

IV. RESULTADOS

1.- Interacción E-cadherina- β -catenina y E-cadherina-p120^{ctn}.

1.1.- Expresión de los distintos productos recombinantes.

Se procedió a expresar y purificar como proteínas de fusión unidas a GST, los distintos componentes del complejo cadherina-cateninas, tal y como se detalla en *materiales y métodos*. En los casos en que fue necesario, el fragmento correspondiente a la GST fue separado por corte con la proteasa PreScission, para facilitar los ensayos de afinidad.

En la figura 13 se muestra la pureza de alguna de las preparaciones obtenidas: el dominio citosólico de la E-cadherina, las cateninas (β y p120) además de diversos mutantes puntuales de β -catenina donde residuos tirosina han sido sustituidos por fenilalanina o glutámico. La razón de la elaboración de estos mutantes se trata más adelante.

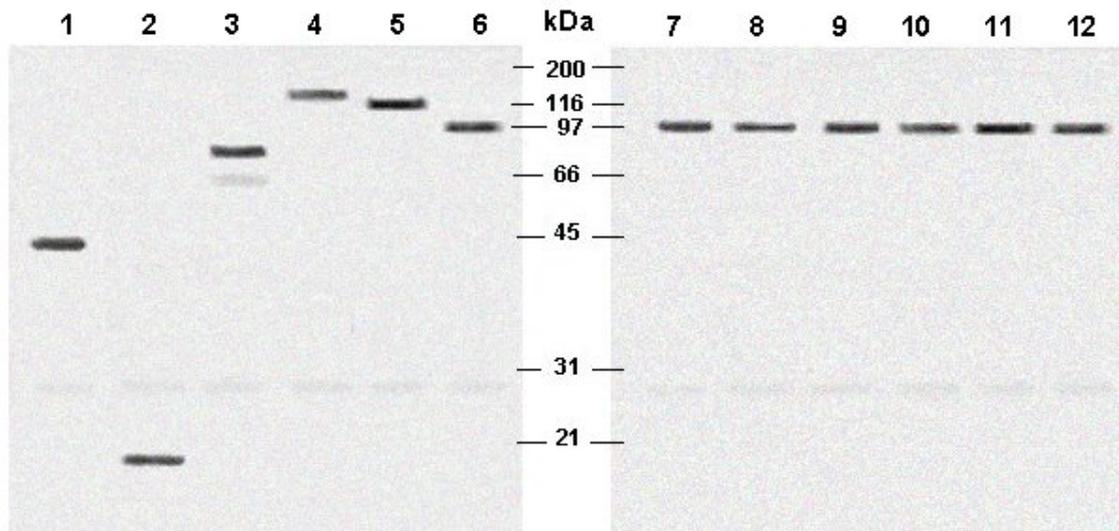


Fig 13. **Expresión de las distintas proteínas recombinantes utilizadas en este trabajo.** SDS-PAGE (12% poliacrilamida) teñido con Coomassie Brilliant Blue. **1.** GST-cyto-E-cadherina, 43 kDa; **2.** cyto-E-cadherina, 17 kDa; **3.** p120^{ctn}, 81 kDa; **4.** GST- α -catenina, 127 kDa; **5.** GST- β -catenina, 118 kDa; **6.** β -catenina, 92 kDa; **7.** β -catenina-Y86F, 92 kDa; **8.** β -catenina-Y654F, 92 kDa; **9.** β -catenina-Y86,654F, 92 kDa; **10.** β -catenina-Y86E, 92 kDa; **11.** β -catenina-Y654E, 92 kDa; **12.** β -catenina-Y86,654F, 92 kDa.

En alguna de las muestras puede observarse una banda débil de unos 26 kDa que corresponde a GST que se expresa y purifica junto con el producto deseado, aunque en proporción despreciable.

1.2.- La tirosina quinasa Src fosforila *in vitro* a β -catenina y p120^{ctn}.

Tal y como se detalla en la *Introducción*, se había correlacionado la fosforilación en tirosinas de β -catenina y p120^{ctn} con la pérdida de las uniones adherentes y un posible candidato para llevar a cabo esta fosforilación *in vivo* era Src. Se desconocía si la fosforilación era llevada a cabo por la propia quinasa c-src, qué residuos concretos eran fosforilados directamente y cómo afectaba este fenómeno a la formación de los complejos de adhesión. Por este motivo procedimos a estudiar la fosforilación *in vitro* de la β y p120-cateninas con ³²P. 1,5 μ g de β -catenina o p120^{ctn} recombinantes se incubaron con 3 unidades de la proteína quinasa Src y 0.1 mM de ATP [γ -³²P] (a unas 1000 cpm/pmol) durante 4 horas a 22°C en las condiciones detalladas en la sección de *Materiales y métodos*. Las muestras se procesaron por electroforesis, se fijaron, secaron y se pusieron en contacto con películas de rayos-X durante 12 h a -80°C. El mismo experimento se repitió cinco veces. La figura 14A es un autoradiograma representativo de las distintas pruebas. Ambas cateninas fueron fosforiladas por Src recombinante. Esta fosforilación fue totalmente bloqueada por la adición de herbimicina -a 34 μ M de concentración final en la mezcla de reacción- un inhibidor específico de Src (Uehara et al. 1989).

Se analizó la estequiometría de estas fosforilaciones. Se tomaron diversas alícuotas de las reacciones a diferentes tiempos, se sometieron a electroforesis y la cantidad de fosfato incorporado en cada muestra se detectó sometiendo cada banda recortada del gel al contador de centelleo. Los datos se representan en la figura 14B. Se observó que una unidad de Src era capaz de incorporar 1,5 moles de P/ mol de β -catenina y 2,1 moles de P/ mol de p120^{ctn} (figura 14B), cuando las reacciones se llevaban a cabo a 22°C. Esto indicaba que, en ambos casos, más de un residuo estaba siendo modificado.

pp60c-src	+	-	+	+	-	+	+
β -cat	-	+	+	+	-	-	-
p120-cat	-	-	-	-	+	+	+
Hb	-	-	-	+	-	-	+

A



B

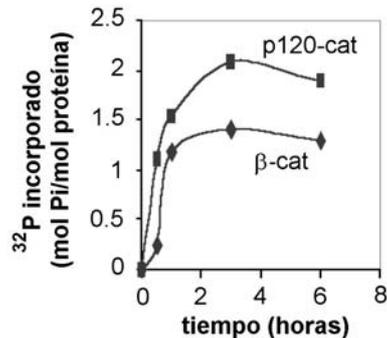


Fig 14. **Fosforilación de la β -catenina y p120^{ctn} por Src.** (A) Fosforilación de 1 nmol de proteína con 3 unidades de Src durante 4 horas. Autorradiografía expuesta 12h a -80°C . Hb=herbimicina; (B) Estequiometría de la fosforilación obtenida estudiando la incorporación de ^{32}P a lo largo del tiempo.

1.3.- La fosforilación *in vitro* de β -catenina por c-src, afecta negativamente a su interacción con E-cadherina.

Con el fin de determinar la relevancia de la fosforilación de β -catenina, se analizó la capacidad de la β -catenina fosforilada para interaccionar con el dominio citosólico de la E-cadherina y se comparó con la de β -catenina no modificada.

Había sido descrito que un fragmento de 41 aminoácidos de la porción citosólica de la E-cadherina era suficiente para unir a la β -catenina tanto *in vitro* como *in vivo* (Pai et al. 1996). En estos ensayos se incubaron cantidades variables de β -catenina no modificada y β -catenina fosforilada por Src (30, 60, 150, 300 y 500 ng) con una cantidad fija de GST-cytoEcadherina ($1,2 \cdot 10^{-12}$ moles). Como control se incubaron las dos formas de β -catenina con la misma cantidad molar de GST sola ($1,2 \cdot 10^{-12}$ moles). Los complejos formados se

aislaron por afinidad a glutathion-sepharose y la β -catenina unida se analizó por western blot con anti- β catenina. En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos para la interacción de $1,2 \cdot 10^{-12}$ moles de GST-cytoEcadherina con 30 y 60 ng de β -catenina control y fosforilada por Src.

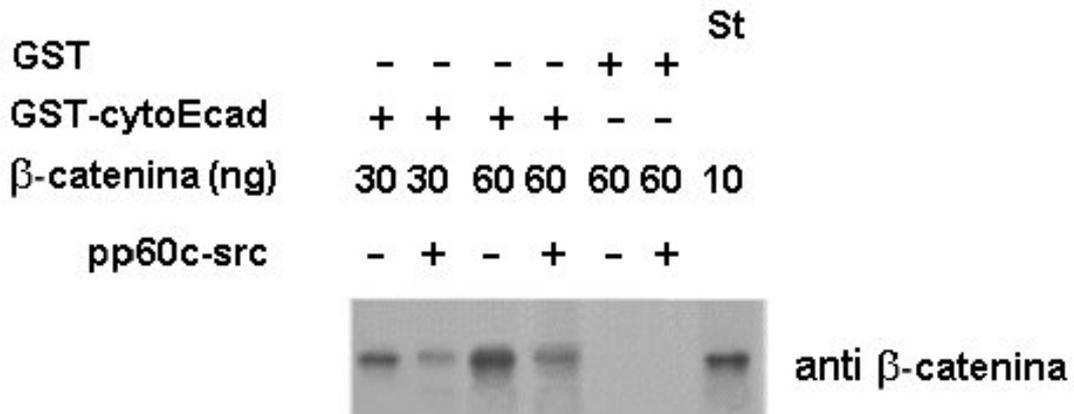


Fig 15. Interacción de E-cadherina con β -catenina no fosforilada y β -catenina fosforilada por pp60^{c-src}. Tras la fosforilación a 22°C durante 4 h se realizaron los ensayos de afinidad y se analizaron por geles SDS-PAGE al 10% poliacrilamida. Los geles se transfirieron y revelaron con anti- β catenina. St, standard.

Las fotografías obtenidas fueron densitometradas (ver *materiales y métodos*) y la concentración de β -catenina unida fue determinada comparando patrones internos de β -catenina de concentración conocida presentes en el mismo Western blot. Se llevaron a cabo análisis de Scatchard y se determinó una constante de asociación, K_a , para ambas interacciones, a partir de la pendiente de la recta de regresión obtenida.

Tabla V.
Concentraciones de β -catenina incubadas con 6×10^{-9} mol/L de cytoEcadherina-GST.

[β -catenina] total $\times 10^{-10}$ (mol/L)	[β -catenina] unida $\times 10^{-10}$ (mol/L)	[β -catenina] unida/ [β -catenina] libre
16,6	6,66	0,67
32,6	12,2	0,598
81,5	26,2	0,473
163	39,5	0,319
271,7	50,5	0,228

El número de ensayos realizados para cada concentración fue de 5 y los valores que aparecen en las tablas corresponden al valor medio encontrado en esos cinco experimentos.

La representación de Scatchard obtenida para la unión de E-cadherina con β -catenina no fosforilada fue:

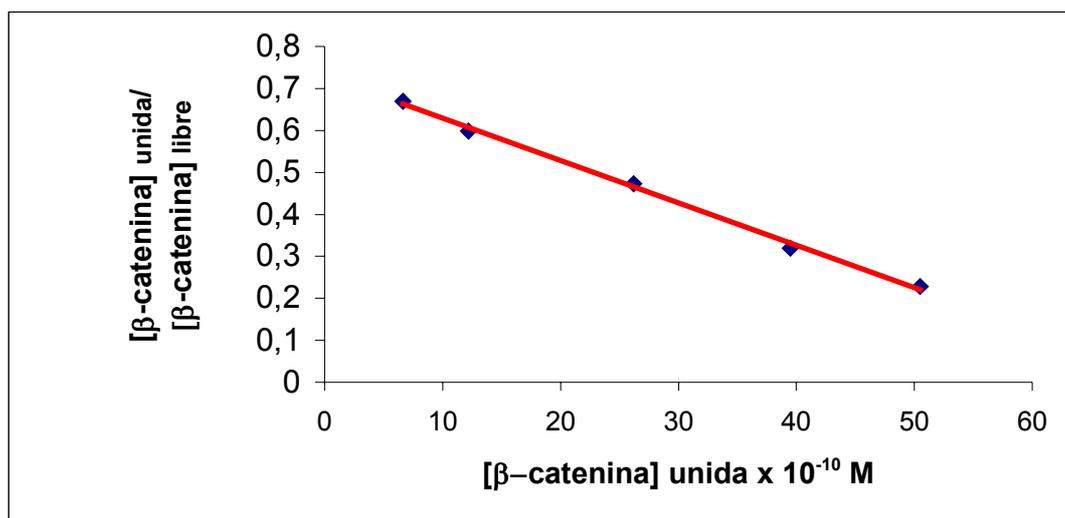


Fig 16. **Análisis de Scatchard de la unión de β -catenina a E-cadherina.** La pendiente de esta representación, $1,0 \cdot 10^8$, es la constante de afinidad (k_a).

Para la interacción E-cadherina/ β -catenina se determinó una k_a de $1,0 \cdot 10^8$ M^{-1} y una K_a de $1,8 \cdot 10^7$ M^{-1} para la unión de E-cadherina/ β -catenina-P, lo que claramente muestra que la fosforilación en tirosinas de la β -catenina afecta a su afinidad por el fragmento citosólico de la E-cadherina, disminuyéndola en un factor de 5.

1.4.- La fosforilación *in vitro* de p120^{ctn} por Src, afecta positivamente a su interacción con E-cadherina.

Se procedió de igual manera con la p120^{ctn} para averiguar si su fosforilación por Src afectaba a la interacción con la E-cadherina. Se incubaron cantidades variables de p120^{ctn} y p120^{ctn}-fosforilada con una cantidad fija de

la p120^{ctn} afectase a la interacción de la β -catenina con la E-cadherina cuando ambas proteínas estuvieran fosforiladas en tirosinas.

Para comprobarlo, se llevaron a cabo ensayos de unión entre GST-cytoEcadherina y β -catenina; en presencia de cantidades variables de p120^{ctn} hasta un exceso molar de 4 veces en relación a la β -catenina. Si la fosforilación de p120^{ctn} de alguna manera “expulsaba” a la β -catenina del complejo, debíamos encontrar una disminución de la β -catenina unida a GST-cytoEcadherina. Se realizaron dos series de incubaciones: una con β y p120 no modificadas y otra con β y p120 fosforiladas por Src que se analizaron en paralelo con anticuerpos contra β -catenina y p120^{ctn} (figura 18).

Los resultados mostraron que la adición de cantidades crecientes de p120^{ctn} (fosforilada o no) no modificaba la unión de β -catenina (fosforilada o no) a E-cadherina. Así, las constantes de asociación medidas en estas condiciones no variaron respecto a las calculadas para la β -catenina en ausencia de p120^{ctn} (ver tabla VI). Se determinó una K_a para la interacción β -catenina/ Ecadherina (en presencia de un exceso molar de 4 veces de p120^{ctn} no fosforilada) de $8,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (cuando sin p120^{ctn} era de $10 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$). La unión β -catenina-P/ Ecadherina (en presencia del mismo exceso de p120^{ctn}-P) mostró una k_a de $1,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (cuando sin p120-P era de $1,8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$).

Se descartó entonces un efecto de la p120^{ctn} sobre la afinidad de la β -catenina por el dominio citosólico de la E-cadherina. Ambas cateninas interaccionan con la cadherina de una forma independiente.

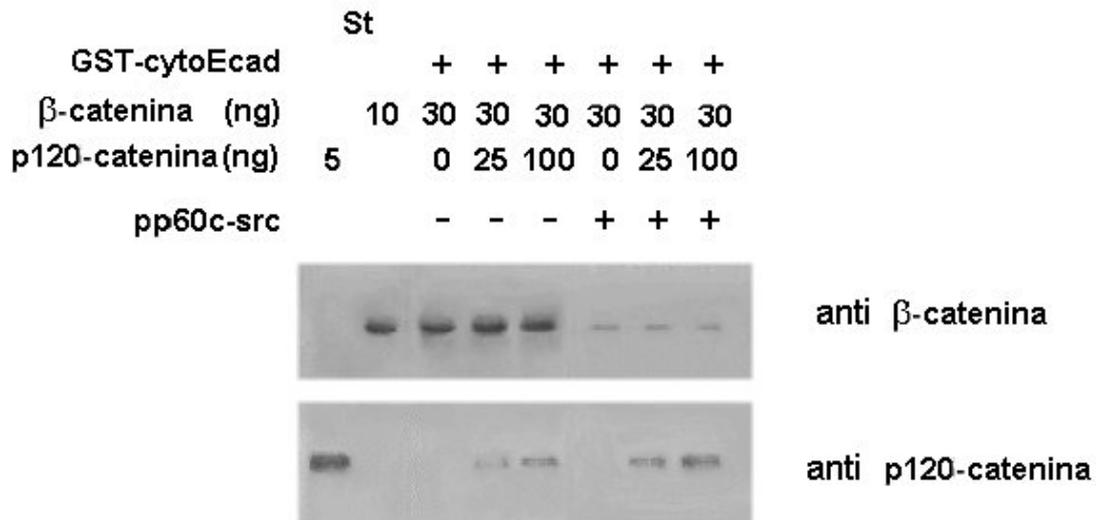


Fig 18. Interacción de β -catenina y p120^{ctn} no fosforiladas y fosforiladas por pp60^{c-src} con E-cadherina. **Se añadieron cantidades crecientes de p120^{ctn} hasta un exceso molar de 4 (100 ng), fosforiladas o no, a 30 ng de β -catenina control o fosforilada en presencia de 60 ng de GST-cytoEcad. Se analizaron por SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se revelaron con anti- β catenina y anti-p120^{ctn}. St, standard. p120-catenina, p120^{ctn}.**

1.6.- Las tirosinas 86 y 654 de β -catenina son fosforiladas por Src.

Ya que la fosforilación en tirosinas de β -catenina presentaba una relevancia funcional para la actividad de la E-cadherina, se persiguió identificar las tirosinas concretas que eran modificadas. De los ensayos de fosforilación *in vitro* con Src sabíamos que más de un residuo estaba siendo fosforilado.

Se procedió entonces a la construcción de distintos mutantes delecionados de β -catenina, mediante digestión con endonucleasas de restricción sobre el cDNA de la β -catenina entera y se estudió su fosforilación por Src. Estos estudios revelaron que dos zonas principales de la proteína eran fosforiladas: una entre los residuos 1-106 y otra entre los aa 575-782. Estudiando las tirosinas presentes en estos fragmentos, y comparando las secuencias con secuencias de sustratos bien conocidos de la quinasa c-src, se eligieron las tirosinas 86 y 654 como mejores candidatas a ser modificadas por Src.

Se generaron mutantes puntuales de β -catenina con el residuo 86, el 654 o ambos sustituidos por fenilalanina (mutación conservativa que impide la fosforilación) o por glutámico (mutación que aporta una carga negativa y simula los efectos de la fosforilación en el residuo o residuos sustituidos).

En la figura 19(A y B) se muestran los experimentos de fosforilación *in vitro* llevados a cabo con la β -catenina control y los distintos mutantes con fenilalanina.

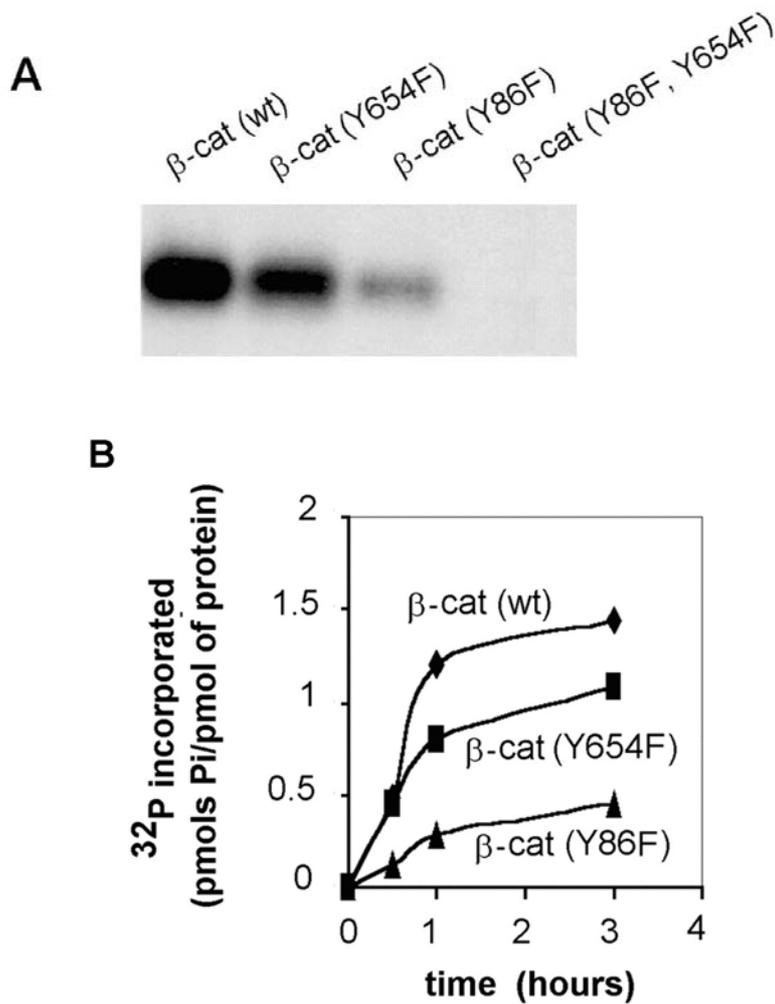


Fig 19. Fosforilación de la β -catenina wild-type y de los mutantes Y86F, Y654F e Y86,654F por pp60^{c-src}. (A) Fosforilación de 1 nmol de proteína con 3 unidades de pp60c-src durante 4 horas. Autorradiografía expuesta 12h a -80°C ; (B) Estequiometría de la fosforilación obtenida estudiando la incorporación de ^{32}P a lo largo del tiempo. Wt, *wild type*, Y86F, Tyr-86 \rightarrow Phe, Y654F, Tyr-654 \rightarrow Phe.

Los resultados de la fosforilación de las distintas formas mutadas confirmaron nuestras predicciones: ambos mutantes Tyr-86→Phe y Tyr-654→Phe fueron significativamente fosforilados en menor grado que la β -catenina control, lo que implicaba que ambos residuos eran fosforilados por c-src. Además, el doble mutante Tyr-86/654→Phe -carente de ambas tirosinas no se fosforiló, implicando que estos son los dos únicos residuos fosforilados por Src.

Estudiando la estequiometría de la incorporación de fosfato en cada mutante se comprobó que el residuo 86 era fosforilado más eficientemente por la quinasa que el 654.

1.7.- Interacción del fragmento citosólico de E-cadherina con mutantes de β -catenina de las tirosinas 86 y 654. La modificación de la Tyr654 inhibe la unión E-cadherina/ β -catenina *in vitro*.

Mutantes tirosina→fenilalanina. Una vez identificados los residuos de tirosina en β -catenina fosforilados por Src, el 86 y el 654, se realizaron experimentos de afinidad con E-cadherina. Así, se incubó GST-cytoEcadherina con cantidades variables de los mutantes de β -catenina (Tyr-86→Phe o Tyr-654→Phe) no fosforilados y fosforilados por Src. La figura 20 muestra los resultados obtenidos.

		St								
GST		-	-	-	-	-	-	+	+	+
GST-cytoEcad		+	+	+	+	+	+	-	-	-
c-src		-	+	-	+	-	+	-	-	-
β -catenina (ng)	WT	WT	WT	Y86F	Y86F	Y654F	Y654F	WT	Y86F	Y654F
	10	30	30	30	30	30	30	30	30	30

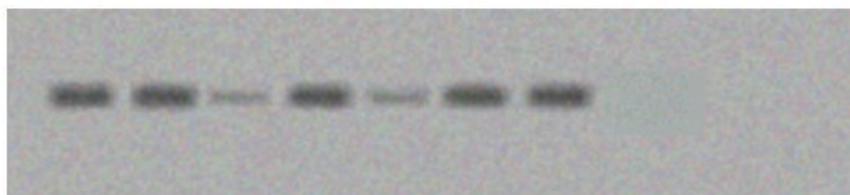


Fig 20. Interacción de β -catenina wt, Y86F e Y654F, fosforilada o no por pp60^{src}, con cyto-E-cadherina. Las muestras se analizaron en un gel SDS-PAGE al 10% poliacrilamida, se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa y se revelaron

con un anticuerpo contra β -catenina. Wt, *wild type*, Y86F, Tyr-86→Phe, Y654F, Tyr-654→Phe.

Tal como esperábamos, la K_a determinada para la unión de E-cadherina y β -catenina Y654F fue de $10,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (muy similar a la de la β -catenina *wild type*). La Y654F fosforilada por Src presentó una afinidad igualmente parecida a la β -salvaje (ver tabla VI). La K_a determinada para la unión de E-cadherina y β -catenina Y86F fue de $9,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (muy similar a la de la β -catenina salvaje); mientras que la Y86F fosforilada por Src presentó una una afinidad mucho menor con una K_a de $1,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$.

Tal y como suponíamos, los dos mutantes no fosforilados presentaron una afinidad muy parecida a la de β -catenina control. Esto confirmaba que la conformación de la proteína no se veía alterada al sustituir los residuos 86 y 654 por fenilalanina.

