

3.4. Mobilitat

El PMA, un activador de la PKC, induïx migració cel·lular i pèrdua de contactes (“scattering”) en les cèl·lules HT-29 (Fabre & García de Herreros, 1993) de la mateixa manera que ha estat descrit per altres factors motogènics com és el cas del HGF (“Hepatocyte growth factor”) (revisat a Galimi et al., 1993). Així doncs, després de ser tractades durant 16-18 h amb 100 nM de TPA i en medi sense sèrum, les cèl·lules HT-29 control s’individualitzen (Fig. 15 panell A: c) perdent els contactes intercel·lulars, la qual cosa s’acompanya de la disminució de l’E-cadherina present en la membrana tal i com s’observa per immunofluorescència (Fig. 15 panell B: a). No obstant, els transfectants HT-29/DCC tractats amb TPA continuen creixent en forma de colònies compactes (Fig. 18 panell A: d) i conserven l’E-cadherina en la membrana cel·lular (Fig. 15 panell B: b; 15 panell C). Aquest experiment demostra que malgrat el DCC no actua directament sobre les unions adherents (veure secció 3.2) inhibeix l’efecte d’individualització i migració cel·lular induïda pel TPA.

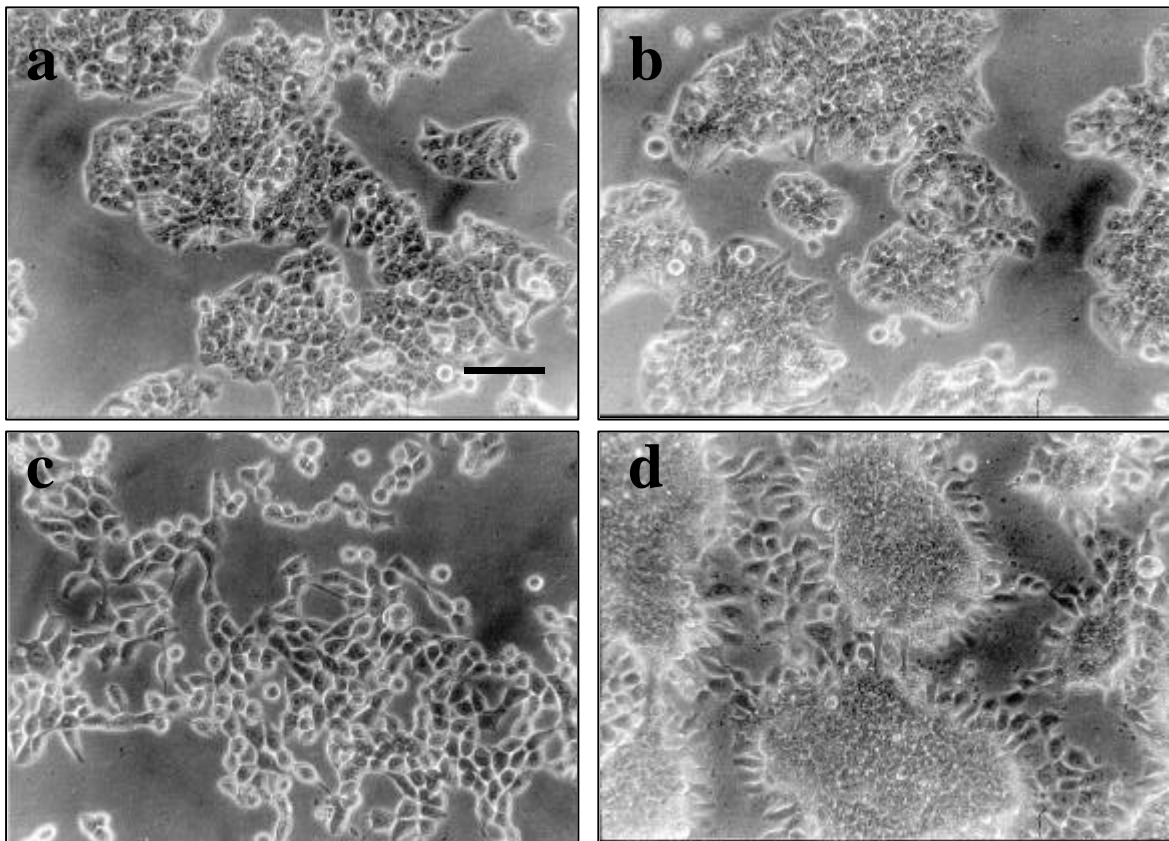
Figura 15 (pàgina següent): Anàlisi de l’efecte del DCC sobre el “scattering” induït pel TPA en les cèl·lules HT-29

(A): Els transfectants HT-29 control (a, c) i HT-29/DCC (b, d) han estat cultivats durant 16-18 h, en medi sense sèrum i absència (a, b) o presència (c, d) de TPA. La morfologia de les cèl·lules ha estat estudiada per microscopia de contrast de fases. Barra d’escala: 50 µm.

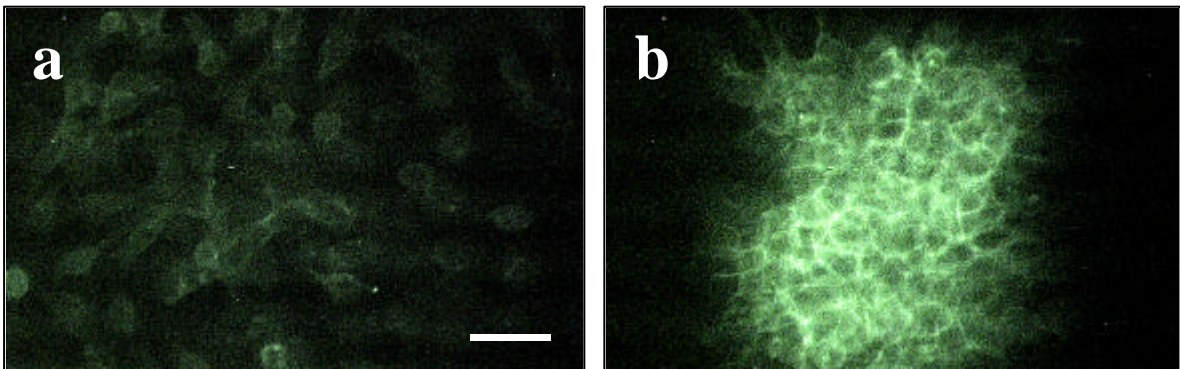
(B): La distribució de l’E-cadherina ha estat analitzada mitjançant immunofluorescència, en cèl·lules HT-29 control (a) i HT-29/DCC (b) tractades amb TPA. Barra d’escala: 160 µm.

(C): Quantitat d’E-cadherina en la fracció protèica soluble (s) i insoluble (i) en Tritó X-100 dels transfectants HT-29 control i HT-29/DCC sense tractar o tractats amb TPA. L’E-cadherina s’ha quantificat per densitometria del senyal obtingut en l’anàlisi per Western blot de les fraccions protèiques esmentades. El valor obtingut s’ha normalitzat segons la quantitat de proteïna total detectada per la mateixa metodologia.

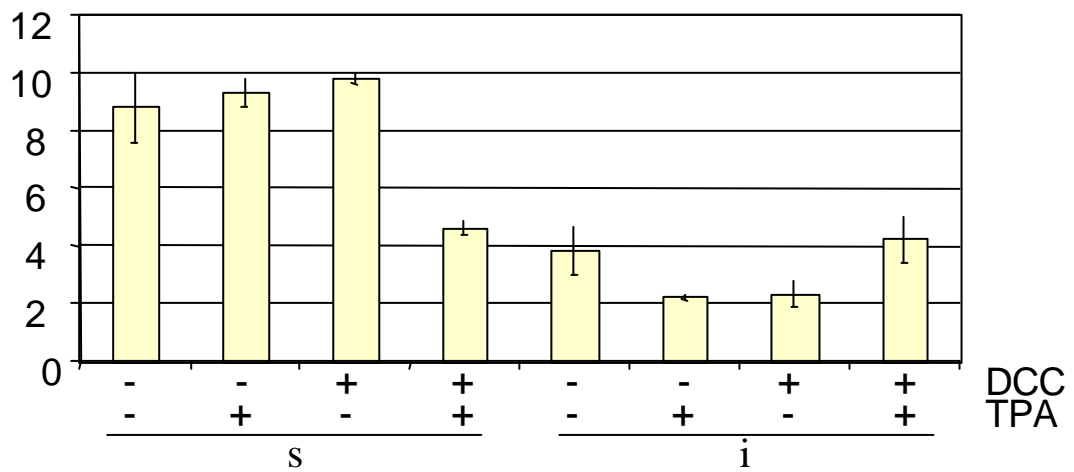
A



B



C



Amb la fi de quantificar els canvis induïts pel DCC en la migració cel·lular, els transfectants HT-29/DCC i els control es van sembrar en *Transwells*[®] i es va analitzar la capacitat de migració de les cèl·lules en absència o presència de 100 nM de TPA. Segons aquest experiment, l'expressió del DCC inhibeix la migració de les cèl·lules HT-29 induïda pel TPA, d'un 20 a un 40% (clons 31 i 16 respectivament) (Fig. 16). L'experiment, utilitzant els medis condicionats de les cèl·lules C9, C20 o 293/EBNA-Net-1 en lloc del TPA, revelà que cap d'aquests medis té un efecte significatiu sobre la migració de les cèl·lules HT-29, independentment de l'expressió del DCC.

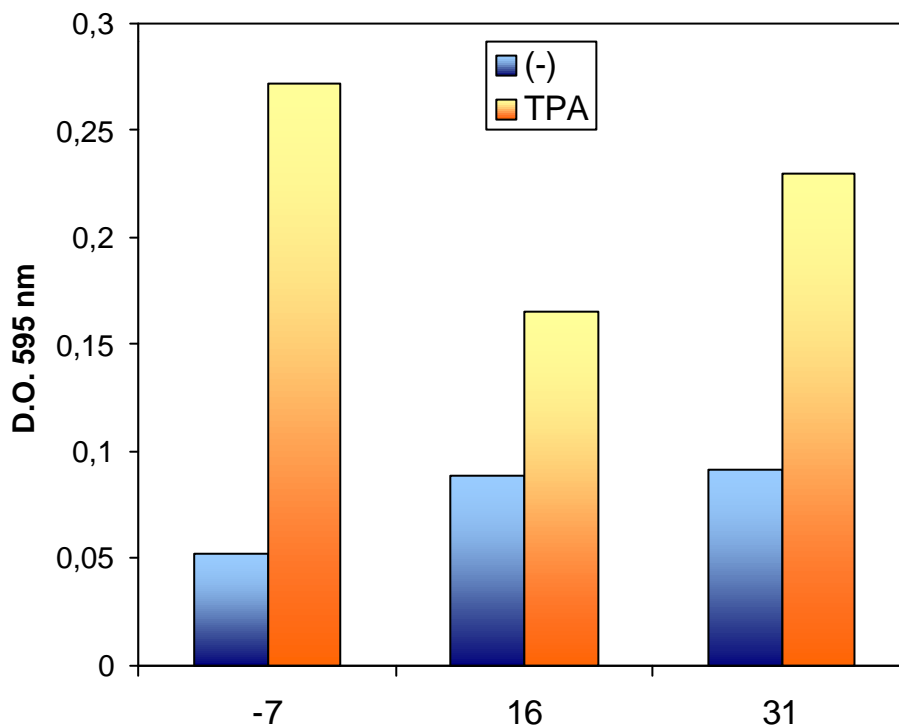


Figura 16: Anàlisi de la mobilitat dels transfectants HT-29/DCC i control mitjançant l'anàlisi en *Transwells*[®]

Les cèl·lules que han migrat cap a la cambra inferior del "Transwell[®]", s'han tenyit amb cristall violeta i s'han quantificat per absorbància a 595 nm. En aquest diagrama de barres es compara la migració dels transfectants control (clon -7) i els transfectants/DCC (clons 16, 31) en absència (-) i en presència de 100 nM de TPA. El DCC inhibeix d'un 20 a un 40% la migració induïda pel TPA de les cèl·lules HT-29.

3.5. Adhesió cèl·lula-matriu

Com s'ha mencionat en la secció 3.2 del capítol d'introducció, la interacció de les cèl·lules amb la matriu extracel·lular és de fonamental importància en molts processos biològics, entre els quals s'hi troba la migració cel·lular. Les laminines són els principals components de la làmina basal i més concretament a l'intestí, la laminina majoritària és la laminina 1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$), però també s'hi troben les laminines 2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$), 8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$), 10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$) i 5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$).

Amb la finalitat d'estudiar la capacitat d'adhesió a la matriu de les cèl·lules HT-29/DCC i control es va realitzar un assaig de resistència a la tripsina després de sembrar les cèl·lules sobre plàstic o sobre diferents substrats (BSA, laminina, fibronectina, col·lagen de tipus I i IV i matriu extracel·lular de cèl·lules HT-29 M6 ó de fibroblasts humans). Les cèl·lules que expressen DCC es desprenen més fàcilment que les HT-29 control, ja hagin estat sembrades sobre plàstic o sobre qualsevol tipus de substrat. En la figura 17 es mostra els resultat d'un d'aquests assajos en el que les cèl·lules s'han sembrat sobre plàstic o sobre matriu extracel·lular de fibroblasts. Aquests experiments demostren que l'expressió del DCC redueix la unió cèl·lula-substrat, tant sobre plàstic o sobre matriu extracel·lular de fibroblast. Amb tots els tipus de substrats estudiats es van obtenir resultats equivalents.

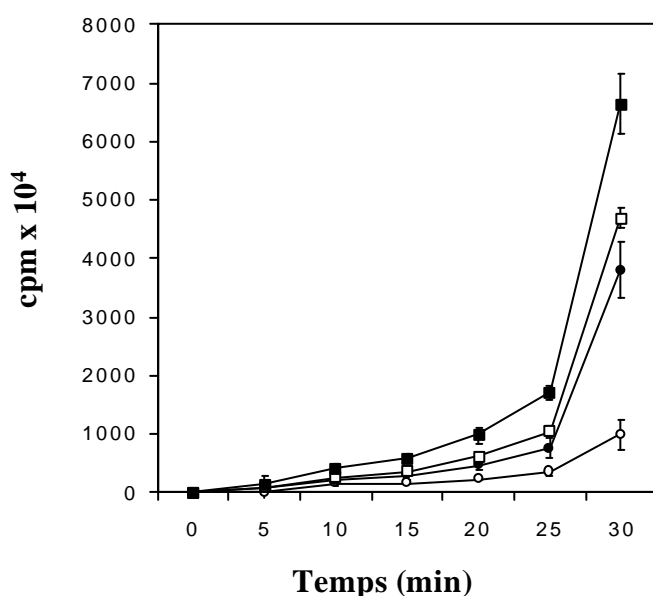
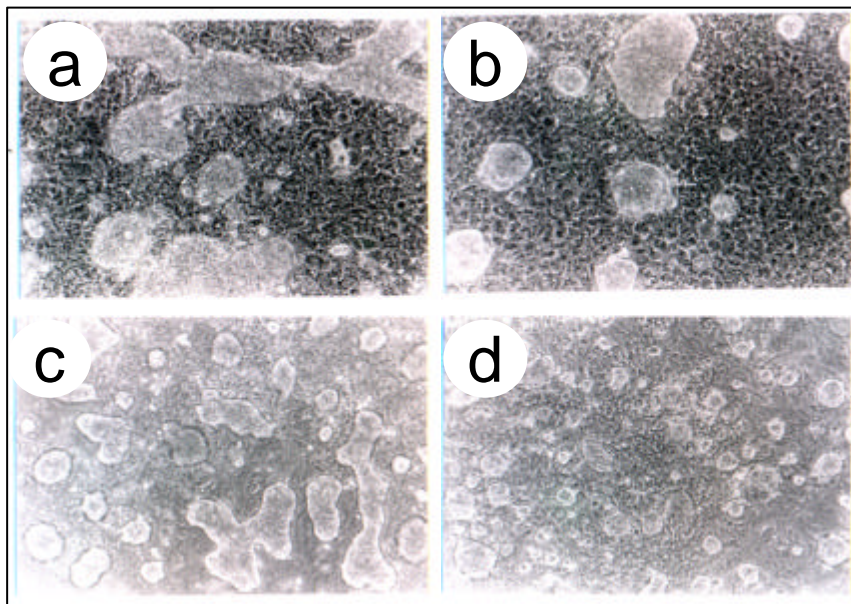


Figura 17: Assaig de resistència a la tripsina

Les cèl·lules HT-29 control (cercles) i DCC (quadrats) sembrades sobre plàstic (blanc) o matriu extracel·lular (ECM) de fibroblasts (negre) es marquen metabòlicament amb ^3H -Thy. Després s'incuben amb tripsina i la quantitat de cèl·lules que es desprenen del substrat a cadascun dels temps estudiats es determina per escintil·lació utilitzant un comptador de partícules beta.

Per tal d'analitzar *in vitro* la possible implicació del DCC en les interaccions epiteli-mesènquima de l'intestí, vem estudiar la capacitat d'adhesió de les cèl·lules HT-29/DCC i control a les cèl·lules mesenquimals C9 i C20 ó a fibroblasts de pell humana, mitjançant experiments de co-cultiu (Fig 18). En tots els casos les cèl·lules que expressen DCC presenten major dificultat en estendre's sobre la monocapa de cèl·lules subjacents. Aquest resultat queda evidenciat en els talls semifins del co-cultiu sobre fibroblasts (Fig. 18 B), on s'observa que la superfície de contacte de les cèl·lules HT-29/DCC amb els fibroblasts és menor respecte les control. Les HT-29/DCC creixen apilant-se fins a desadherir-se del substrat.

A



B



Figura 18: Co-cultiu de les cèl·lules HT-29/DCC i control sobre fibroblasts

A: Anàlisi per microscopia de contrast de fases de les cèl·lules HT-29/DCC (clon 31) (b, d) i control (clon -7) (a, c) sembrades sobre els clons C9 (a, b) i C20 (c, d).

B: Anàlisi de talls semifins de cèl·lules HT-29/DCC (b) i control (a) sembrades sobre fibroblasts de pell humana.

Finalment es va quantificar la capacitat d'adhesió *de novo* de les cèl·lules al plàstic en absència i presència de medis condicionats de les cèl·lules secretores de Netrina-1, dels clons C9 i C20, BSA, i en co-cultiu sobre una monocapa de cèl·lules C9 i C20 (Fig. 19). En tots els casos la capacitat d'adhesió de les cèl·lules control és major que la de les cèl·lules que expressen DCC i aquesta diferència s'accentua en els co-cultius sobre els clons C9 i C20. No obstant, aquesta diferència en la capacitat d'adhesió entre HT-29/DCC i control sembrades sobre plàstic, es redueix en presència dels medis condicionats de les cèl·lules 293/EBNA-Net-1, C9 i C20.

