

Regulació de l'activitat transcripcional d'Snail per fosforilació

Bàrbara Montserrat Sentís
Barcelona, 2006

Programa de Doctorat en Bioquímica i
Biologia Molecular

Unitat de Recerca en Biologia Cel·lular i
Molecular, IMIM



Regulació de l'activitat transcripcional d'Snail per fosforilació

Memòria presentada per Bàrbara Montserrat Sentís per a optar al grau de Doctora en Bioquímica i Biologia Molecular per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Tesi doctoral realitzada sota la direcció
d'Antonio Garcia de Herreros a la Unitat de Recerca
en Biologia Cel·lular i Molecular de l'Institut
Municipal d'Investigació Mèdica

Antonio Garcia de Herreros,
Director de la tesi

Bàrbara Montserrat Sentís,
Doctoranda

Agraïments

En primer lloc vull agrair a l'Antonio la oportunitat de treballar al seu grup. Gràcies per anar guiant la meva feina i ajudar-me a superar els entrebancs, per la paciència, el pragmatisme i l'optimisme. Gràcies també al David, per endinsar-me al món d'Snail i de la ciència, per ensenyar-me com treballar al laboratori, per l'entusiasme i la perseverança. També vull agrair l'ajuda i l'acollida en els seus laboratoris a l'Anna, la Karen, la Mariona, el Xavier i el Raül, i tots aquells amb els que he compartit moments durant aquestes estades, com a estudiant o durant la tesi.

També vull donar les gràcies a tots els membres de l'Snail Team, presents i passats, perquè de tots ells n'he après alguna cosa. Per compartir les penes i alegries d'aquesta proteïna i pels cops de mà infinits. I sobretot, gràcies a tota la gent amb la que he coincidit a la UBCM, que és molta, estudiants, doctornads, postdocs, tècnics, administratius, col·laboradors i investigadors, perquè a tots en general, i a tots en particular, els tinc alguna cosa o altra que agrair, algun que altre protocol, consell o "truquillo", les estones compartides a cultius, a l'impressora o a qualsevol racó de la unitat, els dinars al final del passadís, al Xiri o al Pato Pekin, els findes al lab (sobretot últimament), l'ocupació d'algun que altre despatx, el segrest d'un ordinador, i sempre que ho he necessitat, un cop de mà en qualsevol cosa que m'ha calgut. Agrair també totes les activitats extraescolars compartides: la pujada al Pedraforca, el meu pas fugaç per la Imimitable, les classes de francès, els cines, sortidetes en bici, els tallers de Sushi, un partidàs de futbol, una casa al Berguedà, passes de fotos, visites a Londres, Madrid,... (falta París!), sopars varis, de "Lobas", de comiats, d'aniversari... inclús un a Girona que es va acabar convertint en un sopar de negocis. Gràcies per convertir-vos en amics!!

Gràcies també a tots aquells extraimim amb els qui he compartit aquests darrers anys, amb mil sopars, cerveses, findes i activitats varies, a les nenes de Químiques i a les del Montserrat, als futboleros de la BDM, especialment als Lokomotiv, a les nenes de Les Pintes i extensiu a les Univers, a les veïnes de la Muntanya, a la Mar i el Miqui, als "biciclistes

marroquins", als Matinada, al profe d'escalada i a la caçadora d'Orques. Gràcies també al "Pequeño Saltamontes", més que veïna, membre de la nostra família graciencia, i al Nunoportugueix, un català com el que més. Agrair l'ajuda en aquesta tesi a la bibliotecària particular de Físiques, pel tràfic d'articles, i a la Gemma, per llegir-se tot això sense entendre res.

I per descomptat agrair a la família, o millor dit a les famílies, per tot el seu recolzament. A la Pilar i el Xavi per tot el suport amb qualsevol adjectiu imaginable, al Papa, pels seus ànims, als "emigrats", a la gran família de La Clota, als de Gràcia, als tiets bioquímics, als de Tàrrrega, als meus pares adoptius de sempre i als Sagris, que en certa manera també m'han adoptat.

Gràcies també a un gran amic i company, a qui més d'aprop ha viscut aquesta tesi, per totes les estones compartides, per la lluita i per la rauxa, per ser una gran persona i per acceptar-me tal i com sóc.

Abreviatures

Abreviatures

CHX: Cicloheximida

CIP: Calf Intestinal Phosphatase

CK1: Casein Kinase 1

CK2: Casein Kinase 1

CRM1: Chromosome Region Maintenance 1

Ct: carboxiterminal

E-box: Caixes E, Ephrussi box-like motif

EMT: Transició Epiteli-Mesènquima

GFP: Proteïna verda fluorescent

GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase- β

GST: Glutathione S-Transferase

ILK: Integrine-Linked Kinase

LCT: Lactacistina

LMB: Leptomomicina B

MBP: Maltose Binding Protein

MG132: Z-Leu-Leu-Leu-al

NES: Seqüència d'Export Nuclear

NLS: Senyal de Localització Nuclear

Nt: aminoterminal

PI3K: Phosphoinositide-3 Kinase

RFP: proteïna vermella fluorescent

RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

WB: Western-blot

Índex

Introducció	1
1. La transició epiteli mesènquima	3
1.1. Procés de canvi	3
1.2. Rellevància fisiològica	6
1.2.1. Desenvolupament	6
1.2.2. Fibrosi	7
1.2.3. Càncer	8
1.3. Inducció i regulació de l'EMT	9
1.4. Paper de l'Ecaderina en l'EMT	10
2. Snail	12
2.1. La superfamília d'Snail	12
2.2. Snail participa en processos de desenvolupament, fibrosi i càncer	14
2.2.1. Desenvolupament	15
2.2.2. Fibrosi	17
2.2.3. Càncer	18
2.4. Vies de senyalització que indueixen l'expressió d'Snail	19
2.3. Funcions moleculars d'Snail	20
Materials i mètodes	25
Resultats	41
1. Snail es localitza al nucli i al citosol de diferents línies tumorals	43
2. Dos dominis diferents de la proteïna (aminoterminal i carboxiterminal) són els responsables de la localització subcel·lular alternativa d'Snail	46
3.-Una seqüència rica en leucines és la responsable de l'export nuclear d'Snail mediat per CRM1	47
4. La fosforilació d'un domini ric en serines regula l'export nuclear	50
5. La fosforilació d'un domini ric en serines modula la interacció entre els fragments carboxiterminal i aminoterminal de la proteïna	51
6. La localització d'Snail modifica la seva funcionalitat	58

7. La fosforilació d'Snail i la seva distribució subcel·lular està regulada per les unions de la cèl·lula a la matriu extracel·lular	59
8. Snail és fosforilat <i>in vitro</i> per les quinases GSK3 β i CK2	62
9. CK2 estimula la fosforilació d'Snail per GSK3 β	65
10. El mutant Snail-119SA es fosforila pitjor que l'Snail-WT i es localitza preferentment al citosol	67
11. L'Snail no fosforilable es comporta com l'Snail "wild-type"	70
12. Snail es degrada al nucli i de manera independent a la fosforilació en el domini ric en serines	71
13. La regió 108-151 d'Snail és la responsable de la inestabilitat dins el nucli	75
14. Akt regula la degradació nuclear d'Snail	76
Discussió	79
1. Snail es localitza al nucli i al citoplasma	81
2. El transport nucleocitoplasmàtic d'Snail està regulat per fosforilació	86
3. Snail és fosforilat per les quinases CK2 i GSK3 β	89
4. Joga algun paper Snail al citosol?	91
5. Snail es degradat al nucli pel sistema del proteasoma	92
6. Un model per a la regulació de la degradació	93
Conclusions	97
Bibliografia	99

Introducció

1. La transició epitelí mesènquima

1.1. Característiques generals

L'anomenada transició epitelí-mesènquima (EMT, de l'anglès "Epithelial-Mesenchymal transition") fa referència al canvi molecular i en conseqüència fenotípic que pateixen certes cèl·lules epitelials en resposta a diferents senyals, i que les indueix a adoptar una morfologia mesènquima. Les cèl·lules experimenten canvis tant en l'arquitectura com en el comportament cel·lular, que es veuen reflectits en les diferències en la morfologia, l'arquitectura cel·lular, l'adhesió i la capacitat de migració (Hay, 1995).

Un epitelí típic està format per una capa de cèl·lules, sovint una monocapa, amb cèl·lules epitelials individuals contigües les unes amb les altres en una disposició uniforme. Les cèl·lules tenen una polarització apico-basolateral, es troben associades a una làmina basal i unides entre elles per unions laterals, formades per estructures especialitzades de la membrana com ara les unions estretes ("tight junctions"), les unions adherents ("adherent junctions") i els desmosomes (Figura IR1).

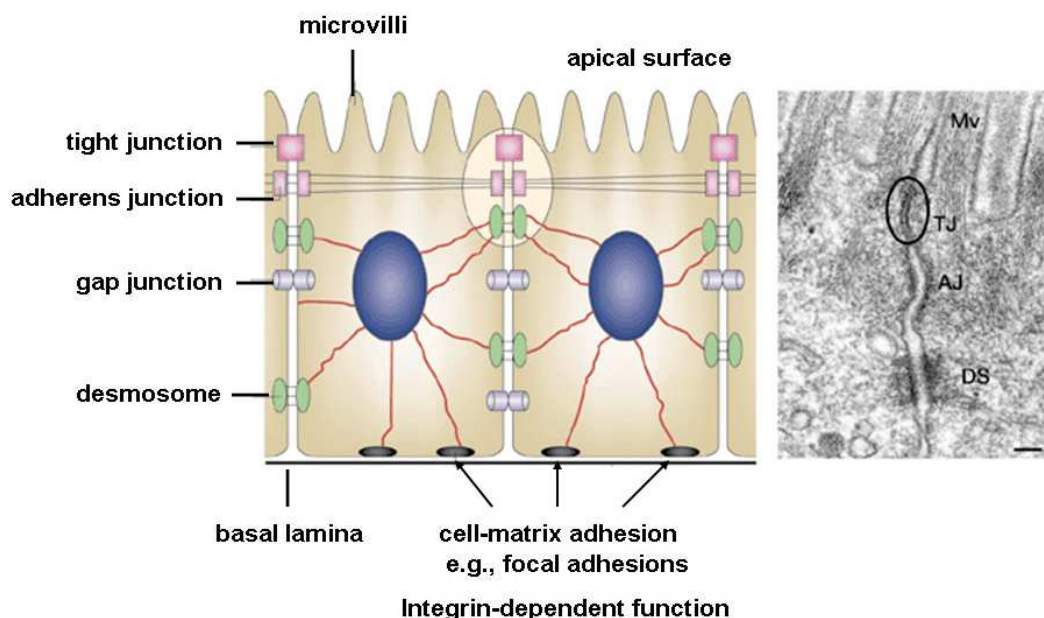


Figura I1. Estructura de les cèl·lules epitelials. Les cèl·lules epitelials presenten polaritat apicobasal, amb una cara apical i unides a la làmina basal. En la Figura I s'esquemmatitzen els diferents tipus d'unió cèl·lula-cèl·lula, assenyalats a la dreta en una fotografia presa amb microscopi electrònic.

La seva disposició localitzada i regularment espaiada dins la cèl·lula permet la formació d'un anell lateral on el citoesquelet d'actina es troba polaritzat, de manera que manté les cèl·lules fortament unides i inhibeix el moviment de cèl·lules individuals fora de la monocapa epitelial. En condicions normals, les cèl·lules ni es desenganxen ni migren tot i que tenen certa capacitat motriu, sempre, però, dins la capa epitelial. Aquesta forta adhesivitat interna permet que la monocapa epitelial delimiti un espai tridimensional i li doni definició estructural i rigidesa mecànica (Thiery and Sleeman, 2006).

Les cèl·lules mesenquimals estan més esteses, tenen una forma més allargada, comparant-les amb les cèl·lules epitelials, tenen polaritat front-cua, filipodis, i capacitat motriu invasiva. Les adhesions entre cèl·lules mesenquimals veïnes tenen lloc per contactes focals, que són menys fortes que les que tenen les seves homòlogues epitelials, i no estan associades a una làmina basal, de manera que permeten una major capacitat migratòria.

