i fibronectina, es segueix el protocol descrit a continuació: 24 h abans de sembrar les cèl·lules s'afegeix 0.5 ml d'una solució de 10 µg/ml de cadascun d'aquests substrats a excepció de la fibronectina que es prepara a 5 µg/ml. Llavors, la placa de 24 pous es seca deixant-la oberta durant 16-18 h dintre de la campana de fluxe laminar. La matriu extracel·lular d'HT-29 M6 i fibroblasts es prepara de la següent manera: les HT-29 M6 i els fibroblasts es sembren i als 3-4 dies després d'haver arribat a confluència s'incuben durant 10 minuts amb ddH₂O a 37 °C.

En tots els casos, els pous es renten dues vegades amb PBS abans de sembrar-hi les cèl·lules. En el moment en que aquestes presenten un 50% de confluència (3-4 dies de cultiu), es marquen durant 16-18 h amb ³H Timidina (1 uCi/ml). A continuació es renten varis cops amb PBS, es tracten amb 1 ml de 0.125% de tripsina en DMEM sense FBS i es recullen alíquotes de 100 µl cada 5 minuts durant 30 minuts, de manera a establir una cinètica de desadhesió. Les cèl·lules despreses es quantifiquen per escintil·lació, utilitzant un comptador de cpm's (comptes per minut).

4.3. Assaig d'adhesió *de novo* a la matriu

Quan les cèl·lules estan 70% confluents, es marquen amb H³ Timidina (1uCi/ml) durant 16-18 h. Després es renten exhaustivament amb PBS per eliminar la radioactivitat no incorporada, les cèl·lules es tripsinitzen, es resuspenen en DMEM suplementat amb 0.5% de FBS i es calcula l'eficiència del marcatge (cpm's / cèl·lula) per escintil·lació. Llavors, es sembren a una densitat de 3x10⁴ cèl·lules / cm² en plaques de 24 pous sobre diferents substrats: plàstic, BSA o una capa de cèl·lules C9 o C20 a dia 5 de cultiu, i en absència o presència de medi condicionat de les cèl·lules 293/EBNA-Net-

1 o C9. S'incuben durant 1 h a 37°C, 5% de CO₂ i 90% d'humitat i es renten amb PBS a fi d'eliminar les que no s'han adherit. Les cèl·lules adherides es lisen amb 1% SDS en H₂O, durant 30 min a 37°C i es quantifiquen per escintil·lació. Cada condició analitzada (substrat i/o medi condicionat) s'analitza en triplicats. Els resultats dels assajos presentats corresponen a dos experiments independents.

4.4. Assaig de migració en *Transwells*

S'han utilitzat filtres Transwell® de policarbonat de 6.5 mm de diàmetre i 5 µm de porus (Costar). En la cambra superior es sembren 75.000 cèl·lules en medi carent de FBS però suplementant amb 1% de BSA. L'agent inductor de la migració: TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), 100 mM en DMEM suplementat amb 10% de FCS o el medi condicionat de les cèl·lules C9 o C20, es col·loca a la cambra inferior. Al cap de 72 hores, les cèl·lules es fixen a la membrana amb 1% de glutaraldèhid durant 10 minuts i es renten amb PBS. La cara superior del filtre es rasca suaument per eliminar les cèl·lules adherides que no han migrat. Les cèl·lules que sí que ho han fet queden fixades a la cara inferior de la membrana i es tenyeixen amb 0.1% de cristall violeta durant 30 minuts. Es renten amb aigua destil·lada i les cèl·lules tenyides s'observen al microscopi de contrast de fases i/o es quantifica la migració lisant les cèl·lules en 10% d'àcid acètic i mesurant la D.O. a 595 nm.

5. Anàlisis dels nivells de RNA

5.1. Obtenció de les mostres de teixit

S'han recollit mostres de tumor i de teixit normal de 10 pacients que han sofert una ressecció d'intestí gruixut a l'Hospital del Mar, Barcelona, com a tractament d'un tumor de còlon. Els pacients, 8 homes i 2 dones, són d'edats compreses entre les 46 i els 98 anys. Set dels casos corresponen a

càncer de còlon i 3 a càncer de recte. La distribució dels casos segons l'estadi del càncer és: estadi II (n=4), estadi III (n=4) i estadi IV (n=2). Les mostres de mucosa normal distant del tumor (>8 cm) i de tumor han estat ràpidament congelades en nitrogen líquid per a la posterior extracció del RNA.

5.2. RT-PCR (“Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction”)

El RNA total de les línies cel·lulars i dels teixits és aïllat utilitzant el mètode de l'isotiocianat de guanidini (Chomczynski and Sacchi, 1987) i tractat amb DNAsa I (Promega) com segueix: 25 µg de RNA total són incubats durant 20 minuts a 37°C en 10 mM de Tris-HCl a pH 8.0, 20 mM de MgCl₂, 40 U de RNAsin (Promega) i 4 U de DNAsa I (Promega). El cDNA es sintetitza a partir de 5 µg de RNA tractat amb DNAsa I, durant 1 hora a 37°C en una mescla de reacció contenint 50 mM de Tris-HCl a pH 8.3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 0.1 mg/ml de BSA, 2 mM de dNTP's, 100 ng de hexàmers aleatoris (“random hexamers”) (Promega), 500 ng d'oligo (dT)₁₅ (Promega), 40 U de RNAsin i 200 U de MMLV-RT (Promega). El cDNA s'amplifica per PCR en una reacció contenint 20 mM de Tris-HCl a pH 8.4, 2.5 mM de MgCl₂, 0.1 mM de dNTP's, 0.6 U de polimerasa Taq (Perkin Elmer) i 0.2 µM de cadascun dels encebadors utilitzats. Per amplificar les seqüències del domini extracel·lular del DCC s'han utilitzat els encebadors DCK2834S (EX1) i DCK3151A (EX2) descrits en Reale et al. (1994) (Taula I). Amb aquest parell d'encebadors que corresponen a seqüències dels exons 15 i 17, respectivament, s'obtenen dos productes d'amplificació (341 i 281 pb), depenent de la utilització d'un lloc de processament alternatiu descrit en Reale et al. (1994). Per analitzar l'expressió de les seqüències del domini intracel·lular del DCC s'han utilitzat els encebadors DCK4540A (IN2) i IN3 (Reale et al., 1999; Fabre et al., 1999) (Taula I). IN2/IN3, situats als exons 26 i 27 respectivament, amplifiquen seqüències de 164 i 159 pb depenent de la utilització d'un lloc de processament alternatiu descrit en Reale et al. (1994).