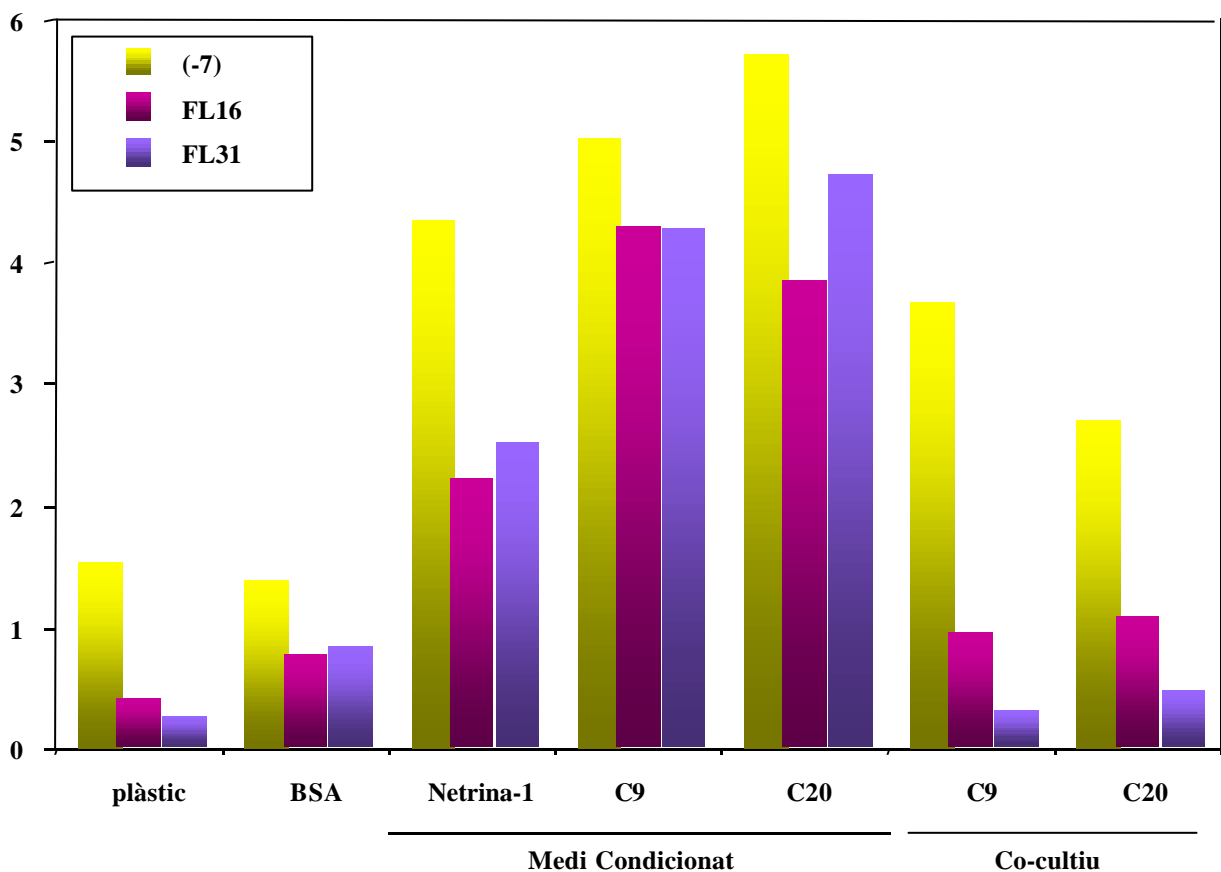


Figura 19: Efecte del DCC sobre l'adhesió de novo

Les cèl·lules marcades amb ^3H -Thy s'han sembrat sobre plàstic en absència o presència de medi condicionat de cèl·lules 293/EBNA-Net-1, C9 i C20, sobre BSA i en co-cultiu sobre els clons C9 i C20 i al cap d'una hora es quantifiquen les cèl·lules adherides per escintil·lació.

El conjunt d'aquests resultats demostra que el DCC indueix una disminució de la capacitat d'adhesió a la matriu en les cèl·lules HT-29, disminució que s'accentua en els co-cultius amb els clons C9 i C20 però que es redueix en presència de medis condicionats d'aquestes cèl·lules.

Donat que els experiments de migració en sistemes de dues dimensions (veure secció 3.4 d'aquest capítol) suggerien que el DCC tenia un efecte inhibitor sobre la migració induïda pel TPA en les cèl·lules HT-29, vàrem voler comprovar aquests resultats en un sistema de tres dimensions. Així, vem estudiar el paper del DCC en la migració cel·lular mitjançant l'anàlisi d'agregats cel·lulars dels transfectants HT-29 control o HT-29/DCC dins d'una matriu de col·lagen de tipus I (el col·lagen majoritari en la matriu extracel·lular de l'intestí). Després de 2-3 dies d'haver depositat els agregats en el col·lagen, les cèl·lules de la perifèria d'aquests agregats comencen a migrar. En el cas de les HT-29 control, les cèl·lules que migren ho fan de forma individualitzada (Fig. 20 a i c). En canvi, en els agregats de les HT-29/DCC les cèl·lules no migren individualment sino formant unes digitacions (Fig. 20 b i d). La presència de 100nM de TPA (Fig. 20 c i d) potencia aquest efecte.

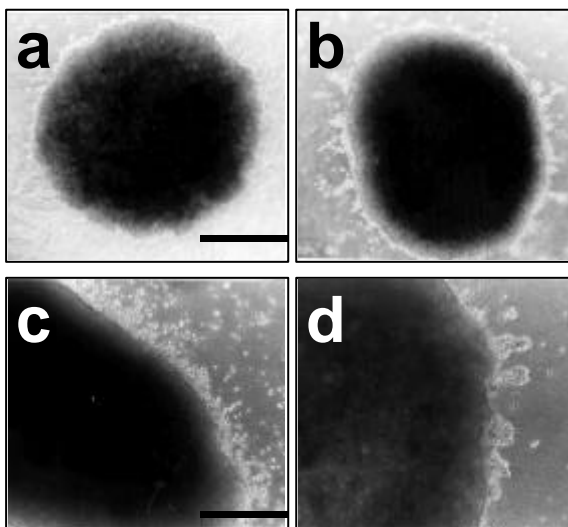


Figura 20: Anàlisi per microscopia de contrast de fases d'agregats cel·lulars en matriu de col·lagen

Agregats de cèl·lules HT-29 control (-7) (a, c) i HT-29/DCC (clon 16) (b, d), mantinguts en cultiu 5 dies sense FCS i absència (a, b) o presència de 100 nM de TPA (c, d). Barres d'escala: 250 μm (a, b) i 100 μm (c, d).

En el sistema nerviós s'ha demostrat que l'efecte atractiu o repel·lent de la netrina-1 sobre la migració axonal depen de la seva interacció amb el DCC (Fazeli et al., 1997; Hong et al., 1999). Per aquesta raó, mitjançant aquesta tècnica de cultiu en tres dimensions també vem estudiar l'efecte sobre les HT-29/DCC i control dels medis condicionats i d'agregats co-existents en el mateix pou, de les cèl·lules 293/EBNA-Net-1 i control i els clons C9 i C20. Respecte a les 293/EBNA-Net-1 no s'observà cap efecte específic ni de la netrina-1, ni de l'expressió del DCC. Pel que fa al medi condicionat dels clons C9 i C20, s'indueix una inhibició de la migració de les cèl·lules perifèriques dels agregats HT-29-DCC (Fig. 21 b, d). La migració en els agregats HT-29 control també està inhibida encara que en menor grau (Fig. 21 a, c). El co-cultiu d'agregats de C9 ó C20 en el mateix pou que els agregats HT-29/DCC i control també inhibeix la migració perifèrica d'aquests (Fig. 21 e-h). En casos concrets en que els dos agregats HT-29 i C9 o C20 es troben molt propers, s'observa que hi ha cèl·lules de l'agregat HT-29 que migren en direcció a l'agregat C9 o C20. Aquest efecte però, és inespecífic de l'expressió del DCC (Fig. 21 f, g).

HT-29 control HT-29/DCC

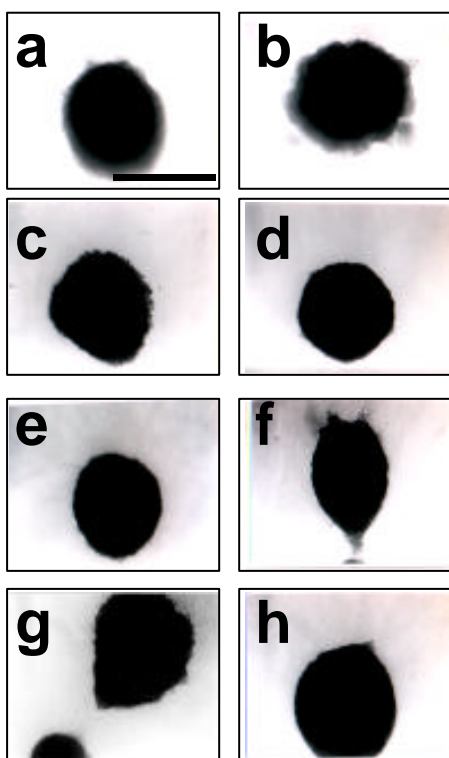


Figura 21: Anàlisi per microscopia de contrast de fases de l'efecte del medi condicionat i del co-cultiu d'agregats dels clons C9 i C20, en els agregats de cèl·lules HT-29 control i DCC

Els agregats d'HT-29 control (esquerra) i HT-29/DCC (dreta) han estat en cultiu durant 15 dies en absència (a, b), presència de medi condicionat de cel·lules C9 (c, d) o co-cultiu d'un agregat C9 (e, f) o C20 (g, h). Barres d'escala: 250 µm

3.6. Disseminació

En la literatura està descrit que les pèrdues d'expressió del DCC en tumors colorectals s'observen sobretot en etapes avançades del procés tumorigènic (Kinzler and Vogelstein, 1996) associant les pèrdues de la regió 18q.21 a tumors invasius i metastàsics (Kern, et al., 1989). Per aquestes raons i donats els nostres resultats obtinguts *in vitro*, vàrem voler estudiar la capacitat de disseminació *in vivo* dels tumors desenvolupats per les cèl·lules HT-29/DCC i control, en xenoempelts. Per a determinar l'efecte de l'expressió del DCC sobre la disseminació, fragments (aproximadament 8 mm³) de tumors sòlids subcutanis foren implantats en el cec de ratolins *nude*. Aquests es van sacrificar en el moment de presentar un fenotip moribund, i es determinà la presència de metàstasi. Els ratolins control van haver de ser sacrificats entre els dies 47 i 64 post-implant. A dia 64, també es van sacrificar 3 ratolins implantats amb tumors desenvolupats a partir de cèl·lules HT-29/DCC (clon16) que presentaven un aspecte normal però amb tumors palpables. En aquests ratolins no s'observà cap anomalia o metàstasi a nivell macroscòpic dels teixits mentre que en 4 dels ratolins control s'observaren metàstasis macroscòpiques en el diafragma (3 ratolins) o en el fetge (1 ratolí) i en la majoria d'ells alguns ganglis afectats. La resta de ratolins implantats amb tumors de cèl·lules HT-29/DCC foren sacrificats a dies 71, 86 i 105 post-implant. En aquest últim ratolí, també s'hi observà una possible metàstasi al diafragma, pendent de confirmar a nivell histològic.

Donades les dades de sacrifici post-implant, s'ha realitzat una corba de supervivència (Fig. 22) on n=12 pels ratolins control i n=7 pels ratolins/DCC. S'ha de considerar, si més no, que cap dels 3 ratolins/DCC sacrificats a dia 64 post-implant presentava símptomes de fenotip moribund i es sacrificaren per comparar-los amb els ratolins control en el mateix moment post-implant. Aquest experiment demostra que la presència del DCC augmenta la supervivència dels ratolins en aquest tipus d'assaig.

Per altra banda els tumors desenvolupats pels ratolins control eren de tamany superior que els desenvolupats pels ratolins implantats amb tumors/DCC. En aquest experiment, un cop el ratolí sacrificat, es quantificà el pes dels tumors obtenint una mitjana de 2.1 g pels tumors control (n= 12) i de 1.31 g pels tumors/DCC (n= 7).

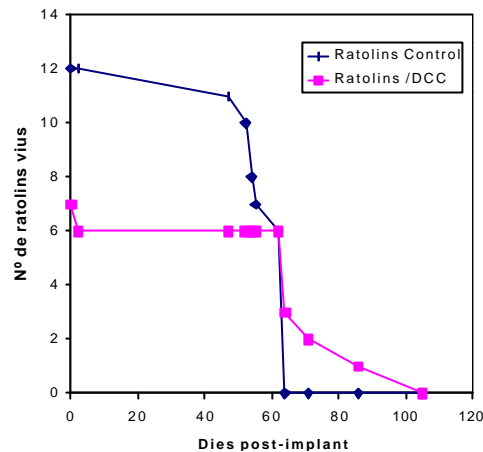


Figura 22: Corba de supervivència dels ratolins *nude* implantats amb xenoempelts

A mode de conclusió, els efectes observats del DCC sobre les HT-29 venen resumits en la taula següent:

	HT-29/DCC respecte les control
Diferenciació	=
Proliferació	=
Mobilitat	↓
Adhesió cèl·lula-cèl·lula	↑
Adhesió cèl·lula-matriu	↓
Migració cèl·lules individualitzades en cultius 3D	↓
Creixement tumoral <i>in vivo</i>	↓
Disseminació <i>in vivo</i>	↓

Malgrat que els clons C9 i C29, o el seu medi condicionat, afecta les HT-29 en la majoria de paràmetres, només l'efecte sobre l'adhesió cel·lular és específic dels clons transfectats amb DCC.

4. DCC interacciona amb les proteïnes de la família ERM

4.1. DCC indueix la disrupció d'adhesions focals i hemidesmosomes de tipus II.

Com s'ha descrit al capítol d'introducció, les cèl·lules epitelials s'adhereixen al substrat mitjançant dos tipus d'unions: les adhesions focals i els hemidesmosomes de tipus II (HDII). A l'epiteli intestinal, els HDII es localitzen majoritàriament en la superfície basal de les cèl·lules diferenciades que migren cap a la superfície dels villi. Per aquest motiu s'ha proposat que, en aquest sistema, més que una estructura d'ancoratge, els HDII serien uns complexos que permetrien la migració controlada en l'eix cripta-villus durant el procés de diferenciació i renovament cel·lular constant que té lloc en aquest tipus d'epiteli (revisat a Simon-Assmann et al., 1995). D'altra banda, contrastant amb la seva funció en l'epiteli normal, s'ha demostrat que la integrina $\alpha 6\beta 4$ estimula la migració i la invasió de cèl·lules canceroses mitjançant la interacció amb el citosquelet d'actina promovent la formació i estabilització de lamel·lipodis (Rabinovitz and Mercurio, 1997; Rabinovitz et al., 1999). Resultats previs, havien suggerit una implicació de la integrina $\alpha 6\beta 4$ en la migració i la invasió de les cèl·lules canceroses, donat que l'expressió de la subunitat $\beta 4$ es troba incrementada en carcinomes invasius respecte adenomes benignes i els teixits normals (Kennel et al., 1989).

Segons els nostres estudis de localització del DCC per immunofluorescència, aquest no col·localitza amb cap d'aquestes estructures d'adhesió en les cèl·lules HT-29 transfectades (Fig. 7; secció 2.3). No obstant, vem decidir d'examinar si les proteïnes implicades en aquests complexos d'adhesió al substrat estaven afectades per l'expressió del DCC. L'estudi per immunofluorescència mostra que el patró observat de les subunitats d'integrina $\alpha 6$ i $\beta 4$ en les HT-29 control (Fig 23 b, c) es perd en les HT-29/DCC (Fig 23 f, g). El mateix efecte s'observa en la localització de la talina (Fig. 23 d, h), component de les adhesions focals. En canvi, altres subunitats d'integrines pròpies d'adhesions focals com són la $\alpha 2$, $\alpha 3$, i

$\beta 1$ (les HT-29 no expressen $\alpha 1$), no es troben afectades (Fig. 23 a, e). L'estudi dels nivells d'expressió de les subunitats d'integrines $\alpha 6$ i $\beta 4$, per Western Blot i RT-PCR respectivament, no indica diferències entre les HT-29 control i les HT-29/DCC, suggerint que DCC no actua a nivell d'expressió de proteïna sino de localització i disrupció dels contactes al substrat.

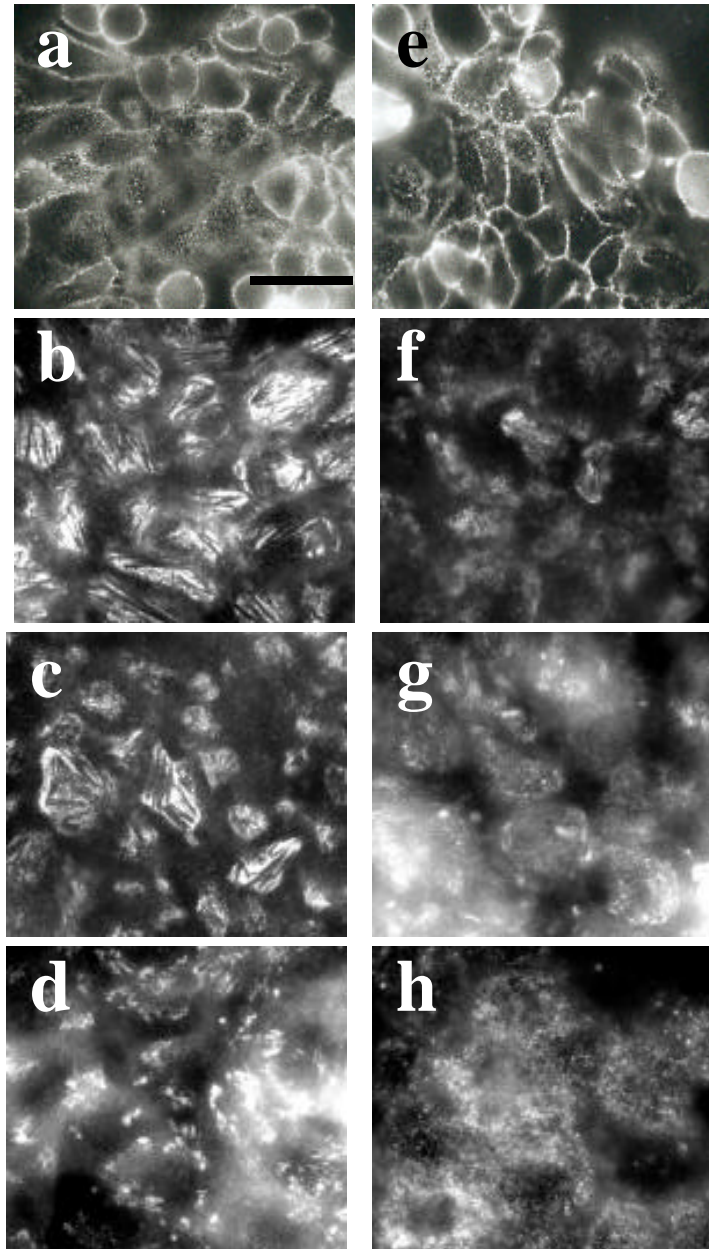


Figura 23: Anàlisi de les proteïnes d'adhesió a la matriu

Anàlisi de la localització en la part basal de la cèl·lula de les subunitats d'integrines $\alpha 2$ (a, e), $\alpha 6$ (b, f) i $\beta 4$ (c, g), així com de la talina (d, h), en cèl·lules HT-29 control (a-d) i HT-29/DCC (e-h). Barra d'escala: 50 μm

4.2. La disrupció de les adhesions focals té lloc via fragmentació de les fibres d'estrés

Les estructures cel·lulars d'adhesió al substrat afectades per l'expressió del DCC es troben associades a l'actina i als filaments intermediaris. Per aquest motiu es va examinar ambdós tipus de citoesquelet en els transfectants HT-29 control i DCC. El marcatge per immunofluorescència de les citoqueratines CK8 i CK19 suggereix que els filaments intermediaris no estan alterats per l'expressió del DCC. No obstant, el marcatge de l'actina utilitzant faloidina-rodamina tant en cèl·lules senceres i permeabilitzades (Fig. 24 a, b) com en adhesions focals aïllades (Fig. 24 c, d), revelà que el DCC induïx una fragmentació de les fibres d'estrés mentres que no hi ha canvis en l'actina cortical.

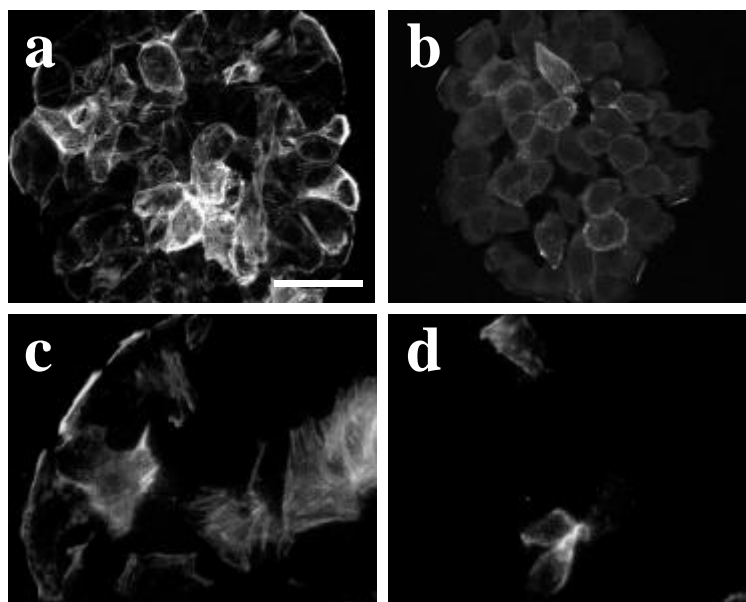


Figura 24: Anàlisi del citoesquelet d'actina

Col·localització dels filaments d'actina amb faloidina conjugada a rodamina. (a, b): imatge d'un pla basal de cèl·lules senceres permeabilitzades i analitzades amb microscopia confocal. Barra d'escala: 20 μm . (c, d): adhesions focals purificades. Barra d'escala: 10 μm (a, c): HT-29 control. (b, d): HT-29/DCC.