Además, el mutante Tyr-86→Phe -que conserva la tirosina 654 intacta- presentó una afinidad débil por la E-cadherina al ser fosforilado por Src (similar a la de la β -catenina *wild type* fosforilada). Estos resultados indicaron que la fosforilación de la Tyr-654 de la β -catenina era importante para regular la interacción E-cadherina/ β -catenina, mientras que la fosforilación de la Tyr-86 no afectaba a dicha interacción.

Mutantes tirosina→glutámico. Se procedió también a analizar la interacción de los mutantes Tyr-86→Glu y Tyr-654→Glu de β -catenina por el dominio citosólico de la E-cadherina. Estas sustituciones de tirosina por glutámico tenían como objeto simular la fosforilación, incorporando un residuo con una carga negativa, tal y como lo haría la incorporación del grupo fosfato. Se realizaron ensayos de afinidad con una cantidad fija de GST-cytoEcadherina ($1,2 \cdot 10^{-12}$ moles) y cantidades variables de β -catenina Y86E o Y654E. La figura 21 corresponde a un Western blot que muestra la unión de los distintos mutantes de β -catenina a E-cadherina.

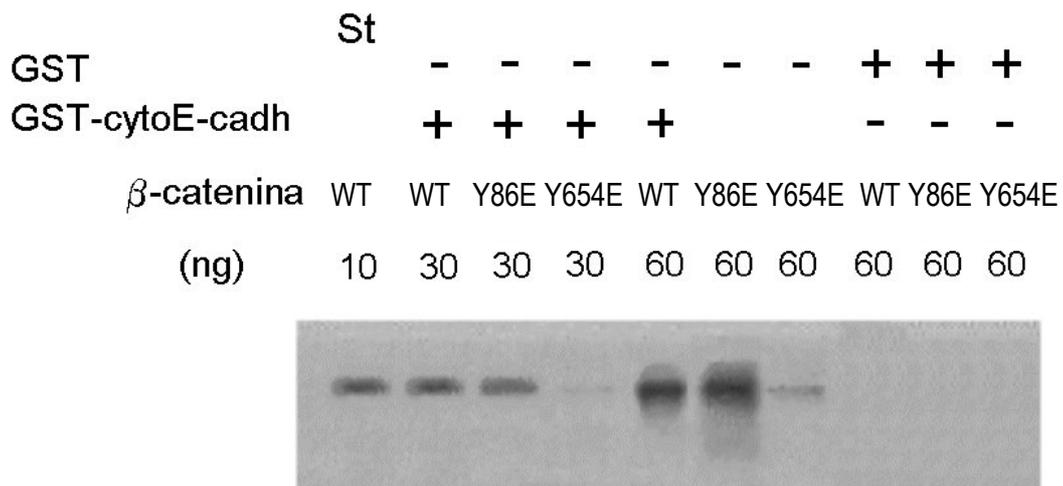


Fig 21. Interacción de β -catenina wt, Y86E e Y654E con cyto-E-cadherina. Las muestras se analizaron en un gel SDS-PAGE al 10% poliacrilamida, se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa y se revelaron con un anticuerpo contra β -catenina. WT, *wild type*, Y86E, Tyr-86→Glu, Y654E, Tyr-654→Glu.

El análisis de los datos por Scatchard permitió obtener una constante de afinidad para la interacción β -catenina Y86E/ E-cadherina de $8,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (muy similar a la afinidad de la β -catenina salvaje por la E-cadherina). La K_a de la unión de β -catenina Y654E con E-cadherina fue de $7,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (más de diez veces inferior a la afinidad de la β -catenina *wild type* por la E-cadherina).

Estos resultados mostraron claramente que la introducción de una carga negativa en el residuo 654 de la β -catenina, afectaba a la interacción con la E-cadherina, pero no había efectos evidentes al modificar el residuo 86.

El hecho de que el mutante Y654E presentase menor afinidad por la cadherina que la β -catenina fosforilada por Src, se explica probablemente porque la fosforilación *in vitro* no tiene una eficiencia del 100% y un porcentaje de la β -catenina puede quedar sin ser fosforilada en el residuo 654.

Tabla VI. Constantes de afinidad de la interacción del dominio citosólico de E-cadherina con β -catenina o p120^{ctn}.

Unión de cyto-Ecadherina con	K_a (M^{-1}) ($\times 10^7$)
β -catenina	10 ± 2
β -catenina (fosforilada por Src)	1.8 ± 0.4
p120 ^{ctn}	0.36 ± 0.05
p120 ^{ctn} (fosforilada por Src)	1.2 ± 0.3
β -catenina (en presencia de un exceso molar de 4 veces de p120 ^{ctn})	8.2 ± 0.5
β -catenina fosforilada (en presencia de un exceso molar de 4 veces de p120 ^{ctn} fosforilada)	1.4 ± 0.2
β -catenina Y86F	9.5 ± 1.6
β -catenina Y86F (fosforilada por Src)	1.5 ± 0.2
β -catenina Y654F	10.5 ± 2
β -catenina Y654F (fosforilada por Src)	10.1 ± 1.8
β -catenina Y86E	8.6 ± 0.7
β -catenina Y654E	0.77 ± 0.14

Las constantes de afinidad fueron calculadas como se indica en **Materiales y Métodos** a partir del resultado de cinco experimentos llevados a cabo en duplicado.

1.8.- La fosforilación de la Y654 *in vivo* también inhibe la interacción E-cadherina/ β -catenina.

Para comprobar la relevancia funcional que la fosforilación de la tirosina 654 pudiera tener *in vivo*, células Caco-2 fueron transfectadas transitoriamente con β -catenina *wild type* o los dos mutantes de tirosina-654 (Tyr654→Glu y Tyr654→Phe), marcados con una cola de polihistidina para facilitar su purificación. En algunos casos, el medio de crecimiento celular se suplementó con ortovanadato sódico, inhibidor de tirosina-fosfatasa que impide la defosforilación de la tirosina 654 de β -catenina. El incremento de fosforilación

de β -catenina se correlaciona en estudios similares con la disociación de las uniones adherentes (Volberg et al. 1992; Skoudy et al. 1996).

Como se muestra en la figura 22A (*panel anti-PTyr*), la fosforilación de la β -catenina *wild type* aumentó por la incubación con ortovanadato. Los niveles de fosfotirosina presentes en los dos mutantes de la Tyr-654 no se incrementaron. Sin tratar con ortovanadato, el contenido en fosfotirosina de las tres formas era muy similar lo que sugería que la Tyr-654 no estaba siendo fosforilada en condiciones basales y el tratamiento indujo la fosforilación del residuo.

En el panel central (*anti E-cadherina*) se muestra la cantidad de E-cadherina que fue copurificada con la β -catenina en cada caso. Tras el tratamiento con vanadato, la cantidad de cadherina que interaccionó con β -catenina *wild type* fue sustancialmente menor. Este efecto no se vió en los mutantes de Tyr-654→Glu ni Tyr-654→Phe, antes y después del tratamiento con vanadato.

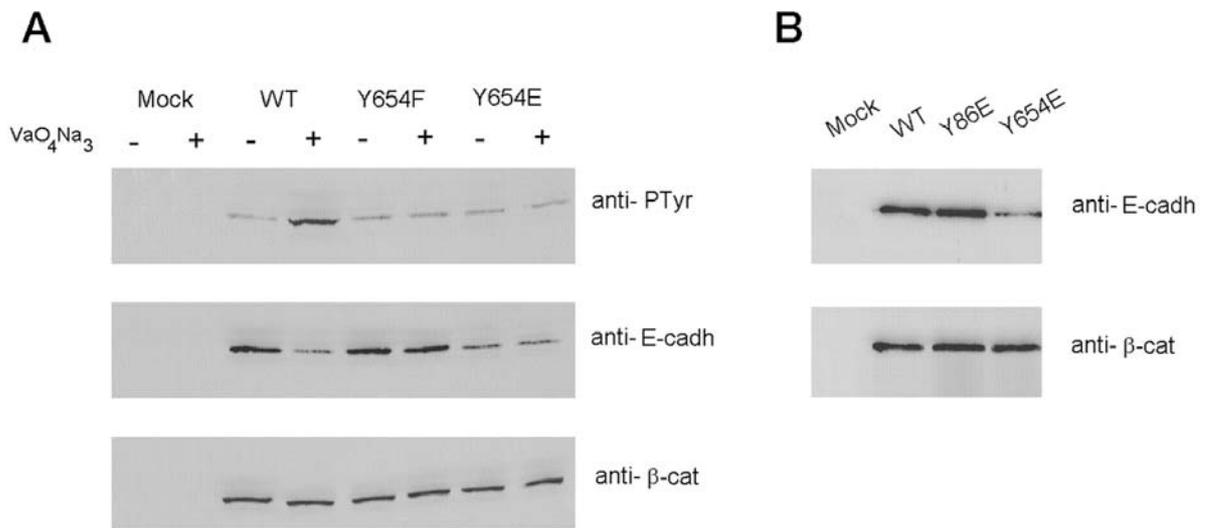


Fig 22. Fosforilación *in vivo* e interacción entre la E-cadherina y los mutantes puntuales de la β -catenina. Los cDNAs de la β -catenina *wild type* y de algunos de sus mutantes puntuales fueron transfectados en células Caco-2 como se describe en *Materiales y Métodos*. Después de 30 horas se prepararon los extractos celulares. Cuando se indica, las células fueron tratadas con ortovanadato sódico ($250\mu\text{M}$) durante las últimas 6 horas. Las formas de β -catenina expresadas fueron purificadas por cromatografía con Niquel-agarosa y las proteínas unidas a la columna, se sometieron a SDS-PAGE y Western blot con un anticuerpo anti β -catenina para comprobar que se obtienen niveles de expresión similares en todos los casos. Las membranas fueron estripadas y reanalizadas con anticuerpos contra E-cadherina y fosfotirosina. WT, *wild type*, Y654F, Tyr-654→Phe, Y654E, Tyr-654→Glu, Y86E, Tyr-86→Glu.

Finalmente, se analizó la asociación *in vivo* de los mutantes Tyr-86→Glu y Tyr-654→Glu a la E-cadherina. Se puede apreciar una menor interacción con E-cadherina, tanto para la β -catenina tratada con ortovanadato como para el mutante Tyr-654→Glu (fig. 22A). A diferencia del mutante Tyr-654→Glu, el mutante Tyr-86→Glu interaccionó con E-cadherina de forma muy similar a la β -catenina *wild type* (fig. 22B).

Todos estos resultados demostraron que la fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina era relevante para la modulación *in vivo* de la interacción entre E-cadherina y β -catenina.

1.9.- El Receptor de EGF y su homólogo erbB2 fosforilan activamente la tirosina 654 de β -catenina.

La modificación de la tirosina 654 de β -catenina es importante para regular la interacción entre β -catenina y E-cadherina. La quinasa Src era capaz de fosforilar este residuo en las condiciones ensayadas *in vitro* aunque, como muestra la figura 19, cataliza con mayor eficiencia la fosforilación del residuo 86. Por ello es probable que sea otra quinasa o quinasas las responsables de la modificación del residuo 654.

Como se ha comentado en la *Introducción*, el receptor de EGF (EGFR) había sido descrito como tirosina quinasa capaz de interaccionar y fosforilar a β -catenina (Hoschuetzky et al. 1994). Además, el EGFR y su homólogo c-erbB-2 se unen a β -catenina en una zona que engloba las últimas tres repeticiones armadillo –zona donde se localiza el residuo 654- (Shibata et al. 1996).

Para probar si el EGFR podía catalizar eficientemente la fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina, 800 ng de β -catenina *wild type* o los mutantes Tyr-86→Phe, Tyr-142→Phe y Tyr-654→Phe fueron fosforilados con unas seis unidades de EGFR (Sigma) o con células transfectadas con erbB2 como se describe en *Materiales y Métodos*. Los resultados del ensayo se muestran en la figura 23.

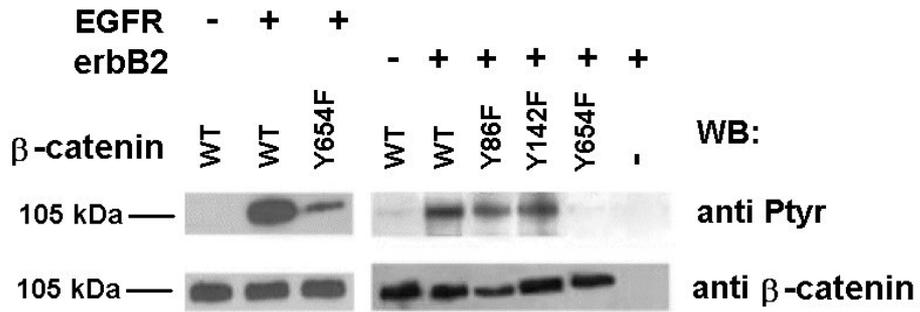


Fig 23. EGFR y erbB2 fosforilan la tirosina 654 de β -catenina. 6,7 pmoles de GST- β -catenina (*wild type* o mutantes Y86F(Tyr-86→Phe), Y142F(Tyr-142→Phe) o Y654F(Tyr-654→Phe)) fueron fosforiladas con EGFR recombinante (Sigma) o erbB2 como se describe en *Materiales y Métodos*. La fosforilación se analizó mediante Western blot con anti-Fosfotirosina. La membrana fue *stripped* y reanalizada con anti- β -catenina para comprobar que niveles similares de β -catenina estaban siendo fosforilados en todos los casos.

Como se puede apreciar, tanto el EGFR como erbB2 catalizaron *in vitro* la fosforilación del residuo 654, ya que el mutante Tyr-654→Phe se fosforiló considerablemente menos que la forma *wild type*. Pero éste no es el único residuo de β -catenina modificado por estas quinasas, ya que el mutante Tyr-654→Phe- sigue presentando algo de fosforilación.

2.- Interacción β -catenina- α -catenina.

2.1.- En la zona de β -catenina que se une a α -catenina únicamente hay una tirosina (Tyr142).

Además de comprobar que la interacción de β -catenina con E-cadherina está modulada por fosforilación, había indicios que la unión de β -catenina a α -catenina también pudiera estar regulada por fosforilación en tirosinas. La zona de β -catenina que interviene en la interacción con α -catenina comprende los aminoácidos del 120 al 151 (Aberle et al. 1994).

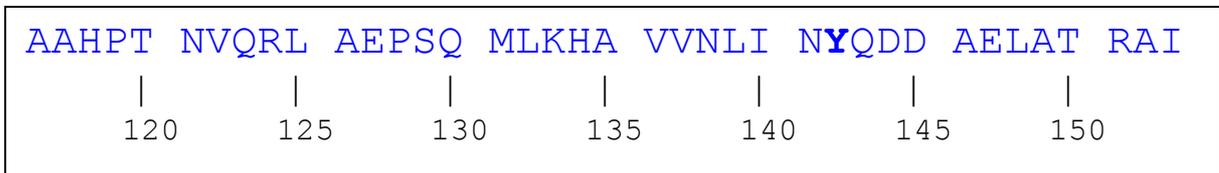


Fig 24. Detalle de la secuencia aminoacídica de la zona de β -catenina que interacciona con α -catenina. (GenBank™, Accession M90364). **Se destaca en negrita la Tirosina-142 de β -catenina.**

Como se aprecia en la figura, esta secuencia, situada entre el final del dominio N-terminal y la primera repetición armadillo de β -catenina, sólo contiene una tirosina, la 142. Estudios de mutagénesis puntual de β -catenina habían mostrado que la tirosina 142 era esencial para la interacción con α -catenina (Aberle et al. 1996).

2.2.- Las tirosina-quinzas Fer o Fyn fosforilan la Tyr142 *in vitro*.

Se procedió a probar distintas tirosina-quinzas en busca de alguna que pudiera catalizar la fosforilación de la tirosina 142 de β -catenina.

En primer lugar, de forma análoga a lo descrito anteriormente para las tirosinas 86 o 654, se generaron mutantes puntuales de β -catenina con la

tirosina 142 sustituida por fenilalanina (Tyr-142→Phe) para analizar su fosforilación en relación a la β -catenina *wild type*.

Cantidades equivalentes de β -catenina *wild type* y mutantes puntuales de las tirosinas 86, 142, 654 o el doble mutante 86/654 fueron fosforiladas *in vitro* por varias tirosina-quinasa: Lck, Src, Fyn, Fer, EGFR, Yes, y Fps, en las condiciones que se describen en *Materiales y Métodos*. Fer fosforiló eficientemente a β -catenina *wild type* y la sustitución de la Tyr-142 por Phe anula la fosforilación de β -catenina por esta quinasa (figura 25A, carriles 2 y 4). Además, la fosforilación de los otros mutantes por Fer no difirió de la de β -catenina *wild type* (figura 25A, carriles 2, 3, 5 y 6). La quinasa Fer mostró una gran especificidad por el residuo 142 de β -catenina.

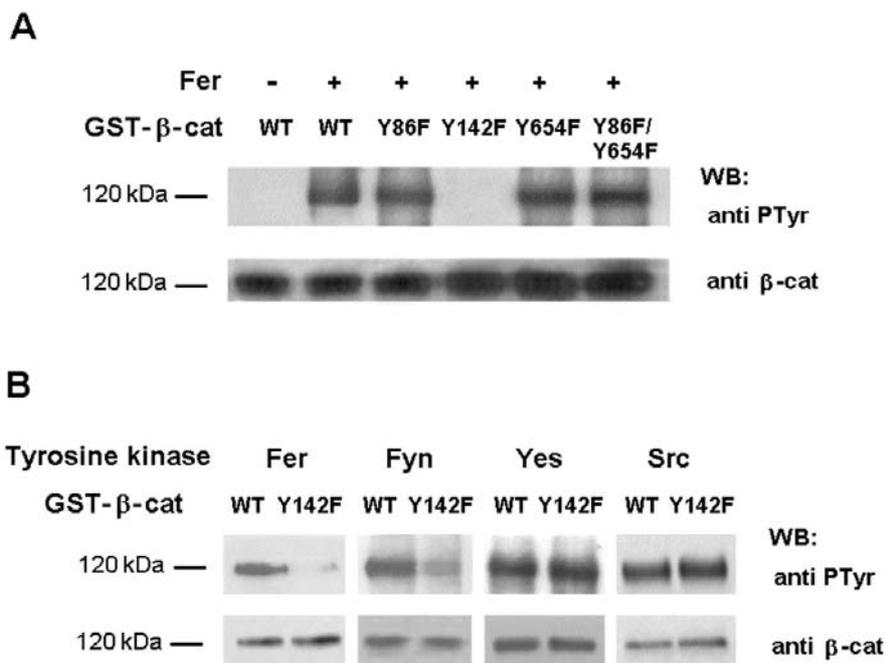


Fig 25. Fer y Fyn fosforilan específicamente la tirosina 142 de β -catenina. (A) 6,7 pmoles de GST- β catenina (*wild type* o los mutantes indicados) se fosforilaron con la quinasa Fer, purificada de células RWP1 transfectadas, como se describe en *Materiales y Métodos*. (B) 6,7 pmoles de GST- β catenina *wild type* o mutada Tyr142→Phe fueron fosforiladas con Fer, Fyn, Yes o Src (pp60^{c-src}) como se describe en *Materiales y Métodos*. La fosforilación se analizó por Western blot con anti-Fosfotirosina. Las membranas fueron estripadas y reanalizadas con anti- β catenina para comprobar que niveles similares de proteína estaban siendo fosforilados en todos los casos. WT, *wild type*, Y86F, Tyr-86→Phe, Y142F, Tyr-142→Phe, Y654F, Tyr-654→Phe, Y86F/654F, Tyr-86/654→Phe.

En la figura 25B, se analiza la capacidad de otras tirosina-quinazas de la familia de Src (Src, Fyn y Yes) para fosforilar *in vitro* a β -catenina. Aunque Src y Yes fosforilaron a β -catenina, solamente la acción de Fyn fue sensible a la mutación en el residuo 142, sugiriendo que Fyn se comportaría como Fer modificando este residuo.

2.3.- La fosforilación de la tirosina 142 disminuye la interacción β -catenina/ α -catenina *in vitro*.

Para verificar la relevancia de la fosforilación de la tirosina 142 sobre la interacción β -catenina/ α -catenina, se examinó *in vitro* la capacidad de la β -catenina fosforilada en este residuo de unirse a α -catenina y se comparó con la capacidad de la β -catenina no modificada.

GST- β -catenina fue fosforilada con Fer en iguales condiciones que las descritas anteriormente para conseguir la modificación específica del residuo 142. Se procedió entonces a realizar ensayos de *pull-down* (ver *Materiales y Métodos* para más detalle) para analizar la capacidad de la β -catenina fosforilada o no por Fer de unir α -catenina (figura 26, carriles 1 y 2).

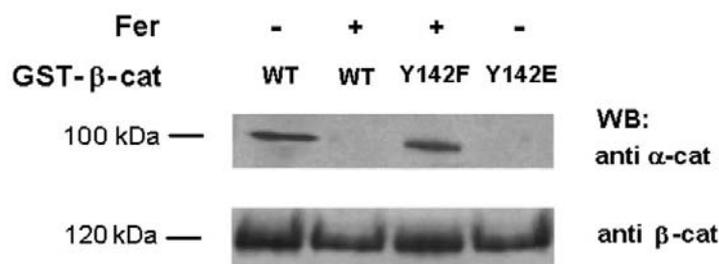


Fig 26. La fosforilación de la tirosina 142 de β -catenina reduce su interacción con α -catenina. 6,7 pmoles de GST- β catenina (*wild type* o mutantes Tyr142→Phe o Tyr142→Glu) fueron fosforilados con Fer cuando se indica en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*. Se procedió a la realización de ensayos de *pull-down* añadiendo 40 μ g de extractos celulares totales de RWP1. La cantidad de α -catenina asociada en cada caso se determinó por Western blot con anti- α catenina. La membrana se estripó y reanalizó con anti-

β catenina para asegurar cantidades similares de β -catenina en cada muestra.
WT, *wild type*, Y142F, Tyr-142→Phe, Y142E, Tyr-142→Glu.

La tirosina 142 fue mutada también a glutámico (mutante denominado Tyr142→Glu o Y142E) para mimetizar el efecto que tiene la carga negativa introducida por la fosforilación del residuo. Experimentos de pull-down mostraron que este mutante no puede unirse a α -catenina (figura 26, *carril 4*).

En conjunto, estos resultados sugieren que la fosforilación del residuo 142 de β -catenina anula la interacción entre β -catenina y α -catenina y que esta fosforilación puede ser llevada a cabo *in vitro* por las quinasas solubles Fer y Fyn.

2.4.- La fosforilación de la tirosina 142 disminuye la interacción β -catenina/ α -catenina *in vivo*.

Para verificar los resultados anteriores en un entorno celular, células RWP1 fueron transfectadas transitoriamente con las quinasas Fer o Fyn y se analizó la interacción entre β -catenina y α -catenina en estas condiciones por co-inmunoprecipitación de las proteínas endógenas. Como se muestra en la figura 27 (A y B), se detectó menos α -catenina en las inmunoprecipitaciones con anti- β -catenina de las células transfectadas con Fer o Fyn, respecto a las células no transfectadas.

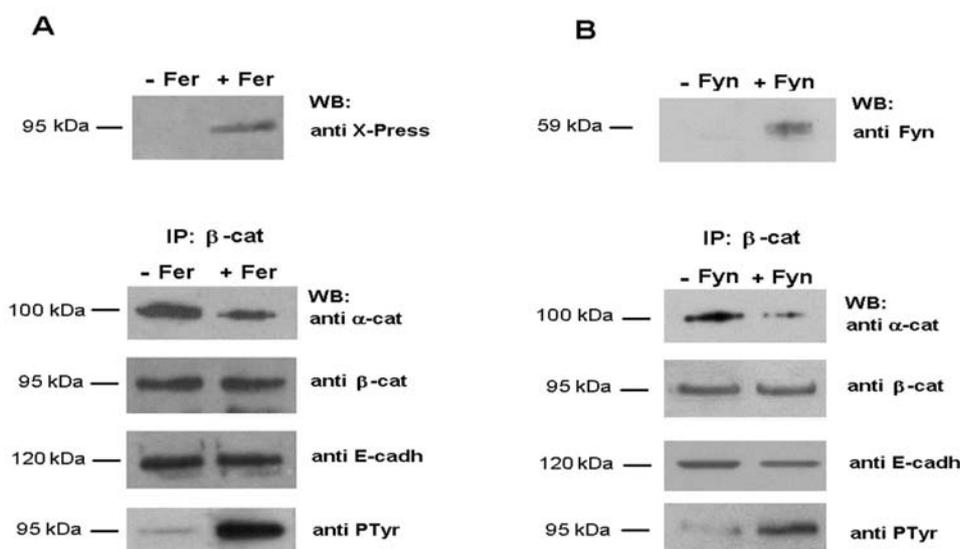


Fig 27. La sobreexpresión de Fer o Fyn en RWP1 provoca fosforilación de β -catenina y reduce la interacción entre α -catenina y β -catenina. Células RWP1 fueron transfectadas con 5 μ g de pcDNA3-His-Fer (*panel A*), pEF-Bos-Fyn (*panel B*) o vectores vacíos como control. Tras 48 h se prepararon extractos celulares. (A) *Panel superior*, 5 μ g de extractos totales de RWP1 transfectados o no con Fer-quinasa se analizaron por SDS-PAGE y Western blot con anti-Xpress™ para verificar la transfección de Fer. *Panel inferior*, 300 μ g de extractos totales de RWP1, transfectados o no con Fer, se sometieron a inmunoprecipitación con anti- β catenina y se analizaron por SDS-PAGE y Western blot con anti- α catenina. La membrana se estripó y reanalizó con anticuerpos contra β -catenina, E-cadherina y Fosfotirosina. (B) lo mismo que en (A) pero transfectando con pEF-Bos-Fyn quinasa.