Domini extracel·lular del DCC	EX1	5' –CCC AGA CTA ACT GCA TCA TCA TGA G- 3'
	EX2	5' –CAC CTA CTG GTG GGA GCA T- 3'
Domini intracel·lular del DCC	IN2	5' –TTG GGT AGT TGG TCC TTC ACT CAC- 3'
	IN3	5' –CAA CGC TAG AAA GTC CCC AGT A- 3'
Smad4	S	5' –ACC TGG AGA TGC TGT TCA- 3'
	AS	5' –TGT CTT GGG TAA TCC GGT C- 3'
β -actina	ACT1	5' –GAC TTA GTT GCG TTA CAC CC- 3'
	ACT2	5' –CCT CCC CTG TGT GGA CTT GG- 3'

Taula I: Seqüències dels encebadors utilitzats pels assajos de RT-PCR

Pels estudis d'expressió de Smad4, s'han utilitzat encebadors corresponents a seqüències localitzades en l'exó 8 (S) i l'exó 11 (AS) descrits en Kong et al. (1997) (Taula I), donant un producte d'amplificació de 285 pb.

Les condicions de la reacció de PCR són de: 30 s a 94°C, 1 min a 58°C i 1 min a 72°C. El nombre de cicles s'ha optimitzat per cadascun dels parells d'encebadors per assegurar que el producte amplificat es troba en la fase lineal de la reacció d'amplificació permetent així realitzar l'anàlisi semiquantitatiu. S'han fet 33 cicles per l'anàlisi d'expressió del DCC i 30 cicles per l'anàlisi del Smad4.

Per a l'anàlisi semiquantitatiu de l'expressió d'aquests dos gens s'han realitzat, paral·lelament, reaccions de PCR amb els mateixos cDNA's, utilitzant encebadors corresponents a la seqüència de la β -actina tot seguint les mateixes condicions de PCR i 16 cicles per tal de mantenir en tot moment la reacció en fase lineal. Els encebadors utilitzats per l'amplificació del cDNA de la β -actina són ACT1 i ACT2 (Taula I) els quals generen un producte de 349 pb (Hanukoglu, 1983).

Per assegurar que els resultats de la RT-PCR reflecteixen la presència de trànscrips, s'han realitzat els següents controls:

- 1) Per poder detectar possibles amplificacions de DNA genòmic contaminant, els encebadors utilitzats corresponen a seqüències localitzades en diferents exons.
- 2) Per a detectar possibles contaminacions, en cadascun dels experiments s'ha realitzat paral·lelament una PCR utilitzant com a motllo una reacció de síntesi de cDNA sense l'enzim MMTV-RT i en totes les reaccions de PCR s'ha inclòs un tub sense motllo (control amb H₂O).
- 3) Cada PCR s'ha repetit fins a 3 cops utilitzant diferents preparacions de cDNA.

Els productes de les RT-PCR's han estat analitzats per electroforesi en gel de 1.5% d'agarosa i tinció amb bromur d'etidi a excepció de l'estudi del DCC que degut als baixos nivells d'expressió, després de l'electroforesi, el DNA es transfereix a un filtre de niló (Hybond-N; Amersham) per a ser analitzat seguidament per Southern utilitzant com a sonda el cDNA complet del DCC i posteriorment visualitzat per autoradiografia. La sonda es marca amb α -³²P[dCTP] (3000 Ci/mmol) (ICN) per "random priming" seguint les directrius del kit Rediprime (Amersham) i es purifica per centrifugació mitjançant una columna MicroSpin S-400 HR (Pharmacia).

L'expressió relativa dels mRNAs es calcula mitjançant densitometria semiquantitativa: les fotografies dels gels tenyits amb bromur d'etidi i els films no saturats s'escanejen utilitzant un ImageMaster DTS (Pharmacia, LKB) i s'analitzen amb el software Advanced Quantifier I-D Match (Bio Image). A partir d'aquests resultats es calcula la relació: nivells de mRNA de DCC ó Smad4 / nivells de mRNA de l'actina.

5.3. Northern Blot

Mostres de RNA total es desnaturalitzen a 70°C durant 10 min en tampó MOPS (20 mM de MOPS, 5 mM de NaAc, 0.1 mM d'EDTA) contenint 50% de formamida i 6.5% de formaldehid. Els RNAs es fraccionen en un gel d'agarosa al 1%, 6.5 % de formaldehid i MOPS, i es transfereixen per capilaritat, en tampó 10x SSC (3M de NaCl, 0.3M de citrat de sodi, pH7.0), a

una membrana de niló (Hybond-N; Amersham). Els filtres es prehibriden i s'hibriden a 68°C en la solució ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech) seguint el protocol recomanat per la casa comercial. Després, els filtres es renten a 55°C: dos rentats de 15 min amb 2x SSC/0.5% de SDS i un de 30 min amb 0.1x SSC/0.05% de SDS.