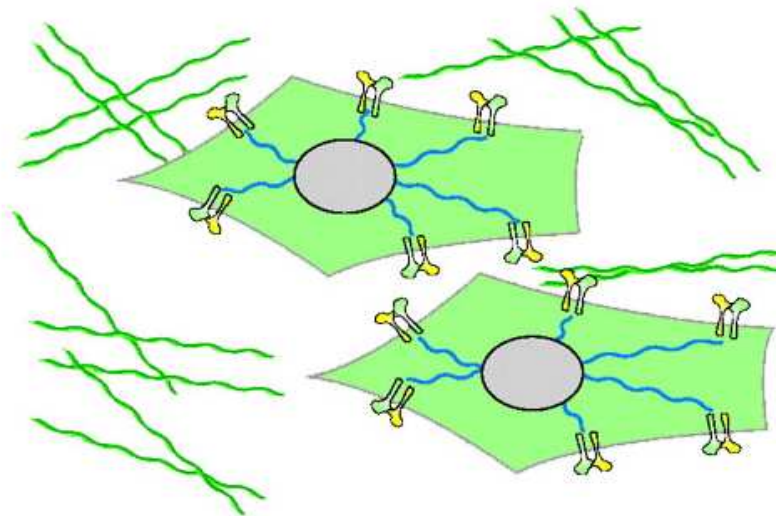


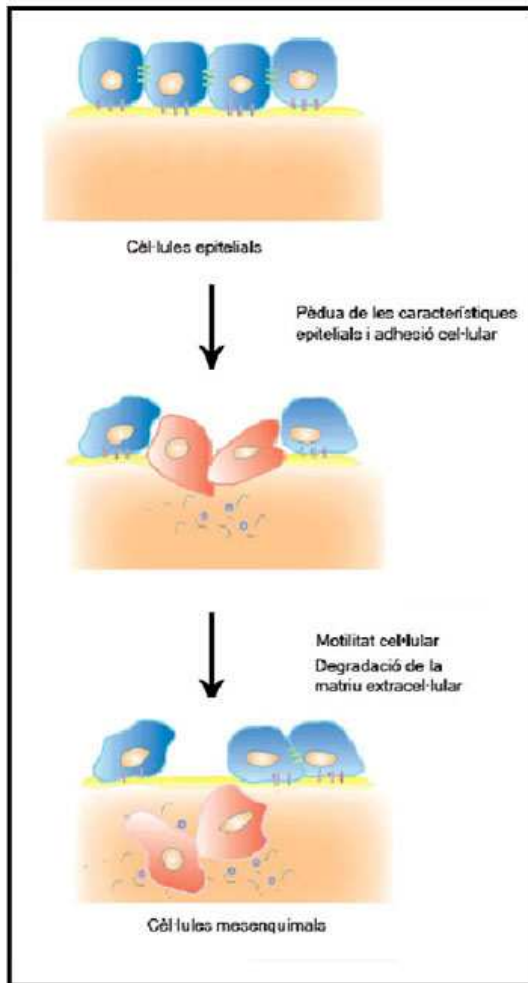
Figura 12. Fenotip de les cèl·lules mesenquimals. Les cèl·lules mesenquimals presenten un fenotip allargat i polaritat front-cua. Només formen contactes de manera transitòria i secreten certs enzims que els permeten degradar la matriu extracel·lular per la qual es mouen.

La migració és mecanísticament diferent al moviment epitelial. Com que generalment no presenten unions intracel·lulars fortes ni s'estructuren de forma alineada, formen estructures irregulars no uniformes en la seva estructura i densitat. Aquesta estructura irregular del mesènquima, al

contrari que l'estructura epitelial, no permet una especialització topològica rígida. En cultiu, les cèl·lules mesenquimals tenen forma de fus, amb una morfologia semblant als fibroblasts i amb tendència a ser molt motrius, tot i que *in vivo* no ha de ser així. De fet, hi ha força plasticitat en la migració i s'han descrit diferents maneres de migrar de les cèl·lules mesenquimals *in vivo*: migren juntes formant una cadena, com a cèl·lules soltes, ja sigui per lliscament ("crawling"), de forma ameboïda o per cicles de translocació de tipus extensió-adhesió-retracció (Friedl, 2004).

Així doncs, en el procés de canvi que transforma una cèl·lula epitelial en una de mesenquimal, l'EMT, les cèl·lules experimenten un canvi d'un fenotip polaritzat i epitelial a un d'altament motriu i fibroblastoïde que inclou alteracions en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula, en la interacció cèl·lula-substrat, en la degradació de la matriu extracel·lular i en la reorganització del citoesquelet. Tots aquests canvis fan augmentar la seva capacitat migratòria i invasiva, així com també la resistència a l'anoikis/apoptosi, de manera que permeten que la cèl·lula es desplaci a teixits llunyans (Huber et al., 2005). A nivell molecular, aquests canvis fenotípics es tradueixen en la baixada de marcadors epitelials, com l'Ecaderina, la Desmoplaquina i la Citoqueratina, i en la pujada de marcadors mesenquimals, com ara la N-Cadherina, la Vimentina i la Fibronectina, la localització nuclear de β -Catenina, i l'augment en la producció de factors de transcripció tals com Snail, Slug, Twist, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2, i/o E47 (Lee et al., 2006). A nivell cel·lular aquest procés inclou dos passos diferents associats a la pèrdua total de la polaritat cel·lular epitelial: 1. Davallada en l'adhesió intercel·lular (per dissociar-se de les capes cel·lulars epitelials) i 2. Increment en la motilitat (per migrar cap a teixits connectius) (Figura I3).

Però, tot i que l'EMT engloba una un ampli espectre de canvis intercel·lulars i intracel·lulars, no sempre es poden observar tots durant una transició, de manera que es poden obtenir diferents "subtipus" d'EMT. Aquestes EMT poden ser induïdes per diferents agents o combinacions d'aquests, són sovint dependents d'un model cel·lular en particular, poden ser reversibles, i poden induir o reprimir la progressió del programa d'expressió gènica de la cèl·lula epitelial vers una gran diversitat de fenotips (Huber et al., 2005). Entre tots aquests possibles canvis que tenen lloc durant l'EMT, podem definir que té lloc una "EMT complerta" quan el fenotip



cel·lular és fibroblastoide, les cèl·lules han perdut l'expressió de l'E-Cadherina i hi ha un guany de la Vimentina. Aquesta EMT és la que més es relaciona amb la invasió local i la metàstasi (Grunert et al., 2003).

Figura I3. La transició epiteli-mesènquima té lloc en dos passos ben diferenciats. En la transició epiteli-mesènquima primer cal que la cèl·lula perdi les seves característiques epitelials, cal una desaparició de les unions cèl·lula-cèl·lula i, en un segon pas, cal que les cèl·lules adquireixin característiques mesenquimals, de manera que augmentin la motilitat cel·lular.

1.2. Rellevància fisiològica

Així doncs, l'EMT és el mecanisme de canvi pel qual cèl·lules epitelials (immòbils, adherides entre elles i a la matriu extracel·lular) generades en una regió particular es poden dissociar de l'epiteli i migrar com a cèl·lules individuals per dirigir-se a diferents localitzacions. Aquests tipus de processos tenen lloc tant en fases clau del desenvolupament embrionari com en diferents processos patològics, com la fibrosi i la progressió tumoral.

1.2.1. Desenvolupament

Durant el desenvolupament embrionari, l'ectoderma és el teixit més primerenc i forma capes de cèl·lules fortament unides entre elles per les unions adherents. Aquestes capes de cèl·lules epitelials contigües estan unides fermament a una matriu extracel·lular situada inferiorment i que conté Col·lagen IV i Laminina, coneguda com a membrana o làmina basal

(Hay, 2005). El primer moment en què té lloc un procés d'EMT és quan en l'estadi de blàstula l'endoderma presumptiu s'invagina i es delamina per donar lloc a cèl·lules mesenquimals migradores en el procés de gastrulació. La migració d'aquestes cèl·lules de l'epiblast permetrà la formació de l'endoderma i del mesoderma (Wolpert, 1998). Així doncs, durant el desenvolupament dels metazous l'EMT és requerida per als moviments morfogenètics subjacents a la formació de l'endoderma parietal i la gastrulació, però també durant la formació d'una àmplia gamma d'òrgans i teixits, tals com la cresta neural, el cor, el sistema mucoesquelètic, estructures craneofacials i el sistema nerviós perifèric (Thiery, 2002).

1.2.2. Fibrosi

Els principals efectors de la fibrosi en diferents òrgans, coma ara en ronyons, pulmons i fetge, són els fibroblasts intersticials que deriven de cèl·lules de l'epiteli danyat del propi òrgan i que han patit una EMT (Iwano et al., 2002). En els processos inflamatoris que tenen lloc com a resposta a dany en el ronyó, hi ha un augment de certs factors, com TGF β , EGF i FGF2 que poden induir l'EMT de les cèl·lules epitelials tubulars (Kalluri and Neilson, 2003). Aquesta inducció ha estat comprovada en models animals de malaltia renal, tot i que no reflecteixen acuradament el procés que té lloc durant la malaltia en humans. Tot i això també s'han fet observacions similars en fibrosis renals d'humans (Rastaldi et al., 2002). La diàlisi renal causa dany en el teixit mesotelial de la cavitat peritoneal, que provoca una EMT d'aquestes cèl·lules i un inici de fibrosi, molt probablement com a resultat de la producció de TGF β (Aguilera et al., 2005). Aquests esdeveniments s'han demostrat en models animals (Margetts et al., 2005). En malalties pulmonars fibròtiques, com ara la fibrosi pulmonar idiopàtica, s'han observat uns nivells de TGF β elevats, que provoquen una EMT de les cèl·lules alveolars epitelials (Willis et al., 2005; Yao et al., 2004). A més a més, s'ha vist que les EMTs induïdes per TGF β tenen un paper important durant la formació de cataractes i la fibrosi capsular en la lent induïda per dany (de Iongh et al., 2005).

Així doncs, sembla que els mateixos mediadors d'inflamació produïts com a resposta al dany, són els causants de l'EMT que provoca fibrosi en els ronyons, el peritoneu, els pulmons, i en la formació de cataractes. La

importància del TGF β en la patogènia de les malalties fibròtiques dependents de les EMT queda reflectida pel fet que ratolins Smad3 $^{-/-}$ són resistents a la inducció de malalties fibròtiques (Flanders, 2004).

1.2.3. Càncer

Diverses observacions donen suport a la idea que l'EMT té un paper important en la progressió tumoral, ja que és molt evident que les cèl·lules pateixen canvis fenotípics que els permeten abandonar una capa epitelial organitzada i iniciar un procés metastàtic que conduirà a l'extensió de la malaltia (Savagner, 2001). Les metàstasis tumorals tenen lloc a través d'una sèrie de passos seqüencials, mostrats en la Figura I3, que comprenen: el creixement tumoral local, on les cèl·lules epitelials acaben formant un carcinoma; la invasió i transmigració a través de les membranes basals i del teixit hoste no tumoral; intravasació cap als vasos sanguinis; disseminació i supervivència dins el corrent sanguini; extravasació, i restabliment en llocs distants del tumor primari. En alguns tumors l'EMT és transitòria, té lloc en els fronts d'invasió de carcinomes primaris metastàsics, i pot ser revertida després de l'establiment de la metàstasi, on les cèl·lules pateixen una transició mesènquima-epiteli (MET, de l'anglès mesenchymal-epithelial transition) (Figura I4).

Durant aquesta progressió cap a competències metastàsiques, les cèl·lules dels carcinomes perden les característiques epitelials i adquireixen patrons d'expressió gènica i propietats mesenquimals. De forma concomitant hi ha canvis en les propietats d'adhesió i s'activen la proteòlisi i la motilitat, de manera que les cèl·lules tumorals són capaces de migrar i establir tumors secundaris en altres teixits distants, de manera que inicien un nou focus tumoral. Tot i això, també s'ha suggerit que l'adquisició de marcadors i propietats mesenquimals durant la progressió tumoral simplement reflecteix inestabilitat genòmica i que l'EMT no succeeix en tumors (Tarin et al., 2005). Respecte a això s'ha argumentat que és poc probable que els patrons d'expressió gènica complexos i coordinats requerits perquè cèl·lules tumorals metastatitzin puguin aparèixer per mutacions a l'atzar com a resultat de la inestabilitat genòmica, i que de fet és més probable que la inestabilitat genòmica canviï l'expressió de factors importants que regulen l'EMT (Thiery and Sleeman, 2006).

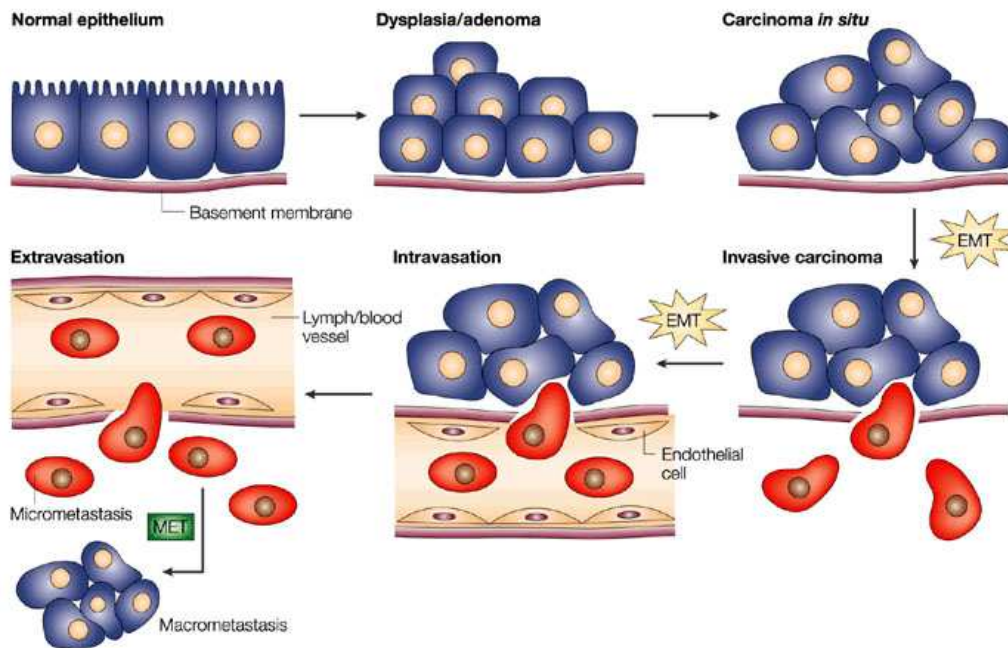


Figura I4. El procés de l'EMT durant la progressió tumoral. En aquesta figura s'observen els passos que tenen lloc quan un epiteli normal es transforma i pateix una transició epiteli-mesènquima durant la progressió tumoral, que permet que les cèl·lules transformades migrin cap a altres teixits i formin metastasi.