Esta menor unión entre α -catenina y β -catenina detectada en las células transfectadas con Fer o Fyn, se correlacionó con un mayor grado de fosforilación de β -catenina (Fig 27A y B, *panel inferior*). Contrariamente, la transfección de Fer o Fyn, no alteró la asociación entre β -catenina y E-cadherina (figura 27A y B, *panel inferior*).

2.5.- IEC18 K-ras: un sistema *in vivo* con interacciones E-cadherina/ β -catenina y β -catenina/ α -catenina reducidas.

El siguiente paso fue investigar si la fosforilación de la tirosina 142 y el aumento de la actividad de las quinasas Fer o Fyn se producían en condiciones que provocaban la pérdida de los contactos intercelulares.

Como se ha comentado en la *Introducción*, se había descrito que la expresión de formas activas del oncogén ras provocaba la disociación celular (Kinch et al. 1995). Pudimos disponer de una línea epitelial de intestino – IEC18- transformada de forma estable con el oncogén (Val-12) K-ras. La expresión del oncogén en estas células provoca la pérdida de los contactos célula-célula y altera profundamente la morfología celular como puede apreciarse en la figura 28A.

Se analizó la misma cantidad de extractos totales de células IEC18 transformadas o no por K-ras para detectar los niveles endógenos de proteína. Mientras que se encontraron niveles similares de α -catenina, p120^{ctn} y E-cadherina en los extractos normales y K-ras, algo más de β -catenina fue detectada en las IEC18 K-ras (figura 28B). Experimentos de coimmunoprecipitación con anticuerpo anti- β catenina, mostraron que la interacción de β -catenina con α -catenina y E-cadherina se perdía en las células K-ras en comparación con las de las IEC18 normales (figura 28C, *derecha*). Estos cambios se correlacionaron además con un aumento en el contenido de fosfotirosina de β -catenina (figura 28C, *derecha panel inferior*).

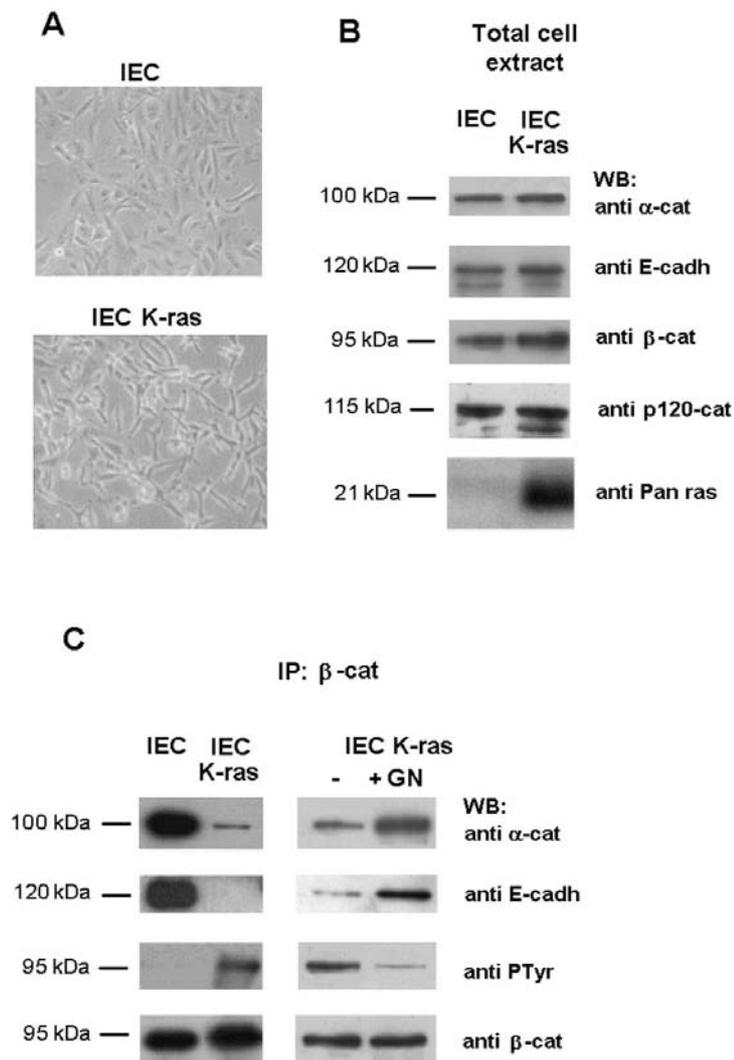


Fig 28. IEC18 K-ras: un sistema celular *in vivo* con las interacciones α -catenina- β -catenina y E-cadherina- β -catenina reducidas. **(A)**, Morfología de las líneas celulares IEC18 e IEC18 K-ras. **(B)**, 5 μ g de extractos celulares totales de IEC18 e IEC18 K-ras fueron analizados por SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos contra α -catenina, E-cadherina, β -catenina o ras para comprobar los niveles endógenos de proteínas en ambas líneas celulares. **(C)**, 300 μ g de extractos totales de IEC18 e IEC18 K-ras (*derecha*) o de IEC18 K-ras tratadas (+GN) o no (-) con 100 μ M de genisteína durante 20 h, son inmunoprecipitados con anti- β catenina, seguida de SDS-PAGE, Western blot e inmunodetección con los anticuerpos indicados en cada caso.

Al añadir al medio de cultivo de las células transformadas por K-ras, genisteína –un inhibidor general de tirosina-quinasa– durante las 20 horas previas a la obtención de extractos celulares, se consiguió recuperar parcialmente la asociación entre β -catenina-E-cadherina y entre β -catenina- α -catenina (figura 28C, *izquierda*). Esto se correlacionaba además con un

decremento de fosforilación en tirosina de la β -catenina (figura 28C, *izquierda panel inferior*).

2.6.- Las tirosinas 142 y 654 de β -catenina se fosforilan en las IEC18 K-ras.

Para examinar si el desensamblaje de los complejos cadherina-cateninas en las IEC18 K-ras era un efecto directo de la fosforilación de alguna de las tirosinas de β -catenina, se procedió a transfectar estas células con β -catenina *wild type* o los mutantes puntuales de β -catenina Tyr86 \rightarrow Phe, Tyr142 \rightarrow Phe o Tyr654 \rightarrow Phe, marcadas con una cola de polihistidina. Los productos transfectados, fueron purificados por cromatografía en níquel-agarosa (ver *Materiales y Métodos*) y se examinó su grado de fosforilación en tirosinas (figura 29A).

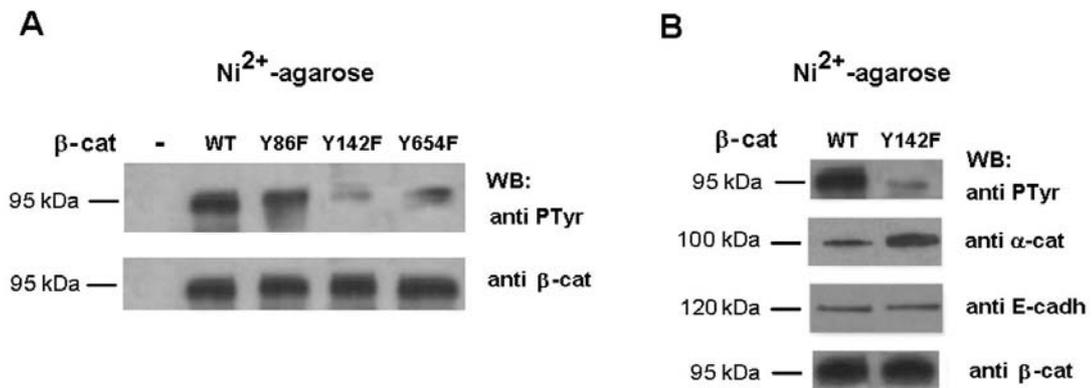


Fig 29. Las tirosinas 142 y 654 de β -catenina se fosforilan en las IEC18 K-ras. La fosforilación de Y142 modula la interacción α -catenina- β -catenina *in vivo*. (A) Células IEC18 K-ras fueron transfectadas con 5 μ g de pcDNA3.1-His- β catenina (*wild type* o los mutantes puntuales indicados) o el vector vacío como control. Tras 48 h se prepararon extractos celulares. Los productos marcados con una cola de polihistidinas fueron purificados por cromatografía en níquel-agarosa, y los niveles de fosforilación fueron examinados por Western blot con anti-Fosfotirosina. La membrana fue reanalizada contra β -catenina para comprobar que niveles similares de expresión fueran obtenidos. (B) Células IEC18 K-ras fueron transfectadas con 5 μ g de pcDNA3.1-His- β catenina (*wild type* o el mutante Tyr142 \rightarrow Phe). Los productos transfectados fueron analizados como en (A) con los anticuerpos indicados.

Como se aprecia en la figura 29A, la fosforilación de β -catenina Tyr-142 \rightarrow Phe y Tyr-654 \rightarrow Phe en estas células, fue mucho menor que la de la β -catenina *wild type* o el mutante Tyr-86 \rightarrow Phe. Esto nos indicaba que las tirosinas 142 y 654 de β -catenina estaban siendo modificadas en las IEC18 K-ras.

Para verificar la relevancia de la modificación de la tirosina 142 en la modulación de la interacción entre β -catenina y α -catenina detectada en la figura 28, células IEC18 K-ras fueron transfectadas con β -catenina *wild type* o el mutante Tyr142 \rightarrow Phe. Se comprobó que la cantidad de α -catenina copurificada con β -catenina es mayor en el mutante Tyr142 \rightarrow Phe que en β -catenina *wild type*, figura 29B, indicando que el bloqueo de la fosforilación en el residuo 142 devuelve la unión entre α -catenina y β -catenina. No se apreciaron diferencias en los niveles de E-cadherina asociados con el mutante o la proteína *wild type* (figura 29B), confirmando que la fosforilación de la tirosina 142 no afecta a la interacción de β -catenina con la E-cadherina.

2.7.- Las quinasas Fer y Fyn se activan en las IEC18 K-ras.

Es conocido que el receptor de EGF se activa por K-ras, por tanto era esperable, a partir de nuestros resultados, que se fosforilara la tirosina 654 de β -catenina en estas células, y también que disminuyera la interacción de β -catenina con E-cadherina. Sin embargo, se desconocía el comportamiento de las quinasas Fer y Fyn y es por ello que procedimos al análisis de su actividad en nuestro sistema celular. Para comprobar si Fer estaba siendo activada por K-ras, células IEC e IEC K-ras fueron transfectadas transitoriamente con Fer marcada con una cola de polihistidinas. Tras 48 horas, se prepararon extractos celulares y la quinasa Fer fue purificada por cromatografía en níquel-agarosa. Niveles equivalentes de β -catenina *wild type* fueron fosforilados con igual cantidad de Fer purificada procedente de las distintas células. El contenido en fosfotirosina de las muestras fosforiladas fue analizado. Como puede apreciarse en la figura 30B, la actividad de Fer sobre β -catenina fue mayor en la Fer procedente de las IEC K-ras. El contenido en fosfotirosina de

Fer fue también mayor (figura 30A). Todo esto apoya la conclusión que la quinasa se activa en estas células tras la transformación con K-ras.

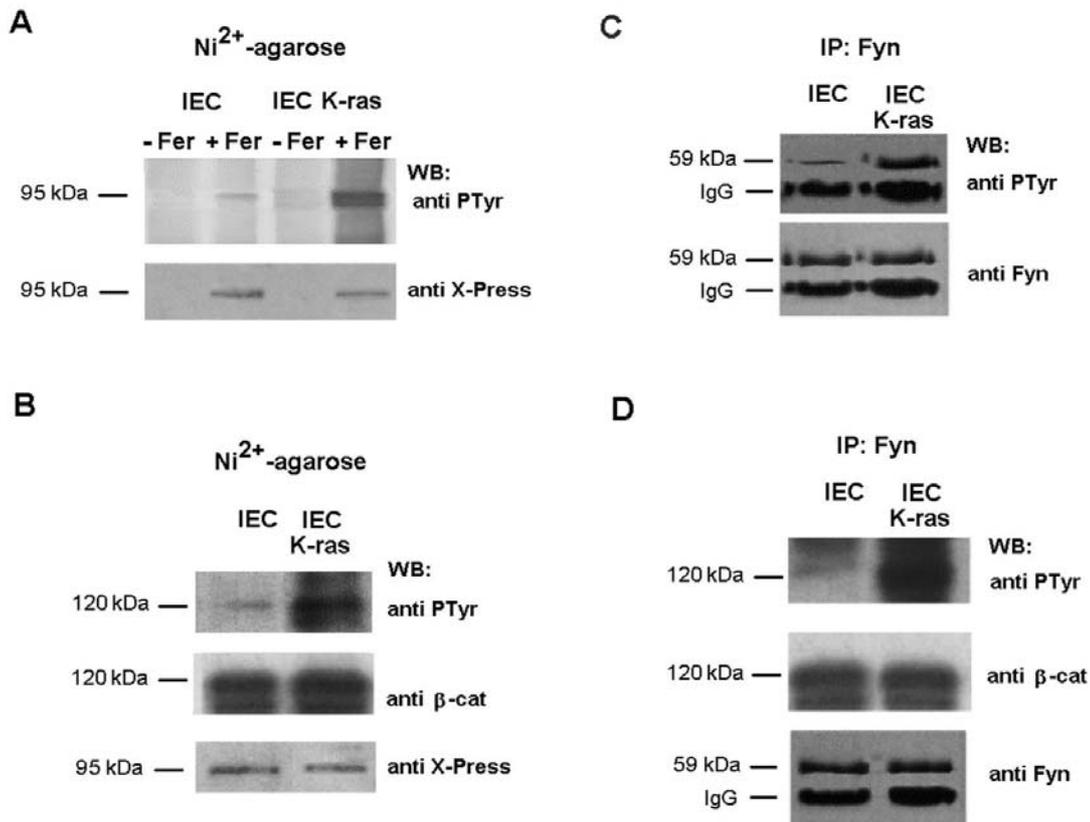


Fig 30. Las quinasa Fer y Fyn se activan en las IEC K-ras. (A) Células IEC18 o IEC18 K-ras fueron transfectadas con 5 µg de pcDNA3-His-Fer o el vector vacío como control. Tras 48 h se prepararon extractos celulares. La quinasa, marcada con una cola de polihistidinas fue purificada por cromatografía en níquel-agarosa, y los niveles de expresión del transgén fueron examinados por Western blot con anti-Xpress™. La membrana fue reanalizada contra Fosfotirosina para comprobar los niveles de fosforilación de Fer. (B), la actividad de la Fer purificada de las IEC o IEC K-ras fue determinada añadiendo 0,4 µg de β-catenina-GST en las condiciones de fosforilar descritas en *Métodos* durante 1 h a 30°C. Las muestras se analizaron por Western contra Fosfotirosinas, Xpress™ y β-catenina (como control de que cantidades similares de β-catenina y Fer estaban presentes en las reacciones). (C) y (D) se llevaron a cabo como (A) y (B) pero transfectando 5 µg de pEF-Bos-Fyn en lugar de Fer e inmunoprecipitando con anti-Fyn para purificar la quinasa.

Experimentos paralelos innumoprecipitando Fyn demostraron que la actividad de esta quinasa sobre β-catenina así como su contenido en fosfotirosina también se incrementaban en las IEC K-ras (figura 30C y D). En conjunto, concluimos que ambas quinasa se activaban en las células transfectadas con ras.

2.8.- Fer y Fyn interaccionan con p120^{ctn}.

Había sido descrito que la quinasa Fer se encuentra constitutivamente asociada con un componente de las uniones adherentes, la p120^{ctn} (Kim and Wong, 1995; Rosato et al. 1998). Examinamos si también Fyn se unía a p120^{ctn} y si esta unión estaba siendo de alguna forma afectada por K-ras.

Se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación de las proteínas endógenas con anticuerpo contra p120^{ctn} (figura 31A) o Fyn (figura 31B). Estos experimentos mostraron que ambas proteínas formaban parte del mismo complejo.

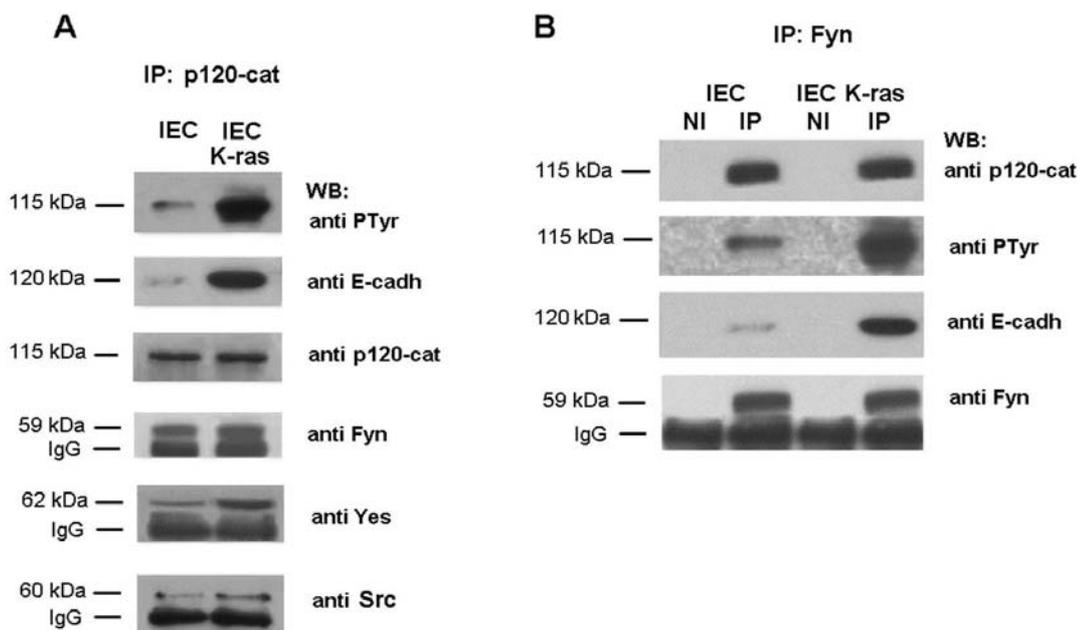


Fig 31. La p120^{ctn}, Fer y Fyn forman parte de un mismo complejo en las uniones adherentes. Inmunoprecipitación de 300 µg de extractos totales de IEC18 e IEC18 K-ras con anti-p120catenina (A) o anti Fyn (B), seguida de SDS-PAGE, Western blot e inmunodetección con los anticuerpos indicados en cada caso. NI, (no-inmunoprecipitación) muestras control sin anticuerpo primario.

En la figura 31A puede apreciarse como K-ras indujo un incremento en la fosforilación de la p120^{ctn} sin afectar a sus niveles totales. La p120^{ctn} fosforilada, interaccionó mejor con E-cadherina que la p120^{ctn} no modificada, en concordancia con nuestros resultados previos (ver figura 17). Cantidades

similares de Fyn se encontraron en los inmunoprecipitados de p120^{ctn} independientemente del grado de fosforilación de p120^{ctn} (figura 31A). De esto se desprende que la fosforilación de p120^{ctn} no tenía importancia en la regulación de la asociación entre Fyn y p120^{ctn}. Estos resultados fueron similares al inmunoprecipitar Fyn en lugar de p120^{ctn}. Básicamente, los mismos niveles de p120^{ctn} se inmunoprecipitaron con Fyn en las IEC y las IEC K-ras (figura 31B, *panel superior*), pese a que la fosforilación en tirosinas de la p120^{ctn} se estimulase en las células transfectadas con ras (figura 31B, *segundo panel*). Como consecuencia de la mejor unión de la p120^{ctn} fosforilada a la E-cadherina, más cadherina fue detectada en los inmunoprecipitados de Fyn en las IEC K-ras (figura 31B, *tercer panel*). Estos resultados sugirieron que K-ras estaba regulando la asociación entre Fyn y E-cadherina a través de la fosforilación de p120^{ctn}.

Para verificar esta conclusión, se realizaron ensayos de pull-down utilizando la GST-cytoE-cadherina como cebo, en presencia de p120^{ctn} fosforilada o no por Src. Únicamente se detectaron Fer o Fyn asociadas a E-cadherina cuando p120^{ctn} estaba presente (figura 32, *comparar carril 1 con el 2 y 3*).

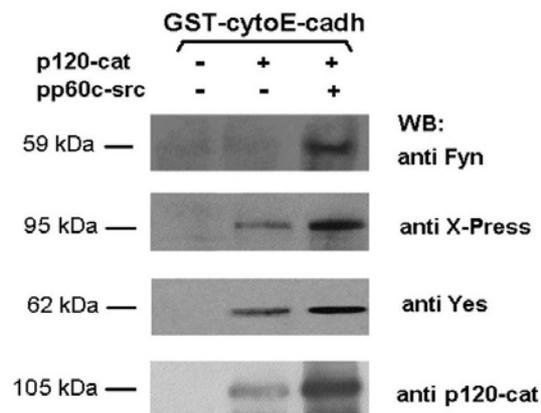


Fig 32. p120^{ctn} media la asociación de Fer y Fyn con la E-cadherina. 15 pmoles de GST-cytoEcadherina fueron incubados o no con p120^{ctn} (pre-fosforilada con pp60^{c-src} cuando se indica). Se añadieron 40 µg de extractos totales de IEC18 K-ras, transfectados con 5 µg de pcDNA3-His-Fer. Los complejos formados fueron aislados por centrifugación en presencia de glutathione-Sepharose y analizados por SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos contra Fyn, el epítipo Xpress™ de la Fer transfectada, Yes y p120^{ctn}.

En ambos casos -y especialmente en el de Fyn- la fosforilación de p120^{ctn} aumentó la asociación de las quinasas con el dominio citosólico de la E-cadherina. Estos resultados apoyaron la conclusión de que la p120^{ctn} mediaba la asociación de las quinasas Fer y Fyn con E-cadherina, reclutándolas a las uniones adherentes.

2.9.- p120^{ctn} también se une a la quinasa Yes (pero sólo a la forma activa).

El posible papel de otras tirosina-quinazas también fue examinado. Dos miembros de la familia de Src: Yes y el propio Src también se detectaron en los inmunoprecipitados de p120^{ctn} (figura 31A, *paneles inferiores*). Al menos en estas células, mayor cantidad de Yes que de Src fue detectada en los inmunocomplejos.

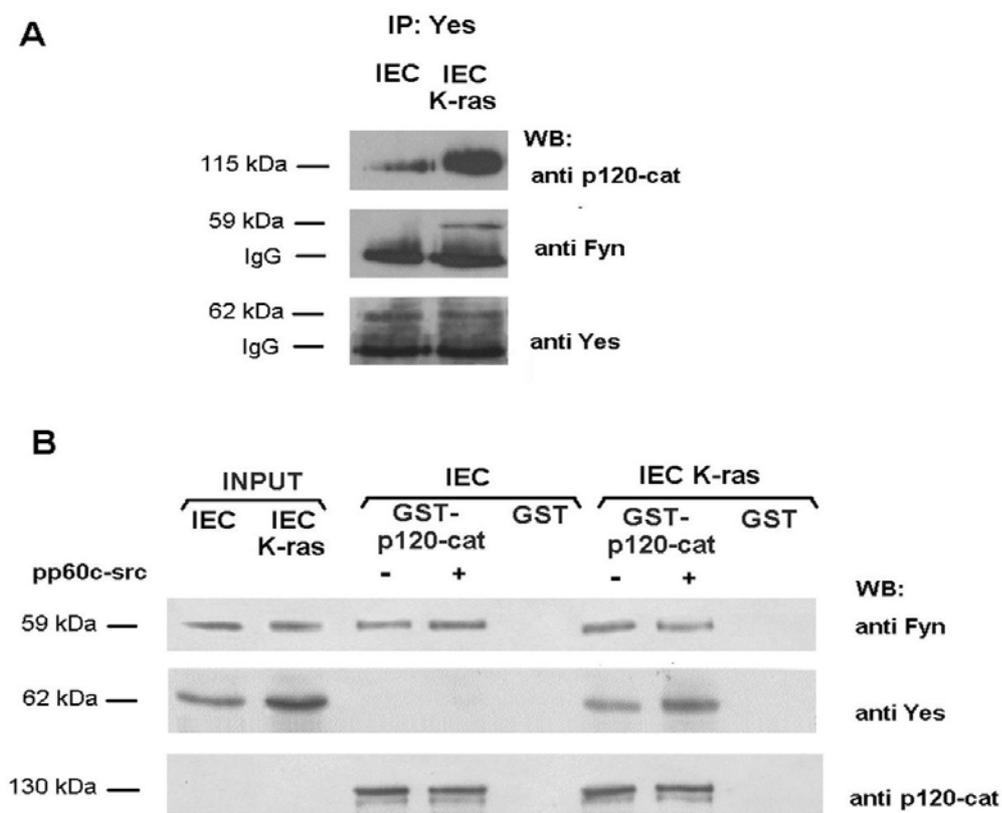


Fig 33. Yes se asocia con p120^{ctn} en las IEC K-ras. (A) Inmunoprecipitación de 300 µg de extractos totales de IEC18 e IEC18 K-ras

con anti-Yes, seguida de SDS-PAGE, Western blot e inmunodetección con los anticuerpos indicados en cada caso. (B), 11 pmoles de GST o GST-p120^{ctn} fueron fosforilados con pp60^{c-src} en las condiciones descritas en *Métodos*. Se procedió a realizar ensayos de pull-down incubando estas proteínas con 50 µg de extractos totales de IEC o IEC K-ras. Se analizó la presencia de Fyn, Yes o p120^{ctn} en los complejos formados por inmunodetección con anticuerpos específicos. En los carriles denominados *Input* se cargó un 10% de los extractos usados para los pull-down.