Les sondes es marquen amb α -³²P[dCTP] (3000 Ci/mmol) (ICN) per "random priming" seguint les directrius del kit Rediprime (Amersham) i es purifiquen per centrifugació mitjançant una columna MicroSpin S-400 HR (Pharmacia). Per a detectar les mucines MUC2, MUC3, MUC6, MUC5AC i MUC5B s'han utilitzat respectivament les sondes següents: SMUC41 (Gum et al., 1989), clon44 (Toribara et al., 1993) ambdues donades generosament pel Dr. Y.S. Kim (Veterans Affairs Medical Center, San Francisco, USA), SIB124 (Gum et al., 1990), L31 (Lesuffleur et al., 1995) i Sall donada generosament pel Dr. P.A. Nielsen (School of Dentistry, University of Copenhagen, Dinamarca).

6. Generació de proteïnes de fusió

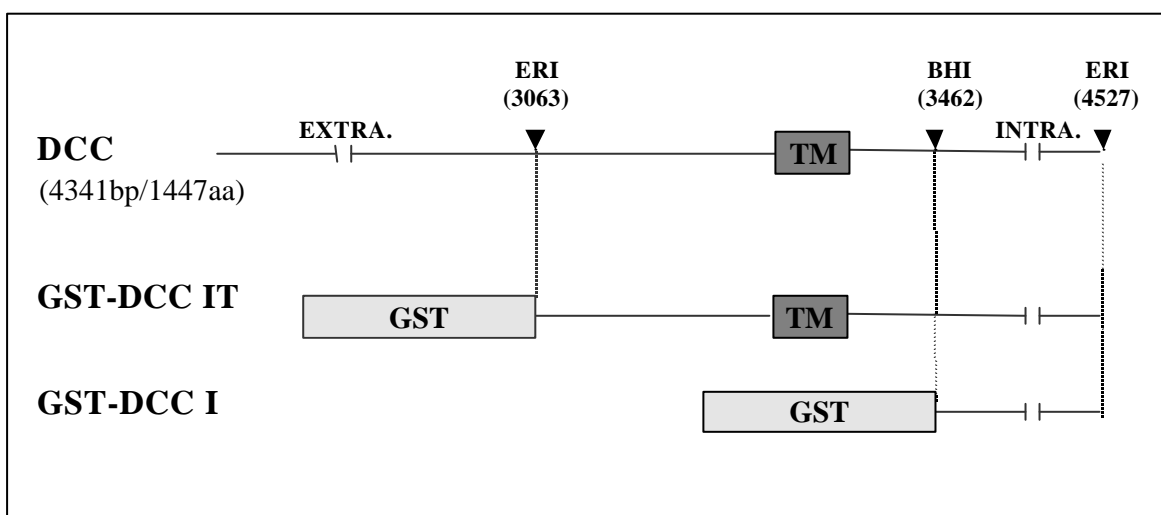


Figura 3: Esquema de les proteïnes de fusió GST-DCC.IT (fragment EcoRI-EcoRI del DCC fusionat a la GST) i GST-DCC.I (fragment BamHI-EcoRI del DCC fusionat a la GST) en comparació a la seqüència del DCC sencera. Els caps de fletxa marquen la posició de les dianes de restricció EcoRI (ERI) i BamHI (BHI) utilitzades per a generar aquestes construccions.

6.1. GST-DCC.I

La seqüència del domini intracel·lular del DCC (AA: 1156-1447; nt: 3462-4527) (fragment BamHI–EcoRI de 1.14 Kb) (Fig. 4) es clona en el vector d'expressió procariota pGEX-3X (Pharmacia) de manera a poder sintetitzar seguidament la proteïna de fusió GST-DCC.I de 61 kDa de pes molecular (GST: "Glutathione S-transferase"). Amb aquesta construcció es transformen bacteris *E. coli* XL1-Blue, es verifica la seqüència i la pauta de lectura. Llavors, a partir d'una colònia, es prepara un precultiu de 20 ml de LB/ampicil·lina que es fa créixer 16-18 h a 37°C i agitació (250 rpm). Després, aquest precultiu es sembra en 1 l de LB i s'incuba a 37°C i 250 rpm fins que assoleix una D.O. a 600 nm de 0.4 (aproximadament unes 3 hores d'incubació). Llavors, s'indueix l'expressió de la proteïna de fusió afegint IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside) a una concentració final de 0.1 mM i incubant durant 4 h més a 37°C i agitació a 250 rpm. Llavors, els bacteris es centrifuguen a 3000 rpm durant 30 min i 4°C, es resuspenen en 20 ml de PBS/1% de Tritó X-100, 5mM de DTT, 1 mM de Pefabloc, 10 μ g/ml de leupeptina i 10 μ g/ml de pepstatina, i es soniquen durant 30 segons en al·lquotes de 1 ml mantingudes en gel durant la sonicació. Seguidament, el lisat es centrifuga 10 min a 4 °C a 10 K i la fracció soluble s'incuba 16-18 h a 4°C amb 2 ml de resina Glutathiona-Sefarosa 4B. Després de rentar amb PBS i 50 mM de Tris-HCl pH 8.0, es du a terme l'elució amb 10 mM de Glutathiona reduïda en 50 mM de Tris-HCl pH 8.0. Les fraccions eluïdes s'analitzen per SDS-PAGE, es visualitzen per tinció amb blau de Coomassie i les que contenen la proteïna de fusió GST-DCC.I s'agrupen. La concentració de proteïna es determina utilitzant el mètode de Bradford (Bio-Rad).