1.3. Inducció i regulació de l'EMT

L'EMT és un procés dinàmic que engloba moltes vies de regulació entrecruades, així com altres esdeveniments intracel·lulars i intercel·lulars. Els mecanismes moleculars que regulen l'EMT es solapen considerablement amb aquells que controlen l'adhesió cel·lular, la invasió, la motilitat, la supervivència i la diferenciació.

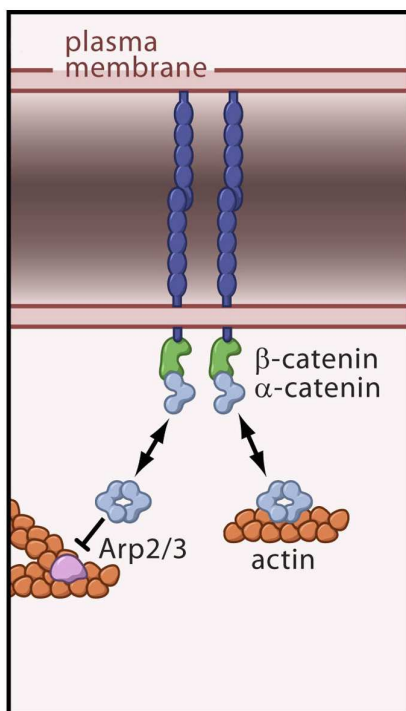
Estudis en cultius cel·lulars *in vitro* mostren les constatacions següents: 1) Hi ha molts activadors extracel·lulars que inicien l'EMT, 2) Existeix un entrecruament entre les diferents vies de senyalització que activen i reprimeixen l'EMT i 3) La majoria de vies que activen l'EMT tenen "finals de ruta" comuns, com pot ser la regulació a la baixa d'E-cadherina o l'expressió de certs gens associats a les EMT, com ara Snail (Thiery and Sleeman, 2006). Per altra banda, estudis *in vivo* demostren la importància del context fisiològic i com cada EMT en particular és regulada per un grup concret d'activadors i repressors (Zavadil and Bottinger, 2005).

Els inductors inicials de l'EMT poden ser tant components de la matriu extracel·lular (colagen, àcid hialuronic (Zoltan-Jones et al., 2003) com factors solubles (HGF, TGF β ,... (Nakamura et al., 1989;Stoker and Perryman, 1985)). La resposta a aquests senyals, mitjançant els seus

receptors de membrana, dóna lloc a l'activació d'efectors intracel·lulars que orquestren el desmembrament dels complexos d'unió cèl·lula-cèl·lula i els canvis en el citoesquelet que tenen lloc durant l'EMT. L'activació de les diferents vies de senyalització també dóna lloc a l'activació de reguladors transcripcionals (com ara Snail o Slug) que modulen els canvis en els patrons d'expressió gènica associats a l'EMT. La diana principal d'aquests reguladors transcripcionals és l'E-cadherina, una proteïna que, com es descriu tot seguit, és fonamental per a l'estabilitat dels contactes i la regulació a la baixa de la qual (fins i tot per mutacions, com té lloc en alguns càncers, (Peinado et al., 2004b)) té conseqüències importants de gran rellevància en l'EMT.

1.4. Paper de l'Ecadherina en l'EMT

L'E-Cadherina, la molècula d'adhesió prototípica de les unions adherents, té funcions importants en l'embriogènesis i en l'arquitectura cel·lular, ja que és necessària per a la formació de les unions intercel·lulars i l'establiment de la polaritat cel·lular. Com podem veure en la Figura I5, és una molècula transmembrana que forma part de les unions adherents (AJ, de l'anglès "Adherent Junctions"), que estableix unions homotípiques depenents de calci. En la seva part intracel·lular es troba unida a β -



Catenina, que s'uneix a α -Catenina, i formen un complex essencial per a l'estabilitat dels filaments d'actina del citoesquelet cel·lular (Drees et al., 2005; Kemler, 1993; Yamada et al., 2005). Les AJ determinen la polaritat cel·lular epitelial i desapareixen durant la transició epiteli-mesènquima (Ikenouchi et al., 2003).

Figura I5. Les unions adherents (AJ). Esquema simplificat on es mostren els complexos proteics que tenen lloc en les unions adherents. L'E-Cadherina forma complexos homotípics entre molècules de dos cèl·lules veïnes. En la seva part intracel·lular es troba unida a la β -Catenina, que s'uneix a l' α -Catenina, i eestabilitzen els filaments d'actina.

Els nivells d'E-cadherina esdevenen limitants per a la integritat epitelial, ja que la pèrdua de la seva expressió dóna lloc, primer, a la pèrdua de les unions adherents i de la unió intercel·lular dependent de calci i segon, a l'alliberament de la β -Catenina citoplasmàtica, que pot anar al nucli i incrementar la via de Wnt, de manera que activi la regulació transcripcional mitjançada per LEF/TCF-4 (Thiery and Sleeman, 2006). En diversos treballs s'ha comprovat com en cèl·lules epitelials, la pèrdua de les adhesions cèl·lula-cèl·lula mediades per l'E-cadherina les dota de capacitats invasives (Behrens et al., 1989). Molts autors han demostrat que la transfecció de l'E-Cadherina en cèl·lules mesenquimals reverteix el seu fenotip cap a un de més epitelial (Behrens et al., 1991; Hay and Zuk, 1995; Takeichi, 1995). A més a més, la producció *de novo* d'E-Cadherina en cèl·lules mesenquimals normals o transformades pot induir la formació de contactes cèl·lula-cèl·lula estables i l'aparició d'unions adherents. En cèl·lules epitelials els contactes primerencs també són mediat per molècules d'E-Cadherina que s'agrupen en petits complexos d'unió ("junctional complexes"), que s'estenen per establir unions adherents estables i promouen la formació dels desmosomes (Adams and Nelson, 1998; Garrod et al., 1996). Precisament, s'ha comprovat que l'E-Cadherina és necessària per al manteniment d'aquestes unions adherents estables, ja que anticossos anti E-Cadherina poden desfer els contactes i induir un fenotip mesenquimal (Imhof et al., 1983)). Per tant *in vitro* s'ha observat una correlació directa entre la pèrdua de l'E-Cadherina i la pèrdua del fenotip epitelial, i un revertiment parcial o total del fenotip mesenquimal i invasiu si s'expressa constitutivament o ectòpicament l'E-Cadherina (Behrens et al., 1998; Navarro et al., 1991; Vleminckx et al., 1991). *In vivo* també s'ha comprovat com hi ha una pèrdua en l'expressió de l'E-Cadherina en les EMT que tenen lloc durant el desenvolupament (formació de l'endoderma parietal en ratolí i durant la gastrulació en *Drosophila*, pollastre i ratolí) i processos patològics (Thiery, 2002). Tant en línies cel·lulars com en tumors hi ha una correlació directa entre la pèrdua d'E-Cadherina i la pèrdua del fenotip epitelial. Per tant l'EMT requereix la regulació a la baixa de l'E-Cadherina.

Durant la progressió tumoral, l'E-Cadherina pot ser silenciada de maneres diferents, ja sigui per control posttraduccional o per regulació a la

baixa de la seva expressió, que pot tenir lloc per mutacions somàtiques, per hipermetilació del promotor i/o, com succeeix en la major part de vegades, per repressió transcripcional directa (Peinado et al., 2004b). Per tant, el procés de repressió de l'E-Cadherina, i la consegüent inducció de l'EMT, ja sigui en processos tumorals com durant el desenvolupament embrionari, és dut a terme per un mateix grup de factors de transcripció, on, entre d'altres, cal esmentar Slug (Hajra et al., 2002), E47 (Perez-Moreno et al., 2001), Zeb1 i Zeb2 (Comijn et al., 2001), Twist (Yang et al., 2004) i Snail (Batlle et al., 2000;Cano et al., 2000).

Diferents evidències han demostrat que Snail és el principal responsable de la davallada en la transcripció d'E-Cadherina (Batlle et al., 2000;Cano et al., 2000). De fet, ratolins mutants per a Snail moren durant la gasrulació, a causa d'una EMT deficient i una expressió sostinguda d'E-Cadherina (Carver et al., 2001).

2. El factor transcripcional Snail

2.1. La superfamília d'Snail

Snail va ser identificat inicialment en una recerca a gran escala de gens essencials per al desenvolupament en *Drosophila*. Des d'aleshores s'han descrit homòlegs a diversos grups d'animals: vertebrats, anèlids, insectes, mol·luscs, nemàtodes, procordats (Nieto, 2002) aus, amfibis, peixos i mamífers (Hemavathy et al., 2000). Fins ara s'han descrit més de 50 membres de la família en metazous (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005;Nieto, 2002).

Els membres de la família d'Snail actuen com a reguladors transcripcionals. Una de les seves principals característiques és la presència de dits de zenc del tipus C_2H_2 en la part carboxiterminal de la proteïna. Aquests poden variar en número de quatre a sis depenent de la família i de l'espècie, però perquè la proteïna sigui funcional en són requerits un mínim de quatre (Fuse et al., 1994;Nakayama et al., 1998). Els dits de zinc funcionen com a dominis de reconeixement i unió a una seqüència específica de DNA. S'ha descrit que la seqüència palindròmica de reconeixement és 5'-CACCTG-3' dreta o inversa (Mauhin et al., 1993) i que correspon a una caixa E2, E-box a la qual també s'hi poden unir altres factors de transcripció del tipus bHLH (basic-helix-loop-helix) amb els quals

hi pot haver una hipotètica competició (Kataoka et al., 2000). Però la capacitat repressora d'Snail no només depèn de la regió carboxiteminal. En vertebrats aquesta activitat és depenent del domini anomenat SNAG (Grimes et al., 1996), que consta dels set primers aminoàcids de la proteïna i que és necessari per al reclutament de deacetilases d'histones (Peinado et al., 2004a). En altres organismes, com ara en *Drosophila*, Snail té un domini d'unió al cofactor CtBP, amb el qual interacciona per desenvolupar la seva tasca com a repressor transcripcional (Nibu et al., 1998). Tant el domini SNAG en vertebrats com el domini d'unió a CtBP en *Drosophila* es troben en la regió aminoterminal de la proteïna, regió no conservada entre les diferents espècies. Així doncs, es proposa (Nieto, 2002) que la capacitat repressora d'Snail està evolucionament conservada, però pot usar diferents mecanismes, ja sigui reprimint directament mitjançant el domini SNAG, usant un cofactor (CtBP), o bé de les dues maneres en conjunció.

En base a la comparació de seqüència dels dits de zinc entre les diferents espècies, s'ha proposat una divisió del que seria la superfamília d'Snail en dos grups filogenètics de gens separats però relacionats: Snail i Scratch. Els membres d'aquestes dues famílies tenen seqüències conservades comunes que les engloba dins la superfamília d'Snail, però també en tenen d'específiques que en permeten la classificació en una de les dues famílies (Manzanares et al., 2001; Nieto, 2002).

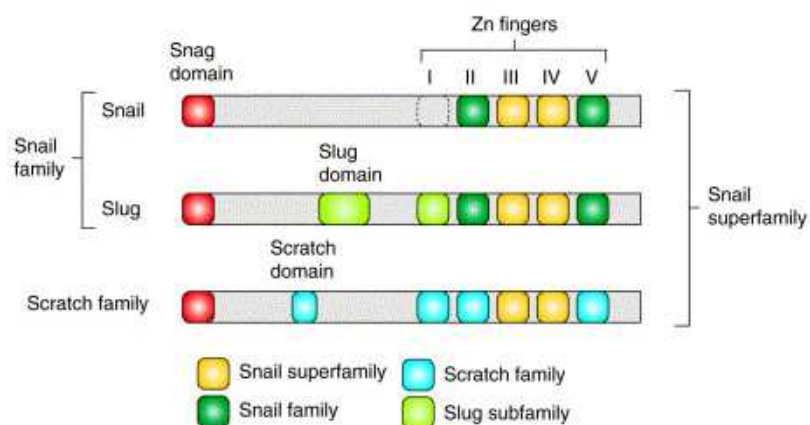


Figura I6. Classificació dels membres de la superfamília d'Snail. Esquema on es mostren les diferents regions responsables de la subclassificació dels membres de la superfamília d'Snail.