La asociación entre Yes y p120^{ctn} se reveló como altamente dependiente de la transfección con K-ras; siendo mucho más evidente en las IEC K-ras. Experimentos de inmunoprecipitación con anti-Yes proporcionaron más evidencias sobre la asociación entre Yes y p120^{ctn} (figura 33).

La capacidad de Yes para interactuar con p120^{ctn}, que a su vez está constitutivamente asociada a Fyn, sugería que ambas tirosina-quinazas debieran ser detectadas en un mismo complejo. Como se muestra en la figura 33A (*panel central*), Fyn se halló en los inmunoprecipitados de Yes, pero únicamente en las IEC K-ras. La interacción de Yes con E-cadherina fue observada mediante ensayos de pull-down; en este caso, el requerimiento de p120^{ctn} fue evidente, ya que en ausencia de la catenina, no pudo detectarse unión entre Yes y E-cadherina (figura 32).

Las diferencias observadas en la asociación de Yes y p120^{ctn} entre las IEC y las IEC K-ras, sugerían que modificaciones en una o ambas proteínas debían ser imprescindibles para que se diera su interacción. Para resolver esta cuestión, se llevaron a cabo ensayos de pull-down con GST-p120^{ctn}. La Yes endógena de las IEC, fue incapaz de unirse a la p120^{ctn}, independientemente de que esta última estuviese o no prefosforilada por Src (figura 33B, *panel central*). Sin embargo, la Yes quinasa de las IEC K-ras fue eficientemente retenida por la GST-p120^{ctn} (figura 33B, *panel central*). La fosforilación de p120^{ctn} incrementó levemente la cantidad de Yes unida a p120^{ctn}.

Por otro lado, Fyn se comportó de forma distinta; como se esperaba de los resultados descritos previamente, no hubo cambios significativos en la cantidad de Fyn unida a la p120^{ctn} en las distintas condiciones ensayadas (figura 32B, *panel superior*). En conjunto, modificaciones en Yes producidas tras la transfección de K-ras aparecían como necesarias para interactuar con la p120^{ctn}.

De nuestros resultados concluimos que la p120^{ctn} actúa como atractor de quinasas a las uniones adherentes permitiendo las fosforilaciones en β -catenina que provocarían su disociación de E-cadherina y α -catenina.

2.10. Yes se activa en las IEC K-ras y activa a su vez a Fyn y Fer.

Las quinasas Fyn, Fer y Yes se asocian a las uniones adherentes en condiciones en que se produce un incremento de fosforilación y la consiguiente disociación de los complejos de adhesión. Fer y Fyn además se activan en tales condiciones. Se procedió a examinar la actividad de la quinasa Yes en este mismo sistema.

La actividad de Yes era mayor cuando esta quinasa se inmunoprecipitó de las IEC K-ras (figura 34A). Resultados similares se obtuvieron cuando enolasa (figura 34B), p120^{ctn} (figura 34C) o β -catenina (no mostrado) se usaron como sustratos.

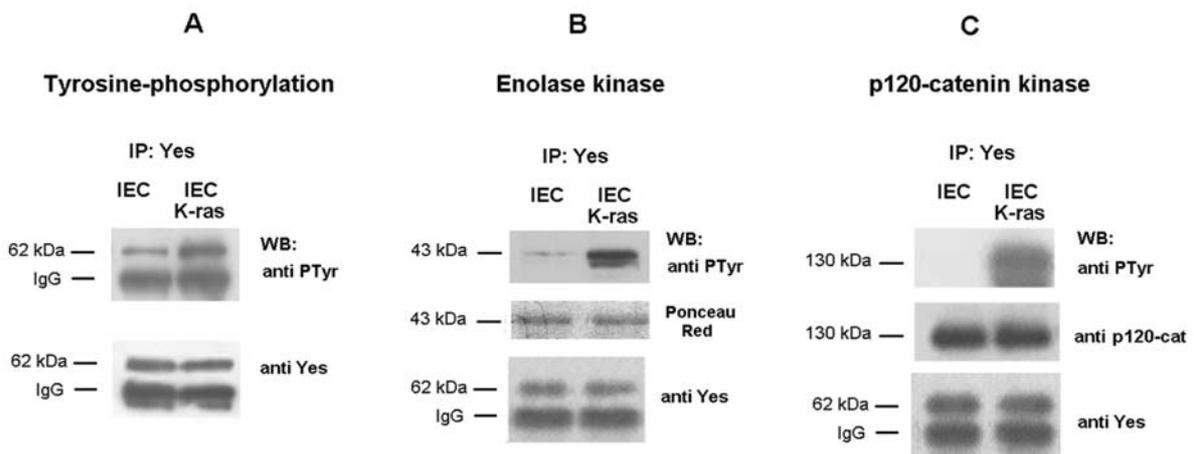


Fig 34. La quinasa Yes se activa en las IEC-K-ras. **Se inmunoprecipitaron 300 μ g de extractos totales de IEC o IEC K-ras con anti-Yes. Los inmunocomplejos fueron analizados con mAb anti PTyr (A) o sometidos a ensayos quinasa *in vitro* con 0,5 μ g de enolasa (B) o p120^{ctn} (C) como sustratos exógenos. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos contra Fosfotirosina y Yes. Para verificar que cantidades equivalentes de sustratos fueron usadas en ambos casos, se muestra la tinción con Ponceau S (A, *panel central*) o la inmunodetección con anti-p120^{ctn} (B, *panel central*).**

En consecuencia, la interacción entre Yes y p120^{ctn} se daba preferentemente cuando Yes se encuentra en forma activada (figura 33A). Como Yes activa se unía a p120^{ctn}, que está constitutivamente asociada a Fer y Fyn, era interesante examinar si Yes podía estar involucrada en la activación de estas dos quinasas. Para ello fueron transfectadas células IEC con varias formas de Yes; Fyn fue inmunoprecipitado y su capacidad para fosforilar a β -catenina exógena fue examinada (figura 35A). La transfección de Yes *wild type* incrementó modestamente la actividad de Fyn respecto a la existente en células control. El incremento de actividad de Fyn fue mucho más evidente cuando se transfectó en las mismas células una forma mutada de Yes (Tyr-535 \rightarrow Phe), constitutivamente activa, (figura 35A, *carril 3*), indicando que Yes en su forma activa provoca a su vez la activación de Fyn.

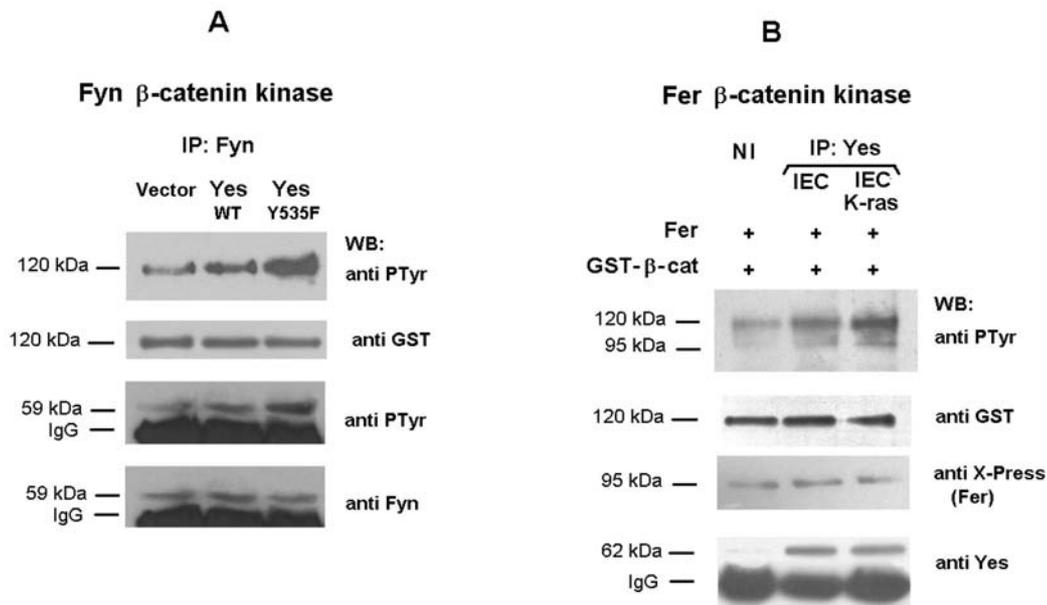


Fig 35. La quinasa Yes activada, activa a su vez a Fyn y Fer. **(A)**, células IEC18 fueron transfectadas con 5 μ g de pMIK-Neo-Yes quinasa (forma *wild type* o el mutante Tyr535 \rightarrow Phe constitutivamente activo) o 5 μ g de vector vacío como control. Tras 48 h, fueron preparados extractos celulares y 200 μ g de éstos fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-Fyn. Los inmunocomplejos fueron analizados con mAb anti PTyr o sometidos a un ensayo quinasa *in vitro* con 0,5 μ g de GST- β catenina como sustrato exógeno y se analizaron por Western blot con anticuerpos contra Fosfotirosina (PTyr) y Fyn. Muy poca fosforilación se obtuvo cuando un ensayo similar se llevó a cabo usando GST- β catenina (Y142F) como sustrato (no mostrado). **(B)**, células IEC18 fueron transfectadas con 5 μ g de pcDNA3-His-Fer quinasa.

Tras 48 h, se prepararon extractos totales y la His-Fer fue purificada por cromatografía en níquel-agarosa y eluída con 60 μ L de Lisis buffer suplementado con 200 mM Imidazol. En paralelo, 300 μ g de extractos totales de IEC18 o IEC18 K-ras fueron inmunoprecipitados con anti-Yes. Los inmunocomplejos fueron mezclados con 20 μ L de la Fer quinasa eluída e incubados 1 h a 30°C en las condiciones indicadas para los ensayos quinasa. Los sobrenadantes –conteniendo la Fer- fueron separados de los inmunocomplejos por microcentrifugación y sometidos a un ensayo quinasa con GST- β -catenina como sustrato exógeno. El grado de fosforilación en tirosinas fue analizado por Western blot anti-Fosfotirosina (PTyr). Para verificar que cantidades similares de Yes se habían inmunoprecipitado, los inmunocomplejos se analizaron por Western blot con anti-Yes. El carril denominado *No IP* corresponde a la fosforilación de β -catenina con quinasa Fer que ha estado en contacto con el control de la inmunoprecipitación de Yes (extractos de IEC18 K-ras inmunoprecipitados sin anticuerpo primario). No se observó fosforilación de β -catenina cuando Fer quinasa fue omitida en la reacción (no mostrado). Los pesos moleculares de 120 y 95 kDa del panel superior corresponden a GST- β -catenina y Fer respectivamente.

La capacidad de Yes para activar a Fer también fue analizada. Fer quinasa fue transfectada, sobreexpresada en células y purificada por cromatografía en níquel-agarosa. La Fer purificada se incubó entonces con inmunoprecipitados de Yes (en presencia todavía de anti-Yes y proteína A-agarosa) procedentes de IEC o IEC K-ras durante 1h a 30°C en condiciones de fosforilación. Yes fue descartada luego por centrifugación al tomar sólo el sobrenadante (que contiene la Fer quinasa libre). Finalmente, se normalizó la cantidad de las diferentes muestras de Fer y se ensayó la capacidad de esta Fer -que había sido preincubada con las diferentes formas de Yes- para fosforilar a β -catenina (en el panel superior de la figura 35B puede verse el grado de fosforilación de la β -catenina-GST).

Estos ensayos mostraron como la preincubación de Fer con Yes procedente de IEC18 incrementó la actividad quinasa de Fer sobre la β -catenina (figura 35B, *panel superior, comparar carriles 1 y 2*). El incremento de actividad de Fer fue aún mayor cuando Fer se preincubó con Yes activa –procedente de las IEC18 K-ras- (figura 35B, *panel superior, carriles 1 y 3*).

En conjunto, la activación de Yes conlleva la activación de Fer y Fyn.

3.- La fosforilación de β -catenina modifica su estructura y su interacción con otros factores.

Identificados los residuos de β -catenina (tirosinas 654 y 142) cuya fosforilación regula la interacción de la proteína con E-cadherina y α -catenina respectivamente, e identificadas las quinasas responsables, nos interesamos por saber si la fosforilación estaba afectando a la conformación de β -catenina y la unión a sus múltiples factores.

Diversas zonas de β -catenina localizadas en los extremos N- y C-terminal habían sido descritas como involucradas en activación transcripcional (Hsu et al. 1998; Hecht et al. 1999). El extremo C-terminal de β -catenina, fusionado a LEF-1, es suficiente para promover transactivación de genes (Hsu et al. 1998). Aunque el mecanismo concreto que lleva hasta la activación génica no se conoce completamente, se sabe que los extremos N- y C-terminal de la catenina interaccionan con una lista creciente de factores nucleares que incluyen a la proteína de unión a la caja TATA (TBP) (Hecht et al. 1999), la pontina (Bauer et al. 1998), Teashirt (Gallet et al. 1999), Sox 17 y 13 (Zorn et al. 1999), la histona deacetilasa (Billin et al. 2000), SMAD4 (Nishita et al. 2000), el receptor de ácido retinoico (Easwaran et al. 1999), o la proteína de unión a CREB y proteínas relacionadas (Takemaru et al. 2000; Hecht et al. 2000; Sun et al. 2000; Miyagishi et al. 2000). Uno de los papeles esenciales del complejo β -catenina-Tcf-4 consiste en reclutar a la maquinaria basal de transcripción hacia los promotores de los genes sensibles a la activación de la ruta de señalización de Wnt. Un componente esencial de este complejo transcripcional es TBP, que interacciona con dos dominios distintos de β -catenina necesarios para la transactivación (Hecht et al. 1999).

Como se ha comentado, la fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina disminuye la interacción E-cadherina- β -catenina. Como este residuo se encuentra en uno de los dominios de β -catenina que interaccionan con TBP (Hecht et al. 1999), se procedió a investigar el posible papel que esta fosforilación pudiera tener en la interacción entre β -catenina y TBP.

3.1.- Interacción β -catenina-TBP *in vitro*.

Se realizaron ensayos de pull-down con distintas formas de GST- β -catenina (*wild type* y mutantes puntuales) fosforiladas o no por Src. Como puede apreciarse en la figura 36, la fosforilación de β -catenina con Src incrementó en gran medida su interacción con la TBP (comparar *carriles 6 y 7*). De resultados previos sabemos que Src sólo modifica las tirosinas 86 y 654 de β -catenina (ver figura 19A). El estudio del comportamiento de los mutantes puntuales de ambas tirosinas a fenilalanina, mostró que sólo la fosforilación del residuo 654 favorecía la interacción con la TBP; así por ejemplo, el mutante Y86F fosforilado por Src se comporta de forma similar a la forma *wild type* fosforilada, incluso un poco menos (*carriles 3 y 7*).

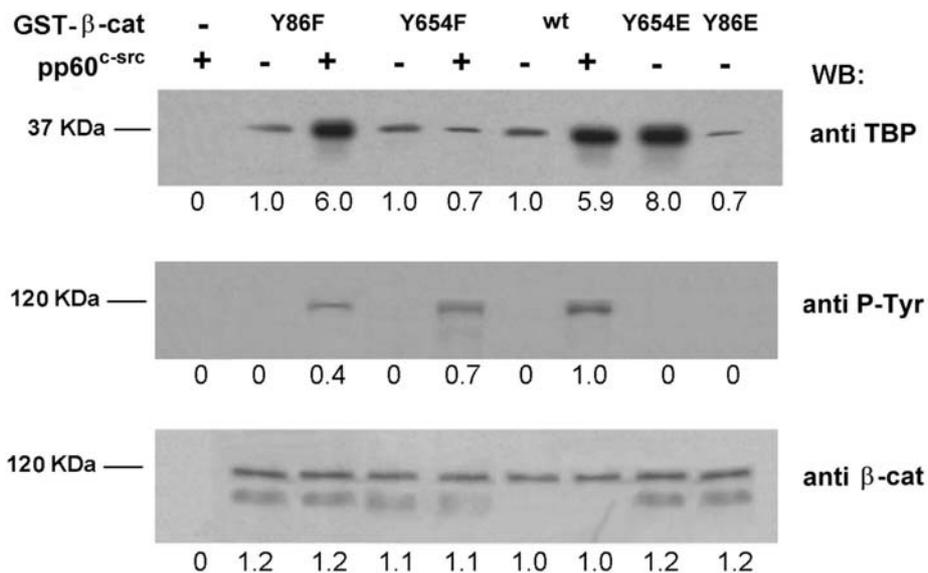


Fig 36. La fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina, aumenta la interacción entre β -catenina y TBP. 11 pmoles de GST o GST- β -catenina se fosforilaron con pp60^{c-src} en las condiciones descritas en *Métodos*. Se realizaron ensayos de pull-down incubando las proteínas conteniendo GST con 50 μ g de extractos totales de células SW-480. Los complejos formados fueron purificados en glutathione-Sepharose y se analizaron en SDS-PAGE seguida de Western blot con los anticuerpos indicados. Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a los proporcionados por el análisis densitométrico de las películas fotográficas. En cada caso se toma un valor de referencia, *carril 6 o 7 según el caso*, y los demás valores se refieren a él. En el panel anti- β -catenina, sólo se encuentra la banda superior; la banda inferior corresponde a un producto de degradación ocasionalmente observado en nuestras preparaciones, que no interfiere en el ensayo.

Para confirmar estas observaciones, también se determinó la interacción entre la TBP y los mutantes de ambas tirosinas a glutámico (sustitución que imita la fosforilación). β -catenina Y654E interaccionó mucho mejor con TBP que la forma *wild type* (carriles 6 y 8). En consecuencia, la introducción de una carga negativa en la posición 654 favorece la unión de β -catenina a TBP.

3.2.- Interacción β -catenina-TBP *in vivo* y análisis de los niveles de transcripción mediada por β -catenina-Tcf-4.

Se procedió a comprobar este efecto en células y se escogió para estos ensayos la línea celular SW-480 porque estas células contienen muy poca E-cadherina y la mayoría de β -catenina no se encuentra asociada a membrana. Las células fueron transfectadas transitoriamente con β -catenina *-wild type* o el mutante Tyr654→Glu-, ambas en pcDNA3.1/His de forma que las proteínas se expresan con cola de histidinas y el epitopo Xpress™ para facilitar su purificación y posterior reconocimiento. La purificación de los productos transfectados se llevó a cabo con níquel-agarosa y los complejos proteicos purificados fueron analizados mediante Western blot con anticuerpos específicos (figura 37A).

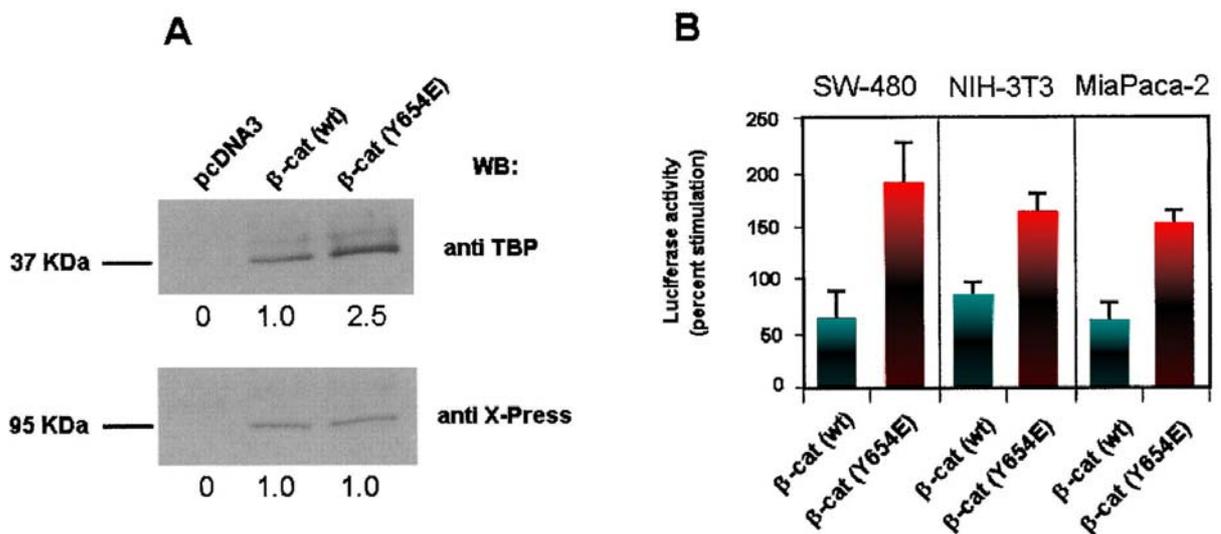


Fig 37. β -catenina Tyr654→Glu interacciona mejor con TBP e incrementa la transcripción mediada por Tcf-4 en mayor medida que la β -catenina *wild type*. (A) Asociación *in vivo* entre β -catenina y TBP. Se transfectaron células SW-480 con 5 μ g de pcDNA3-His- β catenina (*wild type* -wt-, o el mutante Tyr654→Glu) o vector vacío como

control. Tras 48 h, se prepararon extractos celulares y la His- β -catenina fue purificada en níquel-agarosa. Las muestras se procesaron por SDS-PAGE y Western blot. La TBP asociada a β -catenina en cada caso fue detectada con anticuerpo contra TBP. La membrana se estripó y reanalizó con anti-Xpress™ -epítipo que contienen los transgenes- para verificar que niveles similares de expresión de los transgenes se daban en las distintas muestras. Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a los proporcionados por el análisis densitométrico de las películas fotográficas. (B) Análisis de la transcripción mediada por Tcf-4 en células transfectadas con β -catenina (*wild type* o Tyr654→Glu). Fibroblastos NIH-3T3, células SW-480 y MiaPaca-2 fueron cotransfectadas con los plásmidos de β -catenina (150 ng), TOP-FLASH-*Firefly luciferase* (20 ng), y pTK-*Renilla luciferase* (20 ng). Tras 48 h, se determinó la actividad luciferasa relativa de cada muestra como se describe en el apartado de *Métodos*. Los niveles de actividad se refirieron a los de las células transfectadas con pcDNA.3 sólo. Los segmentos indican la desviación estándar de tres o cuatro transfecciones independientes.

Como se muestra en la figura, la TBP se asocia *in vivo* mejor con el mutante Y654E que con la β -catenina *wild type*. Además, esta mayor asociación se correlaciona con una mayor estimulación de la transcripción mediada por el complejo β -catenina-Tcf-4. La sobreexpresión de β -catenina *wild type* en células SW-480 indujo un incremento significativo (de un 60% respecto a las mismas células no transfectadas con β -catenina) en la actividad de un gen *reporter* situado bajo el control de un promotor sensible a β -catenina-Tcf-4 (sistema *TOP reporter*; Korinek et al. 1997). La expresión del mutante Y654E de β -catenina, aumentó aún más la actividad del promotor (un 194% respecto a las células no transfectadas con β -catenina) (figura 37B, *panel izquierdo*). Resultados similares fueron obtenidos en otras líneas celulares (Fig 37B, *paneles central y derecho*).

3.3.- La fosforilación regula la unión del dominio C-terminal con el dominio central de β -catenina y por extensión, la interacción de β -catenina a distintas proteínas.

Como hemos visto, la fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina tiene efectos opuestos sobre la interacción de β -catenina con E-cadherina y con TBP. Se investigaron las bases estructurales de estas diferencias.

Como ya se comentó en la *Introducción*, en β -catenina se distinguen tres regiones principales. Estos dominios tienen una distribución de cargas distinta: los extremos N- y C-terminal, son ácidos, con un pI cercano a 4,5; mientras que

el dominio central de repeticiones armadillo, es básico, con un pI de 8,3 (Huber et al. 1997b). Por ello pensamos en la posibilidad que el dominio C-terminal interaccionase con el dominio armadillo.

Interacción de los dominios terminales con la región central de β -catenina. Para analizar esta posible interacción, se generaron fragmentos de los diferentes dominios de β -catenina. Mediante ensayos de interacción con proteínas recombinantes, se procedió a estudiar la interacción entre el dominio central armadillo (aminoácidos 138-683) y los extremos N-terminal (aminoácidos 1-106) y C-terminal (aminoácidos 696-782) (figura 38).