4.3. L'efecte del DCC sobre el citosquelet d'actina ve mediat per la seva interacció amb les proteïnes de la família ERM

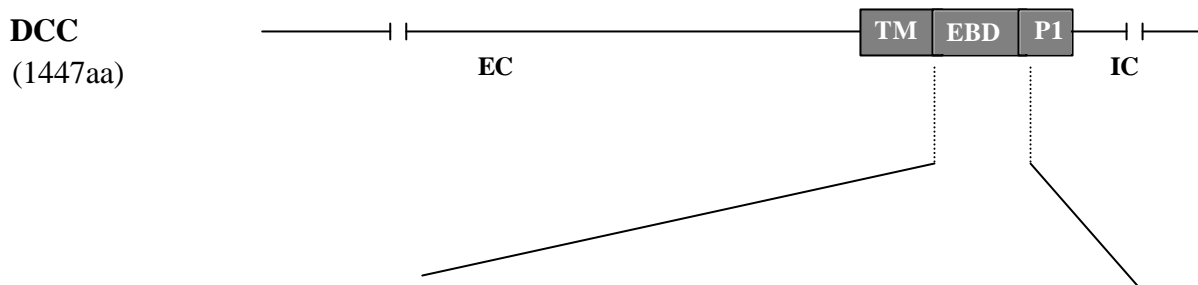
Malgrat no s'observa que el DCC es localitzi a nivell de les adhesions focals (Fig. 7; secció 2.3), els experiments d'extracció diferencial de proteïnes en presència de diferents detergens iònics i no iònics suggereixen que part del DCC es troba associat al citosquelet d'actina. Així, quan les proteïnes cel·lulars s'extrauen en presència de 1% de Tritó X-100, el DCC es detecta tant en la fracció soluble com en la insoluble (Fig. 25), sent aquesta última la que conté les proteïnes associades al citosquelet (Skoudy et al., 1996). Per aquesta raó, s'examinà la seqüència del domini citoplasmàtic del DCC a la recerca de dominis d'unió a l'actina. Malgrat no s'hi trobà cap consensu per l'actina, s'hi trobà un domini de 30 aminoàcids juxtamembrana, ric en residus bàsics (R i K), descrit com a consensu del domini d'unió a proteïnes de la família ERM (Ezrin-Moesin-Radixin) (Yonemura et al., 1998) (Fig. 26 A). A més, el domini citoplasmàtic sencer de DCC presenta un punt isoelèctric bàsic de 8.16, propietat que comparteixen de forma exclusiva les altres proteïnes que s'uneixen a les ERM's (CD44, ICAM-2 i ICAM-3) (Fig. 26 B) (Yonemura et al., 1998). Aquestes dades suggereixen que la interacció del DCC amb el citosquelet podria donar-se via proteïnes de la família ERM.



Figura 25: Anàlisi de l'associació del DCC amb el citosquelet

Fraccions solubles (s) i insolubles (i) en 1% de Tritó X-100 analitzades per Western blot utilitzant l'anticòs anti-DCC.I. (a): cèl·lules HT-29 control; (b): cèl·lules HT-29/DCC.

A



DCC
(1447aa)

DCC (1121-1151)	<u>CTR</u><u>SSAQQR</u><u>KKR</u>ATHSAG<u>KRK</u><u>GSQ</u><u>KDLR</u>
CD44 (344-363)	<u>RRRC</u><u>GQ</u><u>KKK</u>LVI<u>GG</u>NGTV
CD43 (271-302)	<u>RQR</u><u>QRRT</u>GAL<u>TL</u><u>SR</u><u>GG</u><u>KR</u>NGTVDAWAGPA
ICAM-2 (249-277)	HW<u>HRRR</u>TGTYGVLA<u>AWRRL</u><u>PRA</u><u>FR</u><u>ARP</u>

B

Proteïna	Punt isoelèctric	Unió a ERM's
CD 44	8.17	Feble
CD43	9.24	Forta
ICAM-2	12.98	Forta
E-cadherina	3.89	No detectable
Occludina	5.85	No detectable

Figura 26: Anàlisi del domini citoplasmàtic del DCC

(A): Esquema de la proteïna DCC. EC i IC: dominis extracel·lular i intracel·lular de la proteïna, respectivament. TM: domini transmembrana. EBD: domini consensu d'unió a les ERM's ("ERM's binding domain"). P1: seqüència d'unió a UNC-5 (veure secció 6.4 de la introducció). Els 30 aminoàcids juxtamembrana del domini citoplàsmic que componen el putatiu domini EBD s'han comparat amb els consensu d'altres proteïnes que s'uneixen a les ERM's. Els grups de residus bàsics estan subratllats.

(B): Taula amb els punts isoelèctrics de la regió intracel·lular de proteïnes que presenten un domini juxtamembrana bàsic, i la capacitat d'unió d'aquestes a les ERM's. (Taula de Yonemura et al., 1998).

Amb la finalitat de determinar si el DCC interactuava amb les proteïnes ERM, primerament s'analitzà per immunofluorescència la localització de l'eizrina en els transfectants HT-29 control i DCC, donat que aquesta és la proteïna ERM majoritària en les cèl·lules epitelials (Berryman et al., 1993). En les HT-29 control, l'eizrina està distribuïda en les microvellositats primitives i en la membrana plasmàtica. En canvi, en les HT-29/DCC es perd el patró puntiforme de l'eizrina a les microvellositats i només es troba associada a la membrana (Fig. 27 A). Després es van analitzar per western blot els nivells d'expressió en els transfectants, de l'eizrina, la radixina i la moesina. Com mostra la figura 27 B no hi ha diferències entre les cèl·lules control i les que expressen DCC, suggerint que aquest induïx una reorganització intracel·lular de l'eizrina sense afectar els nivells totals de proteïna.

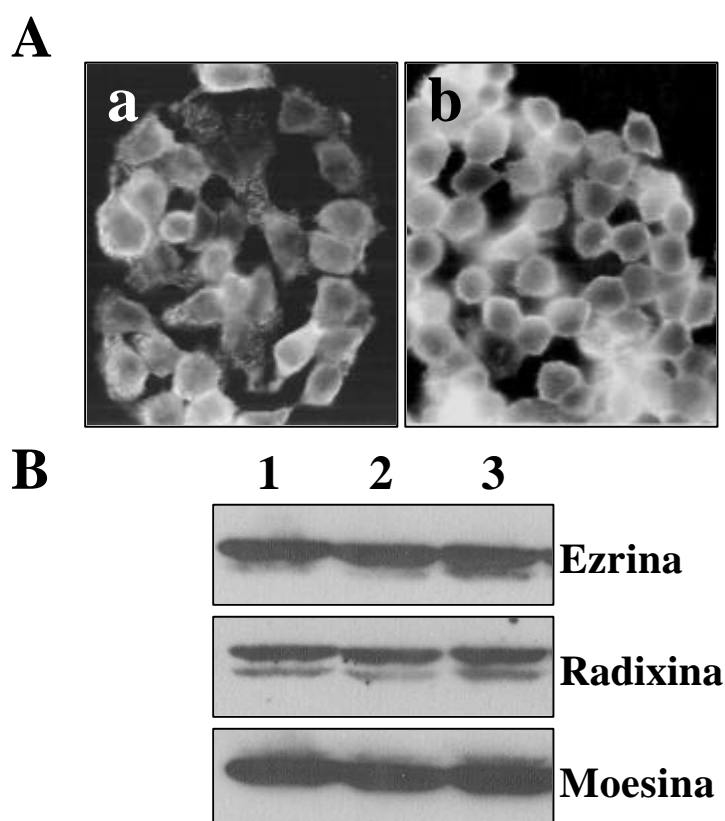


Figura 27: Anàlisi de l'expressió de l'eizrina en els transfectants HT-29

(A): Localització de l'eizrina per immunocitoquímica en les cèl·lules HT-29 control (a) i HT-29/DCC (b). Barra d'escala: 20 μ m (B): Estudi de l'expressió de l'eizrina, la radixina i la moesina per Western Blot en cèl·lules HT-29 control (1) i HT-29/DCC: (2: pool dels clons HT-29/DCC, 3: clon 31).

D'altre banda es va estudiar la distribució del DCC i l'eizrina per microscopia confocal en cèl·lules COS 1 co-transfectades amb les construccions pCMV-DCC i pEGFP-Ezr-i (veure figura 3 dels Materials i Mètodes). Aquesta conté la seqüència que codifica per la proteïna EGFP ("Enhanced Green Fluorescent Protein") interna en el cDNA de l'eizrina, dividint la seqüència d'aquesta en dues parts (AAs 1-234 i AAs 235-585) a banda i banda de la proteïna EGFP. El producte proteic d'aquesta fusió resulta en una molècula d'eizrina incapaç de plegar-se sobre sí mateixa i per tant i esdevé una forma constitutivament activa (Mangeat et al., 1999). En la figura 28 s'observen zones on el DCC i l'eizrina col-localitzen, situades sobretot en la base de les prolongacions membranals i en algunes de les espícules o estructures semblants a filopodis (*filopodis-like*) que les cèl·lules COS 1 formen en resposta a la sobreexpressió de l'eizrina activa.

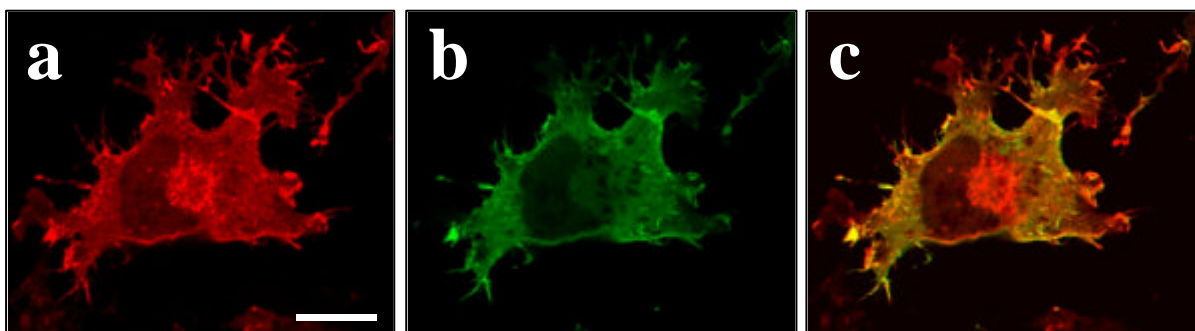


Figura 28: Col-localització del DCC i l'Ezrina en cèl·lules COS 1

Les cèl·lules COS 1 han estat co-transfectades amb les construccions pCMV-DCC i pEGFP-Ezr-i. Després de 48 hores, el DCC ha estat detectat per immunofluorescència utilitzant un anticòs secundari acoplat a rodamina (a). (b): Detecció de la pEGFP-Ezr-i. La col-localització de les dues proteïnes es manifesta en les zones de color groc (c). Barra d'escala: 20 μ m

Per posar de manifest la possible associació directa entre el DCC i l'eizrina, s'han realitzat estudis d'interacció *in vitro*. Per aquest experiment, l'eizrina i la merlina (o NF2) senceres així com els corresponents dominis N-terminal (AA: 1-310 i 1-341 respectivament) han estat sintetitzats en cèl·lules Sf9 infectades amb baculovirus i s'ha analitzat la capacitat d'unir-se a les proteïnes de fusió DCC: GST-DCC-IT o GST-DCC-I immobilitzades sobre una matriu de glutatona-sefarosa. Tal com indica la figura 29 A, la proteïna de fusió GST-DCC-IT conté el domini intracel·lular complet i el domini transmembrana, mentre que la GST-DCC-I conté un fragment C-terminal de la regió citoplasmàtica que manca dels 30 aminoàcids jxtamembrana rics en residus bàsics, proposats com a possible domini d'unió a les ERM's. La proteïna de fusió GST-EBP50 s'ha utilitzat com a control positiu de la unió amb les ERM's i la GST com a control negatiu. Com s'observa en la figura 29 B, la construcció GST-DCC-IT però no la GST-DCC-I, s'uneix a les parts N-terminal de l'eizrina i del NF2. La interacció amb les ERM's senceres és molt baixa probablement degut a que aquestes proteïnes, estan en la conformació inactiva (Mangeat et al., 1999). Experiments fets en paral·lel demostren que DCC no interacciona amb el domini C-terminal de l'eizrina i del NF2. Així doncs, aquests anàlisis d'interacció *in vitro* demostren que el DCC s'uneix específicament a les ERM's, i suggereixen que els 30 aminoàcids jxtamembrana del DCC del domini intracel·lular són els responsables de l'associació amb la regió N-terminal de les ERM's.

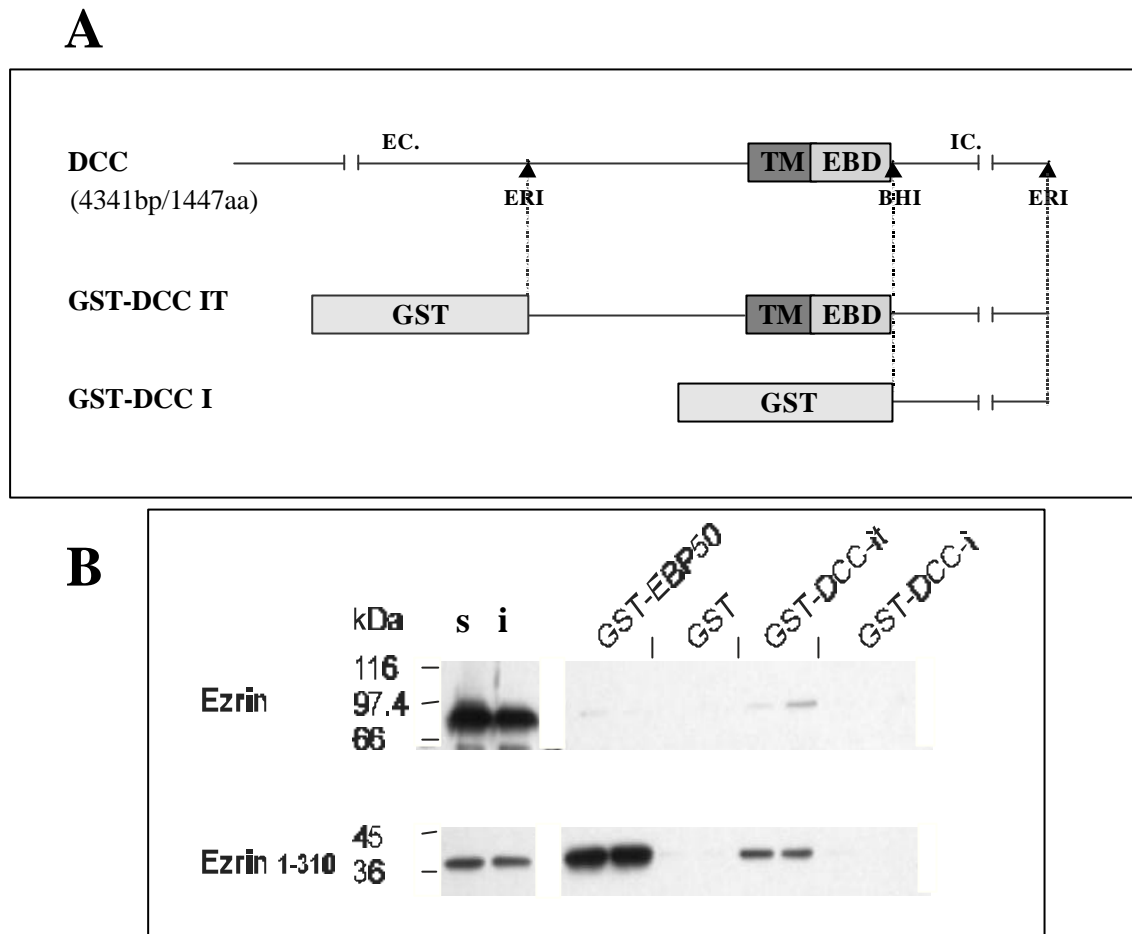


Figura 29: Estudi de la interacció DCC-Ezrina *in vitro*

(A): Esquema de les construccions de fusió GST/DCC utilitzades en aquest assaig. Els caps de fletxa indiquen els llocs de restricció EcoRI (ERI) i BamHI (BHI) utilitzats per generar els constructes a partir del cDNA complet del DCC. GST-DCC-IT: conté el domini transmembrana i el domini intracel·lular complet del DCC (AA: 1021-1447); GST-DCC-I conté un domini intracel·lular del DCC que manca dels 30 primers residus que componen el consensus EBD (AA: 1156-1447).

(B): Assajos d'interacció *in vitro*. Extrets de cèl·lules Sf9 infectades amb baculovirus i sobreexpressant ezrina o NF2 senceres, o la part N-terminal de cadascuna d'elles (AA: 1-310 i 1-341, respectivament) es fraccionen amb matriu d'afinitat: GST-EBP50 (control positiu), GST (control negatiu) i les GST-DCC-IT i GST-DCC-I descrites en (A). La presència d'ezrina, ezrina-N-terminal (1-310), NF2 o NF2-N-terminal (1-341), en les fraccions proteïques de Sf9 retingudes per la columna, s'ha examinat per Western Blot. Els dos primers carrils mostren aquest mateix anàlisi de Western Blot per les fraccions solubles (S) i insolubles (I) en tampó de lisi (veure secció 10 dels materials i mètodes), dels extrets proteïcs totals de les cèl·lules Sf9 infectades. A l'esquerra estan indicats els marcadors de pes molecular.

Per a determinar si aquesta interacció *in vitro*, també tenia lloc *in vivo*, s'han realitzat experiments de co-immunoprecipitació utilitzant extrems proteïcs de diferents teixits o tipus de cèl·lules, diferents anticossos anti-DCC per immunoprecipitar i diferents tipus de tampons de lisi cel·lular i co-immunoprecipitació.

Els experiments realitzats es descriuen a continuació. La combinació de paràmetres utilitzada en cadascun dels experiments ve resumida en la taula II. Per altra banda, malgrat els efectes de les cèl·lules 293/EBNA-Net-1 sobre els transfectants no s'han revelat mai específics de l'expressió del DCC, estudis publicats en contextes diferents del sistema nerviós demostraven la implicació de la netrina-1 en la funció del DCC en altres processos cel·lulars distints del desenvolupament del sistema nerviós (Mehlen et al., 1998). Per aquest motiu i amb la fi d'estudiar si la netrina-1 podia regular la possible interacció *in vivo* DCC/Ezrina, vem realitzar en paral·lel, experiments de co-immunoprecipitació a partir de cèl·lules cultivades en absència o presència de medi condicionat de les cèl·lules 293/EBNA-Net-1.

En un primer lloc vem provar de demostrar l'associació DCC-ezrina en el model d'HT-29/DCC, cultivant les cèl·lules en absència o presència del medi condicionat de les 293/EBNA-Net-1. Per a l'extracció proteïca i per a la immunoprecipitació es van utilitzar diferents tampons els quals només diferien en la composició de detergent. Per altra banda, donada la possibilitat que un anticòs dirigit contra el domini intracel·lular del DCC competís per la unió d'aquest a l'ezrina, vem utilitzar, a més de l'anticòs policlonal anti-DCC.I, l'anticòs dirigit contra el domini extracel·lular AF-5 (Oncogene) (veure llegenda de la taula II). La interacció *in vivo* DCC/ezrina no es va poder demostrar en aquest model.

		Transfecció transitòria amb:	Tampó	Anticòs anti-DCC (IP)
<u>TEIXITS</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Cerebel estadi P7 • Cervell anterior estadi E16 • Cervell de ratolins +/+ ó -/- pel gen Net-1, estadi P0 		<ul style="list-style-type: none"> • S • V • RIPA 	<ul style="list-style-type: none"> • pAb anti-DCC.I • AF5 acoplat covalent a proteïna G.
<u>CÈL·LULES</u>	HT-29/DCC (clon 31)	-	<ul style="list-style-type: none"> • A • B • C 	<ul style="list-style-type: none"> • pAb anti-DCC.I
	HT-29/DCC (clon 31)	-	<ul style="list-style-type: none"> • RIPA 	<ul style="list-style-type: none"> • AF5 acoplat covalent a proteïna G.
	Neuro2 A	pCMV-DCC + pEGFP-Ezr-i	<ul style="list-style-type: none"> • S • V • RIPA 	<ul style="list-style-type: none"> • pAb anti-DCC.I + AF5
	Neuro2 A	pCMV-DCC + pEGFP-Nezr	<ul style="list-style-type: none"> • S • V • RIPA 	<ul style="list-style-type: none"> • pAb anti-DCC.I + AF5
	Neuro2 A	pCMV-DCC	<ul style="list-style-type: none"> • RIPA 	<ul style="list-style-type: none"> • AF5 acoplat covalent a proteïna G.
	COS 1	pCMV-DCC + pEGFP-Ezr-i	<ul style="list-style-type: none"> • S • V 	<ul style="list-style-type: none"> • pAb anti-DCC.I
	COS 1	pCMV-DCC + pEGFP-Nezr	<ul style="list-style-type: none"> • V 	<ul style="list-style-type: none"> • pAb anti-DCC.I + AF5
	COS 1	pCMV-DCC	<ul style="list-style-type: none"> • RIPA 	<ul style="list-style-type: none"> • AF5 acoplat covalent a proteïna G.