En mamífers hi ha tres membres de la família d'Snail (Snail, Slug i Smuc) i dos de la família d'Scratch (Scratch1 i Scratch2 (Barrallo-Gimeno

and Nieto, 2005)). A més a més, en humans, s'ha descrit l'existència d'un retrogen de Snail (Locascio et al., 2002; Paznekas et al., 1999).

Superfamília Snail	Família Snail	Snail retrogen
		Snail
		Slug
		Smuc
	Família Scratch	Scratch1
		Scratch2
		Scratch3

Taula 1. La superfamília d'Snail. Taula on es mostra la classificació i nomenclatura dels diferents gens de la superfamília d'Snail. En aquest cas es mostren les proteïnes descrites en vertebrats, tot i que el retrogen només ha estat descrit en humans.

2.2. Snail participa en processos de desenvolupament, fibrosi i càncer

La funció més coneguda per als gens de la família d'Snail és la inducció de l'EMT, parcialment deguda a la repressió de l'E-Cadherina. Com podem veure en la Figura I4, en tots els processos de EMT estudiats, ja sigui durant la formació del mesoderma, la delaminació de la cresta neural, com en tumors invasius o fins i tot en cèl·lules en cultiu, les cèl·lules que pateixen la transformació expressen els gens de la família d'Snail (Nieto, 2002).

Però els gens d'aquesta família, no només participen en l'EMT reprimint la E-Cadherina o regulant altres gens relacionats amb l'adhesió cel·lular i la migració, sinó que s'ha vist que també actuen sobre altres funcions, que poden ser importants per a una correcta EMT, però que també poden ser desenvolupades independentment d'aquesta transició. S'ha constatat que Snail pot regular la proliferació cel·lular i l'apoptosi, protegint-ne la cèl·lula d'aquesta (Vega et al., 2004).

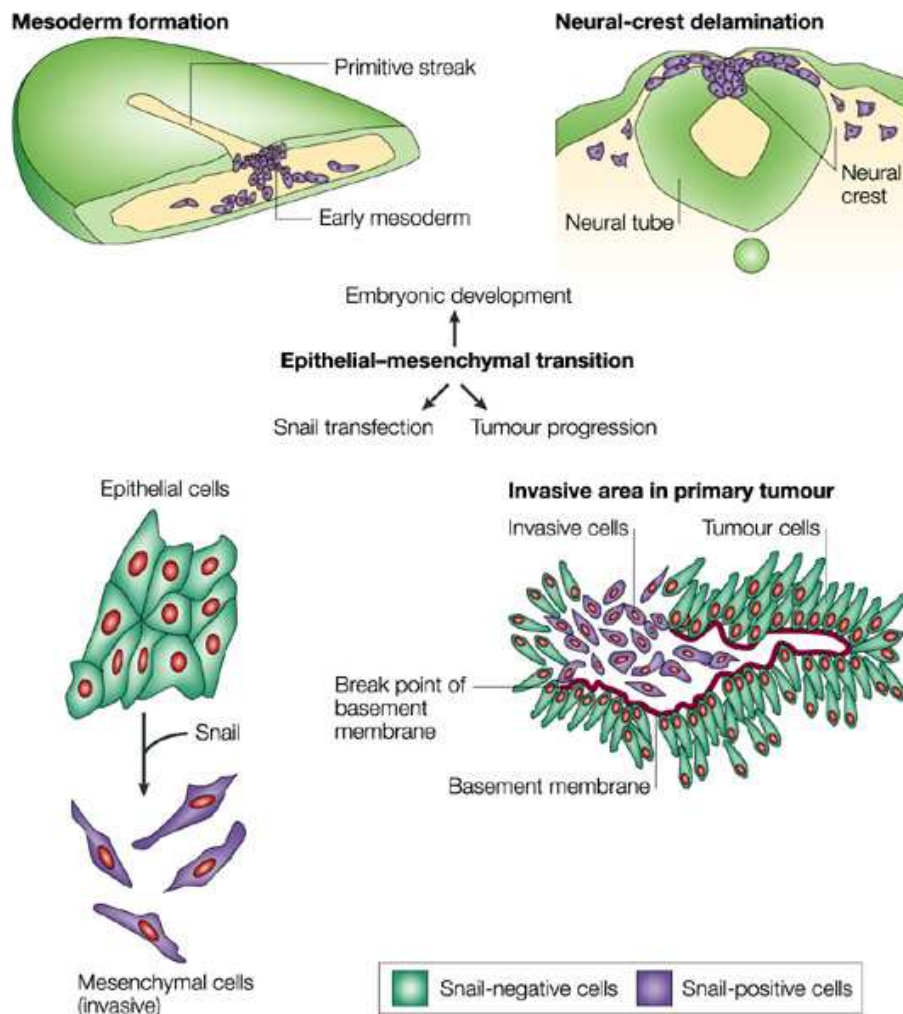


Figura 17. Snail induïx la transició epiteli-mesènquima durant el desenvolupament embrionari i la progressió tumoral. L'EMT induïda per Snail té lloc durant el desenvolupament embrionari, més concretament durant la formació del mesoderma i la delaminació de la cresta neural, i durant processos tumorals. L'expressió d'Snail en cèl·lules epitelials en cultiu també produeix una EMT equivalent a la que succeeix en els altres casos mostrats en la figura.

2.2.1. Desenvolupament

Els membres de la família d'Snail tenen un paper important en la morfogènesi de diferents animals vertebrats i invertebrats durant el desenvolupament embrionari, on s'han vist implicats en la formació de diferents teixits. Inicialment Snail es va identificar en *Drosophila* com un gen essencial en la formació del mesoderma. Posteriors estudis d'expressió i

funció van evidenciar el seu paper especificador en el mesoderma prospectiu, on reprimeix l'expressió de gens neuroectodèrmics, com ara rhomboid i single-minded (Nieto, 2002). Sembla que, en totes les espècies on s'han descrit homòlegs d'Snail, el paper d'aquest gen en l'especificació del mesoderma es troba conservat (Nieto, 2002), excepte en sangoneres (Goldstein et al., 2001) i lapes (Lespinet et al., 2002), on el patró d'expressió no sembla correlacionar-se amb aquesta funció. Però Snail també s'expressa en organismes diploblàstics (amb dos fulls embrionaris, que no tenen mesoderma), i ho fan en l'endoderma, que es forma per invaginació de l'ectoderma. A més a més, en certs animals triploblàstics (amb tres fulls embrionaris) com ara en mol·luscs (Lespinet et al., 2002) i aranyes (Yamazaki et al., 2005), Snail no s'expressa en el mesoderma, sinó en els teixits ectodèrmics que pateixen canvis en l'estructura cel·lular o moviments morfogenètics. Per tant, alguns autors han suggerit que la funció d'Snail està més relacionada amb la regulació de l'adhesió i els moviments cel·lulars que amb la de determinar el destí cel·lular (Barralho-Gimeno and Nieto, 2005). De fet, ratolins deficientes per a Snail moren en l'estadi de gastrulació i mostren deficiències en l'EMT, on la capa mesodèrmica formada és capaç d'expressar certs marcadors mesenquimals. Però les cèl·lules presenten polaritat apico-basal i unions adherents, es a dir, la no-presència d'Snail fa que no es reprimeixi l'E-Cadherina, fet que s'ha vist essencial per a una correcta entrada en la gastrulació (Carver et al., 2001). Els mutants KO d'Snail en *Drosophila* mostren el mateix defecte en l'estadi de gastrulació: els embrions amb pèrdua de funció mostren defectes en la invaginació del mesoderma presumptiu i retracció de la banda germinal (Hemavathy et al., 2000).

En vertebrats, Snail no només s'expressa durant la formació del mesoderma, sinó que també s'ha vist que participa en el desenvolupament de la cresta neural. En pollastre i *Xenopus*, les espècies on més s'han estudiat els gens de la família (Snail i Slug), s'ha vist que Slug participa tant en l'especificació com en el desenvolupament d'aquesta cresta neural (Del Barrio and Nieto, 2002; Nieto, 2002). En canvi, en ratolí el paper d'Snail i Slug en la formació de la cresta neural és més controvertit (Murray and Gridley, 2006). Tant en ratolí com en pollastre, Snail participa en l'establiment de l'asimetria dreta-esquerra (Isaac et al., 1997; Murray and

Gridley, 2006;Patel et al., 1999). Un cop les cèl·lules, ja siguin del tub neural com del mesoderma, s'han especificat, cal que es "delaminin" i migrin, i aquest procés implica un canvi fenotípic on les cèl·lules epitelials prenen un fenotip mesenquimal i poden migrar. Snail participa en aquest procés d'EMT.

Cal mencionar que en pollastre i ratolí, i durant aquests estadis inicials del desenvolupament, molts dels llocs d'expressió d'Snail i Slug estan invertits. Sembla que hi ha hagut una inversió en l'expressió que té lloc entre Snail i Slug entre les dues espècies en certs moments i teixits (cresta neural premigratòria, mesoderma primerenc i durant la formació primerenca de les somites) on, quan la repressió d'E-Cadherina és necessària, en una espècie s'expressa Snail i en l'altra s'expressa Slug. En altres moments del desenvolupament, quan els membres de la família participen d'altres funcions, com ara la generació d'asimetria bilateral, l'expressió i funció d'Snail i Slug respectivament s'han conservat entre les dues espècies durant l'evolució (Locascio et al., 2002;Nieto, 2002).

A més a més, s'ha constatat que Snail participa en altres processos que tenen lloc durant el desenvolupament, com ara la diferenciació de condrocits, on regula l'expressió del col·lagen tipus II i de l'agrecà (Seki et al., 2003); la regulació del cicle cel·lular, en què inhibeix l'expressió de la Ciclina D2 (Vega et al., 2004) i PCNA (Park et al., 2005); la divisió asimètrica en neuroblasts (Ashraf and Ip, 2001), i l'establiment de l'asimetria dreta-esquerra (Murray and Gridley, 2006). Snail també participa en la morfogènesi del pèl, expressant-se en les cèl·lules de l'epiteli que perden l'expressió d'E-Cadherina i s'invaginen per formar els bulbs fol·liculars (Jamora et al., 2005), i en el tancament del paladar, que dona lloc a una correcta separació entre les cavitats nasal i bucal (Martinez-Alvarez et al., 2004).

2.2.2. Fibrosi

Snail està activat en les cèl·lules mesotelials de pacients durant la fibrosi secundària que està associada a una diàlisi prolongada (Yanez-Mo et al., 2003). TGF β 1 pot induir aquests mateixos efectes tant en cèl·lules mesotelials en cultiu com en rates que reben una injecció intraperitoneal amb un vector adenovíric que transfereix TGF β actiu (Margetts et al., 2005).

La Fibrosi també apareix en els ronyons de manera concomitant amb l'expressió d'Snail després de patir dany. L'obstrucció uretral unilateral, que causa fibrosi renal i pot arribar a causar una fallada renal crònica, dona lloc a una EMT mediada per Snail i desencadenada per TGF β . L'expressió de TGF β pot mimetitzar aquest efecte tant *in vitro* com *in vivo* (Sato et al., 2003). L'expressió d'Snail podria ser una resposta general al dany en cèl·lules epitelials, ja que assaigs de tancament de ferida en ratolins mostren expressió d'Snail en fibroblastes activament migradors (Franci et al., 2006). Snail també apareix en les cèl·lules epitelials de la lent que pateixen una EMT com a resposta a dany durant l'extracció de cataractes (Saika et al., 2004).

2.2.3. Càncer

Com ja hem mencionat anteriorment, la inducció de l'EMT constitueix el primer pas en la cascada metastàsica, i diverses observacions apunten a una relació entre l'aparició d'Snail i una baixada d'expressió d'E-Cadherina que duu a aquesta EMT necessària per a la progressió tumoral cap a metastasi. *In vitro* s'ha observat que la transfecció d'Snail en cèl·lules que expressen E-Cadherina dona lloc a que aquesta proteïna es perdi i que s'indueixi l'EMT (Batlle et al., 2000;Cano et al., 2000). Aquest fenomen també es dona en diverses línies cel·lulars derivades de carcinomes hepatocel·lulars (Jiao et al., 2002), així com en les derivades de melanomes (Poser et al., 2001). *In vivo* també s'ha observat aquesta correlació inversa en els tumors induïts a ratolins (Cano et al., 2000), en tumors gàstrics humans (Pena et al., 2006;Rosivatz et al., 2002), en cèl·lules de carcinomes de mama (Blanco et al., 2002;Elloul et al., 2005;Fujita et al., 2003;Moody et al., 2005;Yokoyama et al., 2001), de colon (Palmer et al., 2004;Pena et al., 2005), d'ovari (Elloul et al., 2005), hepatocel·lulars (Jiao et al., 2002;Sugimachi et al., 2003), de cèl·lules esquamoses orals (Yokoyama et al., 2001) i en melanomes (Poser et al., 2001). Aquesta correlació inversa, fins ara observada a nivell d'mRNA, comença a ser confirmada a nivell de proteïna (Franci et al., 2006).