6.2. GST-DCC.IT

La seqüència del domini intracel·lular i transmembrana del DCC (AA: 1021-1447; nt: 3063-4527) (fragment EcoRI–EcoRI de 1.4 Kb) (Fig. 4) es clona en el vector d'expressió procariota pGEX-6P (Pharmacia) de manera a poder sintetitzar la proteïna de fusió GST-DCC.IT de 76 kDa de pes molecular predit. Donat que la proteïna GST-DCC.IT no queda en la fase soluble utilitzant el protocol descrit per la construcció GST-DCC.I, es segueix un protocol diferent per la inducció de la proteïna i la posterior extracció. Així el cultiu de bacteris transformats (1 l) es fa créixer fins assolir una D.O. a 600 nm de 0.7. L'expressió de la proteïna s'indueix amb 0.1 mM d'IPTG durant 3 hores a 30°C i amb agitació a 250 rpm. L'extracció protèica es realitza en 2.5 ml de tampó A (2.3 M de sucrosa, 50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 10 mM d'EDTA, 1 mM de Pefabloc, 10 µg/ml de leupeptina i 10 µg/ml de pepstatina), incubant 30 minuts en gel i agitant regularment amb el vòrtex. Després s'hi afegeixen 4 volums de tampó B (50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 10 mM de KCl, 1 mM d'EDTA, 1 mM de DTT i 1.25 g/l de lisozima) i s'incuba durant 1 h en gel, agitant regularment amb el vòrtex. Seguidament s'afegeix 0.1% de Na-deoxicolat, 10 mM de MgCl₂ i 1500 U de DNAsa, i s'incuba durant 15 minuts en gel agitant regularment amb el vòrtex. Després es centrifuga durant 30 minuts a 60 000 g i a 4°C. La proteïna GST-DCC.IT es purifica amb la resina Glutathiona-Sefarosa 4B seguint el mateix protocol descrit per a la GST-DCC.I.

7. Immunodetecció

7.1. Anticossos

7.1.1. Obtenció d'un anticós policlonal de conill contra el domini intracel·lular del DCC (anti-DCC.I)

La producció de l'anticós es realitza inoculant un conill amb 200 µg de proteïna de fusió GST-DCC.I més Adjuvant de Freund complert en una relació de volum 1:1. Es realitzen 4 inoculacions seguides a 2 setmanes d'interval, aquestes amb Adjuvant de Freund incomplert. 5 dies després de la quarta inoculació, es procedeix a extraure 20 ml de sang. Aquesta es centrifuga 10 min a 2500 rpm a temperatura ambient i el sobrenadant s'aliquota i es congela.

Un cop al mes, es fa una inoculació de "record" amb 200 µg de proteïna de fusió, seguida, 5 dies després, de l'extracció de 20 ml de sang.

Per a la purificació de l'anticós anti-DCC.I, s'utilitza la proteïna de fusió GST-DCC.I lligada covalentment a una resina d'Affigel P10 (Bio-Rad) equilibrada en PBS. Es lliguen 3 mg de GST-DCC.I a 500 µl de resina mitjançant una incubació de 2-3 hores en PBS, a temperatura ambient. Després d'eliminar les proteïnes no lligades a la resina, aquesta es bloqueja incubant o/n amb 1M de Tris-HCl pH 8.0 a 4°C i es carrega en una columna. Llavors s'equilibra amb PBS, s'hi aplica el sèrum (2 ml de sèrum/500 µl de resina), es renta amb PBS i s'elueix amb 0.1 M de glicina-HCl pH 2.8, tot a temperatura ambient. Les fraccions (d'uns 200 µl) es recullen directament en tubs que contenen 6 µl de 1M de Tris base (pH 10). El contingut de les fraccions s'analitza per SDS-PAGE i tinció amb blau de Coomassie. Les fraccions més concentrades s'agrupen i es determina la concentració de proteïnes pel mètode de Bradford (Bio-Rad).

7.1.2. Anticossos monoclonals

De ratolí:

Anticós	Generat contra:	Procedència
AF5	Domini extracel·lular DCC	Oncogene Science Inc.
G97-449	Domini intracel·lular DCC	Pharmingen
HECD1	E-cadherina humana	Zymed
P16520	PKC α	Transduction Laboratories
LDQ10	MUC2	Carrato et al., 1994 (IMIM, Barcelona)
B12	Dextrà	Rosa Castro (IMIM, Barcelona)
258	CEA ("Carcionembryonic antigen")	Dr. J. Sakamoto (Nagoya, Japó)
ZE4	Mucines colòniques	Dra. Swallow (London, UK)
Clon 1&2-2.5	Desmoplakines I i II	Boehringer Mannheim Biochemica
P1E6	Subunitat d'integrina α 2	Gibco-BRL
P1B5	Subunitat d'integrina α 3	Gibco-BRL
8d4	Talina	Sigma Immunochemicals
	Tubulina	Amersham
LP2K	Citokeratina CK 19	Becton Dickinson
E2A	E47 (AAs 195-208)	Santa Cruz Biotechnology

De rata: L'anticós GoH3, contra la subunitat d'integrines α 6, és d'Immunotech.