Taula II: Resum dels diferents teixits, sistemes cel·lulars i condicions experimentals utilitzats per posar en evidència l'associació *in vivo* DCC/ERM

Tampons A, B, C: 50 mM de Tris-HCl pH 7.6, 100 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, 1mM de CaCl₂, 1 mM d'EGTA, 10% de glicerol, 1 mM de DTT i (A): 0.25% de NP-40; (B): 1% de Tritó X-100; (C): 1% de Tritó X-100 + 1% SDS.

Tampó S: 20 mM de PIPES pH 6.8, 100 mM de NaCl, 300 mM de sucrosa, 3 mM de MgCl₂, 1 mM de MgSO₄, 1 mM d'EGTA i 0.25% de Tritó X-100.

Tampó V: 50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1% de Tritó X-100 i 2mM d'EGTA.

RIPA: 10 mM de Tris-HCl pH 7.4, 150 mM de Na Cl, 0.1% de SDS, 0.5% de Na-deoxicolat i 1% de NP-40.

Tots els tampons han estat suplementats amb inhibidors de proteases i fosfatases: 1 mM de Pefabloc, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de pepstatina, 1 mM de NaF i 200 nM de Na₃VO₄.

La construcció pEGFP-Ezr-i correspon a l'Ezrina sencera, clonada en el vector d'expressió pEGFP constitutivament activa. pEGFP-Nezr correspon al domini N-terminal de l'Ezrina (310 aminoàcids), clonat en el vector d'expressió pEGFP.

L'anticòs anti-DCC.I utilitzat, ha estat en tots els casos, purificat per afinitat. L'AF5 és un anticòs monoclonal contra el domini extracel·lular del DCC (veure secció 7.1.2 dels Materials i Mètodes).

En els assajos d'interacció *in vitro*, havíem demostrat la unió específica del DCC al domini N-terminal de l'ezrina i al domini N-terminal del NF-2. Aquesta dada suggeria que el DCC no només és capaç d'interaccionar amb l'ezrina sino que també pot tenir capacitat d'unió a altres molècules ERM com la moesina i la radixina, les quals estan implicades en l'elongació dels axons i la migració dels cons de creixement de neurones en cultiu (Paglini et al., 1998). D'acord amb la nostra hipòtesi, aquests resultats demostraven la implicació de les ERM's en processos de migració axonal depenents del DCC (Keino-Masu et al., 1996; Fazeli et al., 1997; Serafini et al., 1996). El conjunt d'aquestes dades proposaven el sistema nerviós com a un bon candidat a sistema fisiològic on estudiar la interacció *in vivo* del DCC amb les proteïnes de la família ERM. Per aquest motiu, vem realitzar experiments de co-immunoprecipitació utilitzant extrems de cerebel a estadi postnatal 7 (P7) i de cervell anterior a estadi embrionari 16 (E16), el creixement axonal dels quals, en cultiu, presenta una resposta repel·lent i atractant, respectivament, front a la netrina-1 (Alcántara et al., 2000). També s'han utilitzat extrems de cervell de ratolins *wild type* o mutants pel gen de la netrina-1, a estadi P0.

En aquestes condicions experimentals tampoc es va poder posar en evidència, l'associació DCC/ERM *in vivo*. Les raons poden ser diverses i es discutiran en el següent capítol. Una de les causes podria ésser que probablement els components del complexe DCC/ERM es troben en baixa proporció respecte a la proteïna total. Amb la finalitat de superar aquesta limitació, vem transfectar de forma transitòria les construccions pCMV-DCC i/o pEGFP-Ezr-i ó pEGFP-Nezr en dos models cel·lulars distints: les cèl·lules

COS 1 per presentar una elevada eficiència de transfecció, i les cèl·lules derivades de neuroblastoma Neuro-2A, per tenir un *background* neuronal tot i sent cèl·lules transformades.

Les diferents condicions experimentals utilitzades per posar de manifest la interacció DCC/ezrina en aquests sistemes es troba resumida en la taula II. De totes les proves realitzades, només en l'experiment descrit a continuació vem detectar la interacció *in vivo* del DCC amb l'ezrina.

Extrets protèics en tampó RIPA de cèl·lules COS 1 transientment transfectades amb el pCMV-DCC, es van incubar amb l'anticòs monoclonal anti-domini extracel·lular del DCC AF5 així com amb un anticòs irrelevant a mode de control negatiu, ambdós acoplats covalentment a la proteïna G sefarosa. La presència d'ezrina en les fraccions immunoprecipitades es va analitzar per Western blot. La figura 30 mostra que el DCC co-immunoprecipita específicament amb l'ezrina endògena de les cèl·lules COS 1 demostrant la interacció *in vivo* d'aquestes dues proteïnes. No obstant, la quantitat d'ezrina associada amb el DCC és molt baixa respecte a l'ezrina total.

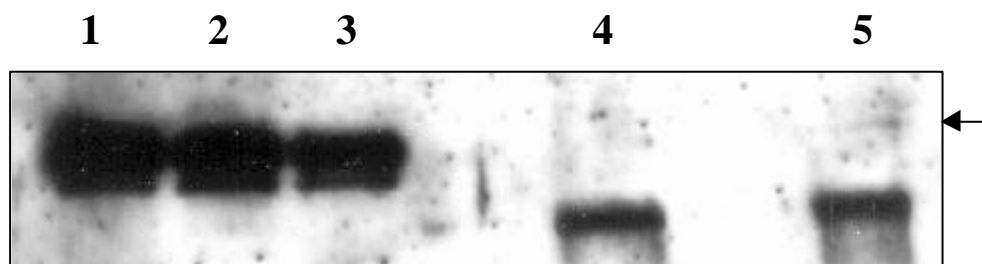


Figura 30: Anàlisi de la interacció *in vivo* entre el DCC i l'ezrina

Experiment de co-immunoprecipitació en cèl·lules COS 1 transfectades amb el pCMV-DCC: Anàlisi per Western Blot de la presència d'ezrina en: (1) Extret total de proteïnes. (2) i (3): Fraccions no immunoprecipitades. (4) i (5): Fraccions immunoprecipitades. (2) i (4): Immunoprecipitació utilitzant l'anticòs contra el factor de transcripció E2A, a mode de control negatiu. (3) i (5): Immunoprecipitació utilitzant l'anticòs contra el domini extracel·lular del DCC, AF5. Els anticossos han estat prèviament acoplats covalentment a la proteïna G sefarosa.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

La inactivació funcional dels gens DCC i Smad4 té lloc per mecanismes independents en tumors de còlon i en línies cel·lulars derivades de càncer de còlon i de pàncrees

Knudson, al descriure l'existència d'un gen responsable per a l'aparició dels retinoblastomes, proposà en 1971 que una mutació en la línia germinal d'un al·lel predisposa al càncer. Aquesta hipòtesi, continua essent vàlida per a molts dels gens supressors tumorals (revisat per Haber and Harlow, 1997). Les pèrdues d'heterozigositat (LOH) en regions cromosòmiques concretes correlacionen amb càncers humans específics i s'han utilitzat per posar de manifest la presència de gens supressors de tumor en les zones afectades. Les pèrdues heterozigòtiques del cromosoma 18q són freqüents en càncers gastrointestinals (revisat per Cho and Fearon, 1995). En els càncers de còlon i pàncrees, les regions delecionades inclouen les zones on es localitzen els gens DCC, Smad2 i Smad4. Smad2 només s'ha trobat alterat en una baixa proporció de càncers de còlon (Eppert et al., 1996) i fins a la data en cap càncer de pàncrees (Villanueva et al., 1998). En canvi, DCC i Smad4 s'han trobat alterats en una elevada proporció de càncers diferents on la seva manca o reducció de l'expressió ha estat relacionada amb les darreres etapes del procés tumoral (revisat a Kinzler and Vogelstein, 1996; Reyes-Mujica et al., 1997; Miyaki et al., 1999; Saegusa et al., 1999). No obstant, altres autors han proposat que la pèrdua del 18q és un esdeveniment primerenc en la tumorigènesi pancreàtica (Fukushige et al., 1998). El gen DCC presenta la incidència d'alteració gènica més elevada en les neoplàsies colorectals, mentres que són els càncers pancreàtics els que presenten més incidència d'alteracions en Smad4 (Fearon et al., 1990; Hahn et al., 1996; Thiagalingam et al., 1996). Ratolins deficients en el gen Smad4, alhora que mutants per APC, han demostrat el paper de Smad4 com a supressor en la progressió tumoral colorectal (Takaku et al., 1998). Fins a la data i seguint una estratègia semblant, el paper del DCC en la progressió

neoplàsica no ha pogut ésser provat (Fazeli et al., 1997). No obstant, evidències a favor d'una funció supressora de tumor han estat obtingudes en altres experiments, on la restauració de la seva expressió revertia el fenotip tumorigènic de cèl·lules en cultiu (Narayanan et al., 1992; Klingelutz et al., 1995). La controvèrsia generada per aquestes dades ha plantejat la possible existència d'altres gens, encara per identificar, en aquesta regió cromosòmica que podrien ser els reponsables dels processos neoplàsics atribuïts a DCC.

Nosaltres ens vem interessar en l'estudi de la possible implicació i els mecanismes d'alteració d'ambdós gens en els processos tumorals de còlon i pàncrees. Per aquest motiu vàrem examinar per RT-PCR, l'expressió de DCC i Smad4 en 10 mostres de tumor colorectal, en el teixit normal corresponent de cadascun dels pacients i en un panell de línies derivades de càncer de còlon i de pàncrees. Aquest estudi demostrà, com ja s'havia observat pel DCC (Fearon et al., 1990; Hedrick et al., 1994; Reale et al., 1994), que en tots els tumors colorectals i en la majoria de les línies derivades de carcinomes de còlon es detecten els trànscrips d'ambdós gens, però els nivells d'expressió són menors respecte els del teixit normal. Només una de les línies cel·lulars presenta una manca complerta d'expressió del DCC, mentre que conserva l'expressió de Smad4. En un mateix tumor ó en una mateixa línia els nivells d'expressió de DCC són independents dels de Smad4 i vice versa.

Entre les línies derivades de càncer de pàncrees la manca d'expressió d'aquests gens és més freqüent. Així, en el 43% de les línies estudiades no es detecta expressió del DCC i en d'altres (25%) només s'observa expressió del domini intracel·lular, suggerint l'existència d'una deleció que comprèn, almenys, la regió extracel·lular detectada pel parell d'encebadors EX1/EX2. De forma independent a la pèrdua d'expressió del DCC, un 31% de les línies presenten pèrdua d'expressió del Smad4.

Aquestes dades suggereixen que les alteracions en ambdós gens en tots dos tipus de càncer són esdeveniments independents. Aquests resultats, que s'han confirmat tant a nivell de tumors de còlon com en les línies

cel·lulars derivades de còlon i de pàncrees estan d'acord amb els obtinguts en l'estudi de xenoempeles d'aquests tipus de tumors en ratolí (Tarafa et al., 2000; Hilgers et al., 2000).

- **Possibles mecanismes d'alteració gènica**

Respecte als mecanismes d'alteració del DCC, les dades obtingudes per RT-PCR suggereixen la pèrdua d'un dels al·lells, mentre que l'altre al·lel es conserva en la majoria dels casos. Els mecanismes d'alteració d'aquest l'al·lel remanent queden per elucidar. No obstant, la freqüència de pèrdues d'heterozigositat, mitjançant l'anàlisi per microsatèl·lits, és menor de l'esperada (Barberá et al., 2000). Altres autors han proposat que la inactivació del DCC en càncer colorectal té lloc per mecanismes diferents a la LOH (Carethers et al., 1998; Thiagalingam et al., 1996).

En algunes línies de pàncrees, la manca completa d'expressió del gen podria suggerir un mecanisme d'inactivació per pèrdua homozigòtica. No obstant, estudis realitzats en el nostre laboratori (Barberá et al., 2000), utilitzant marcadors de microsatèl·lits, no han detectat pèrdues homozigòtiques en la regió cromosòmica flanquejant al gen DCC. De tota manera, donat que els marcadors analitzats són exogènics, la detecció d'aquests no assegura la presència del gen. Tant en les línies derivades de càncer de còlon com en les de pàncrees, s'ha observat una discrepància entre els nivells de mRNAs detectats corresponents a seqüències dels dominis extracel·lular i intracel·lular del DCC. Aquesta discrepància ha estat també descrita en altres treballs (Thiagalingam et al., 1996). Aquests casos podrien ser la conseqüència de delecions intragèniques que podrien no donar producte proteic o bé proteïnes truncades, inestables o carents de certs dominis de manera que no serien proteïnes funcionals. Donat que els nivells de proteïna DCC són en general molt baixos, aquesta hipòtesi no ha pogut ésser verificada per Western blot.

Degut a la grandària del gen DCC (29 exons que s'extenen sobre 1.4 megabases) s'han realitzat pocs treballs a la recerca de mutacions i anàlisis delecionals detallats en aquest gen. No obstant, s'han descrit algunes insercions i algunes mutacions puntuals de les que es desconeix la importància fisiològica o funcional en la proteïna (Fearon et al., 1990; Cho et al., 1994; Cho and Fearon, 1995), alhora que s'ha descrit una mutació en el codó 201 (Arg/Gly) la qual es postula que pot tenir un paper en el pas d'adenoma a carcinoma, estant associada a un pitjor pronòstic (Honsako et al., 1994).

En 1994, Reale i col·laboradors descrigueren dos llocs de processament alternatiu en el mRNA del DCC de ratolí: un d'ells en la seqüència codificant pel domini extracel·lular de la proteïna i l'altre en la seqüència corresponent al domini intracel·lular. En aquest últim, aquest processament del mRNA alternatiu implica la pèrdua d'un lloc putatiu de fosforilació per la caseïna kinasa II. No obstant, es desconeix si aquesta pot estar implicada en la regulació de la funció del DCC. Per analitzar si aquestes formes de processament alternatiu del mRNA del DCC també tenen lloc en humans, els encebadors que hem utilitzat pel nostre estudi d'expressió per RT-PCR, han estat dissenyats per poder discriminar entre aquests diferents processaments del mRNA del DCC. Els nostres resultats han revelat que en humans també existeixen aquestes diferents formes de processament alternatiu del mRNA, tant a nivell de domini extra com intracel·lular, i que no estan associades ni al fenotip de les línies cel·lulars, ni al tipus ni al estadi del tumor.

A l'igual que pel DCC, en general es conserva al menys un al·lel de Smad 4, el mecanisme d'inactivació del qual també resta per elucidar, en totes les mostres de tumor colorectal i en la majoria de les línies derivades de càncer de còlon analitzades. Per altra banda, l'estudi de la presència del gen Smad4 per PCR sobre DNA genòmic revelà la pèrdua homozigòtica del gen Smad4 en 5 de les 16 línies derivades de càncer de pàncrees estudiades (Barberá et al., 2000). No obstant, aquesta pèrdua no s'havia detectat utilitzant marcadors de microsatèl·lits (Barberá et al., 2000), qüestionant la

fiabilitat dels resultats obtinguts en anàlisis basats exclusivament en marcadors de microsatèl·lits exogènics. Aquest estudi també ha demostrat l'existència d'altres mecanismes d'inactivació del gen Smad4: dos casos de mutació puntual no conservadora als exons 8 i 9 respectivament i una inserció de 117 pb entre els exons 10 i 11 que dóna lloc a un producte d'amplificació d'un tamany major. No obstant, en aquests tres casos es detecta un producte proteïc de pes molecular aparentment normal per Western blot i, en canvi, en altres dos línies on el producte d'amplificació per RT-PCR és del tamany esperat, no es detecta proteïna. En aquests casos podria haver mutacions en altres exons no examinats com per exemple les mutacions en els exons 2 i 4 descrites per Schutte i col (1996) les quals donen lloc a proteïnes inestables. Una altra possibilitat seria que el producte proteïc d'aquestes dues línies fossin proteïnes truncades o variants conformacionals que no són detectades per l'anticòs utilitzat.

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

La capacitat supressora de tumor del DCC havia estat demostrada en keratinòcits humans immortalitzats, on la restauració de l'expressió d'aquest gen inhibia la progressió dels tumors desenvolupats en ratolins *nude* (Klingelutz et al., 1995). Per altra banda, en fibroblasts de rata, el mRNA antisentit del DCC promovia el creixement tumoral (Narayanan et al., 1992). Al mateix temps, el paper de supressor tumoral del DCC ha estat qüestionat en el model murí, on els ratolins deficients per aquest gen, així com els heterozigots (+/-), no presentaven major predisposició a generar tumors respecte als ratolins normals (+/+). Tampoc augmentà la predisposició a desenvolupar tumors dels ratolins Min a l'introduir-los l'al·lel nul per DCC (Fazeli et al., 1997).

Els nostres experiments, portats a terme en cèl·lules HT-29 transfectades amb el cDNA complert del DCC, confirmen els resultats publicats per Klingelutz i col. (1995), tant *in vivo* com *in vitro*: l'expressió del DCC

redueix el creixement tumoral en ratolins *nude* però la taxa de proliferació de les cèl·lules en cultiu no varia, suggerint que el DCC pot exercir un paper com a supressor del creixement tumoral mitjançant un mecanisme que no afecta directament a la proliferació de les cèl·lules.

Chuong i col. (1994) ja havien suggerit que el DCC exercia un paper en adhesió cel·lular mitjançant una interacció heterotípica independent de Ca^{2+} . Aquests treballs eren els primers a proposar que el DCC podia actuar com un receptor que s'associava a un lligand presentat per la cèl·lula veïna. Més recentment, DCC ha estat descrit com a receptor de la netrina-1, molècula relacionada amb la laminina (Keino-Masu et al., 1996), component de la matriu extracel·lular. Per tant, la manca d'un lligand putatiu del DCC, absent en les cèl·lules en cultiu i present en l'entorn *in vivo* del ratolí, podria ser el responsable dels efectes observats del DCC sobre la proliferació *in vitro* i el creixement tumoral *in vivo*.

Resultats recents de Velcich i col. (1999) indiquen que nivells alts d'expressió del DCC en cèl·lules HT-29 redueixen també la taxa de proliferació *in vitro*. A més, aquest treball ha demostrat un modest, però estadísticament significatiu, increment de l'apoptosi en les cèl·lules HT-29/DCC, suggerint que aquest efecte és el responsable de la reducció de la taxa proliferativa observada. L'acció pro-apoptòtica del DCC s'ha detectat únicament en cèl·lules, on els nivells d'aquesta proteïna són alts (només el clon HT-29/DCC on es detecten els nivells més alts de DCC per Western blot presenta un increment en l'apoptosi estadísticament significatiu alhora que modest). És possible, però, que l'apoptosi induïda per DCC en les cèl·lules HT-29 sigui el resultat de la sobreexpressió no fisiològica del gen en aquestes cèl·lules. Recentment s'ha proposat que el DCC pot induir l'apoptosi en cèl·lules de ronyó embrionari humà 293T i que la netrina-1 inhibeix aquest efecte (Mehlen et al., 1998). No obstant, aquestes observacions han estat objecte de controvèrsia en altres estudis (Chen et al., 1999).

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

Treballs previs a l'inici d'aquesta tesi havien descrit l'expressió exclusiva del DCC en les zones proliferatives de l'epiteli intestinal adult de pollastre (Chuong et al., 1994) o en les cèl·lules mucosecretors de l'epiteli colònic humà (Hedrick et al., 1994), suggerint que aquesta proteïna tenia un paper en la diferenciació cel·lular intestinal cap al fenotip mucosecretor de l'epiteli intestinal. Els nostres estudis immunohistoquímics de la localització de la proteïna DCC en l'epiteli colònic normal no han confirmat aquests resultats, doncs el DCC es detectà tant en cèl·lules mucosecretors com en cèl·lules absortives i en cèl·lules no diferenciades. En el treball de Chuong i col. (1994) varen utilitzar un anticòs dirigit contra un pèptid localitzat en el domini extracel·lular, mentres que el nostre anticòs està dirigit contra el domini intracel·lular de la proteïna. En canvi, i d'acord amb els nostres resultats, els treballs de Shibata i col. (1996) i de Goi i col. (1998), detecten expressió del DCC tant en la cripta com en l'epiteli de superfície del còlon normal, indistintament del fenotip cel·lular, utilitzant anticossos contra el domini citoplasmàtic i un anticòs contra la proteïna DCC sencera, respectivament.