Però el paper d'Snail en la progressió tumoral no es limita a la repressió de la transcripció de l'E-Cadherina, sinó que, tal i com succeeix durant el desenvolupament embrionari, també és el responsable de la

davallada i de l'augment de l'expressió d'altres proteïnes importants, tant durant el procés d'EMT com en les altres funcions que se li atribueixen. (apoptosi, supervivència....). Aquestes altres funcions permeten a les cèl·lules adquirir propietats migratòries i invasives a través de canvis en el citoesquelet, la inducció de metaloproteïnases i protecció en front la mort cel·lular induïda per la pèrdua de factors de supervivència o bé per estímuls proapoptòtics. La resistència a la mort cel·lular mediada per Snail proporciona a les cèl·lules un avantatge selectiu a les cèl·lules per migrar i colonitzar altres teixits, és a dir, formar metàstasis (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005).

2.4. Vies de senyalització que indueixen l'expressió d'Snail

Com ja hem mencionat anteriorment, l'EMT pot ser iniciada per diferents molècules senyalitzadores tals com EGF, FGF, HGF, TGF β , BMPs, WNTs, i Notch.... Totes aquestes molècules poden activar Snail en diferents contextos cel·lulars (De Craene et al., 2005b). Per tant, podríem dir que la inducció d'Snail és un punt important de convergència per aquells factors que indueixen l'EMT durant diferents moments del desenvolupament embrionari i durant la progressió tumoral.

De totes les vies que augmenten l'expressió d'Snail, l'activada pels membres de la superfamília de TGF β ha estat la més ben caracteritzada, tant *in vivo* com *in vitro* i en diferents sistemes: en hepatòcits (Spagnoli et al., 2000;Valdes et al., 2002), en el tancament del paladar (Martinez-Alvarez et al., 2004), en cèl·lules epitelials (Peinado et al., 2003) i mesotelials (Margetts et al., 2005;Yanez-Mo et al., 2003) i durant el desenvolupament de la pell en ratolí (Jamora et al., 2005). *In vitro* s'ha vist que la inducció de l'expressió d'Snail mediada per TGF β 1 depen de l'activitat de PI3K i MAPK, molt probablement a través de l'activació de Ras en el cas d'aquesta última (Peinado et al., 2003). En alguns casos TGF β 1 pot cooperar amb altres inductors, com Raf (Janda et al., 2006) FGF2 (Peinado et al., 2003), H-Ras (Janda et al., 2002) o Notch (Grego-Bessa et al., 2004;Timmerman et al., 2004;Zavadil et al., 2004). *In vivo* s'ha descrit que la via de FGF mitjançant el receptor FGFR1 és necessari per a l'expressió d'Snail durant el procés de gastrulació en ratolins (Ciruna and Rossant, 2001). L'EGF pot induir Snail, i per tant l'EMT, de manera que promou

l'endocitosi de l'E-Cadherina dependent de caveolines (Lu et al., 2003). Un altre membre de la família EGF, Cripto, també s'ha vist implicat en l'expressió d'Snail. Cèl·lules provinents dels tumors i les hiperplàsies derivades de ratolins que expressen Cripto en la glàndula mamària, han patit una EMT i presenten nivells elevats d'Snail (Strizzi et al., 2004). Altres factors i estímuls que poden activar Snail són la hipòxia (Imai et al., 2003) per via del factor autocrí de motilitat (AMF) (Tsutsumi et al., 2004), VEGF (Yang et al., 2006), la via de Sonic Hedgehog mitjançant Gli-1 (Li et al., 2006), les espècies reactives d'oxigen (ROS) (Radisky et al., 2005), l'hormona anomenada pèptid associat a l'hormona paratiroidea (PTHrP) (Veltmaat et al., 2000), la via de Wnt (Bachelder et al., 2005), les BMP i les integrines (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005).

La via dels receptors d'estrògens (ER) també està implicada en la regulació d'Snail, en aquest cas inhibint-ne la seva expressió per mitjà de la seva diana MTA3, un membre del complex Mi-2/NuRD que participa en la repressió transcripcional d'Snail (Fujita et al., 2003).

Cal recordar que tots aquests estímuls i vies s'entrecreuen, i uns o altres estaran actius depenent de l'entorn fisiològic de cada moment.

Snail genes are a convergence point in EMT induction

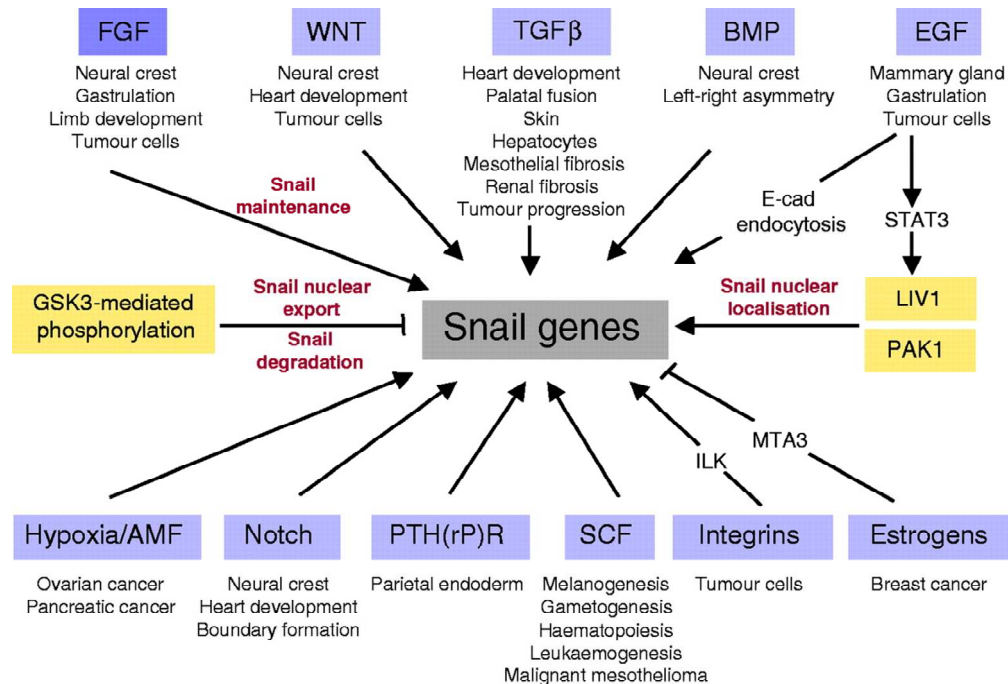


Figura 18. Vies involucrades en la regulació d'Snail. Esquema on es mostren els diferents estímuls capaços de regular l'expressió d'Snail.

2.3. Funcions moleculars d'Snail

Diferents experiments demostren que altres gens a part d'E-Cadherina són regulats per Snail, i que no es poden considerar un efecte secundari a la pèrdua d'E-Cadherina, ja que la seva transfecció no és suficient per revertir el fenotip mesenquimal altre cop cap a epitelial (Cano et al., 2000). Així mateix, s'ha comprovat que membres de la família d'Snail són capaços de regular els tres tipus d'unió que formen les cèl·lules epitelials: les unions adherents, les unions estretes i els desmosomes, que constitueixen el que podríem anomenar complex juncional epitelial (Ikenouchi et al., 2003). Les unions adherents són modificades regulant a la baixa l'E-Cadherina (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). Respecte a les unions estretes, en cèl·lules EpH4 estables per Snail s'ha observat que els nivells de proteïna claudin-3 i occludina són indetectables (Ikenouchi et al., 2003). Tot i que la majoria de treballs han descrit que la repressió de l'Ocludina té lloc a nivell transcripcional, certs autors han suggerit que Snail podria tenir també un efecte a nivell posttranscripcional (Ohkubo and Ozawa, 2004). Pel que fa als desmosomes, s'ha constatat que la presència d'Slug causa una baixada de Desmoplakina i Desmogleïna, i causa una deslocalització o reordenament dels filaments de Citokeratina en cèl·lules NBT-II (Savagner et al., 1997).

Snail no només actua directament sobre proteïnes de les unions entre cèl·lules, sinó que també regula a la baixa el nivell d'altres proteïnes típicament epitelials i que baixen o desapareixen en presència d'Snail com la Citoqueratina-18 (Guaita et al., 2002; Ikenouchi et al., 2003) i MUC-1 (Guaita et al., 2002). Altres dianes d'Snail com a repressor transcripcional són el Receptor de Vitamina D (Palmer et al., 2004), la subunitat beta de la Na/K-ATPasa, relacionada amb la motilitat cel·lular (Espineda et al., 2004), la p53 (Kajita et al., 2004), la CDK4 i les Ciclines D1 i D2, relacionades les tres darreres amb l'aturada en la proliferació cel·lular (Vega et al., 2004). A més a més diferents treballs mostren la capacitat d'Snail d'activar gens, tot i que no ha estat determinat encara si aquesta activitat és directa o bé està mitjançada per altres proteïnes o factors. Exemples de gens regulats a l'alça per Snail són els marcadors típicament mesenquimals Vimentina (Cano et al., 2000) i Fibronectina, els factors de transcripció LEF1 i ZEB1 (Guaita et al., 2002), les proteases de la matriu extracel·lular, que permetran a la

cèl·lula una major motilitat, la p21waf/CIP, també relacionada amb el cicle cel·lular (Vega et al., 2004) i el factor Wnt3a.

Recentment han aparegut dos estudis d'expressió diferencial en cèl·lules que expressen o no Snail, un en cèl·lules de carcinoma de colon que expressen hSnail de forma induïble (De Craene et al., 2005a), i l'altre en cèl·lules MDCK de ronyó de gos estables per a Snail (Moreno-Bueno et al., 2006). Tot i que aquests treballs presenten poques similituds en els gens que es veuen regulats per Snail, atribuïble al diferent disseny experimental i la plataforma "d'arrays" emprada, confirmen la implicació d'Snail en la regulació de gran diversitat de gens. Aquests es troben implicats en diversos processos cel·lulars, on entre d'altres cal destacar l'adhesió cel·lular, la diferenciació epitelial, el metabolisme cel·lular, el cicle cel·lular i la transducció de senyals.

Downstream targets of Snail

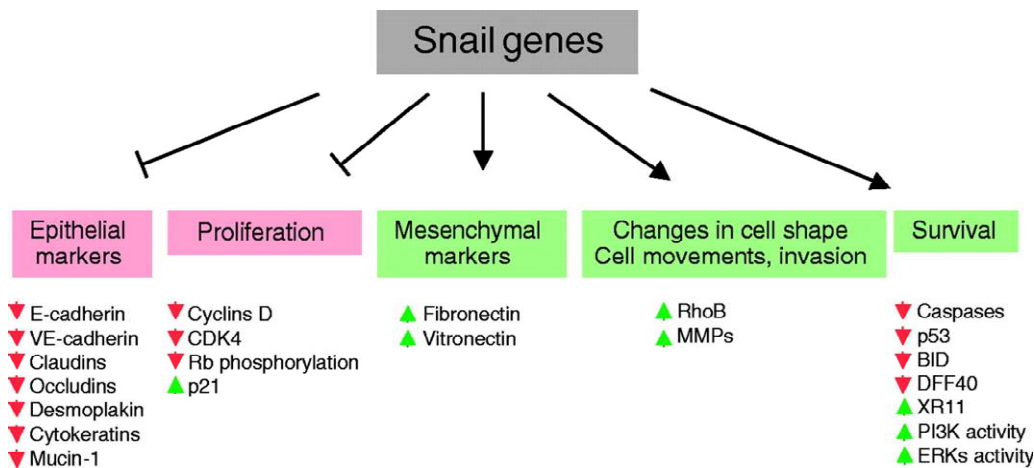


Figura 19. Gens diana d'Snail. Esquema on es resumeix sobre quines proteïnes actua Snail, quines activa i quines reprimeix.

Així doncs, sembla que un gran nombre de proteïnes els gens de les quals són diana per Snail, ajuden a desenvolupar el seu paper central en la inducció de l'EMT. En tot cas el gen diana "estrella" en aquesta funció és l'E-Cadherina que, com ja hem dit abans, és essencial en el manteniment de la integritat cel·lular i la seva desaparició sembla suficient perquè cèl·lules

epitelials perdin el seu fenotip polaritzat i esdevinguin mesenquimals, amb capacitats migratòries i invasives.

Tot i que s'ha descrit que diferents factors de transcripció són capaços de reprimir el promotor d'E-Cadherina tant *in vivo* com *in vitro*, sembla demostrat que el seu principal modulador és Snail, i que la seva presència és suficient *in vitro* per inhibir l'expressió d'E-Cadherina i induir les cèl·lules a una EMT (Nieto, 2002).

Malgrat les evidències de la manca d'E-Cadherina quan les cèl·lules expressen Snail, dades obtingudes per Hajra i col·laboradors (Hajra et al., 2002) i del nostre grup, mostrades en l'apartat de resultats, apunten a una possible coexistència d'Snail i E-Cadherina en certes línies tumorals. Aquest fet planteja la qüestió de si la presència d'Snail sempre correlaciona amb la seva activitat o si l'activitat d'aquest factor pot estar regulada postranscripcionalment.