7.1.3. Anticossos policlonals de conill

Anticós	Generat contra:	Procedència
L56	Mucines gàstriques	Dr. Zweibaum (Villejuif, França)
1937	Subunitat d'integrines β 1	Dra. Kedinger (Strasbourg, França)
1025 IV	Subunitat d'integrines β 4	Dra. Kedinger (Strasbourg, França)
	anti-ezrina, -radixina, -moesina	Dr. Mangeat (Montpellier, França)

7.2. Immunohistoquímica

S'analitzen seccions seriades de 4 µm de mostres de còlon normal incloses en parafina. Aquestes es desparafinen 15 min a 60°C i s'hidraten incubant 5 min/bany en la sèrie següent: xilol, xilol/alcohol, 100% d'etanol, 96% d'etanol, 96% d'etanol, 70% d'etanol i H₂O. Després, les mostres es fixen com segueix: 7 min en 10% de formol, 2 incubacions de 5 min en tampó Tris/NaCl (150 mM de Tris-HCl pH 7.6 i 50 mM de NaCl), 1 min en acetona freda (-20°C) i 1 min en metanol fred (4°C). Després de rentar amb tampó Tris/NaCl, els antígens es desenmascaren per un tractament de 10 min al microones en tampó citrat (10 mM d'àcid cítric pH 6.0).

Pels experiments de marcatge simple es bloqueja primerament l'activitat fosfatasa alcalina endògena 10 min amb 3 mM de Levamisole (Sigma) i després es bloquegen les interaccions inespecífiques durant 20 min amb 5% de llet descremada (Molico) i 0.05% de Tween-20 en 20 mM de Tris-HCl pH 7.5. Llavors les mostres s'incuben amb els anticossos anti-DCC.I purificat per afinitat (dil 1:100) ó anti-dextrà B12 (dil 1:2) en tampó Tris/NaCl i 1% de BSA, durant 16-18 h a 4°C. Després de rentar 2-3 vegades amb Tris/NaCl, es revela amb el Kit Stravigen Multilink (Biogenex) seguint el protocol recomanat per la casa comercial i es visualitza incubant les mostres durant 10 min en la solució de Fast Red (100 mM de Tris-HCl pH 8.2, 0.2 mg/ml de Naftol AS-MX (Sigma), 0.02 % de dimetilformamida (MERCK) i 1 mg/ml de Fast Red (Sigma)). Seguidament les mostres es contratenyeixen amb hematoxilina i es munten amb Aquatex (Merck).

Pels experiments de doble marcatge, les mostres es desparafinen, s'hidraten, es fixen, i es tracten al microones de la mateixa manera que pel marcatge simple. Llavors es bloquegen les activitats peroxidasa i fosfatasa alcalina endògenes, incubant-les successivament: 10 min en 4% d'H₂O₂, 10 min en 3 mM de Levamisole, i finalment es fa el bloqueig d'interaccions inespecífiques amb 20 min en 5% de llet descremada i 0.05% de Tween-20 en 20 mM de

Tris-HCl pH 7.5. Entre cada incubació es fan 2 rentats de 10 minuts amb tampó Tris/NaCl. Seguidament l'anti-DCC.I purificat per afinitat (dilució 1:50) amb l'anti-MUC2 (1:200) o l'anti-CEA (1:2) es co-incuben amb les mostres durant 16-18 h a 16°C. Aquestes es renten amb el tampó Tris/NaCl durant 10 min (5 vegades) i s'incuben durant 1 h amb els anticossos secundaris següents: un anticòs de cabra anti-IgG de conill conjugat amb peroxidasa de raba (Dakopatts) (dilució 1:100) per a la detecció de l'anti-DCC.I, i un anticòs de cabra anti-IgG de ratolí conjugat a fosfatasa alcalina (Dakopatts) (dilució 1:100) per a la detecció dels anticossos monoclonals. Després de 3 rentats de 10 min cadascun amb tampó Tris/NaCl, les mostres s'equilibren durant 5 min en 0.1 M de Tris-HCl pH 8.2 i es procedeix al revelat: s'incuben 10 min amb la solució de Fast Red, es renten 10 min en H₂O seguits de 10 min en tampó Tris/NaCl i s'incuben 10 min en 20 % de diaminobenzidina (DAB) en 0.05% de PBS i 0.1% d'H₂O₂. Es tornen a rentar amb H₂O i tampó Tris/NaCl, es contratenyeixen amb hematoxilina i es munten en Aquatex.

7.3. Immunocitoquímica

Seccions de criostat de 3 µm tallades a partir de rotllos de cèl·lules en cultiu preparats segons Lesuffleur et al. (1991), ó cèl·lules sembrades sobre cubreobjectes, es renten dos cops amb PBS, es fixen amb 1-4% de paraformaldehid/PBS, es permeabilitzen amb 0.2 – 0.5% de Tritó/PBS ó amb 0.1% de saponina/PBS, es bloquejen amb 1% de BSA/PBS i s'incuben 1-2 h amb l'anticòs primari adient diluït en 1% de BSA/PBS. Les dilucions utilitzades per a cadascun dels anticossos són: anti-DCC.I policlonal 1:200; anti-E-cadherina (HECD1) 1:200; anti-desmoplakina 1:400; anti-α2 integrina 1:50; anti-α3 integrina 1:50; anti-α6 integrina (GoH3) 1:50; anti-β1 integrina 1:750; anti-β4 integrina 1:200; anti-talina 1:100; anti-ezrina 1:350. Després de rentar amb PBS, s'incuben amb l'anticòs secundari durant 1 hora en 1% de BSA/PBS. Per a detectar els anticossos policlonals de conill s'ha utilitzat un anticòs de cabra anti-IgG de conill acoplat a fluoresceïna (FITC) (Pierce) o de porc anti-Ig G de conill acoplat a rodamina (TRITC) (Dakopatts). Per a detectar els anticossos monoclonals de ratolí s'ha utilitzat un anticòs

de cabra anti-ratolí acoplat a fluoresceïna o rodamina (Dakopatts). Per a la detecció del monoclonal de rata anti- $\alpha 6$ integrina (GoH3) s'ha utilitzat un anticòs de cabra anti-rata acoplat a fluoresceïna (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.). Tots els anticossos secundaris es dilueixen a la concentració recomanada pel proveïdor. Finalment les preparacions es munten amb Mowiol i s'analitzen utilitzant un microscopi invertit de fluorescència (Zeiss Axioscop) o per microscopia confocal (Leica TSD 4D) en els Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona sota la supervisió de la Dra. Castel.