D'acord amb els nostres resultats d'immunohistoquímica en teixit de còlon normal, no s'establí cap correlació entre l'expressió del DCC, analitzada per RT-PCR, i el fenotip de les línies derivades de càncer de còlon estudiades. Les diferents formes de processament alternatiu detectades en les línies cel·lulars humanes, també s'han revelat independents del fenotip de les línies. No obstant, treballs previs havien associat la forma que correspon al fragment de 281 pb amplificat amb els encebadors EX1/EX2 a una forma embrionària en el desenvolupament del ratolí (Cooper et al., 1995). Per últim, el patró d'expressió del DCC tampoc correlaciona amb el patró d'expressió dels gens de mucines.

Per a aprofundir en l'estudi del paper del DCC en la diferenciació intestinal vàrem escollir les cèl·lules HT-29 pel fenotip indiferenciat que expressen i

per contenir subpoblacions cel·lulars amb capacitat de diferenciar-se cap a un fenotip mucosecretor o parcialment absortiu (Lesuffleur et al., 1990; Dahiya et al., 1992; Lessuffleur et al., 1993). En aquest model cel·lular, el DCC no indueix l'expressió de marcadors específics de diferenciació mucosecretora o absortiva. D'acord amb els nostres resultats, Velcich i col. (1999) tampoc observen l'activació del programa de diferenciació en cèl·lules HT-29 com a conseqüència de l'expressió del DCC.

El conjunt de les nostres dades indica que el DCC no està directament implicat o no és suficient per a la diferenciació intestinal.

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

Els nostres resultats demostren, d'acord amb observacions en altres models cel·lulars (Chuong et al., 1994), que el DCC regula l'adhesió cèl·lula-cèl·lula així com l'adhesió cèl·lula-matriu per mecanismes independents de Ca^{2+} . Referent a l'adhesió cèl·lula-cèl·lula hem confirmat que els transfectants HT-29/DCC contenen quasi el doble de desmosomes que els transfectants HT-29 control i que aquests presenten una major complexitat estructural en les cèl·lules que expressen DCC. Per altra banda, l'expressió del DCC redueix l'efecte "scattering" induït pel TPA suggerint que el DCC no només incrementa l'adhesió intercel·lular, sino que també disminueix la capacitat de migració d'aquestes cèl·lules. Els experiments fets en *transwells* confirmen aquesta hipòtesi. Els assajos d'agregats cel·lulars en gels tridimensionals (3D) de col·lagen de tipus I han estat de gran importància al revelar que el DCC afecta a la migració cel·lular mitjançant la inhibició de la individualització de les cèl·lules. D'acord amb aquests resultats obtinguts *in vitro*, les dades *in vivo* de l'estudi de disseminació en ratolins *nude*, suggereixen que efectivament DCC pot actuar com a supressor de tumor mitjançant un paper antidissemiatiu.

En quant a l'adhesió cel·lular a la matriu, el DCC indueix una disminució de la capacitat d'adhesió a diferents tipus de substrat incloent el plàstic i diferents components de la matriu extracel·lular. Aquests efectes s'associen a la redistribució de les subunitats d'integrines $\alpha 6$ i $\beta 4$, i la desmoplakina, principals components dels HDII, així com de la talina i la vinculina, components de les adhesions focals. No obstant, no tots els components de les adhesions focals tenen afectada la seva localització. És el cas de les subunitats d'integrines $\alpha 2$, $\alpha 3$ i $\beta 1$, la FAK o la paxilina.

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

Les cèl·lules mesenquimals C9 i C20 no afecten a la diferenciació, la proliferació, la migració i la capacitat tumorigènica de les cèl·lules HT-29 a través de mecanismes depenents de l'expressió del DCC. No obstant, les diferències entre la capacitat d'adhesió de les HT-29/DCC respecte a la de les HT-29 control s'incrementen si les cèl·lules són sembrades sobre una capa de fibroblasts o de cèl·lules C9 ó C20, però disminueixen en presència dels medis condicionats d'aquestes cèl·lules mesenquimals.

Segons aquests resultats podríem especular que la interacció del DCC amb un lligand sintetitzat per aquestes cèl·lules mesenquimals inicia un mecanisme d'acció que provoca la desadhesió cel·lular de la matriu. El fet que el medi condicionat de les cèl·lules C9 i C20 redueixi les diferències sobre la capacitat d'adhesió a la matriu entre els transfectants HT-29 control i DCC es podria explicar per l'existència d'un lligand del DCC en forma soluble, només secretat pels clons C9 i C20, capaç de competir amb la forma lligada a la membrana per la unió al DCC, però no d'iniciar el mecanisme d'acció que provoca la desadhesió cel·lular a la matriu (Fig. 1).

L'homologia de la Netrina-1 amb la cadena $\beta 1$ de la laminina i donat que aquesta cadena pot estar sintetitzada tant per les cèl·lules mesenquimals

com per les cèl·lules epitelials (Simon-Assmann et al., 1998), suggereix que la laminina podria ésser un candidat a lligand del DCC en aquest sistema.

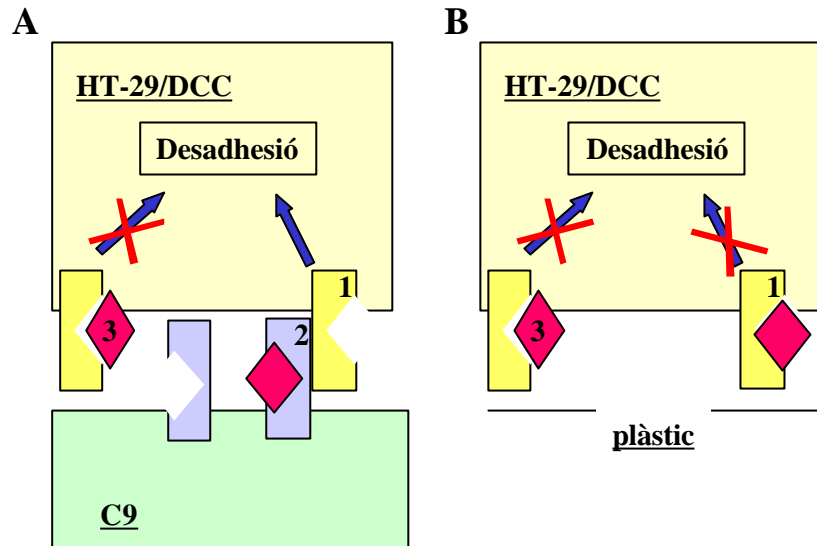


Figura 1: Esquema de l'hipotètic mecanisme responsable dels efectes sobre l'adhesió de les HT-29 observats en co-cultiu (A) o en presència del medi condicionat de les cèl·lules C9 o C20 (B). (1: DCC; 2: lligand hipotètic del DCC lligat a la membrana; 3: forma soluble del lligand hipotètic del DCC).

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

La disrupció de les fibres d'estrès induïda pel DCC així com els experiments d'extracció seqüencial de proteïnes, suggerien una interacció del DCC amb el citosquelet d'actina. En els 30 primers residus intracel·lulars (1121-1151) juxtamembrana del DCC, hem identificat una seqüència consensu semblant a la que presenten les proteïnes que interaccionen amb els membres de la família ERM ("Ezrin Radixin Moesin") (Yonemura et al., 1998; Legg and Isacke, 1998). Aquests han estat identificats com a molècules que connecten proteïnes de la membrana amb el citosquelet d'actina, de manera que interactuen amb aquesta última pel domini C-terminal i amb les proteïnes de membrana pel domini N-terminal (revisat per Mangeat et al., 1999). Els nivells de les proteïnes ERM analitzades en els nostres transfectants no

varien entre les HT-29/DCC i control. En canvi, la distribució de l'ezrina en les HT-29 es troba alterada per la presència del DCC, localitzant-se en el compartiment basolateral de la membrana amb un patró similar al del DCC, i en cèl·lules COS 1 co-transfectades amb els cDNA's complets de totes dues proteïnes, existeixen zones de col·localització. *In vitro*, el DCC interacciona específicament amb el domini N-terminal de l'ezrina i del NF-2, molt probablement a través d'aquest consensu identificat en la regió jxtamembrana que nosaltres hem anomenat domini EBD ("ERM binding domain").

Amb la finalitat de demostrar l'associació DCC/ezrina *in vivo*, hem realitzat experiments de co-immunoprecipitació. Malgrat la diversitat de condicions experimentals provades (veure taula II del capítol dels resultats), només hem detectat una interacció del DCC amb l'ezrina endògena en les cèl·lules COS 1 transfectades amb el pCMV-DCC. Com s'ha discutit en la literatura, la dificultat de posar en evidència la interacció entre proteïnes de membrana amb les ERM és deguda, al menys en part, a l'associació amb el citosquelet creant-se un complex tripartit entre la proteïna de membrana, les ERM i el citosquelet d'actina, que només sota determinades condicions d'extracció protèica pot ésser posat de manifest (Crepaldi et al., 1997; Yonemura et al., 1998; revisat per Mangeat et al., 1999). Així, quan s'utilitzen detergents suaus, les interaccions es mantenen però els complexos no es poden posar en evidència degut a la seva insolubilitat donada per la seva associació amb el citosquelet. Contràriament, quan s'utilitzen detergents més agressius que permeten solubilitzar les proteïnes associades al citosquelet, probablement també es produeix la dissociació de les interaccions entre les proteïnes de membrana i les ERMs. Es, doncs, difícil de trobar unes condicions que permetin la dissociació del citosquelet tot conservant la interacció entre les ERM i les proteïnes de membrana a les que s'uneixen. D'acord amb aquesta hipòtesi, la proporció d'ezrina que hem detectat associada al DCC és molt baixa. Troballes similars han estat descrites per altres autors: així, Granés i col. (2000) han demostrat que només el 0.02% de l'ezrina total de les cèl·lules COS 1 es detecta associada al Sindecà-2, proteoglicà de

membrana probablement implicat en la transducció de senyal des de la matriu extracel·lular (revisat per Zimmerman and David, 1999).

DCC està actualment considerat com a un component d'un receptor multiprotèic de netrina-1. Per tant, la seva interacció amb les ERM pot estar regulada per altres proteïnes, entre les quals UNC-5 podria jugar un paper important donat que s'uneix al DCC en un domini immediatament adjacent al domini EBD. Com s'ha mencionat anteriorment, s'ha proposat que la unió dels dominis citoplasmàtics d'UNC-5 i DCC és responsable del canvi de comportament, d'atracció versus repulsió, front a la netrina-1 (Bashaw et al., 1999; Hong et al., 1999; revisat per Seeger and Beattie, 1999). La resposta atractant o repel·lent front a la netrina-1 que presenten, respectivament, els explants de cerebel (P7) o de cervell anterior (E16) en cultiu (Alcántara et al., 2000), indica que aquest pot ser un bon sistema fisiològic per estudiar si UNC-5 regula d'alguna manera l'associació DCC/ERM. No obstant, la interacció d'aquestes dues proteïnes no s'ha pogut posar de manifest a partir dels extrems protèics d'aquests teixits. Una possible raó és la baixa proporció de DCC i ERM relatius al total de proteïna d'aquests extrems protèics. S'ha demostrat que els cons de creixement dels axons en desenvolupament presenten un enriquiment en radixina i moesina respecte als homogenats totals de cervell fetal de ratolí (Paglini et al., 1998). Una estratègia a seguir podria ser utilitzar extrems protèics de cons de creixement aïllats per fer les co-immunoprecipitacions, determinant alhora si DCC interacciona també amb la radixina i/o la moesina.

Una altra molècula que podria estar regulant l'associació DCC/ERM podria ser la netrina-1, actuant des del domini extracel·lular del DCC. No obstant, no hem pogut detectar el complexe DCC/netrina ni en cèl·lules ni en teixits tractats amb netrina-1.

Durant els experiments de transfecció transitòria, les cèl·lules COS 1 presenten una elevada eficiència de transfecció alhora que permeten nivells alts d'expressió de les proteïnes ectòpiques. Les cèl·lules Neuro-2A no presenten una eficiència de transfecció comparable a la de les cèl·lules

COS1. Per altra banda els transfectants HT-29/DCC pel fet de ser estables, malgrat que detectables per Western blot i capaços d'influir en el fenotip d'aquestes cèl·lules, tampoc presenten uns nivells d'expressió tan elevats com les COS 1 transientment transfectades. Tenint en compte aquests paràmetres, no és difícil de comprendre de que si en les COS 1, on les condicions de transfecció i expressió ectòpica són les més favorables, es detecta una proporció molt baixa d'ezrina associada al DCC, no poguem observar aquesta unió en altres tipus cel·lulars on les condicions de transfecció i/o expressió ectòpica de proteïnes són pitjors.

La regulació de l'adhesió i migració cel·lular pel DCC, el consensus d'unió a proteïnes ERM en la regió juxtamembrana del seu domini intracel·lular, i els experiments d'associació *in vitro* suggereixen, malgrat els experiments *in vivo* no siguin concluent, que al menys un mecanisme d'acció del DCC podria funcionar a través de la seva interacció amb les proteïnes de la família ERM. Per altra banda, i d'acord amb les nostres dades, Hiscox i col. (1999) han demostrat que la inhibició de l'expressió de l'ezrina utilitzant oligonucleòtids antisens, en les línies derivades de càncer colorectal HT115 i HRT18, indueix una disminució de l'adhesió cèl·lula-cèl·lula a la vegada que un augment de l'adhesió cèl·lula-matriu així com de la capacitat de migració i invasivitat. No obstant, el mecanisme que ells proposen, vindria mediat per la interacció de l'ezrina amb molècules de les unions adherents, com és el cas de l'E-cadherina i/o la β -catenina. De tota manera, aquest mecanisme només seria vàlid per les HRT18, ja que les HT115, malgrat tenen una resposta similar front a la pèrdua d'ezrina, no expressen E-cadherina indicant que en aquesta línia cel·lular, l'ezrina ha d'actuar via altres molècules que també afecten a les unions intercel·lulars existents en la cèl·lula, així com a les estructures d'adhesió a la matriu.

Els nostres resultats, suggereixen que, en última instància, l'ezrina participaria en l'efecte de supressor tumoral del DCC reduïnt la capacitat de migració i la invasivitat. Altres treballs han proposat proteïnes de la família ERM com a molècules implicades en la supressió de neoplàsies i alguns

membres d'aquesta família han estat descrits com a supressors tumorals. NF-2 ("Neurofibromatosis factor-2") en fou el primer exemple (Rouleau et al., 1993; Trofatter et al., 1993). La inactivació d'aquest gen dóna lloc a una malaltia hereditària associada a schwanomes, meningiomes i ependimomes (Thomas et al., 1994). Recentment s'ha demostrat que la sobreexpressió del NF-2 en línies cel·lulars derivades de schwanoma afecta a la organització del citosquelet d'actina alhora que indueix una disminució de la proliferació cel·lular, de la mobilitat i de la capacitat d'adhesió a la matriu, suggerint que el seu paper de supressor tumoral ve mediat pel seu efecte sobre el citosquelet d'actina (Gutmann et al., 2000). Recentment, s'ha descrit un nou membre de la família ERM, anomenat DAL-1 ("Differentially expressed in adenocarcinoma of the lung"), com a supressor tumoral en càncer de pulmó (Tran et al., 1999) i en meningiomes esporàdics (Gutmann et al., 2000), alhora que s'ha demostrat una disminució de l'expressió de radixinina i moesina en adenocarcinomes pulmonars (Tokunou et al., 2000). Per altra banda s'ha proposat que l'ezrina està implicada en la transformació de fibroblasts 3T3 mediada pels oncogens Net i Dbl (Quang et al., 2000).

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

- **La unió DCC/Ezrina podria modificar l'acció de RhoGDI i/o PKA sobre RhoA**

Diversos treballs han suggerit un control de l'adhesió a la matriu i de la migració cel·lular per part de les ERM's en cèl·lules epitelials. Per una altra banda, s'ha demostrat que proteïnes ERM interaccionen directament amb proteïnes reguladores de les Rho GTPases que controlen la formació de les estructures d'adhesió cel·lular a la matriu. Així, les ERM s'associen a RhoGDI, inhibint la seva activitat repressora sobre els membres de la subfamília de Rho i facilitant la seva activació (Takahashi et al., 1997). A través de la seva associació amb les proteïnes ERM, el DCC podria inactivar la funció inhibidora d'aquestes sobre les Rho-GDI, permetent la

repressió de les Rho GTPases i regulant negativament la formació de les adhesions focals (Fig. 2).

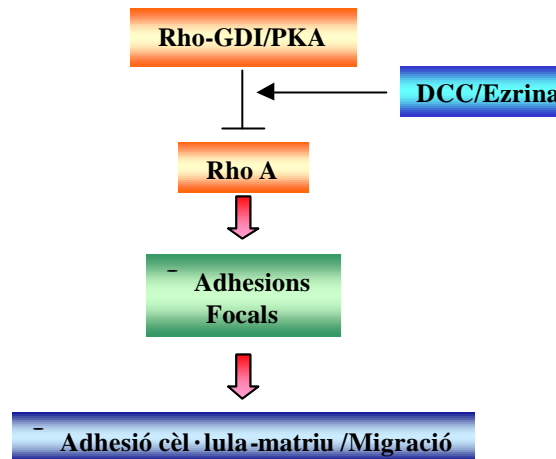


Figura 2: Model del mecanisme d'acció del DCC en les HT-29, via associació amb l'ezrina i a través de Rho-GDI o PKA

A l'igual que el procés de migració cel·lular, el creixement axonal implica la formació d'estructures de tipus filopodi i lamel·lipodi, les quals també estan regulades per les proteïnes Cdc42 i Rac respectivament (Kozma et al., 1997). Recentment s'ha demostrat els rols oposats de Rac i Rho de manera que mentre Cdc42 i Rac indueixen la formació de filopodis i lamel·lipodis en resposta a senyals d'atracció, Rho indueix la retracció d'aquestes estructures en resposta a senyals de repulsió (revisat per Mueller, 1999). Per altra banda, tant la radixina com la moesina estan implicades en l'estabilització dels cons de creixement i de les noves neurites en desenvolupament (Paglini et al., 1998).

D'acord amb aquestes dades, Pierceall i col. (1994a) havien demostrat que l'estimulació del creixement de neurites en les cèl·lules PC12 en cultiu, per part del DCC, era dependent d'una via de senyalització sensible a la toxina pertussis, la qual inhibeix la funció d'una gran varietat de proteïnes G petites (Sumi et Ui, 1975).

Les proteïnes ERM tenen un domini de reclutament de la PKA (“Proteïna kinasa cAMP dependent”) i se sap que una elevada concentració d’AMPc en el con de creixement axonal inactiva RhoA provocant una resposta d’atracció front a la netrina-1. En canvi, una concentració baixa d’AMPc activa aquesta mateixa Rho GTPasa donant lloc a una resposta repulsiva (revisat a Mueller, 1999). Donat que l’AMPc activa PKA, es probable que aquesta resposta via RhoA estigui mediada per aquesta kinasa. En aquest cas, l’associació PKA/ERM podria inhibir la repressió de RhoA mediada per AMPc. Mitjançant la capacitat d’unió a reguladors de les RhoGTPases, les ERM jugarien un paper important en el control d’aquestes proteïnes.

A partir d’aquestes dades, i assumint l’associació DCC/ezrina en el nostre model cel·lular, la disminució de l’adhesió cèl·lula-matriu induïda per l’expressió del DCC en les HT-29, podria tenir lloc segons una via que actuaria sobre RhoGDI i/o la PKA. Així, l’associació del DCC amb les ERM’s impediria que aquestes afavorissin la formació d’adhesions cel·lulars a la matriu, inhibint l’acció repressora de les RhoGDI i de PKA sobre la RhoGTPasa reguladora de la formació de les adhesions focals, RhoA (Fig. 2).