Així doncs, la implicació d'Snail en la repressió de l'E-Cadherina ha estat àmpliament descrita. Tenint en compte que, en estudis previs realitzats tant en el nostre laboratori com en d'altres, s'observava que l'esperada correlació inversa entre l'expressió d'E-Cadherina i Snail no sempre tenia lloc, l'objectiu d'aquest treball fou l'estudi de la funcionalitat d'Snail en aquelles cèl·lules on hi havia una coexistència de mRNA de tots dues proteïnes, enfocant la qüestió a una possible modificació posttraduccional d'Snail que regulés la seva activitat transcripcional.

Materials
i mètodes

Cultius cel·lulars

Totes les línies cel·lulars utilitzades van ser mantingudes en medi modificat de Dulbecco (DMEM, Life technologies), suplementat amb penicil·lina/estreptomicina, glutamina i 10% de sèrum fetal boví. Es van mantenir a 37°C en una atmosfera humida al 5% de CO₂. Les línies epitelials són immortalitzades o provenen de tumors primaris d'humans, ratolí i rata, de diverses localitzacions: MDCK (epiteli tubular renal de gos), HT29- M6 (adenocarcinoma de còlon humà, seleccionada partir de la línia parental HT29 amb metrotexat a una concentració de 10⁻⁶ M, amb un fenotip mucosecretor), CaCo2 (adenocarcinoma de còlon humà amb fenotip absortiu), SW480 (adenocarcinoma de còlon humà), HCT116 (adenocarcinoma de còlon humà), MIAPaCa (adenocarcinoma ductal de pàncrees humà), RWP1 (carcinoma ductal de pàncrees humà), MCF7 (carcinoma ductal de mama humà), EpH4 (carcinoma ductal de mama de ratolí), NIH-3T3 (fibroblastsdèrmics immortalitzats de ratolí) i MDA 231 (cancer de mama humà).

Els clons d'MDCK que expressen establement Snail-WT van ser generats pel nostre grup (Batlle E. et al., 2000 i Guaita S. et al., 2002). Els clons MDCK-SNA-SA (mutant d'Snail no fosforilable) i MDCK-SNA-SD (mutant d'Snail que mimetitza l'estat fosforilat de la proteïna) van ser obtinguts de manera anàloga, transfectant els mutants en cèl·lules MDCK mitjançant el mètode habitual en el laboratori (vegeu l'apartat corresponent) i seleccionant-les amb 500 µg/mL de Geneticina (Gibco) durant dues setmanes. Els clons individuals foren aïllats i la seva expressió de proteïna analitzada per Western Blot.

En els assajos de localització cel·lular d'Snail per inhibir l'export nuclear, les cèl·lules transfectades amb Snail o els seus mutants foren tractades durant dues hores prèviament a la seva fixació amb Leptomomicina B (LMB, Sigma) a una concentració final de 5 ng/mL, diluïda en etanol absolut.

En els assajos d'estabilitat les cèl·lules (transfectades o no) van ser tractades durant cinc hores amb MG132 (Sigma) a una concentració final de 50 µM, Lactacistina (Sigma) a 10 µM i/o Cicloheximida (Sigma) a 25 µg/mL.

Constuctes

mmSnail fou clonat tal i com és descrit en Batlle et al., 2000, i mmSlug va ser clonat de manera anàloga, és a dir, per RT-PCR (kit One-Step RT-PCR System, Invitrogen, amb Platinum Taq polimerasa) a partir d'1 µg d'RNA total de cèl·lules NIH-3T3 mitjançant oligonucleòtids específics per a les zones 5' i 3' a partir de les seqüències exposades al GenBank (Snail:gi: 675558; Slug:gi:6755586). L'ATG d'inici es conservava, mentre el codó d'Stop s'eliminava, per tal de mantenir la fusió amb l'etiqueta HA. Les dianes BglII i EcoRV foren afegides als extrems 5' i 3', respectivament. L'oligonucleòtid 5' inclou una seqüència Kozak (5'CCACC3') que precedeix el codó ATG d'inici, per a millorar-ne la traducció.

La meitat N-terminal (SNA(1-151)) fou obtinguda eliminant la meitat carboxiterminal i aprofitant la diana BglII situada al nucleòtid 455 de mmSnail i la diana BamHI del MCS de peGFP-C1 (clontech), i relligada posteriorment. La meitat C-terminal fou reclonada a peGFP-C2 (Clontech) i a pGEX-6P1 (Promega) mitjançant les dianes BamHI que hi havia allí.

La meitat C-terminal (SNA(152-264)) per expressió en cèl·lules eucariotes fou clonada per amplificació del cDNA sencer amb oligonucleòtids específics on el sentit anellava en els 18 parells de bases (bp) a partir de la diana BglII (nucleòtid 455) i incloïa la seqüència kozak i el codó d'inici ATG.

L'Snail sense l'últim dit de zinc (SNA(1-236)) fou amplificat per PCR d'alta fidelitat i oligonucleòtids específics. L'oligonucleòtid antisentit 3' anellava a la seqüència d'mmSnail evitant l'últim dit de zinc (aminoàcids 237-264), i a l'extrem 3' s'hi va afegir una diana EcoRV per poder posar l'etiqueta HA en pauta. La seqüència era: 5'CCGGATATCCGTATCTCTTCACAT C3'.

El fragment C-terminal sense l'últim dit de zinc (SNA(151- 236)) en pGEX-6P1 (Promega) es va obtenir a partir del sencer i per digestió amb BglII, on la porció N-terminal es descartà.

El mutant Snail Δ 90-120 (deleció del domini ric en Serines) es va fer mitjançant la lligació de les meitats N (1-90) i C-terminals (121-264) fora de la regió rica en Serines, afegint una diana SacI a l'oligonucleòtid antisentit de l'extrem N-terminal (5'CAATGAGCTCAGCTCTACGGCCTTGGGGC TCTCCCGCAG3') i al sentit de l'extrem C-terminal (5'CCGTTAGAGCTCCGCC

GAGGCCTTCATC3'). La fusió d'ambdues dianes SacI afegeix dues Serines a la molècula, que es varen considerar poc significatives, donada la deleció. Per tant, la nova seqüència aminoacídica en aquesta regió fou 5'KAVELSSAEAFI3', quan l'esperada eliminant selectivament el domini sense afegir dianes hauria estat 5'KAVELTLEAEAFI3'.

Els mutants puntuals (SNA-LA) (mutació al senyal d'export), SNA-Nt-LA i SNA-119SA es van obtenir per amplificació per PCR d'alta fidelitat sobre pcDNA3-mmSnail-HA mitjançant dos oligonucleòtids complementaris en seqüència. L'LA sentit era:

5'GGCCAACCTCCCAAGCAGGCGGCCAGGGCCTCGGTGGCCAAGGACCCCCAG3'.

L'LA antisentit era:

5'CTGGGGGTCTTTGGCCACCGAGGCCCTGGCCGCCTGCTTGGGAAGTTGGCC3'.

El 119SA sentit era: 5'CCACCTCGGCCGCCTCCC3' i l'antisentit era: GGGAGGCGGCCGAGGTGG3' que abastaven una seqüència equivalent en nombre de pb flanquejants als llocs de mutació puntual. Es va seguir el protocol del sistema Quick-Change (Stratagene) amb petites modificacions.

En els mutants Serines-a-Alanines (SNA-SA) i Serines-a-Aspartats (SNA-SD), per tal de mutar la totalitat de serines (però no la Treonina 119) presents en el domini ric en serines, es va fer la síntesi dirigida de dos nous dominis (Sigma-Genosys). Els oligonucleòtids, complementaris, engloben els nucleòtids 268 a 350 de la seqüència d'Snail a ratolí. Per mantenir la pauta de lectura en els nous constructes, es varen afegir nucleòtids addicionals a la seqüència sintètica (C a 5', i CT a 3'). Els codons codificants per serines havien estat canviats per codons modificats que codifiquessin per alanines o aspartats, selectivament, i es va mantenir la resta de la seqüència original i només en un cas es modificà un dels codons per un homòleg per tal d'evitar la creació d'un codó d'stop no desitjat. Les dues cadenes complementàries sintetitzades per a cada mutant es varen anellar mitjançant desnaturalització a 94° per 5' i renaturalització progressiva a temperatura ambient en un tampó amb Tris 10 mM, pH 7.4, i EDTA 1 mM. Els extrems 5' dels oligonucleòtids estaven fosforilats. Els dominis sintètics obtinguts eren de marges roms. Es varen insertar en el constructe Snail Δ 90-120, després d'obrir la diana SacI central a la deleció amb l'enzim EcoICRI, isosquizòmer que talla pel mateix punt però deixa extrems roms. Això permetia afegir un nou domini ric en serines, ara mutat, sense alterar

massa la proteïna, afegint únicament una nova leucina: 5'VELS-nou domini sintètic-LSAEA3'.

Els constructes GFP-SNA-(108-151) i GFP-SNA-(82-138) van ser obtinguts en el nostre laboratori a partir del mutant GFP-SNA(82-151). En breu, per obtenir el mutant GFP-SNA-(108-151), es va subclonar en el vector pEGFP el resultat de digerir el mutant GFP-SNA(82-151) amb els enzims NaeI i SmaI. De manera anàloga el mutant GFP-SNA-(82-138) es va obtenir per la digestió amb els enzims BstXI i SmaI.

GFP-TCF4 i GFP-Zeb1 foren clonats com és descrit a Miravet et al., 2002 i Guaita et al., 2002 respectivament.

AKT α -Myr fou amablement cedit pel laboratori del Dr. Larue (Institut Curie d'Orsay, França).

Anàlisi per RT-PCR

L'RNA total fou aïllat de les diferents línies cel·lulars utilitzant procediments estàndards. 1 μ g d'aquest RNA va ser analitzat per la reacció de transcripció reversa seguida de la reacció de la polimerasa en cadena (RT-PCR) en un sol tub mitjaçant el sistema comercial "One-Step RT-PCR System" (Invitrogen). Els oligonucleòtids emprats i el número de cicles foren: E-cadherina humana 5'-TTCCTCCCAATACATCTCCCTTCACAGCAG (nucleòtids 1977–2006) i 5'-CGAAGAAACAGCAAGAGCAGCAGAATCAGA (nucleòtids 2287–2316), 32 cicles; Snail humà, 5'-TTCCAGCAGCCCTACGACCAG-3' (104-125) i 5'-GCCTTTCCCACTGTCCTCATC-3' (290-310), 35 cicles i Ciclofilina A per a normalitzar, 5'-ATGGTCAACCCACCGTG (posicions 45–62) i 5'-TGCAATCCAGCTAGGCATG (690–708), 32 cicles.

Immunofluorescència

Els estudis per immunofluorescència de cèl·lules adherides es varen realitzar sobre cèl·lules crescudes en cobreobjectes i prèviament fixades amb paraformaldèhid (PFA) al 4% durant 12 minuts a temperatura ambient, i rentades en PBS (tampó fosfat-salí) tres cops. Després de la fixació les cèl·lules varen ser permeabilitzades en Tritó X-100 al 0'2% durant cinc minuts o amb SDS 1% durant deu minuts, i rentades de nou amb PBS. A continuació, es va fer un bloqueig amb BSA dissolta a l'1% en PBS i 0.1%

de Saponina durant una hora. Posteriorment, els cobreobjectes es varen incubar sobre una gota de la dilució 1:10 de l'anticòs anti-Snail en el mateix tampó de bloqueig en una cambra humida i fosca durant tota la nit a 4°C (detecció d'Snail exogen) o a temperatura ambient (detecció d'Snail endogen). Després de rentar de nou els cobreobjectes en PBS, es van incubar amb la dilució de l'anticòs secundari conjugat a fluoresceïna (isotiocianat de fluoresceïna, FITC, 1:20, Dako) o Alexa 495 (espectre similar a la Rhodamina, 1:50, Alexa) durant 45 minuts-una hora en la mateixa cambra. Un cop rentats els cobreobjectes de nou en PBS, foren muntats en Mowiol-DABCO i visualitzats al microscopi.

Els assaigs d'immunofluorescència amb cèl·lules no adherides foren realitzats tripsinitzant les cèl·lules i posteriorment fixant-les i permeabilitzant-les amb etanol al 70% durant 30 minuts. El protocol de la immunofluorescència és el mateix que per a cèl·lules adherides, però realitzant tots els passos en eppendorffs i centrifugant a 400xg durant cinc minuts després de cada incubació.

Per a la contratació de nuclis, foren emprats iodur de propidi (durant 30 minuts, dissolt en PBS a 5 µg/mL i amb presència d'RNAsa A 100 U/mL), o bé el compost TOP-Ro, a una dilució 1:1000 de l'estoc, durant cinc minuts. Tots dos en aquestes condicions tenen afinitat per l'ADN.

Les imatges de microscòpia confocal foren captades per un sistema de Microscòpia Confocal Invertida Leica TCS-SP2, amb el programari pertinent. El contrast i la intensitat del senyal foren retocats ocasionalment mitjançant programes de processament d'imatge (Adobe Photoshop 6.0).