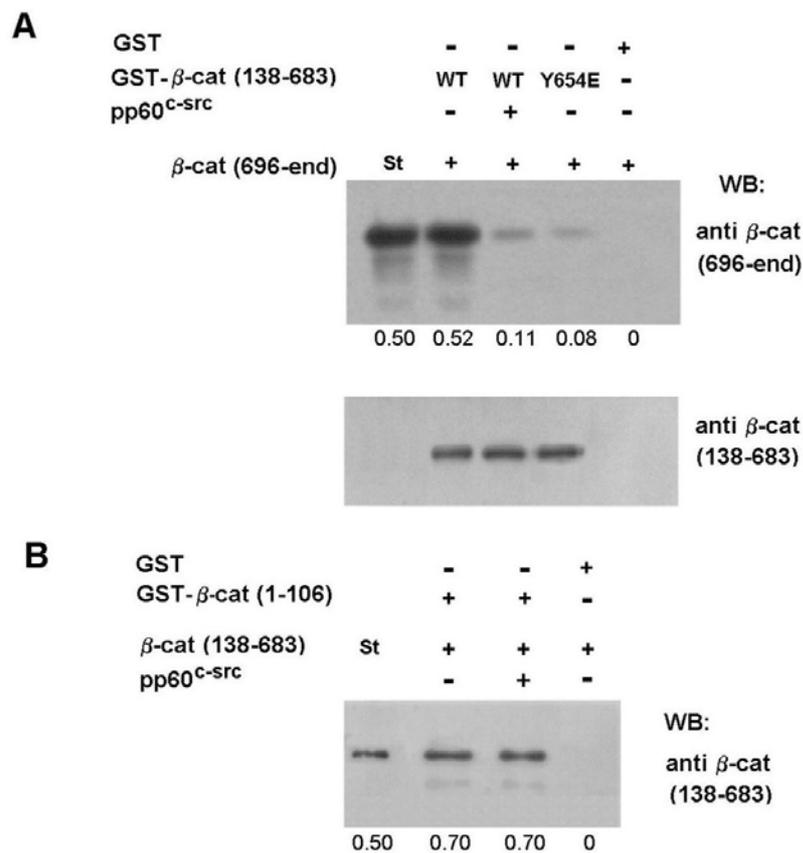


Fig 38. La fosforilación del residuo 654 de β -catenina inhibe la asociación de la cola C-terminal con el dominio central de repeticiones armadillo. 9 pmoles de proteínas de fusión con GST conteniendo las formas de β -catenina que se indican, fueron incubadas con 30 pmoles de dominio C-terminal (696-782) en las condiciones descritas en *Métodos* (A y B). (C) Se determinó la interacción del dominio armadillo con el N-terminal incubando 8 pmoles de GST- β catenina-Nter(1-106) con 2 pmoles de dominio armadillo (β catenina 138-683). Las muestras se procesaron como se describe en los *Métodos*. Se utilizaron dos anticuerpos que reconocen distintas zonas de β -catenina (la 696-*end* o la 138-

683). Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a los proporcionados por el análisis densitométrico de las películas fotográficas

Tanto el dominio N- como el C-terminal interaccionaron con el dominio armadillo, aunque el dominio N-terminal con menor afinidad. La fosforilación del dominio armadillo de β -catenina por Src disminuyó la interacción entre el dominio C-terminal y el armadillo (figura 38A, *carriles 2 y 3*) pero no afectó a la unión del central con el N-terminal (figura 38B). La única tirosina que fosforila Src en el dominio armadillo es la 654 y consecuentemente, el dominio C-terminal también interaccionó mejor con el dominio armadillo *wild type* que con el dominio armadillo con la mutación Tyr-654→Glu (figura 38A, *carriles 2 y 4*).

Una interpretación de estos resultados es que, en su conformación nativa, β -catenina esté plegada con sus extremos interaccionando con la región central. La fosforilación de la tirosina 654, anularía esta interacción y liberaría la cola C-terminal. Para validar este modelo, se llevaron a cabo experimentos de proteólisis limitada de β -catenina con tripsina. Se realizó un seguimiento en el tiempo de la desaparición del extremo C-terminal, analizando las muestras por Western blot utilizando un anticuerpo que sólo reconoce el extremo C-terminal intacto (figura 39).

Como se muestra en la figura, el mutante Tyr-654→Glu presenta mayor susceptibilidad a la proteólisis que la β -catenina *wild type*. Una degradación más rápida se observa también cuando β -catenina es fosforilada con Src antes del tratamiento con tripsina (*panel central*). Patrones muy similares al de la β -catenina *wild type* se obtuvieron digiriendo el mutante Tyr-86→Glu, descartando así posibles efectos de la fosforilación del residuo 86 en nuestro ensayo (no mostrado).

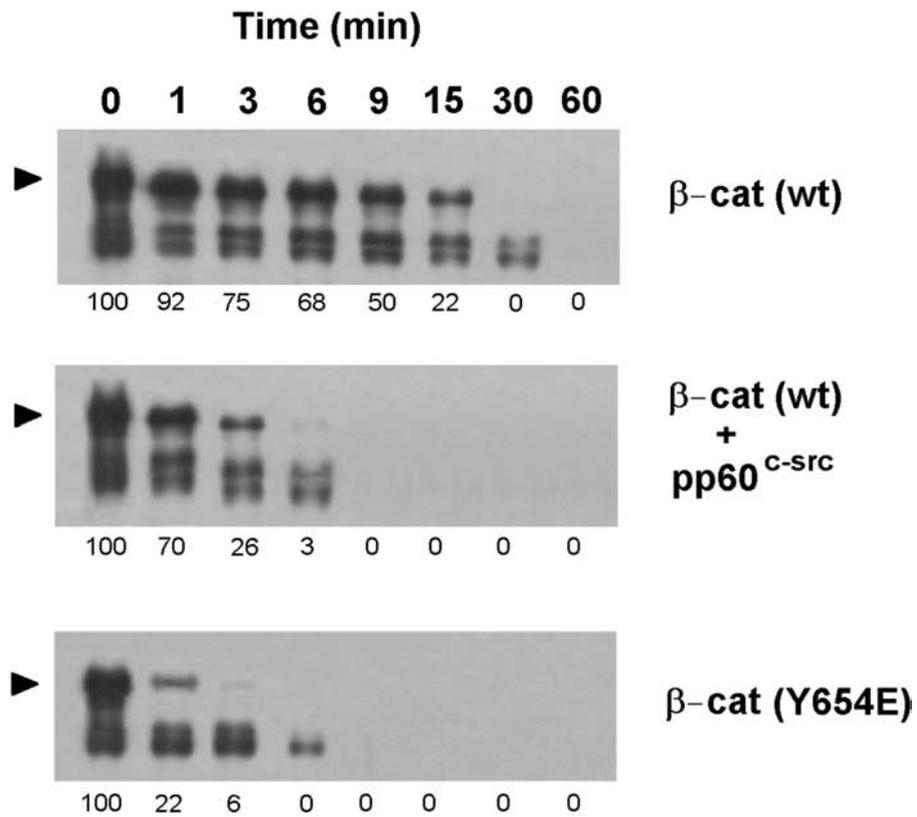


Fig 39 **Seguimiento de la estabilidad global de diferentes formas de β -catenina por su sensibilidad a la proteólisis.** 1 μ g de β -catenina (*wild type*, fosforilada por pp60^{C-src} o el mutante Tyr654 \rightarrow Glu) se incubaron con 60 ng de tripsina a 24°C. Las reacciones se detuvieron a distintos tiempos con tampón de electroforesis y se analizaron por SDS-PAGE seguida de Western blot con anticuerpo contra el C-terminal de β -catenina. Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a los proporcionados por el análisis densitométrico de las películas fotográficas. Sólo la banda superior (señalada por las puntas de flecha) y correspondiente a la proteína entera, es considerada.

La interacción entre el dominio central y el C-terminal afecta a la asociación de β -catenina con otras proteínas. El dominio de interacción de β -catenina con E-cadherina, TBP o el Tcf-4 se localiza en el dominio central de repeticiones armadillo de β -catenina. Para comprobar si la interacción entre el dominio de repeticiones armadillo y el extremo C-terminal de β -catenina afectaba a la asociación con estas proteínas, se llevaron a cabo ensayos de interacción con proteínas recombinantes.

La asociación entre el dominio citosólico de E-cadherina y el dominio armadillo de β -catenina, fue inhibido por la adición de un exceso de dominio C-terminal, indicando que ambos polipéptidos compiten por la interacción a una misma zona del dominio armadillo (figura 40A).

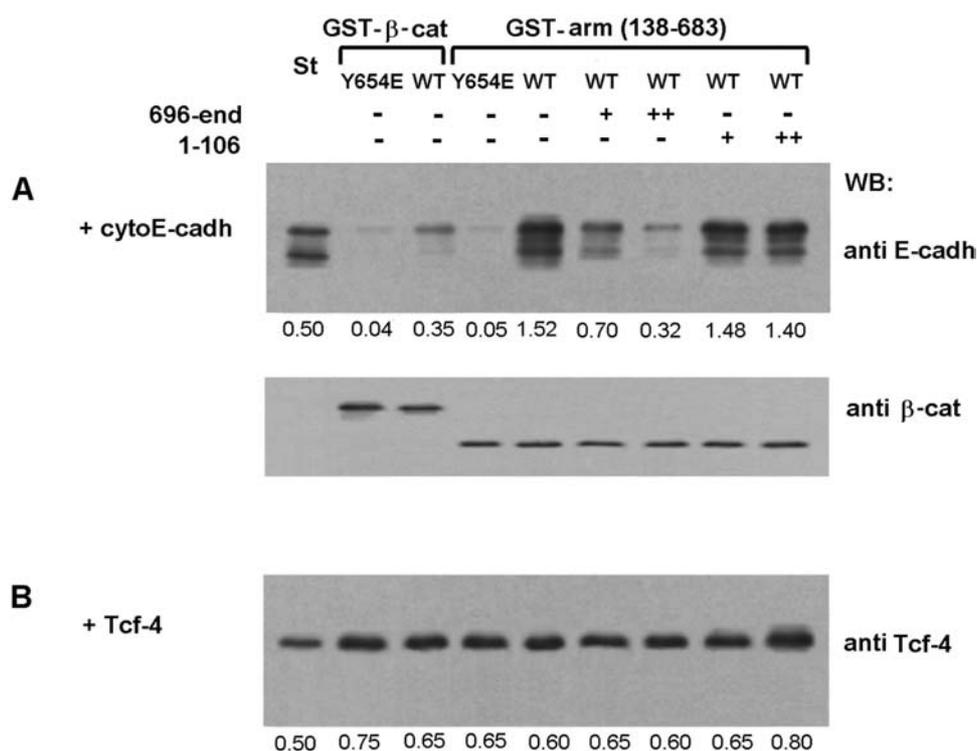


Fig 40. El extremo C-ter de β -catenina (pero no la N-ter) dificulta la interacción del dominio armadillo de β -catenina con E-cadherina. 0,7 pmoles de proteínas de fusión con GST (β -catenina o el dominio armadillo 138-683) fueron incubadas con 3 pmoles de dominio citosólico de E-cadherina (*panel A*) o Tcf-4, residuos 1-80 (*panel B*). Cuando se indica, 26 y 52 pmoles de β catenina-Cter(1-106) o 22 y 44 pmoles de β catenina-Nter(1-106) fueron añadidos a las reacciones. La cantidad de E-cadherina o Tcf-4(1-80) asociados se determinó como en la figura anterior usando anticuerpos específicos contra estas dos proteínas. Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a los proporcionados por el análisis densitométrico de las películas fotográficas en comparación con patrones internos de concentración conocida (*carriles denominados St*).

Por el contrario, la adición de la construcción del N-terminal, no afectó a la asociación entre β -catenina y E-cadherina. Además, E-cadherina interaccionó mejor con el dominio armadillo de β -catenina que con una cantidad equimolar de β -catenina *wild type*, ahondando en la idea de que la ausencia del dominio C-terminal facilitaría la unión entre β -catenina y E-cadherina (figura 40A). El dominio central, en ausencia del C-terminal, con una carga negativa en dicha posición (mutante Y654E) presentó aún menos interacción -prácticamente indetectable- (figura 40A, *carril 4*). Estos resultados indicaron que la fosforilación de la Tyr-654 de β -catenina respecto a la unión a E-cadherina, por un lado favorecería la interacción por el hecho de retirar al dominio C-terminal, pero por otro lado -este efecto con mayor fuerza- la carga negativa que introduce la fosforilación anularía prácticamente la asociación entre E-cadherina y β -catenina.

Por otra parte, la interacción del Tcf-4 con el dominio central de β -catenina no fue modificada significativamente por la adición de ninguno de los extremos de β -catenina (figura 40B).

Ensayos similares se realizaron con los distintos fragmentos de β -catenina y la TBP. Estos experimentos mostraron que la TBP interacciona únicamente con el dominio central (no se pudo detectar asociación con el dominio C-terminal, residuos 696-782) de β -catenina y la cola C-terminal dificulta la asociación entre β -catenina y TBP (figura 41).

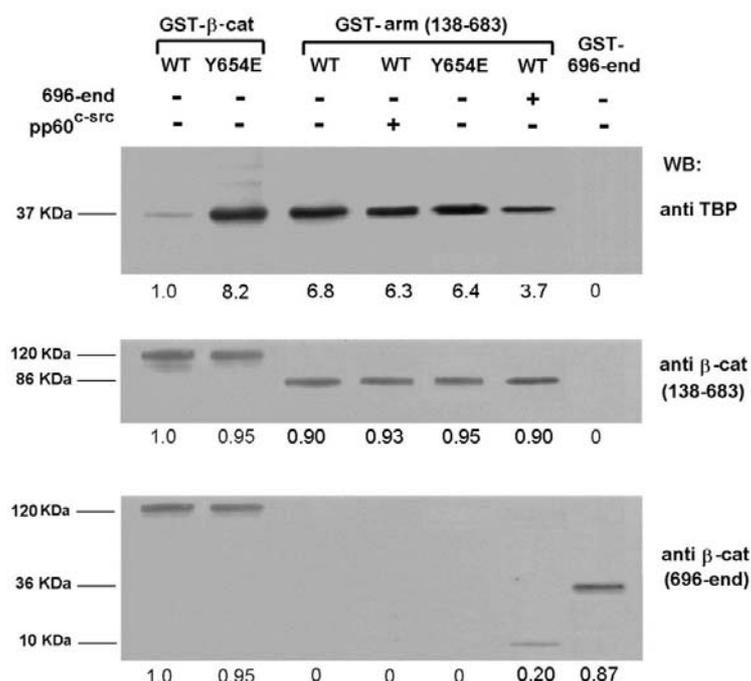


Fig 41. **El extremo C-terminal de β -catenina, dificulta la interacción del dominio armadillo con la TBP.** 10 pmoles de proteínas de fusión con GST conteniendo los dominios de β catenina que se indican (*wild type* o Y654E (Tyr-654→Glu)) fueron fosforilados por pp60^{C-src} o incubados con 100 pmoles de β catenina-Cter (aá. 696-782). Las proteínas unidas fueron purificadas con glutathione-Sepharose e incubadas con 50 μ g de extracto celular total de SW-480. La TBP asociada fue analizada como en la figura anterior seguida de inmunodetección con los anticuerpos que se indican. Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a los proporcionados por el análisis densitométrico de las películas fotográficas.

Independientemente de la presencia del dominio C-terminal, la fosforilación de la tirosina 654 (o su mimetización por el mutante Y654E), no afectó a la interacción de la TBP con el dominio armadillo de β -catenina (figura 41, carriles 3, 4 y 5). Estos resultados indicaron que los cambios en la interacción entre TBP y β -catenina tras la fosforilación de la tirosina 654, se deben básicamente a la liberación del dominio C-terminal del *core* central de β -catenina permitiendo un mejor acceso para TBP. La presencia de la carga negativa en la posición 654 no afectaría a la unión.

En conjunto, aunque TBP y E-cadherina interactúan con un mismo dominio de β -catenina y la presencia o no de extremo C-terminal les afecta de forma similar, su comportamiento frente a la fosforilación del residuo 654 es bien distinto. Esto sugirió que ambas proteínas interactuarían espacialmente

en distintos lugares de β -catenina. Como había sido propuesto, E-cadherina debe interactuar directamente en la zona de la tirosina 654, mediante el establecimiento de pares iónicos. La fosforilación del 654 afecta de forma fatal al equilibrio de cargas establecido y se produce la disociación entre ambas proteínas. La TBP, interactuaría en la misma región (por eso la presencia o no del C-terminal le afecta) pero en una zona o superficie distinta, más alejada de la tirosina 654, sin establecer interacción de carga con ella, de forma que la fosforilación del 654 no tiene efectos directos sobre su interacción con β -catenina. Para explorar estas posibilidades, se analizó la interacción entre β -catenina entera (residuos 1-782) o el dominio armadillo de β -catenina (residuos 138-683) con la TBP en presencia o no de un exceso (x10 molar) de cyto-E-cadherina.

Como se muestra en el panel superior de la figura 42, y tal y como ya habíamos visto, la TBP interactúa mejor con el dominio armadillo aislado de β -catenina (*carril 3*) que con la β -catenina entera (*carril 1*). La adición de E-cadherina no sólo no afectó negativamente a la unión entre TBP y β -catenina entera sino que facilitó esta interacción (comparar *carriles 1 y 2*). La adición de E-cadherina en las reacciones donde interactuaban el dominio citosólico aislado de β -catenina y la TBP, no produjo diferencias significativas (comparar *carriles 3 y 4*).

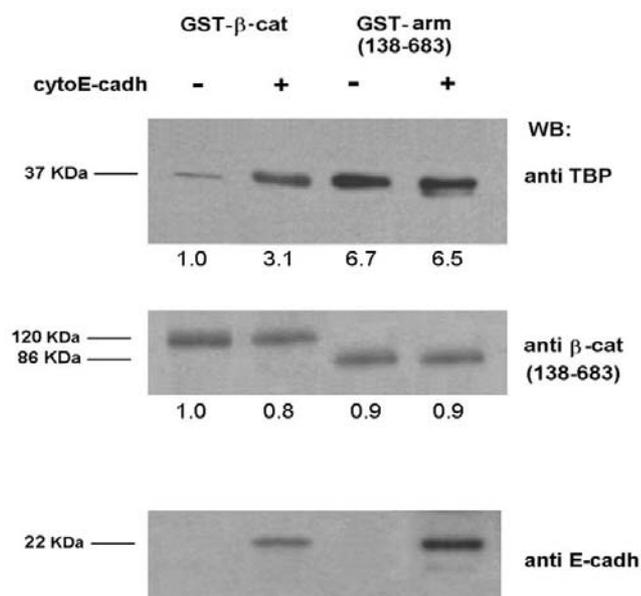


Fig 42. **La cyto-E-cadherina facilita la unión de la TBP a la β -catenina.** 10 pmoles de proteínas de fusión con GST conteniendo los dominios de β catenina que se indican (*wild type* o Tyr654→Glu) fueron fosforilados por pp60^{c-src} o incubados con 100 pmoles de cyto-Ecadherina. Las proteínas unidas fueron purificadas con glutathione-Sepharose e incubadas con 50 μ g de extracto celular total de SW-480. La TBP asociada fue analizada como en la figura anterior seguida de inmunodetección con los anticuerpos que se indican. Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a los proporcionados por el análisis densitométrico de las películas.

Estos resultados confirman que, E-cadherina y TBP se asocian a una misma zona lineal de β -catenina. Ambas pueden hacerlo simultáneamente por lo que deben hacerlo espacialmente en distintas caras del dominio armadillo de la catenina. Más aún, la unión de E-cadherina, un cofactor de alta afinidad por β -catenina, separa o modifica la interacción, al menos parcialmente, del dominio C-terminal con el dominio armadillo permitiendo el acceso de otros cofactores, en este caso la TBP, cuya unión a β -catenina se veía impedida por la presencia del dominio C-terminal.

Estos resultados nos permitieron plantear un modelo de regulación de la unión de factores a β -catenina por los extremos terminales de la proteína. Los dominios terminales de β -catenina restringen físicamente la unión de algunos factores. La unión de una proteína de alta afinidad, compite con los extremos en la interacción con el dominio armadillo. Una vez que estos extremos han sido desplazados, la unión posterior de otras proteínas al dominio armadillo está facilitada siempre que no se presenten impedimentos estéricos con la primera.

V. DISCUSIÓN

1. Interacción β -catenina-E-cadherina.

El presente trabajo se enmarca dentro de un proyecto cuyo objetivo general consiste en determinar los mecanismos que regulan la formación y desensamblaje de las uniones adherentes en la célula. A este respecto hemos demostrado la importancia que tiene la fosforilación en residuos tirosina de β -catenina en la regulación de la interacción cadherina/cateninas.

Anteriormente, varios estudios habían asociado el desensamblaje de las uniones adherentes con la pérdida de los contactos célula-célula y el aumento de la fosforilación en tirosinas de proteínas del complejo cadherina/cateninas (Behrens et al. 1993; Kinch et al. 1995; Ozawa y Kemler, 1998a). Induciendo la expresión de oncogenes como v-src o ras o tratando las células con vanadato, inhibidor de tirosina-fosfatasa, estos autores observaban la pérdida de los contactos intercelulares, la desagregación celular y un aumento de fosforilación en tirosinas de diversas proteínas de los complejos de unión. Entre estas proteínas, los cambios más relevantes habían sido detectados en β -catenina; se había asumido que el incremento en la fosforilación en tirosinas de esta proteína era la causa de la pérdida de función de la cadherina. Sin embargo, al inicio de esta tesis, todavía no se había podido establecer una relación concluyente e incluso se habían propuesto explicaciones alternativas (Takeda et al. 1995).

En esta tesis, se muestra que la fosforilación en tirosina de β -catenina afecta negativamente a su asociación con la E-cadherina en ensayos utilizando proteínas recombinantes (ver figura 15 y tabla VI), evidenciando una relación directa causa-efecto. Se ha identificado la tirosina implicada en la regulación de esta interacción (ver figuras 20 y 21) y se ha demostrado que la modificación de este residuo altera la asociación entre E-cadherina y β -catenina *in vivo* en células Caco-2. Asimismo, la Tyr-654 es uno de los residuos de β -catenina que se fosforilan al tratar estas células con ortovanadato sódico –inhibidor de tirosina fosfatasa- (ver figura 22).

En los ensayos *in vitro*, la fosforilación de β -catenina se ha llevado a cabo por la tirosina quinasa pp60^{C-src} (ver figura 14). Su homólogo viral, pp60^{V-src},

había sido implicado en la fosforilación de β -catenina en células MDCK y en el desensamblaje de las uniones adherentes y pérdida de función de la E-cadherina (Behrens et al. 1993). La estequiometría de la incorporación de fosfato en β -catenina por parte de pp60^{c-src} indica que más de un residuo de β -catenina está siendo fosforilado (ver figura 14B). Los resultados expuestos en este trabajo indican que pp60^{c-src} fosforila a β -catenina en dos tirosinas, identificadas como las tirosinas 86 y 654 (ver figura 19) pudiendo ser la quinasa responsable de la fosforilación e inactivación de la β -catenina. Sin embargo, no se puede descartar que otra quinasa sea la responsable de la fosforilación de la tirosina 654. A este respecto, hay que recordar que las dos tirosinas modificadas *in vitro* por pp60^{c-src} -la 86 y la 654- no son fosforiladas con la misma eficiencia; es posible que pp60^{c-src} esté catalizando la fosforilación directa de la Tyr-86 pero no de la Tyr-654. Otras quinastas que se han encontrado asociadas a β -catenina, como la quinasa FER, el receptor de EGF o su homólogo erbB2, eran posibles candidatos para la fosforilación del residuo 654 (Rosato et al. 1998; Shibamoto et al. 1994; Shibata et al. 1996; respectivamente). En nuestras manos, en ensayos quinasa *in vitro*, tan sólo el EGFR recombinante y erbB2 fosforilan con alta eficiencia la tirosina 654 de β -catenina (ver figura 23).

La tirosina 654 se encuentra en la duodécima y última repetición armadillo de β -catenina (Peifer et al. 1994). La estructura de las repeticiones es muy rígida y consiste en una superhélice alargada formada íntegramente por hélices α que dejan un surco cargado positivamente (Huber et al. 1997b). Los 30 aminoácidos del dominio citosólico de E-cadherina suficientes para unir a la β -catenina, son ácidos (pI de 3,3) (Shapiro, 2001). Se había propuesto que la interacción entre β -catenina y E-cadherina estaría dominada por la formación de pares iónicos en una extensa región.

Durante la realización de esta tesis ha sido determinada la estructura tridimensional del complejo E-cadherina- β -catenina (Huber and Weis, 2001). De este estudio se desprende que la interacción entre el dominio citosólico de la E-cadherina y el dominio central de β -catenina se da en una amplia zona. Los cien residuos de la fracción citoplásmica de la cadherina rodean prácticamente la totalidad de las doce repeticiones del dominio armadillo de la

catenina, estableciéndose cinco subregiones puntuales de mayor acercamiento entre ambas proteínas y de interacción cuasi-independiente. El análisis de los cristales obtenidos

muestra que, la tirosina 654 de β -catenina es uno de los residuos de β -catenina que establecen uniones directas –bien por puente de hidrógeno o salino- con residuos de cadherina. Esta tirosina forma un puente de hidrógeno directamente con el aspártico 665 de la E-cadherina. Es fácil pensar que la introducción de un grupo fosfato en la posición 654 de β -catenina, causaría la disociación de la estructura, ya que el grupo fosfato es excesivamente grande para ser acomodado en la interfase, y repelería electrostáticamente al aspártico 665 de la cadherina (Huber and Weis, 2001).