8. Altres tècniques de detecció

8.1. Tinció de les mucines amb Blau Alcià

Seccions de 4 μm de mostres de còlon normal incloses en parafina, es desparafinen, hidraten, es fixen i es tracten al microones com es descriu en la secció 7.2. Després es tenyeixen durant 30 min amb 0.1 % de Blau Alcià en 3% d'àcid acètic. El Blau Alcià reacciona amb els sucres associats a les mucines. Es renten amb H_2O i es contratenyeixen durant 10 min amb vermell nuclear al 0.1% per visualitzar els nuclis de les cèl·lules. Es deshidraten fent passar les preparacions de forma seqüencial durant 5 min/bany en: 50% d'etanol, 75% d'etanol, 100% d'etanol, 100% d'etanol, xilol/alcohol, xilol. Es munten amb DPX (Merck).

Seccions de criostat de 3 μm tallades a partir de rotllos de cèl·lules en cultiu preparats segons Lesuffleur et al. (1991), es fixen 10 min amb acetona freda (-20°C) i s'incuben 30 min amb 0.1 % de Blau Alcià en 3% d'àcid acètic. A l'igual que pels talls histològics es renten amb H_2O i es contratenyeixen amb vermell nuclear al 0.1% (10 min). Després es renten amb H_2O , es deshidraten i es munten en DPX (Merck).

8.2. Marcatge del citosquelet d'actina

Cèl·lules senceres: Les cèl·lules, sembrades sobre cubreobjectes, es renten amb PBS, es fixen amb 4% de paraformaldèhid/PBS, es permabilitzen amb 0.1% de saponina/PBS i es bloquejen amb 1% de BSA/0.1% de saponina/PBS. Llavors, s'incuben durant 30 min amb 2 µg/ml de faloidina marcada amb fluoresceïna (FITC) (Sigma) en 1% de BSA/0.1% de saponina/PBS. Després de rentar amb PBS es munten en Mowiol.

Adhesions Focals aïllades: Les adhesions focals s'aïllen a partir de cèl·lules sembrades sobre cubreobjectes, seguint el protocol descrit a continuació (Niederreiter i Gimona, 1994). Les cèl·lules, sembrades sobre cubreobjectes, es renten amb tampó C (5.5 mM de glucosa, 5.3 mM de KCl, 137 mM de NaCl, 0.44 mM de KH_2PO_4 , 4.2 mM de Na_2HPO_4 , 3.4 mM de NaHCO_3 , 5 mM de MES, 2 mM de MgCl_2 , 0.57 mM de CaCl_2) a pH 6.1, i després s'incuben durant 3 minuts amb 0.2 % de saponina en tampó C. Seguidament, els cubreobjectes es tornen a rentar amb tampó C, durant 30s, utilitzant aquest cop una bomba peristàltica que doni un fluxe d'aproximadament 0.5-1 ml/s, de la manera que es mostra en la figura 5. Llavors, els cubreobjectes es renten amb PBS, es bloquegen amb 1% de BSA/PBS i s'incuben durant 30 minuts amb 2 µg/ml de faloidina marcada amb fluoresceïna (FITC) (Sigma) en 1% de BSA/PBS. Després de rentar amb PBS, es munten amb Mowiol.

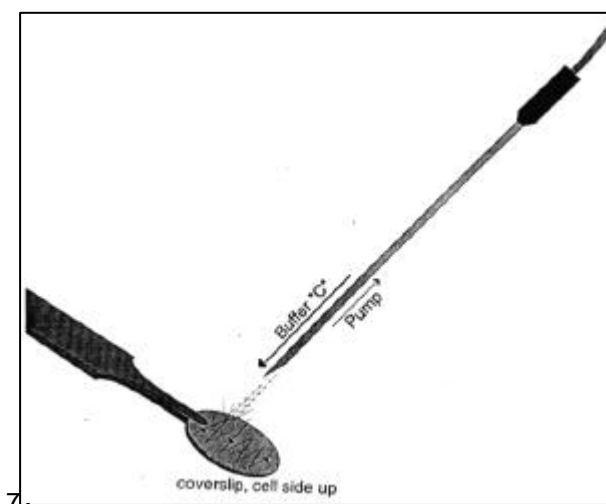


Figura 5: Esquema que il·lustra la manera de fer els rentats sobre els cubreobjectes, a un fluxe de 0.5-1/ml/s utilitzant una bomba peristàltica, per a la eliminació dels cossos cel·lulars i la purificació de les estructures d'adhesió al substrat.

9. Extracció de proteïnes i anàlisi per Western blot.

9.1. Obtenció de fraccions proteòmiques solubles en tampó T10/Tritó i en tampó RIPA.

Les cèl·lules es lisen bé en tampó T10 (25 mM de Tris-HCl pH 7.6, 1 mM d'EDTA, 10 mM de NaCl, 25 µg/ml de leupeptina i 10 µg/ml d'aprotinina) contenint 1% de Tritó X-100 (tampó T10/Tritó), bé en tampó RIPA (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% de SDS, 0.5% de Na-deoxicolat, 1% de NP-40, 1 mM de Pefabloc, 10 µg/ml de leupeptina i 10 µg/ml de pepstatina). Després de 30 min d'incubació amb agitació suau a 4°C, els lisats es clarifiquen centrifugant a 13 000 rpm durant 30 min a 4°C.