- **L’associació DCC/Ezrina podria regular negativament la polimerització dels filaments d’actina**

S’ha proposat que molècules riu aball de Cdc42 i Rac (PIP5K, p65^{PAK}, WASP) estan implicades en la regulació de la polimerització dels filaments d’actina (revisat per Hall, 1998). D’altra banda, dades recents suggereixen que les ERM regulen la nucleació i la polimerització de l’actina en fagosomes de macròfags (Defacque et al., 2000). D’acord amb aquestes dades, els nostres experiments han demostrat que el citosquelet d’actina està alterat en els transfectants que expressen DCC. No obstant, les HT-29/DCC presenten alteracions no només en les adhesions focals sino també en els HDII, els quals es troben associats als filaments intermediaris.

Malgrat que la majoria de treballs publicats en la literatura sobre l'entrecruament de la senyalització ("crosstalk") entre els diferents citosquelets de la cèl·lula (revisat per Kjølner and Hall, 1999) fan referència als citosquelets d'actina i de microtúbuls, treballs recents suggereixen també un "crosstalk" entre els citosquelets d'actina i el de filaments intermediaris. Així, s'ha suggerit que malgrat la connexió dels HDII als filaments intermediaris, la seva organització i agrupament ("clustering") en cèl·lules epitelials derivades de càncer intestinal, sembla ser dependent de filaments d'actina (Fontao et al., 1999). A més, se sap que la subunitat d'integrines $\beta 4$ i l'actina-F competeixen per la unió a la plectina, proteïna dels HDII (Geerts et al., 1999). Per altra banda s'ha demostrat que la integrina $\alpha 6\beta 4$ estimula la migració i la invasió de cèl·lules canceroses com a conseqüència de la seva interacció amb el citosquelet d'actina (Rabinovitz and Mercurio, 1997; Rabinovitz et al., 1999).

El conjunt d'aquestes dades suggereix que el DCC, a través de la seva interacció amb l'ezrina i conseqüentment per la via de les RhoGTPases, podria regular negativament la polimerització de l'actina, actuant així sobre l'estructura de les adhesions focals alhora que en l'estabilització dels HDII. La desestabilització d'aquests últims alliberaria components comuns als desmosomes donant lloc a la major quantitat i la major complexitat estructural d'aquests complexos d'adhesió intercel·lular observada en els transfectants HT-29/DCC (Fig. 3).

- **La possible associació DCC/Talina com a mecanisme d'acció paral·lel i/ó alternatiu al descrit via Ezrina**

Dintre dels components de les adhesions focals, la localització dels quals està afectada específicament per l'expressió del DCC, es troba la talina. El domini N-terminal d'aquesta proteïna presenta un 23% d'identitat amb el domini N-terminal de l'ezrina (Algrain et al., 1993), regió a la que el DCC s'associa *in vitro*. Per altra part s'ha demostrat que la talina té activitat promotora de la formació de filaments d'actina a partir de l'actina

monomèrica i que és essencial per a l'adhesió i la migració de fibroblasts sobre fibronectina (revisat per Hemmings et al., 1995). El conjunt d'aquestes dades suggereix una possible associació entre el DCC i el domini N-terminal de la talina, que tindria un efecte directe negatiu en l'estructura de les adhesions focals i en la polimerització de les fibres d'actina, actuant doncs també de forma indirecta sobre els HDII. La possible interacció DCC/talina no exclou l'associació DCC/ERM, de manera que, en les cèl·lules epitelials, DCC podria actuar via ezrina o talina indistintament (Fig. 3).

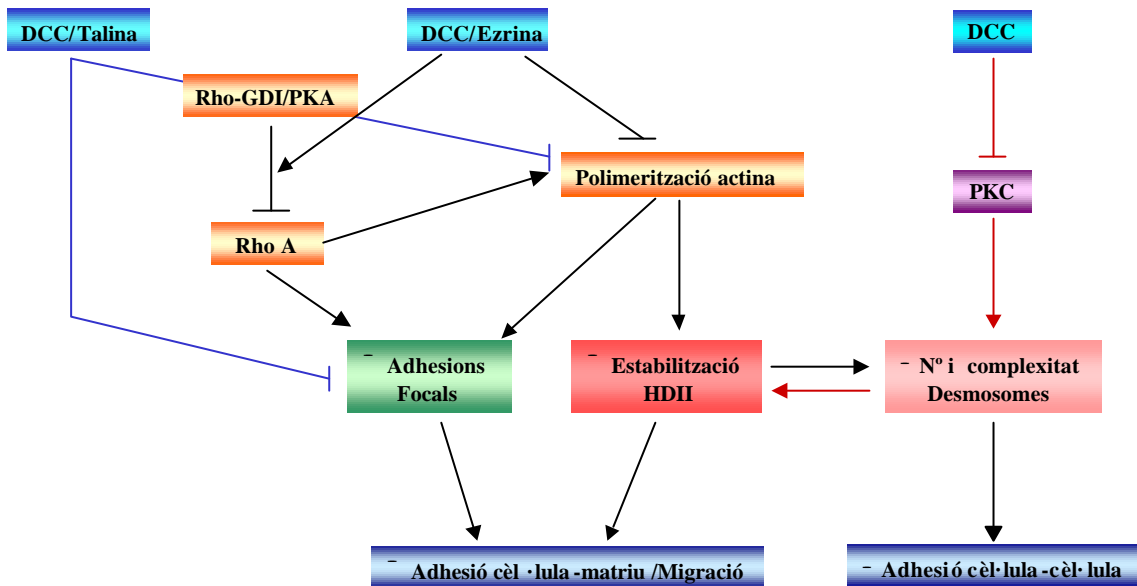


Figura 3: Mecanismes d'acció del DCC proposats, via la seva interacció amb l'ezrina i/o talina

El DCC podria inhibir els efectes de la PKC actuant directament sobre l'assemblatge dels desmosomes

Segons el model que hem proposat, la disrupció dels HDII, conseqüència de l'efecte del DCC sobre la polimerització d'actina, allibera components comuns als desmosomes permetent la formació d'un major nombre d'aquests i de major complexitat estructural.

Per una altra banda, experiments en keratinòcits utilitzant inhibidors específics de la PKC, o activant-la utilitzant TPA, han suggerit que per l'assemblatge dels desmosomes és necessària la inhibició d'aquesta kinasa, mentres que la seva activació indueix el desassemblatge (Amar et al., 1998). Aquest treball suggereix una altra possibilitat en quant als mecanismes de senyalització del DCC, proposant que aquest podria inhibir els efectes de la PKC, actuant així directament sobre els desmosomes. D'acord amb aquestes dades, hem demostrat que el DCC inhibeix el "scattering" induït pel TPA en les cèl·lules HT-29 i es coneix un domini d'unió de la PKC en els membres de la família de les ERM. Resultats recents han demostrat que la plakofilina 1, membre de la família armadillo, facilita el reclutament de les proteïnes desmosomals en la membrana plasmàtica dels keratinòcits i també juga un paper en la regulació del citosquelet d'actina (Hatzfeld et al., 2000). A partir d'aquesta molècula, o de components comuns entre desmosomes i unions adherents com és el cas de la plakoglobina, l'efecte del DCC sobre els desmosomes podria repercutir en el citosquelet d'actina i l'adhesió a la matriu, donant lloc als efectes que hem observat en els nostres transfectants. Tanmateix, no podem descartar que el DCC actui sobre el citosquelet d'actina, inhibint l'acció repressora de les ERM sobre RhoGDI ó PKA, alhora que sobre els desmosomes inhibint la PKC, per un mecanisme encara per elucidar (Fig. 3).

DCC: Partner d'ezrina i supressor tumoral

Segons la nostra hipòtesi, a través de la seva interacció amb l'ezrina, el DCC reduiria la individualització cel·lular afectant d'aquesta manera a la capacitat de migració i de disseminació d'aquestes cèl·lules, esdevenint així un agent antidissemiatiu. Aquest model que proposem està d'acord amb el paper com a supressor tumoral implicat sobretot en les últimes etapes del procés neoplàsic que se li ha atorgat al DCC repetidament en la literatura (revisat per Kinzler and Vogelstein, 1996), així com la seva implicació en adhesió cel·lular (Chuong et al., 1994) i potser fins i tot, malgrat que de forma indirecte, en diferenciació (Hedrick et al., 1994) si tenim en compte que en l'epiteli intestinal la diferenciació cel·lular és un procés íntimament lligat a la migració des de la base de les criptes cap a l'epiteli de superfície (Gordon and Hemirston, 1994). No obstant, el ratolí deficient pel gen DCC, malgrat presenta alteracions en el sistema nerviós, no presenta cap afectació a nivell de l'epiteli intestinal (Fazeli et al., 1997), la qual cosa qüestiona la seva implicació en tots aquests processos mencionats. La depleció d'altres molècules implicades en processos cel·lulars imprescindibles, ha donat lloc en altres casos a ratolins *knock out* sense afectacions. Les ERM en són un exemple degut a la seva funcionalitat redundant. Així, és necessària la inactivació d'almenys dues d'aquestes proteïnes per observar un fenotip mutant (Paglini et al., 1998). La neogenina és l'única molècula coneguda fins aquest moment, que presenta homologia amb el domini intracel·lular del DCC (39% d'identitat) (Vielmetter et al., 1994) suggerint que aquestes dues molècules podrien exercir papers redundants en l'epiteli intestinal encara que no ho facin a nivell del sistema nerviós. Si més no, segons els nostres resultats, DCC seria un bon candidat com a regulador de la migració controlada, de la qual depen la regeneració constant de l'epiteli intestinal.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- 1) L'expressió dels gens DCC i Smad4 està reduïda en tumors de còlon i en línies derivades de càncer de còlon i de pàncrees, respecte els teixits normals. Les alteracions en ambdós gens són esdeveniments independents.
- 2) L'expressió ectòpica del DCC en les HT-29 no afecta a la capacitat proliferativa d'aquestes cèl·lules *in vitro* malgrat redueix la capacitat tumorigènica *in vivo*.
- 3) El DCC no està implicat directament en el procés de diferenciació epitelial o no és suficient per promoure aquest procés.
- 4) L'expressió del DCC en les HT-29 induïx una augment de l'adhesió cèl·lula-cèl·lula i una disminució de l'adhesió a la matriu.
- 5) Les cèl·lules mesenquimals d'intestí C9 i C20, en co-cultiu amb les HT-29, potencien la reducció de l'adhesió a la matriu induïda pel DCC en aquestes cèl·lules epitelials. En canvi, els medis condicionats tenen l'efecte contrari, reduïnt específicament l'efecte inhibidor del DCC en l'adhesió a la matriu de les cèl·lules HT-29.
- 6) El DCC actua com a inhibidor de la migració *in vitro*, probablement com a conseqüència de la seva implicació en adhesió intercel·lular. *In vivo*, el DCC és un factor antidissemiatiu.
- 7) El DCC induïx una disminució d'adhesió al substrat mitjançant la disrupció de les adhesions focals i dels hemidesmosomes. També induïx la disrupció de les fibres d'estrés d'actina mentres que no sembla influenciar en la organització dels filaments intermediaris.

CONCLUSIONS

8) El DCC s'associa *in vitro* de forma específica a l'extrem N-terminal de l'Ezrina i del NF-2, i l'Ezrina co-immunoprecipita amb el DCC en extrems de cèl·lules COS1 transientment transfectades amb el pCMV-DCC, suggerint que el mecanisme d'acció del DCC podria estar mediat per la seva interacció amb molècules de la família ERM.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson. Molecular biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. New York & London. 3rd Edition, 1994.

Alcántara S, Ruiz M, De Castro F, Soriano E, Sotelo C. Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. Development 2000. 127:1359-72.

Algrain M, Turunen O, Vaheri A, Louvard D, Arpin M. Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role a membrane-cytoskeletal linker. J Cell Biol. 1993. 120:129-39.

Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. Cell 1988. 53: 549-54.

Amar LS, Shabana al-HM, Oboeuf M, Martin N, Forest N. Desmosomes are regulated by protein kinase C in primary rat epithelial cells. Cell Adhes Commun. 1998. 5: 1-12.

Ayscough KR. *In vivo* functions of actin-binding proteins. Curr Op Cell Biol. 1998. 10: 102-11.

Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal carcinoma. Genomics 1990. 5: 554-60.

Barallobre MJ, Del Rio JA, Alcántara S, Borrell V, Aguado F, Ruiz M, Carmona MA, Martín M, Fabre M, Yuste R, Tessier-Lavigne M, Soriano E. Aberrant development of hippocampal circuits and altered neural activity in netrin 1-deficient mice. Development 2000. 127:4797-810

Barberá VM, Martín M, Mariñoso L, Munné A, Carrato A, Real FX, Fabre M. The 18q21 region in colorectal and pancreatic cancer: independent loss of DCC and DPC4 expression. Biochim Biophys Acta 2000. 1502: 283-96.

Bashaw GJ, Goodman CS. Chimeric axon guidance receptors: the cytoplasmic domains of slit and netrin receptors specify attraction versus repulsion. Cell 1999. 97: 917-26.

BIBLIOGRAFIA

Beavon IR. The E-cadherin-catenin complex in tumor metastasis. Structure, function and regulation. *Eur J Cancer* 2000. 36: 1607-20.

Berryman M, Franck Z, Bretscher A. Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J Cell Sci.* 1993. 105: 1025-43.

Bierkamp C, Mclaufhlin KJ, Schwarz H, Huber O, Kemler R. Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoblobin. 1996. *Dev. Biol.* 180: 780-5.

Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, Harris M, Jones PH, Binch A, Crowther D, Craft AW, Eden OB, Evans DGR, Thompson E, Mann JR, Martin J, Mitchell ELD, Santibanez-Koref MF. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. 1994. *Cancer Res.* 54: 1298-1304.

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

Bockman DE. Anatomy of the pancreas. In: Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA. *The pancreas. Biology, pathology and disease.* 1993. Raven Press 1-8.

Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem.* 1981. 256: 1604-7.

Borradori L, Sonnenberg A. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complex. *J Invest Dermatol.* 1999. 112:411-418.

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987. 327: 293-7.

Bracke MC, van Roy FM, Mareel MM. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996. 213: 123-61.

Bretscher A. Purification of an 80, 000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in non-muscle cells. *J Cell Biol.* 1983. 97: 425-32.

Brewster SF, Gingell JC, Browne S, Brown KW. Loss of heterozygosity on chromosome 18q is associated with muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 1994. 70: 697-700.

Brown JD, Moon RT. WNT signaling: why is everything so negative? *Curr Opin Cell Biol.* 1998. 10: 182-7.

Buchner A, Oberneder R, Riesenberger R, Keiditsch E, Hofstetter A. Expression of plakoglobin in renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 1998. 18: 4231-5.

Buisine MP, Devisme L, Savidge TC, Gespach C, Gosselin B, Porchet N, Aubert JP. Mucin gene expression in human embryonic and fetal intestine. *Gut* 1998. 43: 519-24.

Burkitt HG, Young B, Heath JW. *Histología funcional Wheather.* Churchill Communications Europe España. 1996

Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet.* 1994a. 8: 27-32.

Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redson MS, Yeo CJ, Kern SE. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res.* 1994b. 54: 3568-73.

Caldas C, Kern SE. K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol.* 1995. 18: 1-6.

Capellà GM, Cronauer-Mitra S, Peinado MA, Perucho M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect.* 1991. 93: 125-31.

Carethers JM, Hawn MT, Greenson CL, Hitchcock CL, Boland CR. Prognostic significance of allelic loss at chromosome 18q21 for stage II colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998. 114: 1188-95.

Carlier M-F. Control of actin dynamics. *Curr Op Cell Biol.* 1998. 10: 45-51.

Carrato C, Balagué C, De Bolós C, González E, Gambús G, Planas J, Perini JM, Andreu D, Real FX. Differential apomucin expression in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues. *Gastroenterology* 1994. 107: 160-72.

BIBLIOGRAFIA

Cerny WL, Mangold KA, Scarpelli DG. K-ras mutation is an early event in pancreatic duct carcinogenesis in the Syrian golden hamster. *Cancer Res.* 1992. 52: 4507-13.

Chambers JA, Hollingsworth MA, Trezise AE, Harris A. Developmental expression of mucin genes MUC1 and MUC2. *J Cell Sci.* 1994. 107: 413-24.

Chan SS, Zheng H, Su MW, Wilk R, Killeen MT, Hedgecock EM, Culotti JG. UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* 1996. 87: 187-95.

Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* 1988. 48: 1936-42.

Chen X, Weisberg E, Fridmacher V, Watanabe M, Naco G, Whitman M. Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 1997. 389: 85-9.

Chen Y, Lebrun JJ, Vale W. Regulation of transforming growth factor beta- and activin-induced transcription by mammalian Mad proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996. 93: 12992-7.

Chen YQ, Hsieh JT, Yao F, Fang B, Pong R, Cipriano SC, Krepulat F. Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene* 1999. 18: 2747-54.

Chenevix-Trench G, Leary J, Kerr J, Michel J, Kefford R, Hurst T, Parsons PG, Friedlander M, Khoo SK. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 18 in ovarian adenocarcinoma which does not always include the DCC locus. *Oncogene* 1992. 7: 1059-65.

Cho KR, Fearon ER. DCC: linking tumor suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer? *Curr Opin Genet Dev.* 1995. 5: 72-8.

Cho KR, Oliner JD, Simons JW, Hedrick L, Fearon ER, Preisinger AC, Hedge P, Silverman GA, Vogelstein B. The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. *Genomics* 1994. 19: 525-31.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987. 162: 156-9.

Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *TIBS.* 1999. 24: 73-6.

Chung DC. The genetic basis of colorectal cancer: Insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 2000. 119: 854-65.

Chung DC. Molecular prognostic markers and colorectal cancer: the search goes on. *Gastroenterology* 1998. 114: 1330-8.

Chuong CM, Jiang TX, Yin E, Widelitz RB. cDCC (chicken homologue to a gene Deleted in Colorectal Carcinoma) is an epithelial adhesion molecule expressed in the basal cells and involved in epithelial-mesenchymal interaction. *Dev Biol.* 1994. 164: 383-97.

Clarke AS, Lotz MM, Chao C, Mercurio AM. Activation of the p21 pathway of growth arrest and apoptosis by the β 4 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 1995. 270: 22673-6.

Cohen CM, Foley SF. The role of band 4.1 in the association of actin with erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 1982. 688: 691-701.

Colamarino SA, Tessier-Lavigne M. The axonal Chemoattractant Netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 1995a. 81: 621-9.

Colamarino SA, Tessier-Lavigne M. The role of the floor plate in axon guidance. *Annu Rev Neurosci.* 1995b. 18: 497-529.

Cooper HM, Armes P, Britto J, Gad J, Wilks AF. Cloning of the mouse homologue of the deleted in colorectal cancer gene (mDCC) and its expression in the developing mouse embryo. *Oncogene* 1995. 11: 2243-54.

Corset V, Nguyen-Ba-Charvet KY, Forcet C, Moysse E, Chédotal A, Mehlen P. Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. *Nature* 2000. 407: 747-50.

Cowin P, Kapprell H-P, Franke WW, Tamkun J, Hynes RO. Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell* 1986. 46: 1063-73.

Craig SW, Johnson RP. Assembly of focal adhesions: progress, paradigms and portents. *Curr Op Cell Biol.* 1996. 8: 74-85.

Crepaldi T, Gautreau A, Comoglio PM, Louvard D, Arpin M. Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. *J Cell Biol.* 1997. 138: 423-34.

BIBLIOGRAFIA

Dahiya R, Lesuffleur T, Kwak KS, Byrd JC, Barbat A, Zweibaum A, Kim YS. Expression and characterization of mucins associated with the resistance to methotrexate of human colonic adenocarcinoma cell line HT29. *Cancer Res.* 1992. 52:4655-62.

Daniel JM, Reynolds AB. Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *BioEssays* 1997. 19: 883-91.

DeArcangelis A, Neuville P, Boukamel R, Lefevre O, Kedinger M, Simon-Assmann P. Inhibition of laminin α 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J Cell Biol.* 1996. 133: 417-30.

De Angelis PM, Stokke T, Beigi M, Mjaland O, Clausen OP. Prognostic significance of recurrent chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization in sporadic colorectal cancer. In *J Colorectal Dis.* 2001. 16: 38-45.

Defacque, H, Egeberg M, Habermann A, Diakonova M, Roy C, Mangeat P, Voelter W, Marriott G, Pfannstiel J, Faulstich H, Griffiths G. Involvement of ezrin/moesin in de novo actin assembly on phagosomal membranes. *EMBO J.* 2000. 19: 199-212.

Depont J, Shabana AH, Florescu-Zorila S, Gehanno P, Forest N. Down regulation of desmosomal molecules in oral and pharyngeal squamous cell carcinomas as a marker for tumour growth and distant metastasis. *Eur J Oral Sci.* 1999. 107: 183-93.