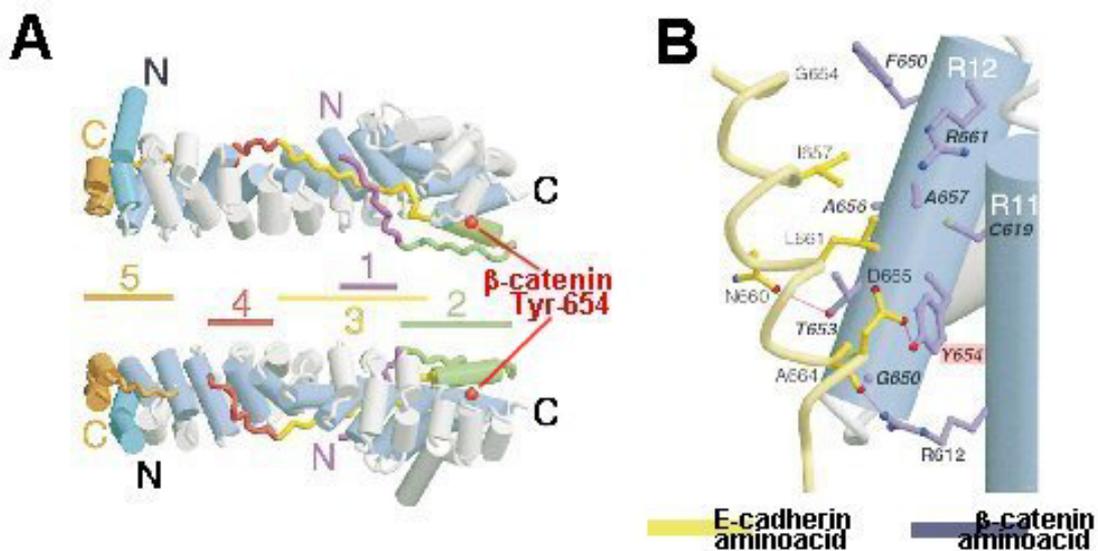


Fig 43. **Estructura global del complejo cito-Ecadherina/β-catenina y detalle de la zona de la tirosina 654 de β-catenina.** (A) Estructura global del complejo visto desde dos ángulos distintos: β-catenina se representa con cilindros azules y blancos mientras que el dominio citosólico de E-cadherina se muestra como una cinta coloreada donde cada color marca una subregión distinta. Los extremos N y C terminales de cada proteína se indican así como la posición de la tirosina 654 de β-catenina. (B) Detalle de la región de interacción denominada II donde se indican en violeta los aminoácidos de β-catenina que establecen uniones con residuos de E-cadherina –en amarillo-. Se destaca en rojo pálido la posición de la tirosina 654. Los puentes de hidrógeno y salinos se muestran como líneas rosadas. (Adaptado de Huber and Weis, 2001).

2. Interacción β -catenina- α -catenina.

La fosforilación de β -catenina se correlaciona con la pérdida de contactos celulares y con el aumento de la concentración de β -catenina libre en el citosol (Behrens, 1993; Ozawa and Kemler, 1998a; Müller et al. 1999). Para ser transportada al núcleo y actuar como coactivador transcripcional, se requiere la disociación de los complejos de la β -catenina; es decir, no sólo con E-cadherina sino también con α -catenina (Orsulic et al. 1999; Giannini et al. 2000).

La tirosina 142 es la única tirosina de β -catenina situada en la zona de interacción con α -catenina. Estudios previos de mutagénesis secuencial mostraron que su sustitución por alanina alteraba la afinidad entre β -catenina y α -catenina, mientras que el cambio conservativo a fenilalanina no modificaba la unión entre ambas proteínas (Aberle et al. 1996). La resolución por difracción de rayos X de la estructura de una quimera consistente en el dominio de β -catenina que interacciona con α -catenina fusionada al dominio N-terminal de esta última (Pokutta and Weis, 2000), muestra que la tirosina 142 de β -catenina establece interacciones de puente de hidrógeno o contactos de van der Waals con diversos residuos de α -catenina y también con el aspártico 144 y el glutámico 147 de β -catenina. La Tyr-142 se sitúa justo antes de la primera α -hélice de la primera repetición armadillo que comienza en el residuo 145 y se extiende hacia el extremo C-terminal (Pokutta and Weis, 2000).

La posición del grupo hidroxilo de la tirosina 142, muy próximo a dos residuos ácidos, hace muy probable que la introducción del grupo fosfato con su consiguiente carga negativa afecte negativamente al mantenimiento de la estructura y a la interacción con α -catenina (ver figura 44).



Fig 44. **Interacción entre α -catenina y β -catenina.** (A) Representación esquemática de la quimera $\beta\alpha$ -cat. En rojo se representa la β -catenina (completada con la información de Huber et al. 1997b). El punto azul marca la tirosina 142. En amarillo se representa la región N-terminal de α -catenina. (B) Detalle de la zona de interacción entre α -catenina (en amarillo) y β -catenina (en rojo). Recuadrada en verde se destaca la tirosina 142 de β -catenina. α y β indica que dichos aminoácidos son respectivamente de α -catenina y β -catenina (adaptado de Pokutta and Weis, 2000).

En este trabajo, se han generado mutantes de β -catenina en los que se ha sustituido la tirosina 142 por fenilalanina o glutámico, y se ha ensayado *in vitro* la capacidad de diversas quinasas para fosforilar la forma nativa y mutada de β -catenina (ver figura 25). De esta manera hemos detectado dos tirosina quinasas solubles que pueden modificar el residuo 142; las quinasas Fer (de *Fps/Fes*-related) y Fyn (miembro de la familia de Src). Ambas están ampliamente expresadas en tejido epitelial, y han sido implicadas en la fosforilación de β -catenina y la regulación de los contactos celulares (Rosato et al. 1998; Owens et al. 2000). Entre ellas, Fer presenta una mayor especificidad, fosforilando exclusivamente a β -catenina en la posición 142. Fyn además fosforila, aunque con muy baja eficiencia la tirosina 654.

Mediante ensayos de interacción con proteínas recombinantes, fosforilando β -catenina con Fer o bien simulando la fosforilación de β -catenina en la posición 142 mediante mutación a glutámico (Tyr-142 \rightarrow Glu), se consigue

bloquear completamente la unión entre β -catenina y α -catenina (ver figura 26). Estos datos confirmaban, efectivamente que la interacción entre β -catenina y α -catenina podía ser regulada por fosforilación de la tirosina 142 de β -catenina. Efectos similares se detectan *in vivo*; células epiteliales RWP1 transfectadas transitoriamente con Fer o Fyn muestran un incremento en los niveles de fosforilación de β -catenina y un decremento en la asociación entre α -catenina y β -catenina, respecto a los controles de RWP1 no transfectadas (ver figura 27).

3. Interacción p120^{ctn}-E-cadherina.

p120^{ctn} fue primero caracterizada como sustrato de pp60v-src (homólogo viral de pp60^{c-src}, constitutivamente activa -Takeya and Hanafusa, 1983-). Había sido descrita su fosforilación en tirosinas en condiciones de pérdida de funcionalidad de la E-cadherina y este hecho se acompañaba con una interacción más fuerte por el dominio citosólico de la cadherina; en células epiteliales de mama transformada con una forma activa del oncogen ras (Kinch et al. 1995) o en epiteliales tumorales que presentan una pp60^{c-src} activada (Skoudy et al. 1996). Se había sugerido para la p120^{ctn} un papel como efector negativo de las uniones adherentes, disminuyendo la unión de β -catenina con E-cadherina (revisado en Daniel y Reynolds, 1997).

Nuestros resultados indican que éste no es el caso. Aunque no descartamos un efecto negativo (véase más adelante) la interacción de p120^{ctn} no altera directamente la afinidad entre β -catenina y E-cadherina. La p120^{ctn} es fosforilada *in vitro* por pp60^{c-src} (ver figura 14). Al fosforilarse, y al contrario de lo observado con β -catenina, la p120^{ctn} incrementa su afinidad por la cadherina. A pesar de que β -catenina y p120^{ctn} se unen al dominio citosólico de la cadherina no compiten en su unión a este dominio. La unión de la p120^{ctn} no afecta a la unión entre β -catenina y E-cadherina (ver figuras 17, 18 y tabla VI).

¿Qué relevancia tiene la fosforilación en tirosinas de la p120^{ctn} en la regulación de la adhesión celular? Como se ha comentado en la *Introducción*, hay una fuerte controversia sobre el papel de la p120^{ctn} en la regulación de las uniones adherentes. Por un lado, varios autores sostienen que la p120^{ctn} tiene un papel positivo en el mantenimiento de las uniones: se une al dominio

citoplasmático de la E-cadherina en la región más próxima a la membrana, y actúa potenciando la asociación lateral de moléculas de cadherina e incrementar la fuerza de las interacciones entre células vecinas (Yap et al. 1998; Thoreson et al. 2000). Mientras que con resultados aparentemente opuestos, otros estudios sugieren que la p120^{ctn} juega un papel crucial en el desensamblaje de las uniones adherentes (Ozawa and Kemler, 1998b; Okubo and Ozawa, 1999).

A la vista de nuestros resultados *in vitro*, en los que la fosforilación en tirosina de p120^{ctn} incrementa su asociación con la E-cadherina pero sin modificar la asociación entre E-cadherina y β -catenina, el papel de la p120^{ctn} parecería ser positivo respecto a la adhesión celular. Nuestros estudios posteriores con células epiteliales intestinales, en cambio, muestran que el papel que juega la p120^{ctn} en los contactos es negativo, porque, aunque al fosforilarse se asocia mejor a E-cadherina y por extensión a los complejos de adhesión, supone un lugar de anclaje para diversas tirosina quinasas cuya actividad comporta la pérdida de asociación entre las cadherinas y el citoesqueleto; tal y como se discute a continuación.

4. Regulación de las uniones adherentes por K-ras.

Para profundizar y comprobar la funcionalidad de las diferentes quinasas y fosforilaciones en un contexto celular, utilizamos en este estudio unas células epiteliales derivadas de criptas normales de intestino de rata (IEC-18) transfectadas de forma estable con una versión activa del oncogén humano K-ras. La transformación mediada por el oncogén en estas células es evidente y afecta profundamente a la forma y tamaño celular, a la cantidad de contactos intercelulares y a la capacidad de duplicación, alejándolas del fenotipo que presentan las células no transformadas (ver figura 28A) y proporcionándoles una capacidad de crecimiento de tres a cinco veces mayor. A nivel molecular, se han llevado a cabo estudios en los últimos años con estas mismas células para determinar los diversos productos que pudieran ser alterados por la transformación inducida por ras. La activación de ras altera el control de la proliferación celular y confiere a estas células epiteliales resistencia a distintos

tipos de apoptosis (Rak et al. 1995; Arber et al. 1997). Se induce la sobreexpresión de productos como la ciclina D1, diana crítica de las señales proliferativas en G1, confiriendo a las células una gran capacidad proliferativa (Filmus et al. 1994). Se detecta sobreexpresión de CD44, molécula de adhesión que participa en la progresión de diversos tipos de tumores (Jamal et al. 1994). Aumentan los niveles también de COX-2 (ciclooxigenasa-2) y su inducción es dependiente de la activación de la MAP-quinasa y de la PKB/Akt (Sheng et al. 2001). Productos como el transductor de señales-activador de la transcripción STAT3 está constitutivamente activado de una manera dependiente además de la activación del EGFR (Zushi et al. 1998). En las IEC-18, ras estimula también la expresión de sindecano-1 (Wong et al. 1998) y la transformación es dependiente de la activación de la PI3-quinasa (Sheng et al. 2001). La sobreexpresión de ras provoca resistencia a la inhibición del crecimiento promovida por el TGF- β en estas células (Filmus et al. 1992) y se regula a la baja Bak, miembro pro-apoptótico de la familia de Bcl-2 (Rosen et al. 1998).

En nuestros ensayos, la transformación por K-ras no altera significativamente los niveles totales de las proteínas de los complejos cadherina-cateninas pero sí muestran las células transformadas una mayor fosforilación en tirosinas de β -catenina y la pérdida casi completa de las interacciones que β -catenina establece con α -catenina y con E-cadherina (figura 28B y C) por lo que tomamos esta línea celular transformada como modelo *in vivo* donde se produce el desensamblaje de las uniones adherentes.

En estas condiciones, detectamos un incremento en la actividad de las quinasas Fer y Fyn (ver figura 30) y β -catenina es fosforilada principalmente en las tirosinas 142 y 654. En menor medida, se fosforila algún otro residuo (figura 29). Como se ha comentado anteriormente, la modificación de las tirosinas 142 y 654 afecta negativamente a las interacciones que β -catenina establece respectivamente con α -catenina y E-cadherina. Además, el tratamiento de las células transformadas con genisteína, un inhibidor general de tirosina quinasas se correlaciona con un decremento en la fosforilación de β -catenina y el restablecimiento de las interacciones E-cadherina- β -catenina y β -catenina- α -catenina (ver figura 28). Recientes estudios con este mismo inhibidor habían

conseguido reducir la fosforilación de β -catenina en células IEC, restablecer la asociación entre los complejos cadherina/cateninas y el citoesqueleto y bloquear la migración celular (Guo et al. 2002).

Fer no fosforila la tirosina 654 y Fyn lo hace con muy baja eficiencia, lo que induce a pensar que estas quinasas no regulan la interacción entre β -catenina y E-cadherina, al menos actuando directamente sobre β -catenina. Como hemos visto, en células RWP1, la transfección de Fer o Fyn tampoco parece afectar de manera importante a la interacción entre β -catenina y E-cadherina (ver figura 27), aunque no podemos descartar que en otros sistemas celulares, la sobreexpresión de estas quinasas puedan estar afectando indirectamente esta interacción, como apuntan algunos autores (Rosato et al. 1998).

5. El papel de p120^{ctn} como sitio de anclaje de quinasas.

Como se ha comentado, Fer y/o Fyn se activan en condiciones en que se produce la disociación de los complejos de adhesión y ambas quinasas fosforilan eficientemente la tirosina 142 de β -catenina, que controla la asociación entre β -catenina y α -catenina. Pero además, para que pueda producirse la liberación de β -catenina de los complejos de adhesión, otras quinasas tienen que actuar sobre ella y modificar también el residuo 654, que regula la unión β -catenina-E-cadherina.

Como Fer y Fyn fosforilan *in vitro* a p120^{ctn} y la transformación por K-ras induce la fosforilación en tirosinas de p120^{ctn} incrementando su unión a E-cadherina (ver figura 31A), no es descabellado pensar que Fer o Fyn puedan estar facilitando de esta forma la unión de la p120^{ctn} con la E-cadherina. Otras quinasas podrían asociarse con la p120^{ctn}, tal y como lo hacen Fer, Fyn, Src o Yes (figuras 31A y 33A), y fosforilar a β -catenina en la tirosina 654. De las quinasas ensayadas aquí, el receptor de EGF (ver figura 23) o su homólogo ErbB2, serían los mejores candidatos catalizar *in vivo* esta fosforilación, por su mayor capacidad de fosforilar la tirosina 654 en los ensayos llevados a cabo *in vitro*. Sabemos además que el EGFR se encuentra activo en las IEC transformadas con ras y la transformación mediada por ras es dependiente de esta activación del EGFR (Gangarosa et al.1997).

Respecto a las interacciones que p120^{ctn} establece con las diversas quinasas; Fer y Fyn se encuentran constitutivamente unidas a la p120^{ctn} (Kim and Wong, 1995 y figura 31). Src o Yes también se unen a p120^{ctn} e interaccionan mejor con ella tras la transformación con K-ras (figura 31A y 33A). Al menos en este tipo celular, la cantidad de Yes que interacciona con p120^{ctn} es superior a la de Src. Como se muestra en la figura 33B, el incremento en la unión entre Yes y p120^{ctn} es independiente del estado de fosforilación de la p120^{ctn} y se debe fundamentalmente al estado de activación de la quinasa Yes.

Fer, Fyn y Yes se activan tras la transformación con K-ras (ver figuras 30 y 34) y Yes en forma activa es capaz de activar a su vez a Fer y a Fyn en ensayos *in vitro* (ver figura 35). Todo esto indicaría que p120^{ctn} no sólo facilita la interacción de Fer y Fyn con los componentes de los complejos de adhesión, y la consiguiente fosforilación de la tirosina 142 de β -catenina; sino que además posibilita la activación de ambas quinasas, incrementando la concentración efectiva de Yes en su entorno. Es posible que el papel que Yes lleva a cabo en este tipo celular sea desarrollado en otros tipos celulares por otras quinasas similares como la propia Src. Tanto Src como Yes se expresan de forma ubicua y se localizan preferentemente en las uniones adherentes en varios tipos celulares (Tsukita et al. 1991).

Para que β -catenina pueda encontrarse libre en el citosol, debe disociarse tanto de E-cadherina como de α -catenina. Hemos visto que la fosforilación específica de sus tirosinas 654 y 142 respectivamente bloquea su asociación con estas proteínas. No hemos podido determinar con claridad en qué orden se producen ambas fosforilaciones. La p120^{ctn} se une a E-cadherina y permite el acercamiento de Fer y Fyn activas, que inducirán la fosforilación de la tirosina 142 y la disociación entre α -catenina y β -catenina. Parecería pues que la actividad de Fer y Fyn sobre β -catenina se restringiría a las condiciones en que ésta aún está unida a E-cadherina, y por tanto antes de que se produzca la fosforilación de la tirosina 654. Datos recientes sugieren que esto puede no ser estrictamente necesario; ha sido descrito en *Drosophila* que la p120^{ctn} puede interaccionar indirectamente con α -catenina mediante la asociación de ambas proteínas a la GTPasa Rho-1 (Magie et al. 2002). De esta forma, la p120^{ctn} y

sus quinasas asociadas podrían mantenerse cerca de β -catenina aún cuando se hubiera producido la fosforilación en el residuo 654 y β -catenina ya no permaneciera unida a la E-cadherina.

Hemos podido detectar Rho y α -catenina en inmunoprecipitados de p120^{ctn} en las IEC-Kras lo que sugeriría que la asociación entre p120 y α -catenina puede darse también en células de mamífero (no mostrado). Recientemente se ha descrito a la quinasa Fyn como intermediario de la función llevada a cabo por Rho y PRK2 en la regulación de la adhesión celular en queratinocitos, lo que, según nuestros resultados, involucraría también a p120^{ctn} (Calautti et al. 2002). Se hacen necesarios estudios más profundos para poder clarificar qué formas de Rho se asociarían a p120^{ctn} y α -catenina y en qué grado esta asociación es dependiente del estado de fosforilación de la p120^{ctn}.

Nuestra visión global de todos estos acontecimientos, que conducirían a la disociación de β -catenina y α -catenina (por la fosforilación de la tirosina 142 de β -catenina mediada por Fer y/o Fyn) se representan en el modelo de la figura 45.

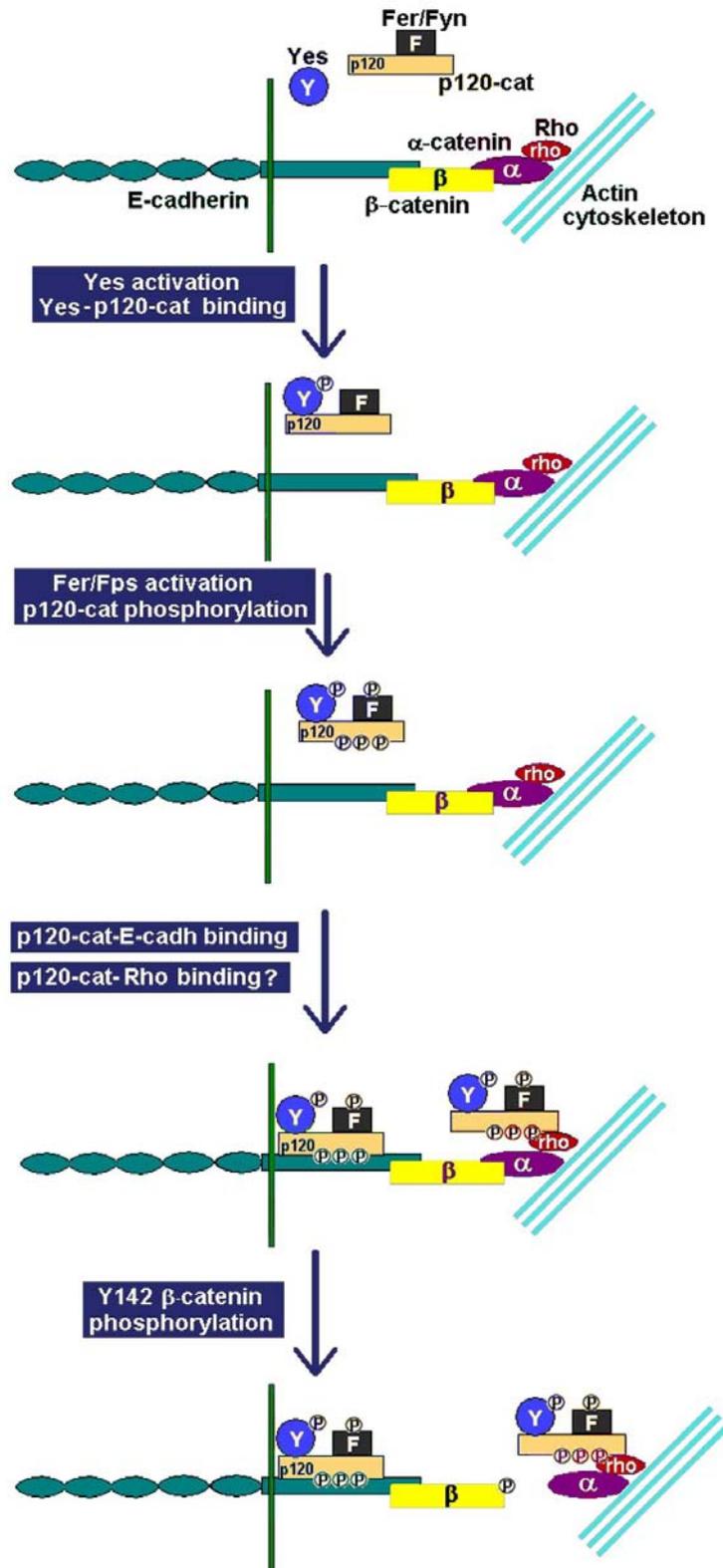


Fig 45. **Modelo propuesto para la regulación de la interacción β -catenina- α -catenina.** En las uniones adherentes, E-cadherina se asocia al citoesqueleto de actina a través de β -catenina y α -catenina. p120-catenina está asociada a Fer y/o Fyn quinasas y normalmente no se encuentra unida a los complejos de E-cadherina. Cuando se produce el estímulo del desensamblaje, Yes se une al complejo p120-Fer/Fyn y activa a estas quinasas. Es entonces cuando Yes, Fer/Fyn o ambas quinasas fosforilan a p120-catenina en residuos tirosina aumentando su interacción con E-cadherina. Paralelamente, el complejo Fer/Fyn/Yes-p120-catenina se une a α -catenina a través de la asociación con Rho. La presencia de las quinasas Fer/Fyn en el complejo de adhesión promueven la fosforilación de β -catenina en la Tyr-142 y la consiguiente pérdida de la asociación α -catenina- β -catenina. No se han dibujado Fer, Fyn, Yes y Rho asociadas a la membrana, donde probablemente se localizan, para no añadir complejidad al modelo.

Estos resultados, unidos al hecho que Fer y Fyn pueden complementarse mutuamente a la hora de actuar sobre β -catenina y regular la adhesión celular, explicarían por qué ratones deficientes únicamente en las actividades tirosina quinasa de Fyn (Stein et al. 1992) o de Fer (Craig et al. 2001) muestran fenotipos tan poco alterados y se desarrollan con normalidad.

6. Interacción β -catenina-TBP y actividad transcripcional de β -catenina.

A parte de su localización en membrana, formando parte de los complejos de adhesión celular, β -catenina puede encontrarse en el citosol y en el núcleo. Los niveles de β -catenina en el citosol son regulados por la vía de señalización de Wnt. Cuando la ruta está inactiva, la β -catenina libre en el citosol es degradada y no puede translocarse al núcleo. La activación de la vía Wnt se correlaciona con la inhibición de la degradación de β -catenina por el proteasoma, el aumento de la concentración de β -catenina libre en el citosol y la entrada de β -catenina al núcleo (revisado en Miller et al. 1999; y en Zhurinsky et al. 2000b). Una vez en el núcleo, β -catenina interacciona con factores de transcripción de la familia Lef/Tcf, actuando como coactivador de la transcripción génica. Durante el transcurso de esta tesis, se describió que la TATA-box Binding Protein (TBP), miembro clave de la maquinaria basal de transcripción, interaccionaba con β -catenina (Hecht et al. 1999). Una de las zonas de β -catenina implicadas en la interacción con TBP incluye a la tirosina 654 y esta misma zona forma parte de la región C-terminal-transactivadora de β -catenina requerida para la activación de la expresión génica (Hecht et al. 1999). Los resultados que se desprenden de los ensayos de interacción presentados en esta tesis indican que la fosforilación de la tirosina 654 incrementa la unión entre β -catenina y TBP, tanto *in vitro* como *in vivo* (figuras 36 y 37A).

La mayor asociación entre β -catenina y TBP se correlaciona además con un aumento de la actividad transcripcional mediada por los complejos β -catenina-Tcf-4. Así, en células transfectadas con el mutante de β -catenina Tyr-654→Glu

(que simula la fosforilación constitutiva del residuo 654) se produce una mayor activación de los genes reporteros sensibles al complejo β -catenina/Tcf-4 que en las células transfectadas con β -catenina nativa (figura 37B). Este aumento de actividad transcripcional, es independiente de la capacidad del mutante de interactuar con la E-cadherina en los complejos de adhesión, ya que también se observa en células con muy bajos niveles de expresión de E-cadherina, donde prácticamente toda la β -catenina celular se encuentra en el citosol apta para acceder al núcleo. En conjunto, nuestros datos sugieren que la fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina es importante no sólo para inhibir la asociación entre E-cadherina y β -catenina, sino también para estimular la interacción de la β -catenina nuclear con la maquinaria basal de la transcripción.