9.2. Fraccionament cel·lular

Es fa una extracció seqüencial de les proteïnes per solubilitat diferencial en detergents iònics i no iònics. Així, en tampó T10 només són solubles les proteïnes citosòliques. Les proteïnes de membrana queden al "pellet", del qual poden extraure's les proteïnes no associades al citosquelet amb tampó T10/Tritó. Finalment, les proteïnes associades al citosquelet es solubilitzen incubant 10 min a 100°C en un tampó contenint 25 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1 mM d'EDTA, 1% de SDS, 25 µg/ml de leupeptina i 10 µg/ml d'aprotinina, seguit de clarificació centrifugant 30 min, a 13 000 rpm i a 4°C.

9.3. Biotinilació i extracció de proteïnes de membrana

Les cèl·lules en cultiu, a 80% de confluència, són marcades amb 0.5 mg/ml de Sulfobiotina (NHS-Biotin, Sigma) en D-PBS (PBS, 1 mM de MgCl₂ i 0.1 mM de CaCl₂) durant 20 minuts a 4°C. Després de rentar amb DMEM, s'incuben 10 minuts amb DMEM a 4°C, es renten amb D-PBS i es lisen en 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1% de Tritó X-114, 25 µg/ml de leupeptina i 10 µg/ml d'aprotinina. Els lisats s'incuben 15 minuts en gel i a continuació es clarifiquen per centrifugació a 13 000 rpm durant 20 min i a

4°C. Per a separar les proteïnes citosòliques i les de membrana, ambdues solubles en aquest tampó, els lisats es barregen a 4°C amb la següent solució: 6% de sucrosa, 10 mM de Tris-HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl i 0.06% de Tritó X-114, i després s'incuben 3 minuts a temperatura ambient per induir la formació de micel·les. Aquestes queden en la fase del detergent després de centrifugar a 1 000 rpm durant 5 min a temperatura ambient, mentre que les proteïnes citosòliques queden en la fase aquosa superior (Bordier, 1981). La fracció detergent s'equilibra fins a 1% de Tritó X-114 amb 10 mM de Tris-HCl pH 7.4 / 150 mM de NaCl. Totes dues fraccions (aquosa i detergent) s'incuben durant 2 h a 4°C amb 100 µl de streptavidin-agarosa (Sigma) i es renten successivament amb tampó RIPA (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% de SDS, 1% de Na-deoxicolat, 1% de NP-40), TNEN (10 mM de Tris-HCl pH 7.2, 500 mM de NaCl, 1mM d'EDTA, 0.5% de NP-40 i 0.1% de SDS), i PBS. Aquestes s'elueixen bullint durant 5 minuts en tampó Laemmli i s'analitzen per Western blot.

9.4. Western blot

La concentració de proteïna en els lisats es mesura pel mètode de Bradford (BioRad). Les proteïnes es separen per SDS-PAGE i es transfereixen a una membrana de nitrocel·lulosa (Schleicher and Schuell). Després de bloquejar la membrana durant 1 hora amb 1% de llet descremada i 0.1% de Tween-20 en PBS, s'incuba amb els anticossos primaris durant 2 hores a les dilucions següents: anti-GST-DCC.I a 1:1000, anti-mucines gàstriques (L56) a 1:100, anti-E-cadherina humana (HECD1) a 2 µg/ml, anti-PKC α (P16520) a 0.5 µg/ml, anti-ezrina, anti-radixina, anti-moesina a 1:5000, anti- β 1 a 1:25 000, anti- β 4 (1025) a 1:5000, anti α 6 (4E9G8) a 5 µg/ml. Després de rentar una vegada amb el tampó de bloqueig, i tres vegades més amb 0.1% de Tween-20 en PBS, els filtres s'incuben 1 h amb l'anticós secundari corresponent acoplat a peroxidasa (HRP) (Dakopatts), es renten successivament amb 0.1% de Tween-20 en PBS i PBS. Es revela mitjançant el sistema de detecció Luminol ECL detection system (Amersham).

10. Assaig d'interacció *in vitro*. (Assaig de “pull-down”)

10.1. Producció de l'Ezrina sencera i dels dominis N- i C-terminal de l'ezrina en cèl·lules Sf9

Les cèl·lules Sf9 es sembren a la densitat de 3.0×10^5 cèl·lules/cm² en flascons T150 i 18 h després s'infecten amb els baculovirus contenint les construccions d'ezrina a analitzar (2 flascons T150 per a cadascuna de les construccions). Al cap de 37-38 hores, les cèl·lules es lisen en 30 mM d'Hepes pH 7.5, 1 mM d'EGTA, 5 mM de MgCl₂, 40 ó 130 mM de KCl, 1% de NP-40, 1 mM de DTT, 1 mM d'ortovanadat, 5 mM de NaF, 1 mM de PMSF, 10 µg/ml de leupeptina i 10 µg/ml de pepstatina, mesclant varies vegades amb un vòrtex durant 10-15 minuts d'incubació a 4°C. A continuació, els lisats es centrifuguen durant 15 min a 14 000 rpm i a 4°C.

10.2. Assaig de “pull down”

Aproximadament una cinquena part (de 100 a 200 µl) de cada lisat (obtingut segons es descriu en la secció anterior) s'incuba durant 1 hora a 4°C i amb agitació suau amb cadascuna de les construccions de GST inmovilitzades en 10-20 µl de Glutathiona-Sefarosa 4B. Després es realitzen 5 rentats amb tampó de lisi (1 ml/rentat). Les proteïnes acomplexades a les construccions inmovilitzades en la columna de glutatió agarosa s'elueixen bullint durant 5 minuts en tampó Laemmli i s'analitzen per Western blot.