Devilee P, van den Broek M, Kuipers-Dijkshoorn N, Kolluri R, Khan PM, Pearson PL, Cornelisse CJ. At least four different chromosomal regions are involved in loss of heterozygosity in human breast tumorigenesis. *Genomics* 1989. 5:554-60.

Dewinko B, Yang LY, Leibovitz A, Barlogie B, Lutz D, Jansson B, Stragand JJ, Trujillo JM. Cellular discriminants for a biological classification of human colon carcinoma. *Cancer res.* 1984. 44: 4241-53.

Drescher U. Netrins find their receptor. *Nature* 1996. 384: 416-7.

DuBois RN, Shao J, Tsujii M, Sheng H, Beauchamp RD. G1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-1. *Cancer res.* 1996. 56: 733-7.

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, Dubois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1997. 107: 1183-8.

Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 1996. 86: 543-52.

Fabre M, Garcia de Herreros A. Phorbol ester-induced scattering of HT-29 human intestinal cancer cells is associated with down-modulation of E-cadherin. *J Cell Sci.* 1993. 106: 513-21.

Fabre M, Martín M, Ulloa F, Real FX. In vitro analysis of the role of DCC in mucus-secreting intestinal differentiation. *Int J Cancer* 1999. 81: 799-807.

Falk M, Salmivirta K, Durbeej M, Larsson E, Ekblom M, Vestweber D, Ekblom P. Integrin $\alpha 6 \beta 1$ is involved in kidney tubulogenesis in vitro. *J Cell Sci.* 1996. 109: 2801-10.

Fawcett DW. *Tratado de Histología.* Ed. Interamericana McGraw-Hill. 12ª Edición. 1995.

Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 1997. 386: 796-804.

Fearon ER. DCC: is there a connection between tumorigenesis and cell guidance molecules? *Biochim Biophys Acta* 1996. 1288: M17-23.

Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990. 247: 49-56.

Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987. 238: 193-7.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990. 61: 759-67.

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Nat Cancer Inst.* 1977. 59: 221-6.

Fogh J, Trempe G. *New human tumor cell lines.* Plenum Publishing Corp: New York. 1975.

BIBLIOGRAFIA

Fontao L, Stutzmann J, Gendry P, Launay JF. Regulation of the type II hemidesmosomal plaque assembly in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res.* 1999. 250: 298-312.

Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987. 327: 298-303.

Fritsch C, Simon-Assmann P, Kedinger M, Evans GS. Cytokines modulate fibroblast phenotype and epithelial-stroma interactions in rat intestine. *Gastroenterology* 1996. 112: 826-838.

Fukata M, Nakagawa M, Kuroda S, Kaibuchi K. Cell adhesion and Rho small GTPases. *J Cell Sci.* 1999a. 112: 4491-500.

Fukata M, Oshiro N, Kinoshita N, Kawano Y, Matsuoka Y, Bennett V, Natsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility. *J Cell Biol.* 1999b. 145: 347-361.

Fukushige S, Furukawa T, Satoh K, Sunamura M, Kobari M, Koizumi M, Horii A. Loss of chromosome 18q is an early event in pancreatic ductal tumorigenesis. *Cancer Res.* 1998. 58:4222-6.

Galimi F, Brizzi MF, Comoglio PM. The hepatocyte growth factor and its receptor. *Stem Cells* 1993. Suppl 2: 22-30.

Gallicano GI, Koulis P, Bauer C, Yin M, Vasioukhin V, Degenstien L, Fuchs E. Desmoplakin is required early in development for assembly desmosomes and cytoskeletal linkage. *J. Cell Biol.* 1998. 143: 1009-22.

Gao X, Honn KV, Grignon D, Sakr W, Chen YQ. Frequent loss of expression and loss of heterozygosity of the putative tumor suppressor gene DCC in prostatic carcinomas. *Cancer Res.* 1993. 53: 2723-7.

Geerts D, Fontao L, Nievers MG, Schaapveld RQJ, Purkis PE, Wheeler GN, Lane EB, Leigh IM, Sonnenberg A. Binding of integrin $\alpha 6 \beta 4$ to plectin prevents plectin association with F-actin but does not interfere with intermediate filament binding. *J Cell Biol.* 1999. 147: 417-34.

Gendler SK, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol.* 1995. 57: 607-34.

Giancotti FG. Complexity and specificity of integrin signalling. *Nature Cell Biol.* 2000. 2: E13-4.

Gilmore AP, Burridge K. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature* 1996. 381: 531-5.

Gima T, Kato H, Honda T, Imamura T, Sasazuki T, Wake N. DCC gene alteration in human endometrial carcinomas. *Int J Cancer* 1994. 57: 480-5.

Goi T, Yamaguchi A, Nakagawara G, Urano T, Shiku H, Furukawa K. Reduced expression of deleted colorectal carcinoma (DCC) protein in established colon cancers. *British J Cancer* 1998. 77: 466-71.

Gómez S, del Mont Llosas M, Verdú J, Roura S, Lloreta J, Fabre M, García de Herreros A. Independent regulation of adherens and tight junctions by tyrosine phosphorylation in Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1999. 1452: 121-32.

Gordon JI and Hermiston ML. Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol.* 1994. 6:795-803.

Gotley D, Reeder JA, Fawcett J, Walsh MD, Bates P, Simmons DL, Antalis TM. The deleted in colon cancer (DCC) gene is consistently expressed in colorectal cancers and metastases. *Oncogene* 1996. 13: 787-95.

Goyette MC, Cho K, Fasching CL, Levy DB, Kinzler KW, Paraskeva C, Vogelstein B, Stanbridge EJ. Progression of colorectal cancer is associated with multiple tumor suppressor gene defects but inhibition of tumorigenicity is accomplished by correction of any single defect via chromosome transfer. *Mol Cell Biol.* 1992. 12: 1387-95.

Granés F, Ureña JM, Rocamora N, Vilaró S. Ezrin links syndecan-2 to cytoskeleton. *J Cell Sci.* 2000. 117: 1267-76.

Greenberg ME, Greene LA, Ziff EB. Nerve growth factor and epidermal growth factor induce transient changes in proto-oncogene transcription in PC-12 cells. *J Biol Chem.* 1985. 260: 14101-10.

Grunewald K, Lyons J, Frohlich A, Feichtinger H, Weger RA, Schwab G, Janssen JW, Bartram CR. High frequency of Ki-ras codon 12 mutations in pancreatic adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1989. 43: 1037-41.

BIBLIOGRAFIA

Gum JR, Byrd JC, Hicks JW, Toribara NW, Rothe EM, Lagage, RE, Kim YS. Molecular cloning of human intestinal mucin. *J Biol Chem.* 1989. 264: 6480-7.

Gum JR, Hicks JW, Swallow DM, Lagace RL, Bird JC, Lamport DTA, Siddiki B, Kim YS. Molecular cloning of cDNA's derived from a novel human intestinal mucin gene. *Biochem Biophys Res Comm.* 1990. 171: 407-15.

Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996. 84: 345-57.

Gutmann DH, Donahoe J, Perry A, Lemke N, Gorse K, Kittiniyom K, Rempel SA, Gutierrez JA, Fewsham F. Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Hum Molec Genet.* 2000. 9: 1495-500.

Haber D, Harlow E. Tumour suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nat Genet.* 1997. 16: 320-2.

Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996. 271: 350-3.

Hahn SA, Seymour AB, Hoque AT, Schutte M, da Costa LT, Redston MS, Caldas C, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Allelotype of pancreatic adenocarcinoma using xenograft enrichment. *Cancer Res.* 1995. 55: 4670-5.

Hainaut P, Soussi T, Shomer B, Hollstein M, Greenblatt M, Hovig E, Harris CC, Montesano R. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: undated compilation and future prospects. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25: 151-157.

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998. 279: 509-14.

Hall PA, Lemoine NR. Rapid acinar to ductal transdifferentiation in cultured human exocrine pancreas. *J Pathol.* 1992. 166: 97-103.

Hansen R, Oren M. p53, from inductive signal to cellular effect. *Curr Opin Genet Dev.* 1997. 7: 46-51.

Hartwell L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 1992. 71: 543-6.

- Hanukoglu I, Tanese N, Fuchs E. Complementary DNA sequence of a human cytoplasmic actin. Interspecies divergence of 3' non coding regions. *J Mol Biol.* 1983. 163: 673-8.
- Harris R, Sabatelli LM, Seeger MA. Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline: identification and characterization of two *Drosophila* Netrin/UNC-6 homologs. *Neuron.* 1996. 17: 1174-83.
- Hatzfeld M, Haffner C, Schulze K, Vinzens U. The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol.* 2000. 149: 209-22.
- Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH. The *unc-5*, *unc-6*, and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron.* 1990. 4: 61-85.
- Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B. The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev.* 1994. 8: 1174-83.
- Heiska L, Alfthan K, Gröholm M, Vilja P, Vaheri A, Carpen O. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). *J Biol Chem.* 1998. 273: 21893-900.
- Helander T, Carpen O, Turunen O, Kovanen PE, Vaheri A, Timonen T. ICAM-2 redistributed by ezrin as a target for killer cells. *Nature* 1996. 382: 265-268.
- Heldin CH, Miyazono K, Dijke PT. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997. 390: 465-71.
- Hemmings L, Barry ST, Critchley DR. Cell-matrix adhesion: structure and regulation. *Biochem Society Transactions* 1995. 23: 319-26
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JJ, Markowitz S, Willson JKV, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998. 95: 6870-75.
- Hilgers W, Song SS, Hays M, Hruban RR, Kern SE, Fearon ER. Homozygous deletions inactivate DCC, but not MADH4/DPC4/SMAD4, in a subset of pancreatic and biliary cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2000. 27: 353-7.

BIBLIOGRAFIA

Hinds PW, Finlay CA, Quartin RS, Baker SJ, Fearon ER, Vogelstein B, Levine AJ. Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell Growth Differ.* 1990. 1: 571-80.

Hirao M, Sato N, Kondo T, Yonemura S, Monden M, Sasaki T, Takai Y, Tsukita Sh, Tsukita Sa. Regulation mechanism of ERM (ezrin/moesin/radixin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol.* 1996. 135: 37-51.

Hiscox S, Jiang WG. Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cad/βcat. *J Cell Sci.* 1999. 112: 3081-90.

Hohne MW, Halatsch ME, Kahl GF, Weinel RJ. Frequent loss of expression of the potential tumor suppressor gene DCC in ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1992. 52: 2616-9.

Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, Harris CC. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res.* 1996. 24: 141-146.

Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 1999. 97: 927-41.

Honsako Y, Aoyama N, Futami S, Tamura T, Morimoto S, Nakashima T, Ohmoto A, Ohamo H, Miyamoto M, Kasuga M, Fujimori T, Maeda S. Codon 201^{Gly} in DCC gene relates to invasive colorectal carcinoma and its distant metastasis. *Gastroenterology* 1994. 106: A394.

Hopker VH, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo M, Holt C. Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 1999. 401: 69-73.

Hoque AT, Hahn SA, Schutte M, Kern SE. DPC4 gene mutation in colitis associated neoplasia. *Gut* 1997. 40: 120-2.

Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clinical Cancer Res.* 2000. 6: 2969-72.

Hu G, Zhang S, Vidal M, Baer JL, Xu T, Fearon ER. Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 1997. 11: 2701-14.

Huang Y, Boynton RF, Blount PL, Silverstein RJ, Yin J, Tong Y, McDaniel TK, Newkirk C, Resau JH, Sridhara R, et al. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer Res.* 1992. 52: 6525-30.

Hupp TR, Lane DP, Ball K. Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem J.* 2000. 352: 1-17.

Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992. 69: 11-25.

Iino H, Fukayama M, Maeda Y, Koike M, Mori T, Takahashi T, Kikuchi-Yanoshita R, Miyaki M, Mizuno S, Watanabe S. Molecular genetics for clinical management of colorectal carcinoma. 17p, 18q, and 22q loss of heterozygosity and decreased DCC expression are correlated with the metastatic potential. *Cancer* 1994. 73: 1324-31.

Ishii N, Wadsworth WG, Stern BD, Culotti JG, Hedgecock EM. UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron.* 1992.9: 873-81.

Itoh F, Hinoda Y, Ohe M, Ohe Y, Ban T, Endo T, Imai K, Yachi A. Decreased expression of DCC mRNA in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 1993. 53: 260-3.

James CD, Carlom E, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK. Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989. 86: 2858-62.

Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1994. 331: 213-21.

Kedinger M, Fritsch C, Evans GS, De Arcangelis A, Orian-Rousseau V, Simon-Assmann P. Role of stromal-epithelial cell interactions and of basement membrane molecules in the onset and maintenance of epithelial integrity. In: *Essentials of mucosal immunology.* San Diego, CA, Academic Press. 1996 : 111-23.

Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, Tessier-Lavigne M. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 1996. 87: 175-85.

BIBLIOGRAFIA

Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 1993. 9: 317-21.

Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 1994. 78: 425-35.

Kennel SJ, Foote LJ, Falcioni R, Sonnenber A, Stringer CD, Crouse C, Hemler E. Analysis of the tumor-associated antigen TSP-180. Identity with $\alpha 6\beta 4$ in the integrin superfamily. *J Biol Chem.* 1989. 264: 15515-21.

Kern SE, Fearon ER, Tersmette KWF, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic loss in colorectal carcinomas. *J Am Med Assoc.* 1989. 261: 3099-103.

Kikuchi A. Regulation of β -catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Com.* 2000. 268:243-8.

Kim SK, Fan Y, Papadimitrakopoulou V, Clayman G, Hittelman WN, Hong WK, Lotan R, Mao L. DPC4, a candidate tumor suppressor gene, is altered infrequently in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996. 56: 2519-21

Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996. 87: 159-70.

Kjøller L, Hall A. Signaling to Rho GTPases. 1999. *Exp Cell Res.* 253: 166-179

Klingelhutz AJ, Hedrick L, Cho KR, McDougall JK. The DCC gene suppresses the malignant phenotype of transformed human epithelial cells. *Oncogene* 1995. 10: 1581-6.

Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971. 68: 820-3.

Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, Pulkkinen L, Uitto J, Shultz L, Murphy GF, Whitaker-Menezes D, Stanley JR. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J. Cell Biol.* 1997. 137: 1091-102.

Kolodziej PA, Timpe LC, Mitchell KJ, Fried SR, Goodman CS, Jan LY, Jan YN. frazzled encodes a Drosophila member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 1996. 87: 197-204.

Kong XT, Choi SH, Inoue A, Xu F, Chen T, Takita J, Yokota J, Bessho F, Yanagisawa M, Hanada R, Yamamoto K, Hayashi Y. Expression and mutational analysis of the DCC, DPC4, and MADR2/JV18-1 genes in neuroblastoma. *Cancer Res.* 1997. 57:3772-8.

Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 1997. 275: 1784-7.

Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet.* 1998. 19: 379-383.

Kornberg LJ, Earp HD, Turner CR, Prockop CM, Juliano RL. Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of beta 1 integrins. *Proc Acad Sci USA.* 1991. 88: 8392-6.

Kozma R, Sarner S, Ahmed S, Lim L. Rho family GTPases and neuronal growth cone remodeling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cel Biol.* 1997. 17: 1201-11

Kretschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev.* 1997. 11: 984-95.

Ku NO, Zgou X, Toivola DM, Omary B. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Am J Physiol.* 1999. 277: G1108-37.

Kurokawa M, Lynch K, Podolsky DK. Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor beta inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biochem Biophys Res Comm.* 1987. 142: 775-782.

Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 1996. 383: 832-6.

BIBLIOGRAFIA

Lankes WT, Furthmayr H. Moesin: a member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991. 88: 8297-301.

Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996. 84: 359-69.

Lawlor KG, Narayanan R. Persistent expression of the tumor suppressor gene DCC is essential for neuronal differentiation. *Cell Growth Differ*. 1992. 3: 609-16.

Lee MM, Lotz CA, Steele GD Jr, Mercurio AM. The integrin $\alpha 6 \beta 4$ is a laminin receptor. *J Cell Biol*. 1992. 117: 671-8.

Legg JW, Isacke CM. Identification and functional analysis of the ezrin-binding site in the hyaluronan receptor, CD44. *Curr Biol*. 1998. 8: 705-8.

Leibovitz A, Stinson JC, McCombs III WB, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res*. 1976. 36: 4562-9.

Lemoine NR, Jain S, Hughes CM, Staddon SL, Maillet B, Hall PA, Kloppel G. Ki-ras oncogene activation in preinvasive pancreatic cancer. *Gastroenterology* 1992. 102: 230-6.

Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M. Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 1997. 386: 833-8.

Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. 1990. *Cancer Res*. 50: 6334-43.

Lesuffleur T, Barbat A, Luccioni C, Beaumatin J, Clair M, Kornowski A, Dussaulx E, Dutrillaux B, Zweibaum A. Dihydrofolate reductase gene amplification-associated shift of differentiation in methotrexate-adapted HT-29 cells. *J Cell Biol*. 1991. 115: 1409-18.

Lesuffleur T, Porchet N, Aubert JP, Swallow D, Gum JR, Kim YS, Real FX, Zweibaum A. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J. Cell Sci*. 1993. 106: 771-783.

Lesuffleur T, Zweibaum A, Real FX. Mucins in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 1994.17: 153-80.

Lesuffleur T, Roche F, Hill A, Lacasa M, Swallow DM, Zweibaum A, Real FX. Characterization of a mucin cDNA clone isolated from HT-29 mucus-secreting cells: a 3' end of MUC5AC? *J Biol Chem*. 1995 270: 13665-73.

Li FP, Fraumeni Jr JF, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. 1988. *Cancer Res*. 48: 5358-62.

Lickert H, Domon C, Huls G, Wehrle C, Duluc I, Clevers H, Meyer BI, Freund JN, Kemler R. Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene *Cdx1* in embryonic intestine. *Development* 2000. 12: 3805-13.

Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Carcamo J, Harland RM, Massague J. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 1996. 381: 620-3.

Loeffler M, Birke A, Winton D, Potten C. Somatic mutation, monoclonality and stochastic models of stem cell organization in the intestinal crypt. *J Theor Biol*. 1993. 160:471-91.

Luttges J, Schlehe B, Menke MA, Vogel I, Henne-Bruns D, Klöppel G. The K-ras mutation pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma usually is identical to that in associated normal, hyperplastic and metaplastic ductal epithelium. *Cancer (Phila.)*. 1999. 85: 1703-10.

MacGrogan D, Pegram M, Slamon D, Bookstein R. Comparative mutational analysis of DPC4 (*Smad4*) in prostatic and colorectal carcinomas. *Oncogene* 1997. 15: 1111-4.

Mackay J, Steel CM, Elder PA, Forrest AP, Evans HJ. Allele loss on short arm of chromosome 17 in breast cancers. *Lancet*. 1988. 2: 1384-5.

Mainiero F, Pepe A, Wary KK, Spinardi L, Mohammadi M, Schlessinger J, Giancotti FG. Signal transduction by the $\alpha 6 \beta 4$ integrin: Distinct $\beta 4$ subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *EMBO J*. 1995. 14: 4470-81.

Malats N, Porta M, Corominas JM, Piñol JL, Rifa J, Real FX. Ki-ras mutations in exocrine pancreatic cancer: association with clinico-pathological characteristics and with tobacco and alcohol consumption. PANK-ras I project investigators. *Int J Cancer*. 1997. 70: 661-7.

BIBLIOGRAFIA

Malats N, Porta M, Fernandez E, Real FX. Detection of c-Ki-ras mutation by PCR/RFLP analysis and diagnosis of pancreatic adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1993. 85: 2008-12.

Mangeat P, Roy C, Martin M. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol.* 1999. 9: 187-92.

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan R, Zborowska E, Kinzler K, Vogelstein B, Brattain M, Willson J. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995. 268:1336-8.

Martinez-Lopez E, Abad A, Font A, Monzo M, Ojanguren I, Pifarre A, Sanchez JJ, Martin C, Rosell R. Allelic loss on chromosome 18q as a prognostic marker in stage II colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998. 114: 1180-7.

Massagué J, Chen Y-C. Controlling TGF- β signalling. *Genes devel.* 2000. 14: 627-44.

Massagué J, Hata A, Liu F. TGF- β signalling through the Smad pathway. *Trends in Cell Biol.* 1997. 7: 187-92.

Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J.* 2000. 19: 1745-54.

Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S, Tsukita S. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol.* 1998. 140: 647-657.

Matsui T, Yonemura S, Tsukita Sh. Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol.* 1999. 9: 1259-62.

Matter ML, Laurie GW. A novel laminin E8 cell adhesion site required for lung alveolar formation in vitro. *J Cell Biol.* 1994. 124: 1083-90.