Transfeccions transitòries

Els vectors d'expressió pEGFP o pcDNA3 on hi havia subclonat Snail i els diferents mutants, foren transfectats en les diverses línies cel·lulars utilitzant el sistema Lipofectamine-Plus Reagent d'Invitrogen en medi OptiMEM (Invitrogen). La mescla de transfecció es deixava sobre les cèl·lules de quatre a sis hores (segons fossin RWP1, NIH-3T3 en el primer cas, o la resta de línies en el segon), per després rentar-les i afegir medi DMEM amb 10% de sèrum fetal boví. En funció del tipus d'assaig el temps d'expressió fou variable. En el cas dels assaigs amb GFP per estudiar la localització de la proteïna, es deixava les cèl·lules expressar durant 16-18

hores; per a l'estudi d'estabilitat d'Snail i els seus mutants, es deixaven expressar cinc hores; en els experiments reporters, entre 24 i 36 hores; i pels assaigs de marcatge amb fosfor o pulldown, 36-48 hores.

La quantitat d'ADN, Plus i Lipofectamina utilitzats per a cada transfecció era variable depenent de la superfície del pou a transfectar i el tipus cel·lular, i d'acord amb les instruccions del fabricant i protocols establerts al nostre grup. El nombre de cèl·lules sembrades depenia de la línia cel·lular i la superfície del pou, per tal que la confluència final s'apropés al 50-70% de la superfície total.

En el cas dels estudis de localització amb GFP, les cèl·lules havien estat sembrades sobre cobreobjectes de vidre de 20x20mm que havien estat prèviament esterilitzats amb etanol absolut, 24 hores abans de la transfecció. Les quantitats de plàsmid transfectades eren variables depenent de la línia (750 ng per a RWP1, NIH-3T3, MIAPaCa i SW480; 1 µg per a MCF7, MDCK; i 1.5 µg per a HT29-M6, CaCo2). Aquests cobreobjectes eren després fixats en paraformaldèhid al 4% a temperatura ambient, durant 12 minuts abans del muntatge en Mowiol-DABCO sobre portaobjectes i la visualització al microscopi.

Anàlisi de les modificacions posttraduccionals d'Snail

Per a l'anàlisi de les modificacions posttraduccionals d'Snail es van emprar cèl·lules MDCK estables per Snail (Cló 1X). Per a la comparació entre cèl·lules adherides i no adherides es van sembrar plaques de 10 cm (Nunclon) amb $1.5-2 \times 10^6$ cèl·lules per placa. Les plaques corresponents a les cèl·lules adherides eren incubades 30 minuts en gel amb medi de cultiu per a posteriorment rentar-les tres cops amb PBS fred i rascar-les. Les cèl·lules corresponents a la placa de cèl·lules no adherides eren tripsinitzades durant 20 minuts i, un cop eliminada la tripsina per centrifugació (900 rpm, cinc minuts), resuspeses en medi i incubades 30 minuts en gel, per posteriorment realitzar tres rentats amb PBS fred amb centrifugacions de 3000 rpm 3 minuts. Tot seguit les cèl·lules foren lisades amb Tampó de Lisi Pipes (Pipes 80 mM pH 7.0, NaCl 10 mM, EGTA 1 mM més inhibidors de proteasses i fosfatasses) durant 30 minuts en gel. Després de centrifugar a 14000 rpm 15 minuts a 4°C, el sobrenedant era descartat i el sediment resuspès amb tampó de càrrega. Un cop bullit a

95°C i pipetejat diverses vegades per eliminar la viscositat, era carregat en un gel desnaturalitzant del 15% d'acrilamida per a un posterior anàlisi per Western Blot.

Per a l'anàlisi amb la fosfatasa alcalina, cèl·lules MDCK estables per Snail foren lisades amb tampó de Lisi (Tris 25 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA i 1% SDS) i posteriorment aquest lisat diluït 1:10 en 25 mM Tris pH 7.9, 100 mM NaCl, 1% Tritó X-100, 10 mM MgCl₂, inhibidors de proteases (leupeptina 1 µg/mL, pepstatina 1 µg/mL, pepabloc 50 mM i aprotinina 10 µg/mL), i incubat en un volum final de 350 µl amb (o sense) fosfatasa alcalina durant 6 hores a 37°C. Passat aquest temps s'afegia a la mostra tampó de càrrega per a un posterior anàlisi per WB

Marcatge amb fòsfor radioactiu ($\gamma^{32}\text{P-ATP}$)

Per als assaigs de marcatge amb fòsfor i immunoprecipitació per a analitzar la fosforilació o no d'Snail "wild type" i els diferents mutants, 1.5 milions de cèl·lules NIH-3T3 i RWP1 eren sembrades en pous de 60 mm (Nunclon), i es transfectaven transitòriament amb entre 1.5 i 2 µg de constructe salvatge o mutants d'Snail en pcDNA3 i es deixava 36 hores d'expressió. En el cas de l'anàlisi comparativa entre cèl·lules adherides o suspeses, cèl·lules MDCK estables per a Snail eren sembrades en plaques de 25 cm i usades en l'assaig passades 24 hores.

El medi DMEM-FCS 10% usual fou reemplaçat per un medi sense fosfats (DMEM sense fosfats, FCS dialitzat durant 48 hores), i les cèl·lules foren incubades durant 3 hores en condicions normals. Aquest medi era suplementat amb 50 mM d'HEPES-K, pH 7.6 com a tamponador en l'absència de CO₂ en la fase de marcatge. Després d'aquestes tres hores es va reafegir aquest mateix medi però amb ³²P (Amersham) (300 µCi/mL). Les cèl·lules en aquest medi foren incubades durant tres hores més a 37°C i posteriorment lisades.

Per a la lisi, les cèl·lules eren rentades 3 cops en PBS (tampó salí-fosfat) fred després de descartar el medi de cultiu original, i es rascaven (cèl·lules adherides) o tripsinitzaven (cèl·lules no adherides) per desprendre-les de la placa, sobre gel. En el cas de les cèl·lules no

adherides, primer foren tripsinitzades durant 20 minuts i posteriorment tractades com les altres.

El sediment de cèl·lules obtingut després d'una breu centrifugació de cinc minuts a 4°C i 1000 rpm, era resuspès en 2.5 volums de tampó de lisi no desnaturalitzant per a immunoprecipitació (50 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Tritó X-100, 0.5% NP-40/Nonidet, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, ditiotreitòl 1 mM com agent reductor, inhibidors de proteases (leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, pefabloc 50 mM i aprotinina 10 µg/mL) i inhibidors de fosfatases (NaF 5 mM, ortovanadat sòdic 1 mM, beta-glicerofosfat 2 mM). Aquest mateix tampó s'utilitzava durant la immunoprecipitació i els rentats.

Les cèl·lules resuspeses en aquest tampó eren incubades durant 30 minuts a 4°C en agitació, després el lisat era passat per una xeringa de 20 gauge 10 cops, i la solució resultant centrifugada a 15000 rpm durant 15 minuts a 4°C. El sobrenedant obtingut era considerat "lisat total en condicions natives". Un cop obtinguda d'una petita alíquota de 50 µL (sobre 1 mL de lisat), els lisats eren preabsorbits durant quatre hores a 4°C i en agitació constant amb 30 µL efectius de resina proteïna-G-agarosa, prèviament equilibrada en tampó de lisi-immunoprecipitació. Després de centrifugar a 14000 rpm, durant 2 minuts a 4°C, el sobrenedant ja preabsorbit era incubat amb 1 µg d'anticòs primari específic contra la proteïna a immunoprecipitar (essencialment, HA (1 µg). La incubació amb l'anticòs es feia durant tota una nit a 4°C i en agitació constant. L'endemà s'afegien 30 µL efectius de proteïna-G-agarosa neta, i es deixava incubant la reacció en les mateixes condicions durant tres hores. El sediment de resina procedent d'aquesta incubació conté l'immunoprecipitat. Després de descartar el sobrenedant (lisat postimmunoprecipitació), la resina era rentada 4 cops (10 minuts d'incubació a 4°C en agitació i centrifugació posterior de un minut) en 500 µL de tampó d'immunoprecipitació. Finalment era resuspesa en tampó de càrrega i després de bullida la mostra, se'n feia l'electroforesi i immunodetecció per Western Blot.

Els immunoprecipitats foren rentats abundantment en tampó d'immunoprecipitació, resolts en una electroforesi usual SDS-PAGE en gels del 12% de poliacrilamida, i aquests, un cop rentats en 30%Metanol-10% Acètic en aigua durant 90 minuts (amb canvis cada 15 minuts) per fixar les

proteïnes a la poliacrilamida i extreure l'ATP no fixat, foren assecats amb buit i calor i després exposats a films autoradiogràfics Agfa-Curix entre 16 hores i 2 dies a -80°C .

En paral·lel es varen realitzar les immunoprecipitacions de pous transfectats de manera similar en els quals el medi afegit durant el temps de marcatge era medi DMEM+FCS 10% usual, sense ATP marcat, per tenir una mesura aproximada de la relació entre la proteïna expressada, immunoprecipitada, i la intensitat del marcatge.

Assaigs Reporter d'activitat transcripcional

Els constructes reporters emprats foren els següents: el fragment $-178/+92$ del promotor del gen homòleg humà d'E-cadherina clonat en el vector pGL3 (Promega) ja descrit en Batlle E. et al., 2000, i el fragment $-637/+92$ del promotor humà de Fibronectina cedit pel grup del Dr. Baulida. 25 ng del constructe reporter eren co-transfectats amb 0.5 ng de pRL-SV40 i 1 ng (per a E-Cadherina) o 25 ng (per a Fibronectina) de les formes salvatges o mutants d'Snail clonats en pcDNA3 sobre cèl·lules RWP1 sembrades en plaques de 24 pous, en nombre equivalent per pou. Les transfeccions transitòries es varen realitzar amb el sistema Lipofectamina-Plus (Invitrogen). Després de 48 hores d'expressió, els pous eren rentats tres cops amb PBS i les cèl·lules lisades en 200 μl de tampó de lisi passiva (Invitrogen), per després mesurar-ne l'activitat en un luminòmetre amb el sistema "Dual-Luciferase Reporter Assay" d'Invitrogen, d'acord amb les instruccions del fabricant. Les mesures de l'activitat de Luciferasa de cuca de llum (Firefly) corresponent als reporters eren normalitzades amb les mesures de l'activitat d'un reporter control amb la luciferasa de *Renilla reniformis*, transfectat a quantitat equivalent en tots els pous. Això ens permetia relativitzar les dades depenent de l'eficiència de transfecció en cada pou, i per tant comparar alhora entre diversos experiments. En tots els assaigs reporter les quantitats d'ADN transfectat foren enrasades amb vector buit en el cas de treballar amb quantitats d'efector variables.

Preparació de proteïnes de fusió amb GST

En cultius a mitjana escala, es va afegir un subcultiu de 20 ml de medi LB (Luria-Bertani) crescut durant la nit a 37°C , a un cultiu major de

180 ml, crescut durant dues hores, afegint IPTG (isopropil-1-tio- β Dgalactopiranòsid) a una concentració final de 0.1 M per induir l'expressió de la proteïna. El cultiu es va mantenir en fase d'inducció durant tres hores. Es varen prendre mostres de la mostra prèvia a la inducció i després d'aquesta. El cultiu fou centrifugat 10 min a 4000xg a 4°C. El pellet va ser resuspès en PBS fred. En l'obtenció de la proteïna de fusió GST-mSnail(1-264), al PBS se li afegí 0.1 mg/ml de lisozima i 1.5% de sarkosyl per tal de solubilitzar la proteïna.

Després de la lisi dels bacteris per sonicació en gel, en 5 polsos de 1 segons a mitja potència (35%), es va afegir Tritó X100 a una concentració final de l'1%. Es deixava el lisat durant 30 minuts a 4°C en rotació constant, per tal de solubilitzar la proteïna.

Després de centrifugar l'extracte durant 5 minuts a 20000xg i temperatura ambient o bé 20 minuts a 4°C i 10000xg, es recuperava el sobrenedant, que era purificat (en cultius a gran escala) per cromatografia d'afinitat a través d'una columna amb resina amb Glutatió conjugat (GS4B, Amersham); o bé en "batch" (incubació a petita escala amb 300 μ l efectius de la mateixa resina en eppendorfs, durant 30 minuts a temperatura ambient en rotació, o bé durant 16 hores a 4°C). Després de tres rentats amb PBS fred (1 mL per rentat en els "batch", o 10 cops el volum de la columna en el cas dels cultius a gran escala), la proteïna fou alliberada de la columna amb 1 mL d'un tampó a pH 8.0 en presència de Glutatió ((50 mM Tris-Cl, pH 8.0, +10 mM Glutatió per a la majoria de proteïnes de fusió: mutants SA, SD); o bé un tampó amb 100 mM Glutatió per eluir la fusió GST-mSnail (1-264), que incloïa 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 250 mM EDTA, i 0.02% Tween 20, donada la baixa eficiència d'elució d'aquesta fusió); o finalment amb 6M urea per eluir la fusió GST-mSnail(1-151), especialment difícil d'obtenir).