7. Implicaciones estructurales de la fosforilación de β -catenina.

El hecho de que la fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina tuviera efectos contrarios sobre la interacción de la proteína con E-cadherina o con TBP hizo que nos cuestionáramos las implicaciones que pudiera tener la fosforilación sobre la estructura de la β -catenina.

Como ya se ha comentado, la estructura primaria de β -catenina consta de un extremo amino terminal de unos 145 aminoácidos, un dominio central de 525 aminoácidos con 12 repeticiones armadillo y un extremo carboxilo terminal de unos 110 aminoácidos. Estas tres regiones tienen una distribución de cargas diferente: los extremos N- y C-terminal son ácidos con un pI cercano a 4,5 mientras que el dominio armadillo es básico, con un pI de 8,3 (Huber et al.1997b).

La β -catenina interactúa con proteínas muy diversas en sus diferentes localizaciones celulares: con E-cadherina y α -catenina en los complejos de adhesión de la membrana, con APC, axina y GSK3 en el citoplasma, con factores de transcripción de la familia LEF/Tcf o TBP en el núcleo, entre muchas otras (Shapiro, 2001). Con la mayoría, lo hace a través de la región central de repeticiones armadillo (ver figura 5). Los diferentes cofactores

reconocen porciones solapadas de la β -catenina a lo largo de sus repeticiones armadillo. Las secuencias de unión de estos cofactores no presentan mucha homología, pero tienen en común que son ácidas (pl 3.3-4.1) (Huber et al.1997b).

Por difracción de rayos X sólo ha sido posible visualizar el dominio central de la β -catenina -aminoácidos 149 al 666- (Huber et al. 1997b), que forma una estructura muy rígida. De momento no ha sido posible cristalizar la molécula entera, o incluyendo alguno de los dominios terminales. La formación de complejos de Tcf o E-cadherina unidos a β -catenina permitió obtener cristales en los que se visualizaban los residuos 134-149, previamente desordenados en los cristales que sólo contenían β -catenina (Huber and Weis, 2001). Sólo se ha podido visualizar una pequeña porción aislada del fragmento N-terminal – aminoácidos 118 al 149- (Pokutta and Weis, 2000). Nos planteamos la posibilidad de que los extremos terminales de β -catenina (ácidos) pudieran estar interaccionando con el dominio armadillo (básico) y, en el caso que estas interacciones intramoleculares se produjeran, si estaban afectando de alguna forma a las interacciones que establece β -catenina con los diversos cofactores y si tales interacciones eran modulables por la fosforilación de la molécula.

Para empezar a resolver estas cuestiones, procedimos a realizar ensayos de interacción utilizando diferentes fragmentos de β -catenina consistentes en el dominio central de repeticiones armadillo y los extremos N- y C-terminal de β -catenina. De estos ensayos *in vitro* se desprende que ambos extremos terminales interaccionan con el dominio armadillo (ver figura 38) y que la modificación de la tirosina 654 – ya sea por mutación a glutámico o por la fosforilación del dominio armadillo con la Src - inhibe la asociación del extremo C-terminal con el dominio central.

Además, la β -catenina fosforilada por Src y el mutante Tyr-654→Glu son degradadas más rápidamente por tripsina que la β -catenina no modificada en ensayos de proteólisis limitada (ver figura 39). Todo esto permite postular que, en condiciones nativas, la β -catenina presenta una mayor compactación y está plegada con los extremos interaccionando con el dominio armadillo. La fosforilación de la tirosina 654 induce un cambio conformacional del extremo C-terminal permitiendo una estructura más abierta.

Por nuestros resultados sabíamos que la interacción de β -catenina con E-cadherina o TBP también es sensible a la fosforilación de la tirosina 654. Para comprobar el efecto que el dominio C-terminal pudiera tener sobre la interacción de ambos cofactores con β -catenina, se procedió a determinar la unión de E-cadherina y TBP con la construcción del dominio armadillo de β -catenina, carente de los extremos terminales. Tanto TBP como E-cadherina, interaccionan mejor con el dominio armadillo desprovisto de los extremos que con la proteína entera. La adición posterior del dominio C-terminal inhibe estas interacciones, sugiriendo una competición entre el dominio C-terminal y ambos cofactores por unirse al dominio armadillo de β -catenina (figuras 40 y 41).

El dominio armadillo aislado, incluyendo la mutación Tyr-654→Glu, que simula la fosforilación de dicho residuo, retiene la misma TBP que el dominio armadillo nativo, sin fosforilar. Sin embargo, en el caso de la E-cadherina, prácticamente no se detecta E-cadherina unida al dominio armadillo (Tyr-654→Glu) (figuras 40 y 41).

Un modelo que explica estos resultados consiste en que la fosforilación de la tirosina 654, afecta positivamente a la interacción entre β -catenina y TBP porque anula la asociación entre el extremo C-terminal y el dominio armadillo, evitando así la restricción causada por el extremo C-terminal sobre la interacción entre β -catenina y TBP. En el caso de la E-cadherina, la ausencia de extremo C-terminal facilita su acceso al dominio armadillo de β -catenina (la fosforilación de la tirosina 654 sería beneficiosa para la unión E-cadherina- β -catenina en este aspecto) pero como se ha comentado ya en detalle, la introducción de una carga negativa en la posición 654 provoca la disociación entre ambas proteínas. Por esto, no se detecta E-cadherina asociada al dominio armadillo aislado cuando éste tiene la tirosina 654 sustituida por un glutámico .

Aunque E-cadherina y TBP interaccionan con un mismo subdominio del cuerpo central de β -catenina no compiten directamente por unirse a β -catenina. Más aún, en ensayos de interacción con proteínas recombinantes, la presencia de E-cadherina facilita el acceso de la TBP a la β -catenina *wild type* (figura 42). Todo esto sugiere que aunque E-cadherina y TBP interaccionan con una

misma secuencia de β -catenina, lo hacen por caras o superficies distintas, de forma que se puede dar su unión simultánea a β -catenina.

El efecto inhibitor que el extremo C-terminal tiene sobre la interacción de ambos factores con β -catenina, indica que el extremo C-terminal puede interaccionar, y posiblemente ocultar, ambas zonas de unión. A partir de los datos de cristalización, conocemos la secuencia de la E-cadherina que interacciona con el dominio de β -catenina alrededor de la tirosina 654. Como se muestra en la tabla VII, hemos observado que existía una analogía entre una parte de la secuencia de E-cadherina que interacciona con el dominio armadillo y los últimos aminoácidos de la propia β -catenina. Pensamos que la interacción entre los últimos 20 aminoácidos del dominio C-terminal y el dominio armadillo de β -catenina podía darse de forma análoga a como se da la unión entre el dominio citosólico de E-cadherina y el dominio armadillo de β -catenina. Esta hipótesis ha sido verificada recientemente en otros trabajos de nuestro grupo (Castaño et al. 2002).



Tabla VII. **Analogía entre el extremo más C-terminal de β -catenina y la zona de E-cadherina que interacciona con el dominio armadillo de β -catenina.** Comparación entre los últimos aminoácidos de β -catenina (β cat (760-end)) y la región II de E-cadherina que interacciona con el dominio armadillo de β -catenina (E-cadh (655-677)). Los residuos de E-cadherina que interaccionan con aminoácidos del dominio armadillo (mostrados abajo) se indican en negrita (según Huber and Weis, 2001). Aminoácidos del C-terminal de β -catenina equivalentes a éstos de E-cadherina se muestran en negrita en la fila superior. Otros aminoácidos similares en ambas secuencias se indican mediante subrayado (según Castaño et al. 2002).

Ensayos de interacción similares se han llevado a cabo con el dominio de unión del factor de transcripción Tcf-4 (aminoácidos 1-80) y β -catenina. El Tcf-4

interacciona con β -catenina en las repeticiones de la 3 a la 10 del dominio armadillo (Graham et al. 2000). En el caso del Tcf-4, la ausencia de los extremos terminales o la fosforilación de la tirosina 654 no afectó a su interacción con β -catenina. Un modelo en el que se representa la unión de β -catenina (nativa o fosforilada en la posición 654) con E-cadherina, TBP o el Tcf-4 se muestra a continuación:

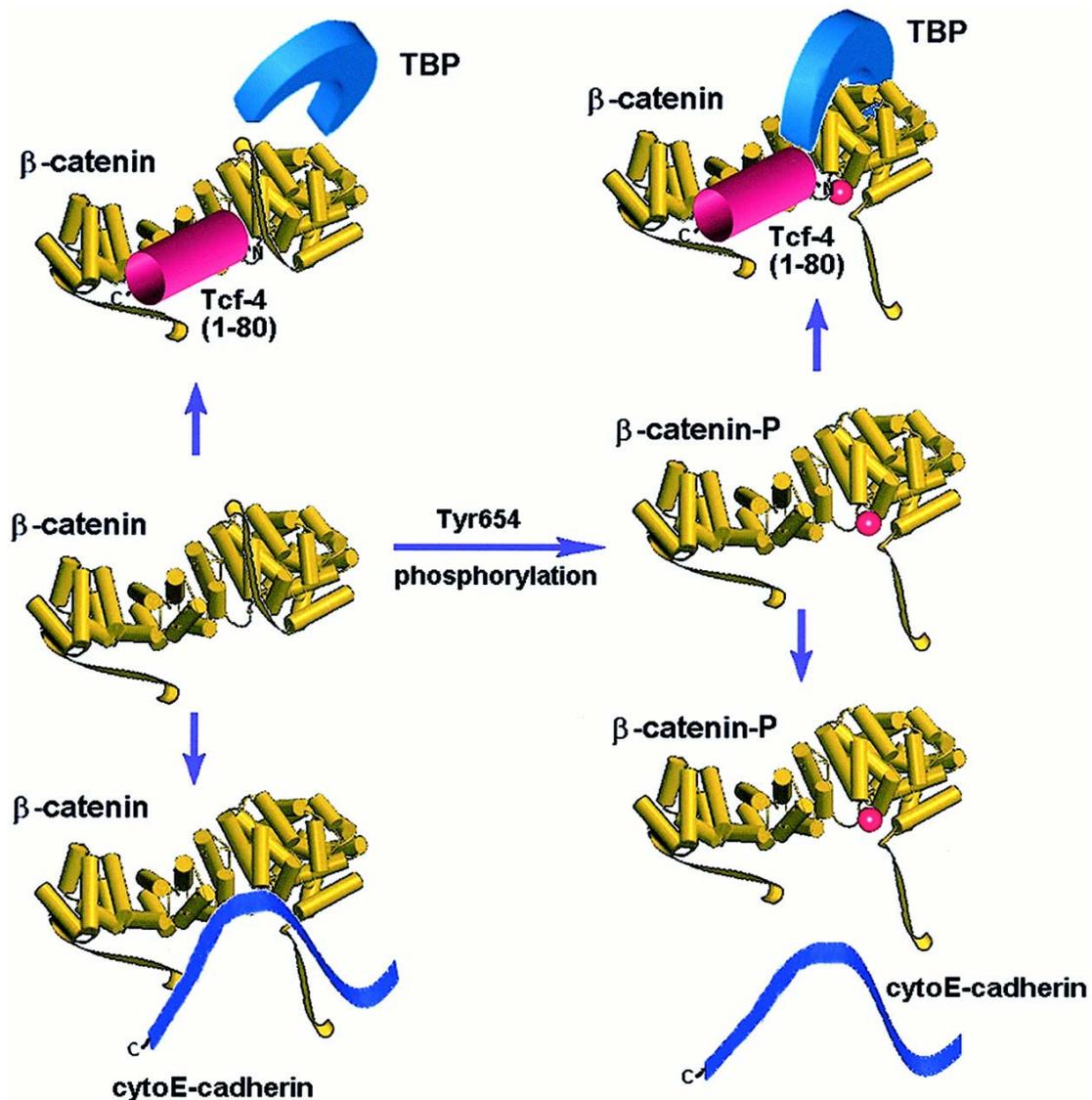


Fig 46. Modelo propuesto de la regulación de la interacción entre β -catenina y TBP, E-cadherina y Tcf-4 por fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina. Modelo que ilustra la asociación con β -catenina de TBP (representada por la media luna azul), el dominio citosólico de E-cadherina (cinta azul), y el dominio N-terminal del Tcf-4 (cilindro rosa). β -catenina se representa en amarillo; las hélices α que constituyen el dominio armadillo se representan con cilindros y los dominios terminales (N y C) como cintas. El punto rojo marca la posición del grupo fosfato cuando la tirosina 654 es fosforilada. En ausencia de fosforilación (izquierda) β -catenina adopta una conformación compacta con el extremo C-terminal interaccionando con el dominio armadillo (panel central de la izquierda). E-cadherina interacciona con gran afinidad con el dominio armadillo estableciendo pares iónicos entre sus residuos ácidos y residuos que

conforman el gran surco positivo del dominio armadillo, entre ellos la tirosina 654 (ver Huber and Weis, 2001) y puede desplazar al extremo C-terminal (panel inferior de la izquierda). Por otro lado, la TBP, que interacciona en la misma zona lineal de β -catenina que la E-cadherina pero en diferente localización espacial, no es capaz de superar la restricción que supone el dominio C-terminal de β -catenina (panel superior de la izquierda). La fosforilación de la tirosina 654 (derecha), rompe la interacción entre el C-terminal y el dominio armadillo, abriendo a β -catenina (panel central de la derecha). En estas condiciones la TBP puede acceder e interactuar con β -catenina (panel superior de la derecha). En el caso de la E-cadherina, aunque la fosforilación hace más accesible el dominio armadillo, la introducción del grupo fosfato en la posición 654 impide la interacción entre E-cadherina y β -catenina (panel inferior de la derecha). La interacción entre β -catenina y Tcf-4 (paneles superiores) no se ve afectada por la fosforilación de la tirosina 654.

Globalmente, los extremos terminales de β -catenina interactúan con su dominio armadillo y, al menos el C-terminal, compite por la interacción de β -catenina con los factores celulares que se unen a las repeticiones armadillo más C-terminales, permitiendo que sólo los que tengan una elevada afinidad por β -catenina (como la E-cadherina) puedan acceder a su dominio central e impidiendo que interacciones más débiles (como en el caso de la TBP) puedan establecerse. La interacción de proteínas con elevada afinidad por β -catenina puede desplazar el dominio C-terminal y facilitar el acceso posterior de otras proteínas que no pueden unirse a β -catenina por sí solas. Esto se ha comprobado en el caso de la formación de complejos E-cadherina- β -catenina-TBP, donde la presencia de E-cadherina facilitó la unión de la TBP a la β -catenina nativa (figura 42). Aunque la localización celular de E-cadherina y TBP aleja la posibilidad de un complejo con las tres proteínas en condiciones fisiológicas, es posible que una función similar a E-cadherina sea desarrollada por otros factores.

Otros estudios de nuestro grupo en este mismo sentido, han mostrado además que ambos dominios terminales de β -catenina interactúan entre ellos y modulan la interacción de distintos cofactores a β -catenina (Castaño et al. 2002). La posición de la tirosina 142 (ver figura 44), justo al final del extremo N-terminal y al inicio de la primera repetición armadillo, donde establece contactos iónicos con diversos aminoácidos colindantes de la propia β -catenina, la hacen un buen candidato para el mantenimiento de la estructura global formada por el dominio central armadillo y el extremo N-terminal y la regulación de dicha estructura mediante su fosforilación y defosforilación.

La fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina abre otra vía de regulación de las interacciones entre β -catenina y los diversos cofactores. Así, la tirosina 654 actúa como clave para abrir o cerrar la β -catenina, desplazando al extremo C-terminal, y afectando de este modo a las interacciones que β -catenina establece con factores que se unan a las últimas repeticiones armadillo o al propio extremo C-terminal.

Este modelo propone un esquema general sobre el modo en que distintos factores interaccionan de manera coordinada con β -catenina.

De todas formas una validación definitiva de este modelo requerirá la determinación de la estructura tridimensional completa (incluyendo los extremos terminales) de β -catenina y la caracterización del efecto que dichos extremos tengan en la interacción entre β -catenina y sus diversos cofactores.

VI. CONCLUSIONES

1.- Se han identificado los residuos de β -catenina fosforilados por pp60^{c-src} como las tirosinas 86 y 654. Estudios de interacción con mutantes puntuales indican que la introducción de una carga negativa en la posición 654 de β -catenina -pero no en la 86- provoca la disminución de afinidad por la E-cadherina tanto *in vitro* como *in vivo*.

2.- pp60^{c-src} fosforila la tirosina 654 de β -catenina con poca eficiencia. En cambio se ha determinado que el receptor de EGF y su homólogo erbB2 fosforilan activamente esta tirosina.

3.- La interacción entre β -catenina y α -catenina también es sensible a la fosforilación en tirosinas. La introducción de una carga negativa en la tirosina 142 de β -catenina inhibe la interacción entre β -catenina y α -catenina tanto *in vitro* como *in vivo*. Las tirosina quinasas Fer o Fyn fosforilan eficientemente esta tirosina *in vitro*.

4.- En condiciones *in vivo* en que se produce el desensamblaje de las uniones adherentes y la pérdida de interacción entre E-cadherina- β -catenina y entre β -catenina- α -catenina, la β -catenina está fosforilada en las tirosinas 654 y 142 y las quinasas Fer y Fyn están activadas.

5.- La p120^{ctn} también se fosforila en tirosinas por la quinasa pp60^{c-src} e incrementa su asociación a la E-cadherina. En condiciones en que se disocian las uniones adherentes, las quinasas Yes, Fyn y Fer se unen a la p120^{ctn} que se asocia mejor a la E-cadherina, acercando las quinasas a las uniones adherentes. Yes es capaz de activar a Fyn y Fer en estas condiciones.

6.- β -catenina interacciona también con la TBP -componente de la maquinaria basal de la transcripción- y la introducción de una carga negativa en la posición 654 favorece la interacción β -catenina-TBP tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta mejor asociación se correlaciona con un aumento de la transcripción mediada por β -catenina.

7.- Intramolecularmente, hemos visto que los dominios N- y C-terminal de β -catenina interaccionan con el dominio central rígido de repeticiones armadillo de la proteína. La fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina, disminuye la interacción del extremo C-terminal y el dominio armadillo. La presencia del extremo C-terminal, dificulta el establecimiento de interacciones entre el dominio armadillo de β -catenina y cofactores como E-cadherina o TBP. La fosforilación de la tirosina 654, por su efecto sobre el C-terminal, es un mecanismo de regulación de la accesibilidad de diversos cofactores a β -catenina.

VII. BIBLIOGRAFÍA

A

Abe, J., and Berk, B.C. 1999. Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **274**: 21003-10.

Aberle, H., Butz S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R., and Hoschuetzky, H. 1994. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J. Cell. Sci.* **107**: 3655-63.

Aberle, H., Schwartz, H., Hoschuetzky, H., and Kemler, R. 1996. Single amino-acid substitution in proteins of the armadillo gene family abolish their binding to α -catenin. *J. Biol. Chem.* **271**:1520-26.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. 1994. *Molecular Biology of the Cell - Third Edition*. Garland Science Publishing.

Anastasiadis, P.Z., and Reynolds, A.B. 2000. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signalling and cancer. *J. Cell Sci.* **113**:1319-34.

Anderson, J.M., Balda, M.S., and Fanning, A.S. 1993. The structure and regulation of tight junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**: 772-8.

Aono, S., Nagakawa, S., Reynolds, A.B., and Takeichi, M. 1999. p120ctn acts as an inhibitory regulator of cadherin function in colon carcinoma cells. *J. Cell Biol.* **145**: 551-62.

Arber, N., Han, E.K., Sgambato, A., Piazza, G.A., Delohery, T.M., Begemann, M., Weghorst, C.M., Kim, N.H., Pamukcu, R., Ahnen, D.J., Reed, J.C., Weinstein, I.B., and Holt, P.R. 1997. A K-ras oncogene increases resistance to sulindac-induced apoptosis in rat enterocytes. *Gastroenterology.* **113**:1892-900.

B

Balsamo, J., Leung, T., Ernst, H., Zanin, M.D.B., Hoffman, S., and Lilien, J. 1996. Regulated binding of a PTB1B-like phosphatase to N-cadherin: control of cadherin-mediated adhesion by dephosphorylation of β -catenin. *J. Cell Biol.* **134**: 801-13.

- Battle, S.E., Sancho E., Franci C., Dominguez D., Monfar M., Baulida J., and Garcia de Herreros A. 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **2**: 84-9.
- Batsche, E., Muchardt, C., Behrens, J., Hurst, H.C., and Cremisi, C. 1998. RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcriptional factor AP-2. *Mol. Cell Biol.* **18**: 3647-58.
- Bauer, A., Huber, O., and Kemler, R. 1998. Pontin52, an interaction partner of beta-catenin, binds to the TATA box binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 14787-92.
- Beavon, I.R. 2000. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur. J. Cancer.* **36**: 1607-20.
- Behrens, J., Vakaert, L., Friis, R., Winterhager, E., Roy, F.V., Mareel, M.M., and Birchmeier, W. 1993. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/ β -catenin complex in cell transformed with a temperature sensitive v-src gene. *J. Cell Biol.* **120**: 757-66.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. 1996. Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* **382**: 638-42.
- Ben-Ze'ev, A. 1999. The dual role of cytoskeletal anchor proteins in cell adhesion and signal transduction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **886**: 37-47.
- Billin, A. N., Thirlwell, H., and Ayer, D. A. 2000. Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator. *Mol. Cell Biol.* **20**: 6882-90.
- Brabletz T., Jung A., Reu S., Porzner M., Hlubek F., Kunz-Schughart L.A., Knuechel R., and Kirchner T. 2001. Variable β -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 10356-61.

Brieher, WM., Yap, AS., and Gumbiner, BM. 1996. Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *J. Cell Biol.* **135**: 487-9.

Bullions, L., Notterman, D., Chung, L., and Levine, A. 1997. Expression of wild-type α -catenin protein in cells with a mutant α -catenin gene restores both growth regulation and tumor suppressor activities. *Mol. Cell Biol.* **17**: 4501-8.

C

Cadigan, K.M., and Nusse, R. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Devel.* **11**: 3286-305.

Calautti, E., Cabodi, S., Stein, P.L., Hatzfeld, M., Kedersha, N., and Dotto, G.P. 1998. Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* **141**: 1449-65.

Calautti, E., Grossi, M., Mammucari, C., Aoyama, Y., Pirro, M., Ono, Y., Li, J., and Dotto, G.P. 2002. Fyn tyrosine kinase is a downstream mediator of Rho/PRK2 function in keratinocyte cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* **156**: 137-48.

Carter-Su, C., Rui, L., and Herrington, J. 2000. Role of the tyrosine kinase JAK2 in signal transduction by growth hormone. *Pediatr. Nephrol.* **14**: 550-7.

Castañó, J., Raurell, I., Piedra, J.A., Miravet, S., Dunach, M., and Garcia de Herreros A. 2002. Beta-catenin N- and C-terminal tails modulate the coordinated binding of adherens junction proteins to beta-catenin. *J. Biol. Chem.* **277**: 31541-50.

Cavallo, R., Rubenstein, D., and Peifer, M. 1997. Armadillo and dTcf: a marriage made in the nucleus. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**: 459-66.

Cox, R. T., Pai, L. M., Kirkpatrick, C., Stein, J., and Peifer, M. 1999. Roles of the C terminus of Armadillo in Wingless signaling in *Drosophila*. *Genetics.* **153**: 319-332.

Craig, A., Zirngibl, R., Williams, K., Cole, L., and Greer, P. 2001. Mice devoid of Fer protein-tyrosine kinase activity are viable and fertile but display reduced cortactin phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* **21**: 603-13.

D

Daniel, J.M., and Reynolds, A.B. 1995. The tyrosine kinase substrate p120^{cas} binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or α -catenin. *Mol. Cell Biol.* **15**: 4819-24.

Daniel, J.M., and Reynolds, A.B. 1997. Tyrosine phosphorylation and cadherin/ catenin function. *Bioessays*, **19**: 883-91.

Daniel, J.M., and Reynolds, A.B. 1999. The catenin p120^{ctn} interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol. Cell Biol.* **19**: 3614-23.

E

Easwaran, V., Pishvaian, M., Salimuddin, and Byers, S. 1999. Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr. Biol.* **9**: 1415-8.

F

Filmus, J., Zhao, J., and Buick, R.N. 1992. Overexpression of H-ras oncogene induces resistance to the growth-inhibitory action of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta 1) and alters the number and type of TGF-beta 1 receptors in rat intestinal epithelial cell clones. *Oncogene.* **7**: 521-6.

Filmus, J., Robles, A.I., Shi, W., Wong, M.J., Colombo, L.L., and Conti, C.J. 1994. Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene.* **9**: 3627-33.

Fuchs, M., Muller, T., Lerch, M.M., and Ullrich, A. 1996. Association of human protein-tyrosine phosphatase κ with members of the armadillo family. *J. Biol. Chem.* **271**: 16712-9.

Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H.E., Behrens, J., Sommer, T., and Birchmeier, W. 2002. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat. Cell Biol.* **4**: 222-31.

Fukata, M., Nakagawa, M., Itoh, N., Kawajiri, A., Yamaga, M., Kuroda, S., and Kaibuchi, K. 2001. Involvement of IQGAP1, an effector of Rac1 and Cdc42 GTPases, in cell-cell dissociation during cell scattering. *Mol. Cell Biol.* **21**: 2165-83.