11. Immunoprecipitació

La preparació de proteïnes a analitzar (1 mg) es dilueix fins a 500 µl amb el mateix tampó de la lisi. Amb la fi d'evitar unions inespecífiques durant la immunoprecipitació, es realitzen dos preclarats de 30 min cadascun, amb 10 µl de Proteïna G sefarosa (Pharmacia). A continuació, el sobrenadant s'incuba 16-18 h amb 5 µg d'anticòs prèviament conjugat a 10 µl de proteïna

G sefarosa tal com es descriu més endavant. Per immunoprecipitar el DCC s'utilitza l'anticòs AF-5 (Oncogene Science) dirigit contra el domini extracel·lular de la proteïna. Com a control negatiu, s'ha utilitzat l'anticòs E2A (Santa Cruz). Després, la resina es renta 5 vegades amb tampó de lisi. Totes les incubacions i rentats es realitzen a 4°C i amb agitació suau. Les proteïnes acomplexades a l'anticòs s'elueixen bullint durant 5 minuts en tampó Laemmli i s'analitzen per SDS-PAGE seguit de Western blot.

Conjugació covalent dels anticossos a la Proteïna G-sefarosa: Els anticossos s'incuben en PBS, durant 2 h a temperatura ambient amb agitació suau amb la Proteïna G Sefarosa (Pharmacia) en una relació 1 µg d'anticòs/2 µl de resina. Els complexos es renten amb tampó borat (0.2 M de Na₂B₄O₇ pH 9.0) i s'incuben durant 30 min en agitació suau, amb 20 mM de dimetilpimelimidat/tampó borat. La reacció de conjugació s'atura rentant dos vegades amb 0.05 M de glicina pH 8.0. Els complexos anticòs-proteïna G es renten amb PBS i es guarden en 0.01% d'azida sòdica/PBS a 4°C. Una petita alíquota de l'anticòs incubat amb la Proteïna-G Sefarosa abans i després de l'addició del dimetilpimelimidat/tampó borat, s'analitzen per SDS-PAGE amb la fi d'examinar l'eficiència de la conjugació covalent.

12. Assajos *in vivo* en ratolins *nude*

12.1. Assaig de tumorigenicitat

Després de tripsinitzar les cèl·lules, es resuspenen en PBS estèril a una concentració de 2×10^3 cèl·lules/µl. 50 µl d'aquesta suspensió cel·lular (10^5 cèl·lules) s'injecten subcutàniament, als costats dret i esquerre del quadrant dorsal posterior de ratolins atímics Swiss nu/nu femelles (3 animals per clon) de 4 a 6 setmanes d'edat. Els tumors es mesuren 3 cops per setmana durant un període de 2 mesos amb un peu de rei. El volum del tumor s'estima mitjançant la fórmula $\frac{4}{3} \pi r^3$ on "r" és la mitja entre el radi corresponent a la llargada i el corresponent a l'amplada del tumor. Cada

punt del gràfic correspon a la mitjana dels volums estimats dels tumors desenvolupats a partir de cada tipus cel·lular analitzat. Quan un tumor no es desenvolupa, el seu volum es considera 0. Per l'anàlisi estadístic s'ha utilitzat el test de la t de Student. Els ratolins es sacrifiquen per dislocació cervical abans que el diàmetre dels tumors superi els 15 mm. Una part dels tumors extirpats és congelada immediatament en nitrogen líquid per a posterior extracció de RNA i proteïna, una altra part és criopreservada en OCT per assajos d'immunohistoquímica i una darrera part és fixada en formol per posterior inclusió en parafina i anàlisi histològic i/o immunohistoquímic.

12.2. Assaig de disseminació

Fragments sòlids de tumor, desenvolupats a partir de la inoculació subcutània de cèl·lules en ratolins atímics Swiss nu/nu femelles (veure l'apartat anterior), es trocejen fins a un tamany aproximat de $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ i s'implanten en el cec d'altres ratolins atímics (un fragment per ratolí) Swiss nu/nu mascles de 4 a 6 setmanes d'edat segons es descriu a continuació: Els ratolins s'anestessien per inhalació d'isofluorà (Abbott Laboratories) i una vegada adormits es col·loquen en posició de decúbit prono per tal de facilitar la incisió. Després de pintar la pell del ratolí amb povidona iodada, es fa una incisió mitjana subxifoidea. Un cop oberta la cavitat peritoneal es localitza el cec del ratolí que es mòbil i s'exterioritza. Els fragments de tumor es renten amb medi de cultiu RPMI 1460 amb 20 % de FBS, gentamicina i fungizona per tal de garantir que són lliures de contaminacions. Els fragments es suturen a la serosa i la subserosa de la cara anterior dels cecs amb fil de sutura atraumàtica de prolene de 6/0 i un porta. Abans de tancar la cavitat peritoneal es col·loquen, dintre de la mateixa, 0.5-1 ml de sèrum fisiològic per tal de facilitar la hidratació de l'animal en el postoperatori immediat. La paret es tanca amb una sola capa amb grapes. Després de l'anestèsia, l'animal es recupera bé en 2-3 hores.

L'aparició i creixement dels tumors es determinen per palpació, 3 cops per setmana durant un període aproximat de 2 mesos. Els ratolins es

MATERIALS I MÈTODES

sacrifiquen quan presenten caquèxia (pèrdua de pes, disminució d'activitat, pèrdua del color habitual). Mostres del tumor primari, del tumor desenvolupat en la zona de la ferida, gànglis preaòrtics, ronyó, adenopaties mediastíniques, epiplon, diafragma, pulmó i fetge, es fixen en formol per a posterior inclusió en parafina i anàlisi histològic.