Mayol X, Real FX. In vitro and in vivo models of colorectal cancer. *Gastroenterology International.* 2000. 13: 104-18.

McLean WH, Pulkkinen L, Smith FJD, Rugg EL, Lane EB, Bullrich F, Burgeson RE, Amano S, Hudson DL, Owaribe K, McGrath JA, McMillan JR, Eady RA, Leigh IM, Christiano AM, Uitto J. Loss of plectin causes epidermolysis bullosa with muscular dystrophy: cDNA cloning and genomic organization. *Genes Dev.* 1996. 10: 1724-1735.

Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 1998. 395: 801-4.

Ming GL, Song HJ, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne M, Poo MM. cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron.* 1997. 19: 1225-35.

Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ. Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron.* 1996. 17: 203-15.

Miyake K, Inokuchi K, Dan K, Nomura T. Alterations in the deleted in colorectal carcinoma gene in human primary leukemia. *Blood* 1993. 82: 927-30.

Miyake M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita E, Enomoto M, Igari T, Tanaka K, Muraoka M, Takahashi H, Amada Y, Fukayama M, Maeda Y, Iwama T, Mishima Y, Mori T, Koike M. Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res.* 1994. 54: 3011-20.

Miyake S, Nagai K, Yoshino K, Oto M, Endo M, Yuasa Y. Point mutations and allelic deletion of tumor suppressor gene DCC in human esophageal squamous cell carcinomas and their relation to metastasis. *Cancer Res.* 1994. 54: 3007-10.

Miyaki M, Seki M, Okamoto M, Yamanka A, Maeda Y, Tanaka K, Kikuchi R, Iwama T, Jkeuchi T, Tonomura A, Nakamura Y, White R, Miki Y, Utsunomiya J, Koike M. Genetic changes and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.* 1990. 50: 7166-73.

Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T, Mori T. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 1999. 18: 3098-103.

Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet.* 1992. 4:229-33.

BIBLIOGRAFIA

Montgomery RK, Mulberg AE, Grand RJ. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. *Gastroenterology*. 1999. 116: 702-31.

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997. 275: 1787-90.

Motojima K, Urano T, Nagata Y, Shiku H, Tsurifune T, Kanematsu T. Detection of point mutations in the Kirsten-ras oncogene provides evidence for the multicentricity of pancreatic carcinoma. *Ann Surg*. 1993. 217: 138-43.

Mueller BK. Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci*. 1999. 22: 351-88.

Muñoz A. *Cáncer. Genes y nuevas terapias*. Ed. Hélice. 1997.

Nagatake M, Takagi Y, Osada H, Uchida K, Mitsudomi T, Saji S, Shimokata K, Takahashi T, Takahashi T. Somatic in vivo alterations of the DPC4 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res*. 1996. 56:2718-20.

Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J*. 1997. 16: 5353-62.

Narayanan R, Lawlor KG, Schaapveld RQ, Cho KR, Vogelstein B, Bui-Vinh Tran P, Osborne MP, Telang NT. Antisense RNA to the putative tumor-suppressor gene DCC transforms Rat-1 fibroblasts. *Oncogene* 1992. 7: 553-61.

Niederreiter M, Gimona M. Isolation of Focal adhesions from cultured cells. *Cell Biology: A laboratory handbook* Copyright by Academic Press, Inc. 1994: 584-588.

Nollet F, Berx G, van Roy F. The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol Cell Biol Res Commun*. 1999. 2: 77-85.

Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996. 87: 803-9.

Oshiro N, Fukata Y, Kaibuchi K. Phosphorylation of moesin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures. *J Biol Chem.* 1998. 273: 34663-6.

Paglini G, Kunda P, Quiroga S, Kosik K, Cáceres A. Suppression of radixin and moesin alters growth con morphology, motility and process formation in primary cultured neurons. *J Cell Biol.* 1998. 2: 443-55.

Peltomaki P, Vasen HFA. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. *Gastroenterology* 1997. 113: 1146-58.

Pestonjamas K, Amieva MR, Strassel CP, Naussef WM, Furthmayr H, Luna EJ. Moesin, ezrin and p205 are actin-binding proteins associated with neutrophil plasma membranes. *Mol Biol Cell* 1995. 6: 247-259.

Pierceall WE, Cho KR, Getzenberg RH, Reale MA, Hedrick L, Vogelstein B, Fearon ER. NIH3T3 cells expressing the deleted in colorectal cancer tumor suppressor gene product stimulate neurite outgrowth in rat PC12 pheochromocytoma cells. *J Cell Biol.* 1994a. 124: 1017-27.

Pierceall WE, Reale MA, Candia AF, Wright CV, Cho KR, Fearon ER. Expression of a homologue of the deleted in colorectal cancer (DCC) gene in the nervous system of developing *Xenopus* embryos. *Dev Biol.* 1994b. 166: 654-65.

Pietromonaco SF, Simons PC, Altman A, Elias L. Protein kinase C- θ phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J Biol Chem.* 1998. 273: 7594-603.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, et al., Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 1983. 122: 21-9.

Polakis P. The oncogenic activation of β -catenin. *Curr op Gen Dev.* 1999. 9:15-21.

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992. 359: 235-7.

BIBLIOGRAFIA

Quang, CT, Gautreau A, Arpin M, Treisman, R. Ezrin function is required for ROCK-mediated fibroblast transformation by the Net and Dbl oncogenes. *EMBO J.* 2000. 19: 4565-76.

Rabinovitz I, Mercurio AM. The integrin $\alpha 6\beta 4$ functions in carcinoma cell migration on laminin-1 by mediating the formation and stabilization of actin-containing motility structures. *J Cell Biol.* 1997. 139: 1873-84.

Rabinovitz I, Toker A, Mercurio AM. Protein Kinase C-dependent mobilization of the $\alpha 6\beta 4$ integrin from hemidesmosomes and its association with actin-rich cell protrusions drive the chemotactic migration of carcinoma cells. *J Cell Biol.* 1999. 146: 1147-59.

Real FX. The cell biology of pancreatic cancer: an overview. En: Neoptolemos J, Lemoine NR. Ed. *Pancreatic Cancer.* Oxford: Blackwell Science Press. 1995: 3-17.

Reale MA, Hu G, Zafar AI, Getzenberg RH, Levine SM, Fearon ER. Expression and alternative splicing of the deleted in colorectal cancer (DCC) gene in normal and malignant tissues. *Cancer Res.* 1994. 54: 4493-501.

Reale MA, Reyes-Mugica M, Pierceall WE, Rubinstein MC, Hedrick L, Cohn SL, Nakagawara A, Brodeur GM, Fearon ER. Loss of DCC expression in neuroblastoma is associated with disease dissemination. *Clin Cancer Res.* 1996. 2: 1097-102.

Reyes-Mugica M, Rieger-Christ K, Ohgaki H, Ekstrand BC, Helie M, Kleinman G, Yahanda A, Fearon ER, Kleihues P, Reale MA. Loss of DCC expression and glioma progression. *Cancer Res.* 1997. 57: 382-6.

Riggins GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E, Weinstein CL, Kern SE, Hamilton SR, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Mad-related genes in the human. *Nat Genet.* 1996. 13: 347-9.

Rouleau GA, Morel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze C, Plogastel B, Pulst SM, Lewnoir G, et al. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 1993. 363: 515-21.

Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987. 238: 491-7.

Rutzky LP, Kaye CI, Siciliano MJ, Chao M, Kahan BD. Longitudinal karyotype and genetic signature analysis of cultured human colon adenocarcinoma cell lines LS180 and LS174T. *Cancer res.* 1980. 40: 1443-8.

Saegusa M, Hashimura M, Hara A, Okayasu I. Loss of expression of the gene deleted in colon carcinoma (DCC) is closely related to histologic differentiation and lymph node metastasis in endometrial carcinoma. *Cancer* 1999. 85: 453-64.

Sander EE, Collard JG. Rho-like GTPases: Their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer* 1999a. 35: 1905-11.

Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol.* 1999b. 147: 1009-22.

Scarpa A, Capelli P, Mukai K, Zamboni G, Oda T, Iacono C, Hirohashi S. Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. *Am J Pathol.* 1993. 142: 1534-43.

Scarpelli DM, Rao MS, Reddy JK. Are acinar cells involved in the pathogenesis of ductal adenocarcinoma of the pancreas?. *Cancer Cells* 1991. 3: 275-7.

Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parson JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol.* 1994. 14: 1680-8.

Scheck AC, Coons SW. Expression of the tumor suppressor gene DCC in human gliomas. *Cancer Res.* 1993. 53: 5205-9.

Schmidt GH, Winton DJ, Ponder BA. Development of the pattern of cell renewal in the crypt-villus unit of chimaeric mouse small intestine. *Development* 1988. 103: 785-90.

Schoumacher RA, Ram J, Iannuzzi MC, Bradbury NA, Wallace RW, Hon CT, Kelly DR, Schmid SM, Gelder FB, Rado TA, et al. A cystic fibrosis pancreatic adenocarcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990. 87:4012-6.

Schutte M, Hruban RH, Hedrick L, Cho KR, Nadasdy GM, Weinstein CL, Bova GS, Isaacs WB, Cairns P, Nawroz H, Sidransky D, Casero RA Jr, Meltzer PS, Hahn SA, Kern SE. DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res.* 1996. 56: 2527-30.

BIBLIOGRAFIA

Seeger MA, Beattie CE. Attraction versus repulsion: Modular receptors make the difference in axon guidance. *Cell* 1999. 97: 821-4.

Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 1994. 78: 409-24.

Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wany H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 1996. 87: 1001-4.

Serrador JM, Alonso-Lebrero JL, del Pozo MA, Furthmayr H, Schwartz-Albiez R, Calvo J, Lozano F, Sánchez-Madrid F. Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *J Cell Biol.* 1997. 138: 1409-23.

Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest.* 1997. 99:2254-9.

Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G, Jessup JM, Loda M, Summerhayes IC. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl Med.* 1996. 335: 1727-32.

Simon-Assmann P, Keding M, De Arcangelis A, Rousseau V, Simo P. Extracellular matrix components in intestinal Development. *Experientia* 1995. 51: 883-900.

Simon-Assmann P, Lefebvre O, Bellissent-Waydelich A, Olsen J, Orian-Rousseau V, De Arcangelis A. The laminins: role in intestinal morphogenesis and differentiation. *Ann. NY Acad. Sci.* 1998. 859: 46-64.

Skoudy A, Llosas MM, Garcia de Herreros A. Intestinal HT-29 cells with dysfunction of E-cadherin show increased pp60src activity and tyrosine phosphorylation of p120-catenin. *Biochem. J.* 1996. 317: 279-84.

Slack JM. Developmental biology of the pancreas. *Development* 1995. 121: 1569-80.

Smalley MJ, Dale TC. Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 1999. 18: 215-30.

Smit VT, Boot AJ, Smits AM, Fleuren GJ, Cornelisse CJ, Bos JL. KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res.* 1988. 16: 7773-82.

Smith E, Fuchs E. Defining desmoplakin's interactions with desmosomes. 1998. *J. Cell Biol.* 141: 1229-41.

Song SH, Jong HS, Choi HH, Kang SH, Ryu MH, Kim NK, Kim WH, Bang YJ. Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16(INK4a) expression in gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2000. 87: 236-40.

Sonnenberg A, Linders CJT, Daams JH, Kennel SJ. The $\alpha 6\beta 1$ (VLA-6) and $\alpha 6\beta 4$ protein complexes: tissue distribution and biochemical properties. *J Cell Sci.* 1990: 93: 207-17.

Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998. 58: 1130-4.

Stappenbeck TS, Wong MH, Saam JR, Mysorekar IU, Gordon JI. Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol.* 1998. 10: 702-9.

Su L-K, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould KA, Dove WF. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 1992. 256: 668-70.

Sugarbaker PH, Gianola FJ, Speyer JL, Wesley R, Barofsky I, Myers CE. Prospective randomized trial of intravenous v intraperitoneal 5-FU in patients with advanced primary colon or rectal cancer. *Semin Oncol.* 1985. (3 Suppl 4): 101-11.

Sukhatme VP, Kartha S, Toback FG, Taub R, Hoover RG, Tsai-Morris CH. A novel early growth response gene rapidly induced by fibroblast, epithelial cell and lymphocyte mitogens. *Oncogen Res.* 1987. 1: 343-55.

Sumi T, Ui M. Potentiation of the adrenergic beta-receptor-mediated insulin secretion in pertussis-sensitized rats. *Endocrinology* 1975. 97: 352-8.

Tada H, Hatoko M, Tanaka A, Kuwahara M, Muramatsu T. Expression of desmoglein I and plakoglobin in skin carcinomas. *J Cutan Pathol.* 2000. 27: 24-9.

BIBLIOGRAFIA

Takagi Y, Kohmura H, Futamura M, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K, Saji S. Somatic alterations of the DPC4 gene in human colorectal cancers in vivo. *Gastroenterology* 1996. 111: 1369-72

Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Hotta I, Takaishi K, Imamura H, Nakano K, Kodama A, Takai Y. Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein Dbl. *Oncogene* 1998. 16: 3279-84.

Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Takaishi K, Kamyama T, Tsukita A, Takai Y. Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem*. 1997. 272: 23371-5.

Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* 1998. 92:645-56.

Tanaka K, Oshimura M, Kikuchi R, Seki M, Hayashi T, Miyaki M. Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 5 or 18. *Nature* 1991. 349: 340-2.

Tarafa G, Villanueva A, Farré L, Rodríguez J, Musulén E, Reyes G, Seminago R, Olmedo E, Paules AB, Peinado MA, Bachs O, Capellá G. DCC and SMAD4 alterations in human colorectal and pancreatic tumor dissemination. *Oncogene* 2000. 19: 546-55.

Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science* 1996. 274: 1123-33.

Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, Willson JK, Markowitz S, Hamilton SR, Kern SE, Kinzler KW, Vogelstein B. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet*. 1996. 13: 343-6.

Thomas G, Merel P, Sanson M, Hoang-Xuan K, Zucman J, Desmaze C, Melot T, Aurias A, Delattre O. Neurofibromatosis type 2. *Eur J Cancer* 1994. 13: 1981-7.

Thompson AM, Morris RG, Wallace M, Wyllie AH, Steel CM, Carter DC. Allele loss from 5q21 (APC/MCC) and 18q21 (DCC) and DCC mRNA expression in breast cancer. *Br J Cancer* 1993. 68: 64-8.

Tokunou M, Niki T, Saitoh Y, Imamura H, Sakamoto M, Hirohashi S. Altered expression of the ERM proteins in lung adenocarcinoma. *Lab Invest*. 2000. 80: 1643-50.

Tom BH, Rutzky LP, Jaktyn MM, Oyaser R, Kaye CE, Kahan BD. Establishment and description of a new line. *In vitro* 1976. 12: 180-91.

Toribara NW, Robertson AM, Ho SB, Kuo W-L, Gum E, Hicks JW, Gum JR, Byrd JC, Siddiki B, Kim YS. Human gastric mucin identification of a unique species by expression cloning. *J Biol Chem.* 1993. 268: 5879-85.

Tran YK, Bögler O, Gorse KM, Wieland I, Green MR, Newsham IF. A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res.* 1999. 59: 35-43.

Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, Eldridge R, Kley N, Menon AG, Pulaski K, Haase VH, Ambrose CM, et al. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibron 2 tumor suppressor. *Cell* 1993.72: 791-800.

Tsai YC, Nichols PW, Hiti AL, Williams Z, Skinner DG, Jones PA. Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res.* 1990. 50: 44-7.

Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998. 93:705-16.

Tsukita S, Heida Y, Tsukita S. A new 82-kDa barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell junction: purification and characterization. *J Cell Biol.* 1989. 108: 2369-82.

Tsukita S, Oishi K, Sato N, Sagara J, Kawai A, Tsukita S. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol.* 1994. 126: 391-401.

Turunen O, Wahlstrom T, Vaheri A. Ezrin has a COOH terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J Cell Biol.* 1994. 126: 1445-53.

Uchino S, Tsuda H, Noguchi M, Yokota J, Terada M, Saito T, Kobayashi M, Sugimura T, Hirohashi S. Frequent loss of heterozygosity at the DCC locus in gastric cancer. *Cancer Res.* 1992. 52: 3099-102.

Uematsu J, Nishizawa Y, Sonnenberg A, Owaribe K. Demonstration of type II hemidesmosomes in a mammary gland epithelial cell line, BMGE-H. *J Biochem.* 1994. 115: 469-476.

BIBLIOGRAFIA

Varela-Echavarria A, Guthrie S. Molecules making waves in axon guidance. *Genes Dev.* 1997. 11: 545-57.

Velcich A, Corner G, Palumbo L, Augenlicht L. Altered phenotype of HT29 colonic adenocarcinoma cells following expression of the DCC gene. *Oncogene* 1999. 18: 2599-606.

Vielmetter J, Kayyem JF, Roman JM, Dreyer WJ. Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer. *J Cell Biol.* 1994. 127: 2009-20.

Vilà MR, Lloreta J, Real FX. Normal human pancreas cultures display functional ductal characteristics. *Lab Invest.* 1994. 71: 423-31.

Villanueva A, Garcia C, Paules AB, Vicente M, Megias M, Reyes G, de Villalonga P, Agell N, Lluís F, Bachs O, Capellà G. Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 1998. 17: 1969-78.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor Development. *N Engl J Med.* 1988. 319: 525-32.

Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R. Allelotipe of colorectal carcinomas. *Science* 1989. 244: 207-11.

Volberg T, Zick Y, Dror R, Sabanay I, Gilon C, Levitzki A, Geiger B. The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens -type junctions. *EMBO J.* 1992. 11: 1733-42.

Weston A, Willey JC, Modali R, Sugimura H, McDowell EM, Resau J, Light B, Haugen A, Mann DL, Trump BF, et al. Differential DNA sequence deletions from chromosomes 3, 11, 13, and 17 in squamous-cell carcinoma, large-cell carcinoma, and adenocarcinoma of the human lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989. 86: 5099-103.

Weyrer K, Feichtinger H, Haun M, Weiss G, Ofner D, Weger AR, Umlauf F, Grunewald K. p53, Ki-ras, and DNA ploidy in human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Lab Invest.* 1996. 74: 279-89.

White RL. Tumor suppressing pathways. *Cell* 1998. 92: 591-2.

Wilentz RE, Geradts J, Maynard R, Offerhaus GJ, Kang M, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Inactivation of the p16(INK4A) tumor suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res.* 1998. 58: 4740-4.

Yamashita H, ten Dijke P, Franzen P, Miyazono K, Heldin CH. Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 1994. 269: 20172-8.

Yokota J, Wada M, Shimosato Y, Terada M, Sugimura T. Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 13, and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987. 84: 9252-6.

Yonemura S, Hirao M, Doi Y, Takahashi N, Kondo T, Tsukita S, Tsukita S. Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol.* 1998. 140: 885-95.

Yonemura S, Nagafuchi A, Sato N, Tsukita Sh. Concentration of an integral membrane protein, CD43 (leukosialin, sialophorin), in the cleavage furrow through the interaction of its cytoplasmic domain with actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol.* 1993. 120: 437-49.

Zimmermann P, David G. The syndecans, turners of transmembrane signaling. *FASEB.* 1999. 13: S91-S100.

Zweinbaum A, Laburthe M, Grasset E, Louvard D. Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. In: M. Field and R. A. Frizzel (eds.), *Handbook of physiology. The gastrointestinal system. Vol IV: intestinal absorption and secretion.* American Physiological Society, Washington DC. 1991: 223-55.

ANNEX

PUBLICACIONS

Barallobre MJ, Del Rio JA, Alcantara S, Borrell V, Aguado F, Ruiz M, Carmona MA, Martín M, Fabre M, Yuste R, Tessier-Lavigne M, Soriano E. Aberrant development of hippocampal circuits and altered neural activity in netrin 1-deficient mice. *Development*. 2000. 127:4797-810.

Barberá VM^(*), Martín M^(*), Mariñoso L, Munné A, Carrato A, Real FX, Fabre M. The 18q21 region in colorectal and pancreatic cancer: independent loss of DCC and DPC4 expression. *Biochim Biophys Acta*. 2000. 1502: 283-96.

Fabre M^(*), Martín M^(*), Ulloa F, Real FX. In vitro analysis of the role of DCC in mucus-secreting intestinal differentiation. *Int. J. Cancer*. 1999. 81: 799-807.

Martín M, Martín M, Mangeat P, Simon-Assmann P, Kedinger M, Real FX, Fabre M. ERM Proteins as intracellular effectors of the DCC receptor regulation of actin cytoskeleton. En preparació.

(*) Els autors han contribuït de forma equivalent en el treball