G

Gallet, A., Angelats, C., Erkner, A., Charroux, B., Fasano, L., and Kerridge, S. 1999. The C-terminal domain of armadillo binds to hypophosphorylated teashirt to modulate wingless signalling in *Drosophila*. *EMBO. J.* **18**: 2208-17.

Gangarosa, L.M., Sizemore, N., Graves-Deal, R., Oldham, S.M., Der, C.J., and Coffey, R.J. 1997. A raf-independent epidermal growth factor receptor autocrine loop is necessary for Ras transformation of rat intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 18926-31.

Gao, Z.H., Seeling, J.M., Hill, V., Yochum, A., and Virshup, D.M. 2002. Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**: 1182-7.

Giannini, A.M., Vivanco, M., and Kipta, R.M. 2000. α -catenin inhibits β -catenin signaling by preventing formation of a β -catenin-T-Cell Factor-DNA complex. *J. Biol. Chem.* **275**: 21883-8.

Graham, T., Weaver, C., Mao, F., Kimelman, D., and Xu, W. 2000. Crystal Structure of a β -Catenin/Tcf Complex. *Cell.* **103**: 885-96.

Gumbiner, B.M. 2000. Regulation of cadherin adhesive activity. *J. Cell Biol.* **148**: 399-404.

Guo, X., Rao, J.N., Liu, L., Rizvi, M., Turner, D.J. and Wang, J.Y. Polyamines regulate β -catenin tyrosine phosphorylation via Ca^{2+} during intestinal epithelial cell migration. 2002. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**: C-722-34.

H

Haegel, H., Larue L., Ohsugi M., Fedorov L., Herrenknecht K., and Kemler R. 1995.

Lack of β -catenin affects mouse development at gastrulation. *Development*. **121**: 3529-37.

He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. 1998. Identification of c-myc gene as a target of APC pathway. *Science*. **281**: 1509-1512.

He, T. C., Chan, T. A., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. 1999. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*. **99**: 335-345.

Hecht, A., Litterst, C. M., Huber, O., and Kemler, R. 1999. Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. *J. Biol. Chem*. **274**: 18017-18025.

Hecht, A., Vleminckx, K., Stemmler, M. P., van Roy, F., and Kemler, R. 2000. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J*. **19**: 1839-50.

Hinck, L., Nelson, W.J., and Papkoff, J. 1994. Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing β -catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. *J. Cell Biol*. **124**: 729-41.

Hirano, S., Kimoto, N., Shimoyama, Y., Hirohashi, S., and Takeichi, M. 1992. Identification of a neural α -catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell*. **70**: 293-301.

Hirohashi, S. 1998. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell-adhesion system in human cancers. *Am. J. Pathol*. **153**: 333-9.

Hoschuetzky, H., Aberle, H., and Kemler, R. 1994. β -catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol*. **127**: 1375-80.

Hosono, S., Gross, I., English, M.A., Hajra, K.M., Fearon, E.R., Licht, J.D. 2000. E-cadherin is a WT1 target gene. *J. Biol. Chem*. **275**: 10943-53

Hsu, S. C., Galcerán, J., and Grosschedl, R. 1998. Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 4807-18.

Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B.G., and Kemler R. 1996. Nuclear localization of β -catenin by interaction with transcription factor Lef-1. *Mech. Dev.* **59**: 3-10.

Huber, O., Krohn, M., and Kemler, R. 1997a. A specific domain in α -catenin mediates binding to β -catenin or plakoglobin. *J. Cell. Sci.* **110**: 1759-65.

Huber, A.H., Nelson, W.J., and Weiss, W.I. 1997b. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of β -catenin. *Cell.* **90**: 871-82.

Huber, A.H., and Weis, W.I. 2001. The structure of the β -catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by β -catenin. *Cell.* **105**: 391-402.

Hülsken, J., Birchmeier, W., and Behrens, J. 1994. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **127**: 2061-9.

Hülsken, J., and Behrens, J. 2000. The Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* **113**: 3545.

I

Imamura, Y., Itoh, M., Maeno, Y., Tsukita, S., and Nagafuchi, A. 1999. Functional domains of α -catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. *J. Cell Biol.* **144**: 1311-22.

J

Jamal, H.H., Cano-Gauci, D.F., Buick, R.N., and Filmus, J. 1994. Activated ras and src induce CD44 overexpression in rat intestinal epithelial cells. *Oncogene.* **9**: 417-23.

Jamora, C., and Fuchs, E. 2002. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nature Cell Biol.* **4**: 101-8.

Janssens, B., Goossens, S., Staes, K., Gilbert, B., van Hengel, J., Colpaert, C., Bruyneel, E., Mareel, M., and van Roy, F. 2001. alphaT-catenin: a novel tissue-specific beta-catenin-binding protein mediating strong cell-cell adhesion. *J. Cell Sci.* **114**: 3177-88.

K

Kallakury, B.V., Sheehan, C.E., Winn-Deen, E., Oliver, J., Fisher, H.A., Kaufman, R.P. Jr, and Ross J.S. 2001. Decreased expression of catenins (α and β), p120 CTN and E-cadherin cell adhesion proteins and E-cadherin gene promoter methylation in prostatic adenocarcinomas. *Cancer.* **92**: 2786-95.

Kapus, A., Di Ciano, C., Sun, J., Zhan, X., Kim, L., Wong, T.W., and Rotstein, O.D. 2000. Cell volume-dependent phosphorylation of proteins of the cortical cytoskeleton and cell-cell contact sites. *J. Biol. Chem.* **275**: 32289-98.

Keirsebilck, A.S., Bonn e, K., Staes, J., van Hengel, F., Nollet, A., Reynolds, A.B., and van Roy, F. 1998. Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics.* **50**: 129-46.

Kim, L., and Wong, T.W. 1995. The cytoplasmic tyrosine kinase FER is associated with the catenin-like substrate pp120 and is activated by growth factors. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 4553-61.

Kim, S.W., Fang, X., Ji, H., Paulson, A.F., Daniel, J.M., Ciesiolka, M., van Roy, F., and McCrea, P.D. 2002. Isolation and characterization of Xkaiso, a transcriptional repressor that associates with the catenin Xp120ctn in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* **277**: 8202-8.

Kinch, M.S., Clark, G.J., Der, C.J., and Burridge, K. 1995. Tyrosine phosphorylation regulates the adhesions of Ras-transformed breast epithelia. *J. Cell Biol.* **130**: 461-71.

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

Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Clevers, H. 1997. Constitutive Transcriptional Activation by a β -catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinomas. *Science*. **275**: 1784-7.

Koslov, E.R., Maupin, P., Pradhan, D., Morrow, J.S., and Rimm, D.L. 1997. Alpha-catenin can form asymmetric homodimeric complexes and/or heterodimeric complexes with beta-catenin. *J. Biol. Chem.* **272**: 27301-6.

Kowalczyk, A.P., Bornslaeger, E.A., Norvell, S.M., Palka, H.L., and Green, K.J. 1999. Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int. Rev. Cytol.* **185**: 237-302.

Kypta, R.M., Su, H., and Reichardt, L.F. 1996. Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex. *J. Cell Biol.* **134**: 1519-29.

L

Larue, L., Ohsugi, M., Hircherhain, J., and Kemler, R. 1994. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8263-7.

Lickert, H., Bauer, A., Kemler, R., and Stappert, J. 2000. Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/ β -catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **275**: 5090-5.

Liu, S., Calderwood, D.A., and Ginsberg, M.H. 2000. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J. Cell Sci.* **113**: 3563-71.

M

Magie, C.R., Pinto-Santini, D., and Parkhurst, S.M. 2002. Rho1 interacts with p120ctn and α -catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in *Drosophila*. *Development*. **129**: 3771-82.

Mariotti, A., Kedeshian, P.A., Dans, M., Curatola, A.M., Gagnoux-Palacios, L., and Giancotti, F.G. 2001. EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of

integrin $\alpha 6\beta 4$ at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. *J. Cell Biol.* **155**: 447-57.

McCrea, P., Turck, C., and Gumbiner, B. 1991. An homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science*. **254**: 1359-61.

Miller, J.R., Hocking, A.M., Brown, J.D., and Moon, R.T. 1999. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene*. **18**: 7860-72.

Miyagishi, M., Fujii, R., Hatta, M., Yoshida, E., Araya, N., Nagafuchi, A., Ishihara, S., Nakajima, T., and Fukamizu, A. 2000. Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating beta-catenin with CBP/p300. *J. Biol. Chem.* **275**: 35170-5.

Morton, R.A., Ewing, C.M., Nagafuchi, A., Tsukita, S., and Isaacs, W.B. 1993. Reduction of E-cadherin levels and deletion of the α -catenin gene in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **53**: 3585-90.

Muller, T., Choidas, A., Reichmann, E., and Ullrich, A. 1999. Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *J. Biol. Chem.* **274**: 10173-83.

N

Nagafuchi, A., Takeichi, M., and Tsukita, S. 1991. The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell*. **65**: 849-57.

Nagafuchi, A. 2001. Molecular architecture of adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 600-3.

Navarro, P., Caveda, L., Breviario, F., Mandoteanu, I., Lampugnani, M.G., and Dejana, E. 1995. Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *J. Biol. Chem.* **270**: 30965-72.

Nelson, K.L., Rogers, J.A., Bowman, T.L., Jove, R., and Smithgall, T.E. 1998. Activation of STAT3 by the c-Fes protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **273**: 7072-7.

Nishita, M., Hashimoto, M, Ogata, S., Laurent, M., Ueno, N., Shibaya, H., and Cho, K. 2000. Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* .**6771**: 781-785.

O

Ohkubo, T., and Ozawa, M. 1999. p120ctn binds to the membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity. *J. Biol. Chem.* **274**: 21409-15.

Orsulic, S., Huber, O., Aberle, H., Arnold, S., and Kemler, R. 1999. E-cadherin binding prevents β -catenin nuclear localization and β -catenin/ LEF-1-mediated transactivation. *J. Cell Sci.* **112**: 1237-45.

Overduin, M., Harvey, T.S., Bagby, S., Tong, K.I., Yau, P., Takeichi, M., and Ikura, M. 1995. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science*. **267**: 386-9.

Owens, D.W., McLean, G.W., Wyke, A.W., Paraskeva, C., Parkinson, E.K., Frame, M.C., and Brunton, V.G. 2000. The catalytic activity of the Src family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell-cell contacts. *Mol. Biol. Cell*, **11**: 51-64.

Ozawa, M., and Kemler, R. 1998a. Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of alpha-catenin from the E-cadherin-catenin complex. *J. Biol. Chem.* **273**: 6166-70.

Ozawa, M., and Kemler, R. 1998b. The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. *J. Cell Biol.* **142**: 1605-13.

P

Pai, L.M., Kirkpatrick, C., Blanton, J., Oda, H., Takeichi, M., and Peifer, M. 1996. *Drosophila* α -catenin and E-cadherin bind to distinct regions of *Drosophila* Armadillo. *J.Biol.Chem.* **271**: 32411-20.

Peifer, M., Berg, S., and Reynolds, A.B. 1994. A repeating aminoacid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell.* **76**: 789-91.

Perez-Moreno, M.A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M.A., and Cano, A. 2001. A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* **276**: 27424-27431.

Perl, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G. 1998. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature.* **392**: 190-3.

Peters, J.M., McKay, R.M., McKay, J.P. and Graff, J.M. 1999 Casein kinase I transduce Wnt signals. *Nature.* **401**: 345-50.

Pokutta, S., and Weis, W. 2000. Structure of the dimerization and β -catenin-binding region of α -catenin. *Mol. Cell,* **5**: 533-43.

Polakis, P. 1997. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Bioch. Biophys. Acta* **1332**: F127-F147.

R

Rak, J., Mitsuhashi, Y., Erdos, V., Huang, S.N., Filmus, J., Kerbel, R.S. 1995. Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by the dimensional growth conditions: suppression by mutant c-H-ras oncogene expression. *J. Cell Biol.* **131**: 1587-98.

Reynolds, A.B., Roesel, D.J., Kanner, S.B., and Parsons, J.T. 1989. Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 629-638.

- Reynolds, A.B., Daniel, J., McCrea, P.D., Wheelock, M.J., Wu, J., and Zhang, Z. 1994. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120Cas associates with E-cadherin complexes. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 8333-42.
- Roose, J., Huls, G., van Best, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., Logtenberg, T., and Clevers, H. 1999. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* **285**: 1923-1926.
- Rosato, R., Veltmaat, J., Groffen, J., and Heisterkamp, N. 1998. Involvement of the tyrosine kinase Fer in cell adhesion. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 5762-5770.
- Rosen, K., Rak, J., Jin, J., Kerbel, R.S., Newman, M.J., and Filmus, J. 1998. Downregulation of the pro-apoptotic protein Bak is required for the ras-induced transformation of intestinal epithelial cells. *Curr Biol.* **3**: 1331-4.

S

- Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grübel, G., Legrand, J.F., Als-Nielsen, J., Colman, D.R., and Hendrickson, W.A. 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature.* **374**: 327-37.
- Shapiro, L. 2001. β -catenin and its multiple partners: promiscuity explained. *Nat Struct Biol.* **8**: 484-7.
- Sheng, H., Shao, J., and Dubois. 2001. K-Ras-mediated increase in cyclooxygenase 2 mRNA stability involves activation of the protein kinase B1. *Cancer Res.* **61**: 2670-5.
- Shibata, T., Ochiai, A., Kanai, Y., Akimoto, S., Gotoh, M., Yasui, N., Machinami, N., and Hirohashi, S. 1996. Dominant negative inhibition of the association between β -catenin and c-erbB2 by N-terminally deleted β -catenin suppresses the invasion and metastasis of cancer cells. *Oncogene*, **13**: 883-9.
- Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Oku, N., Miyazawa, K., Kitamura, N., Takeichi, M., and Ito, F. Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and

plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes Commun.* **1**: 295-305.

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

Stein, P.L., Lee, H.M., Rich, S., and Soriano, P. 1992. pp59fyn mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells. *Cell*, **70**: 741:50.

Sun, Y., Kolligs, F.T., Hottiger, M.O., Mosavin, R., Fearon, E., and Nabel, G.J. 2000. Regulation of beta-catenin transformation by the p300 transcriptional coactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 12613-8.

T

Takeda, H., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., Behrens, J., Birchmeier, W., and Tsukita, S. 1995. V-src kinase shifts the cadherin-based cell adhesion from the strong to the weak state and beta catenin is not required for the shift. *J Cell Biol.* **131**:1839-47.

Takeichi, M. 1990. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* **59**: 237-52.

Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**: 1451-5.

Takemaru, K. I., and Moon, R. T. 2000. The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J. Cell Biol.* **149**: 249-54.

Takeya, T., and Hanafusa, H. 1983. Structure and sequence of the cellular gene homologous to the RSV src gene and the mechanism for generating the transforming virus. *Cell.* **32**: 881-90.

Tetsu, O., and McCormick, F. 1999. β -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**: 422-6.

Thomas, S.M., and Brugge, J.S. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 513-609.

Thoreson, M.A., Anastasiadis, P.Z., Daniel, J.M., Ireton, R.C., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hummingbird, D.K., and Reynolds, A.B. 2000. Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol.* **148**: 189-202.

Torres, M., Stoykova, A., Huber, O., Chowdhury, K., Bonaldo, P., Mansouri, A., Butz, S., Kemler, R., and Gruss, P. 1997. An α -E-catenin gene trap mutation defines its function in preimplantation development. *Proc Nat Acad Sci* **94**: 901-6.

Tsukita, S., Oishi, K., Akiyama, T., Yamanashi, Y., Yamamoto, T., and Tsukita, T. 1991. Specific proto-oncogene tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J Cell Biol* **113**: 867-79.

Turner, C.E., and Burridge, K. 1991. Transmembrane molecular assemblies in cell-extracellular matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* **3**: 849-53.

U

Uehara, Y., Fukazawa, H., Murakami, Y., and Mizuno, S. 1989. Irreversible inhibition of v-src tyrosine kinase activity by herbimycin A and its abrogation by sulfhydryl compounds. *Biochem Biophys Res Commun* **163**: 803-9.

V

Van de Wetering, M., Cavallo, R., Doojies, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., Peifer, M., Mortin, M., and Clevers, H. 1997. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* **88**: 789-799.

Van Hengel, J., Vanhoenacker, P., Staes, K., and van Roy, F. 1999. Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Nat Acad Sci* **96**: 7980-5.

Vasioukhin, V., Bauer, C., Degenstein, L., Wise, B., and Fuchs, E. 2001. Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of α -catenin in skin. *Cell* **104**: 605-17.

Vleminckx, K., and Kemler, R. 1999. Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays* **21**: 211-20.

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

W

Wahl, J. K., Nieset, J. E., Sacco-Bubulya, P. A., Sadler, T. M., Johnson, K. R., and Wheelock, M. J. 2000. The amino- and carboxyl-terminal tails of (beta)-catenin reduce its affinity for desmoglein 2. *J. Cell Sci.* **113**: 1737-45.

Wong, M., Rubinfeld, B., and Gordon, J.I. 1998a. Effects of forced expression of an NH2-terminal truncated β -catenin on mouse intestinal epithelial homeostasis. *J Cell Biol* **141**: 765-77.

Wong, Z.M., Choo, B., Li, M., Carey, D.J., Cano-Gauci, D.F., and Buick, R.N. 1998b. Syndecan-1 is up-regulated in ras-transformed intestinal epithelial cells. *Br J Cancer*.**77**: 890-6.

X

Xu, Y., Guo, D.F., Davidson, M., Inagami, T., and Carpenter, G. 1997. Interaction of the adaptor protein Shc and the adhesion molecule cadherin. *J Biol Chem.* **272**:13463-6.

Y

Yamauchi, T., Ueki, K., Tobe, K., Tamemoto, H., Sekine, N., Wada, M., Honjo, M., Takahashi, M., Takahashi, T., Hirai, H., Tsushima, T., Akanuma, Y., Fujita, T., Komuro, I., Yazaki, Y., and Kadowaki, T. 1998. Growth hormone-induced tyrosine phosphorylation of EGF receptor as an essential element leading to MAP kinase activation and gene expression. *Endocr J.* **45** : S27-31.

Yanagawa, S., Lee, J.S., Haruna, T., Oda, H., Uemura, T., Takeichi, M., and Ishimoto, A. 1997. Accumulation of Armadillo induced by Wingless, Dishevelled, and dominant negative Zeste-White-3 leads to elevated DE-cadherin in *Drosophyla* clone 8 wing disc cells. *J Biol Chem* **272**: 25243-51.

Yang, J., Dokurno, P., Tonks, N.K., and Barford, D. 2001. Crystal structure of the M-fragment of α -catenin: implications for modulation of cell adhesion. *EMBO J* **20**: 3645-56.

Yap, A.S. 1998. The morphogenetic role of cadherin cell adhesion molecules in human cancer: a thematic review. *Cancer Invest* **16**: 252-61.

Yap, A.S., Niessen, C.M., and Gumbiner, B.M. 1998. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120^{ctn}. *J Cell Biol* **141**: 779-89.

Z

Zhurinsky, J., Shtutman, M., and Ben-Ze'ev, A. 2000a. Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 4238-52.

Zhurinsky, J., Shtutman, M., and Ben-Ze'ev, A. 2000b. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J. Cell Sci.* **113**: 3127-39.

Zorn, A. M., Barish, G. D., Williams, B. O., Lavender, P., Klymkowsky, M. W., and Varmus, H. E. 1999. Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin. *Mol. Cell* **4**: 487-98.

Zushi, S., Shinomura, Y., Kiyohara, T., Miyazaki, Y., Kondo, S., Sugimachi, M., Higashimoto, Y., Kanayama, S., and Matsuzawa, Y. 1998. STAT3 mediates the survival signal in oncogenic ras-transfected intestinal epithelial cells. *Int J Cancer*. **78**: 326-30.

Los resultados de esta tesis han sido publicados en los siguientes artículos :

Roura*, S., Miravet*, S., Piedra*, J., G^a de Herreros, A., and Duñach, M. 1999. Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **274**: 36734-40.(* estos autores han contribuido por igual en este trabajo).

Piedra, J., Martínez, D., Castaño, J., Miravet, S., Duñach, M. and G^a de Herreros, A. 2001. Regulation of β -catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **276**: 20436-43.

Piedra, J., Miravet, S., Castaño, J., Pálmer, H.G^a., Heisterkamp, N., G^a de Herreros, A., and Duñach, M. 2003. p120-catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate β -catenin Tyr-142 phosphorylation and β -catenin- α -catenin interaction. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 2287-97.

agradecimientos

Agradezco a la Dra. Mireia Duñach su paciencia, su confianza, su dedicación, su apoyo y su estímulo constante en este proyecto que hemos visto nacer juntos. Eres ejemplar.

Al Dr. Antonio García de Herreros que ha estado pendiente de cada minúsculo detalle y sin el que nada de esto sería posible.

Ahora viene lo difícil, porque a lo largo de tantos años mucha gente se cruza en tu camino: para no hacerme interminable, pondré a los que recuerdo ahora mismo, pero los que no estéis, si alguna vez os acercásteis a mí y me hicisteis sonreír, también deberíais estar.

En primer lugar, gracias Susana, porque eres la piedra que elegí como cimiento para edificar mi vida, y está quedando una casa preciosa (y seguirá siendo así mientras me gusten las natillas Danone y tú quieras). En lo científico, nadie sabrá nunca cuánto me has apoyado y cuánto depende de tí que haya podido llegar hasta aquí. Porque has agarrado mis pies cuando empezaban a despegarse del suelo o has tirado de mis manos cuando me hundía en el lodo. Eres preciosa y maravillosa, osa, osa.

A todos los cateninos de todos los tiempos: Rosemary (fue breve pero intenso), Sandra (muchos besos para ti y para Ángel), Manolo (el mejor arrierito de Pucela), Julio (con todo lo grande que te está quedando el pecho, dudo que aún te quepa todo el corazón, tío, muchas gracias), Imma (un verdadero encanto de niña) y Danielo (mi hermano macarrilla), porque los ratos que hemos compartido han sido memorables y porque nos seguiremos viendo. Sois muy grandes y os quiero concomitantemente a todos.

A Nour (Dr. Loukili), porque fuiste la única mano que se me tendió desinteresadamente cuando desembarqué en la cruel selva que era el IMIM de antaño. Formas parte de mi familia para siempre, y tu Marta también. Suerte en todo y que podamos ir reuniéndonos para explicarlo.

A la nueva generación del IMIM: la Sandra, nuestra niñita Isa, Susana, Clarita, Bàrbara, Ari, Cristina, Txell y a ellos; Miki, Maurici, Fran y Agus (como si lo fueras), porque habéis abierto una ventana grande y refrescado el ambiente y siempre es un placer compartir cualquier momento con vosotros.

A todos los que tuvieron una mirada de apoyo y un abrazo para mí en los malos momentos: Paco (Real), Pilar (Navarro), Arrate (Mallabiabarrena), Francesc (Granés), Gabriel (Gil), Xavi (Mayol, ciutadà del labo i amant de van Gaal com jo), Josep María (de Anta), Anouschka (Skoudy), Clara (Francí), Jepi (Baulida), David (Domínguez), Mercè (Monfar, espero seguir-te veient molt sovint), Montse (Nácher), Silvia (Gómez), o la siempre encantadora Carme (Torns). Mil gràcies.

A los que sobreviven en Biofísica, con los que compartí tantos ratos: Mercè (Yáñez, la secre más bella de la UAB) y Elodia (eres toda una torera, gracias por tantos momentos). Antonio (Frumento), Clara (López), Álex (Perálvarez), Merce (Márquez), Álex (el tipo más técnico), Ignaci e Ivan (los computerizados), Anas (Grancelli y Andrés, tan rebosante de elegancia siempre), Víctors (Lórenz y Buzón), Natàlia, todos los titulares de siempre (Esteve, Manel, Toni i Joan, sempre m'heu ajudat quan ho he necessitat, gràcies), en Pep (Cladera, pare d'en 'Kevin', gràcies per tantes converses i estones desestressants), la Mònica (Companyó), Laura (forgoteé tu segundo nombre, Hermida), África (¿tienes nombre de continente porque no se encontró recipiente más pequeño para toda tu humanidad?) y muy especialmente a Ramon (el nom amb accent o sense?, és important) Barnadas, la mente más brillante con el alma más profunda de todas, todo un ejemplo a seguir (ho sento, sé que no t'agraden els piropos però te'ls mereixes, por-su- puesto ets una persona genial de debò).

A Xavi León '*the pulp*' mi compañero de prácticas con el que lo compartí 'casi' todo: ha sido un verdadero placer trabajar contigo; cuídame bien a los niños los años próximos...

A mis compañeros de promoción que se quedaron en la vecindad de la UAB y sirvieron de terapia tantas veces: Sonia, Silvia, Elena (pelín más lejos), Jordi, Quim, Alex; que ens seguim veient.

A mis amigos de Ripo de siempre: David, Rafa e Isma, a los que gracias a Dios sigo viendo con mucha frecuencia. Sois unos tipos formidables. Lo que sigue es en lo que anduve liado estos últimos años, también hay un cachito vuestro...

Y por último a toda mi familia: todos mis tíos, mis dos hermanillas que molan mazo, mis cuñaos que son la bomba, mis suegros que dieron forma a una mujer excelente y que me tratan como a un hijo, a mi 'boli' del alma y a mis padres, que tanto han sufrido por que llegue hasta aquí. Os quiero a todos.

Jose, TT.