La proteïna era el·luïda amb 350 μ l de tampó d'elució durant deu minuts, en recuperar el sobrenedant després d'una breu centrifugació de dos minuts a temperatura ambient i 14000 rpm. L'el·luït de la proteïna N-terminal es dialitzava durant tota la nit a 4°C en TBS (2 L), en una membrana de diàlisi de porus petit, per després concentrar-la mitjançant la deshidratació amb polietilenglicol 4000 sòlid durant uns minuts.

La concentració de proteïna de fusió als el·luïts fou quantificada visualment per comparació amb una corba de concentracions de BSA, en un gel de poliacrilamida, després de tenyir les proteïnes del gel amb blau de Coomassie, i reverificada amb la determinació de concentracions pel mètode de Lowry.

Assaigs de "Pull-Down"

En els experiments de "pull-down" per avaluar interaccions entre els dominis de la proteïna, es varen transfectar cèl·lules RWP1 en plaques de 100 mm amb el protocol usual, i 4 µg d'ADN de les construccions d'mSnail-HA corresponents al fragment C terminal (152-264 i 152-236) subclonats en pcDNA3. Després de 36 hores d'expressió, les cèl·lules es varen lisar en un tampó no desnaturalitzant (TrisCl pH 7.4, 50 mM, NaCl 150 mM, Ditiotretol 1 mM, 1 mM EGTA, MgCl₂ 1 mM, 0'5% NP-40, i inhibidors de proteases usuals). El lisat de cada placa, obtingut de forma similar als fets per a immunoprecipitació, fou preclarificat amb 30 µL efectius de resina glutatió-sefarosa (GS4B, d'Amersham) durant tres hores a 4°C en agitació constant o en el seu defecte, 30 minuts a temperatura ambient. El sobrenedant es va utilitzar per a l'experiment. Una alíquota de 20 µL de cada lisat fou desada com a control de càrrega. 80 µL de lisat preabsorbit (aproximadament 250 µg de proteïna total) foren incubats amb 2 µg de la proteïna de fusió GST-Nterminal Snail normal o bé el mutant SD. La reacció d'interacció es completava afegint tampó de lisi sense detergent, i inhibidors de proteases fins a un volum final de 200 µL.

Després de dues hores a 4°C o 30 minuts a temperatura ambient i en agitació, es va afegir a les reaccions 30 µL efectius de resina GS4B neta i es va deixar incubar la reacció 30 minuts més a temperatura ambient en presència d'etilenglicol al 10%, per a evitar la unió inespecífica de l'Snail a la resina (sabem que això ocorre). La reacció fou centrifugada a 15000 rpm durant dos minuts i els sobrenedants descartats. La resina resultant del "pull-down" fou rentada tres cops en tampó de lisi abundant (500 µL), i després bullida en tampó de càrrega i resolta per SDS-PAGE en gels del 14%, per després fer els Western-Blot pertinents.

Anàlisi de proteïnes per electroforesi desnaturalitzant de poliacrilamida (SDS-PAGE) i Western Blot

Les electroforesis de proteïnes es van realitzar en minigels en condicions desnaturalitzants de poliacrilamida al 12% (assajos quinasa), 14% (pull-down) o al 15% (per una correcta visualització de la doble banda corresponent a Snail modificat posttraduccionalment). Les mostres proteiques havien estat bullides prèviament en tampó de càrrega, o de Laemmli (Tris 10 mM, SDS (1%) i en condicions reductores (presència de beta-mercaptoetanol) i blau de bromofenol (colorant) i glicerol (10%)). El gels van ser resolts en un tampó balancejat de Tris i Glicina, en un protocol clàssic. La immunodetecció de les proteïnes transferides a una membrana de nitrocel·lulosa es va realitzar amb un protocol de Western Blot usual: incubació de una hora en solució de bloqueig (Tampó Tris-Salí, Tween al 0,2% (TBS-t), llet en pols desnatada al 5%). En aquesta mateixa solució de bloqueig fou diluït l'anticòs primari específic. Per detectar l'epítot HA es va utilitzar un anticòs monoclonal de rata (Roche Pharmaceuticals) en una dilució 1:1000 per Western Blot. Per la GST, un de cabra policlonal (BD Biosciences/ Transduction Laboratories) en una dilució 1:2000 per Western Blot. L'anticòs primari era incubat amb la membrana durant dues hores a temperatura ambient en lleu agitació. Després de fer cinc rentats de cinc minuts a temperatura ambient i abundant solució de bloqueig, es procedia a realitzar la incubació amb l'anticòs secundari conjugat a peroxidasa de rave (HRP), específic contra l'espècie originària del primari, durant 45-60 minuts i a temperatura ambient, a una dilució d'1:2000 (anticabra per a GST) o 1:1500 (antirata per a HA) diluït en tampó de bloqueig amb llet al 5%. Després de nous rentats amb solució Tris-Salí+Tween (TBS-t), es revelava la reacció amb un substrat específic per a l'HRP, quimioluminiscent (Enhanced ChemiLuminescence, ECL, Amersham-Pharmacia) durant un minut, per després exposar diferents temps la membrana a pel·lícules autoradiogràfiques Agfa-Curix.

Assaig quinasa

Per realitzar els assaigs quinasa es van utilitzar les proteïnes GST-Snail i els seus mutants obtinguts com és explicat en l'apartat d'obtenció de

proteïnes de fusió amb GST. Les quinases emprades (CK1, CK2 i GSK3 β), de New England Biolabs, eren subministrades amb el tampó 10X corresponent.

Tampó 1X CK2: 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.5

Tampó 1X GSK3 β : 20 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol, pH 7.5

Tampó 1X CK1: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol, pH 7.5

Els diferents assajos es van realitzar en el tampó adient per a cada quinasa, amb 75 Unitats d'aquesta, 1 μ g de proteïna recombinant, 200 μ M d'ATP fred i 3000pmols de γ^{32} P-ATP per reacció. Les reaccions es van realitzar en un volum final de 20 μ L, a 30°C durant 30 minuts. La reacció fou aturada afegint tampó de càrrega per a una posterior resolució en una electroforesi SDS-PAGE en gels del 12% de poliacrilamida. Les proteïnes foren fixades al gel i tenyides amb el colorant Comassie Brilliant Blue R250 en una solució 30% Metanol-10% Acètic en aigua. Un cop rentats els gels en la mateixa solució sense el colorant durant 90 minuts (amb canvis cada 15 minuts) per acabar de fixar les proteïnes a la poliacrilamida i extreure l'ATP no fixat, foren assecats amb buit i calor. Després foren exposats al phosphoimager, o bé a films autoradiogràfics Agfa-Curix entre 16 hores i 2 dies a -80°C.

En el cas de l'assaig de fosforilacions successives, la primera reacció (amb la CK2) es va realitzar com s'ha descrit per a la resta d'assaigs quinasa però sense fosfor radioactiu. La segona reacció (amb la GSK3 β) es va realitzar en un volum final de 50 μ L emprant tot el volum de la primera reacció com a substrat, en presència de γ^{32} P-ATP i heparina a una concentració final de 3 μ g/mL.

Assaig d'estabilitat

Per a estudiar el fragment responsable de la degradació nuclear d'Snail, es van transfectar cèl·lules MDCK sembrades en plaques de sis pous amb 200.000 cèl·lules/pou. Les transfeccions es varen realitzar amb el sistema Lipofectamina-Plus (Invitrogen) durant sis hores. Després de tres hores d'expressió amb medi fresc, es van tractar les cèl·lules amb MG132 (Sigma) (concentració final 50 μ M) i Cicloheximida (Sigma) (Concentració final 25 μ g/mL) per a ser lisades posteriorment amb una solució a l'1% SDS i

25 mM Tris pH 7.5, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA suplementat amb inhibidors de proteases (leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, pefabloc 50 mM i aprotinina 10 µg/mL) i inhibidors de fosfatases (NaF 5 mM, ortovanadat sòdic 1 mM, beta-glicerofosfat 2 mM). Els lisats foren xeringats i bullits durant cinc minuts per a ser posteriorment centrifugats 15 minuts a 13.000 rpm. Finalment foren resoltos en un gel d'acrilamida i analitzats per Western Blot.

Per estudiar l'estabilitat de les proteïnes Snail, Snail-SA i Snail-SD dels clons estables per a aquestes en MDCK, es van sembrar plaques de sis pous amb 200.000 cèl·lules/pou. Les cèl·lules foren tractades amb les drogues i lisades com ha estat explicat anteriorment per a l'estudi del fragment responsable de la degradació nuclear d'Snail en clons MDCK.

Resultats

1. Snail es localitza al nucli i al citosol de diferents línies tumorals

En estudis previs realitzats, tant en el nostre laboratori com en d'altres, es va observar que l'esperada correlació inversa en línies tumorals entre l'expressió d'E-Cadherina i Snail no sempre té lloc. Com es pot veure en la figura R1, tot i que en la majoria de les línies analitzades la correlació entre les dues proteïnes era inversa, en certes línies epitelials tumorals, concretament en les EpH4, les MCF-7, les CaCo2 i les HCT-116, es podien detectar per RT-PCR trànscrips (mRNA) de totes dues proteïnes alhora. Per intentar comprendre aquesta expressió simultània d'Snail i E-Cadherina, i tenint en compte la capacitat repressora d'Snail sobre el promotor de l'E-Cadherina, es va voler estudiar l'expressió i la localització subcel·lular d'Snail en diferents línies cel·lulars.

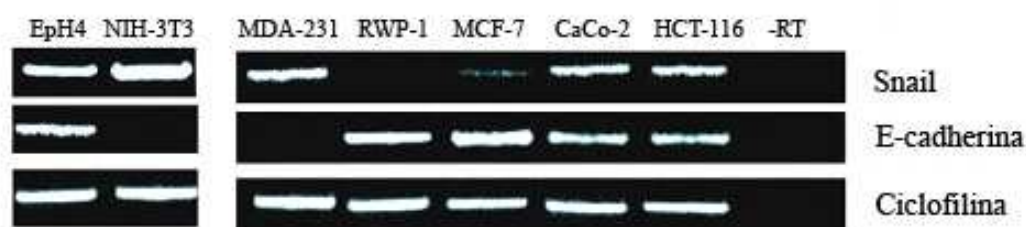


Figura R1. mRNA d'Snail i E-Cadherina coexisteixen en certes línies epitelials. Els nivells d'expressió d'Snail i E-Cadherina endògens foren analitzats mitjançant la tècnica de RT-PCR emprant 1µg de RNA total, obtingut mitjançant procediments estàndards, i els oligonucleòtids i número de cicles per a Snail i E-Cadherina descrits en l'apartat de materials i mètodes. Es va emprar la Ciclofilina per normalitzar la quantitat de RNA. Les línies cel·lulars NIH-3T3 i MDA-231 expressaven Snail i no E-Cadherina, i RWP-1 expressava E-Cadherina i no Snail. La resta (Eph4, MCF-7, CaCo-2 i HCT-116) expressaven tots dos mRNAs.

Per determinar aquesta localització subcel·lular, es van realitzar assaigs d'immunofluorescència amb un anticòs policlonal de conill anti-Snail produït en el nostre laboratori. Com es pot veure en la figura R2, hi ha línies cel·lulars (NIH-3T3) on s'obtenia un marcatge majoritàriament nuclear, tot i que es detectava l'Snail al citosol. En d'altres (CaCo2, HCT116) la tinció era majoritàriament citoplasmàtica.

Per comprovar aquests resultats i facilitar l'anàlisi, es van transfectar transitòriament diferents línies cel·lulars amb un cDNA que permetia expressar la proteïna exògena per a una posterior visualització per

immunofluorescència amb l'anticòs policlonal (figura R3A), o bé com a proteïna de fusió amb la proteïna verda fluorescent (GFP) per a una visualització directa (figura R3B).

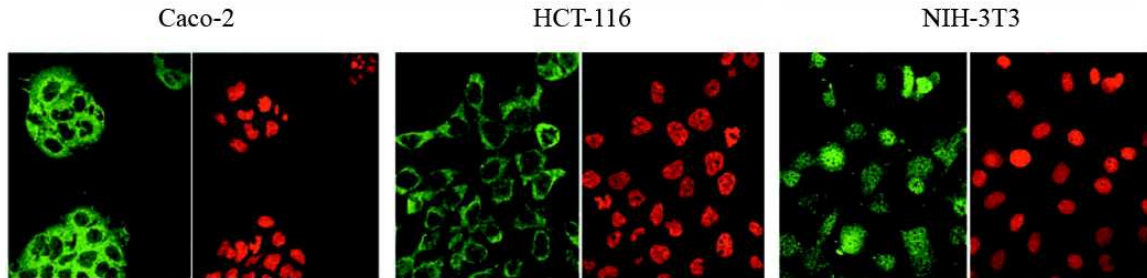


Figura R2. L'Snail endogen es localitza tant al nucli com al citoplasma. La presència de l'Snail endogen al nucli o al citoplasma en les línies cel·lulars emprades, NIH-3T3, HCT-116 i CaCo-2, fou analitzada per immunofluorescència amb un anticòs primari anti-Snail de conill i el secundari FITC-anti-conill (verd). El nucli fou contratenyit amb iodur de propidi.

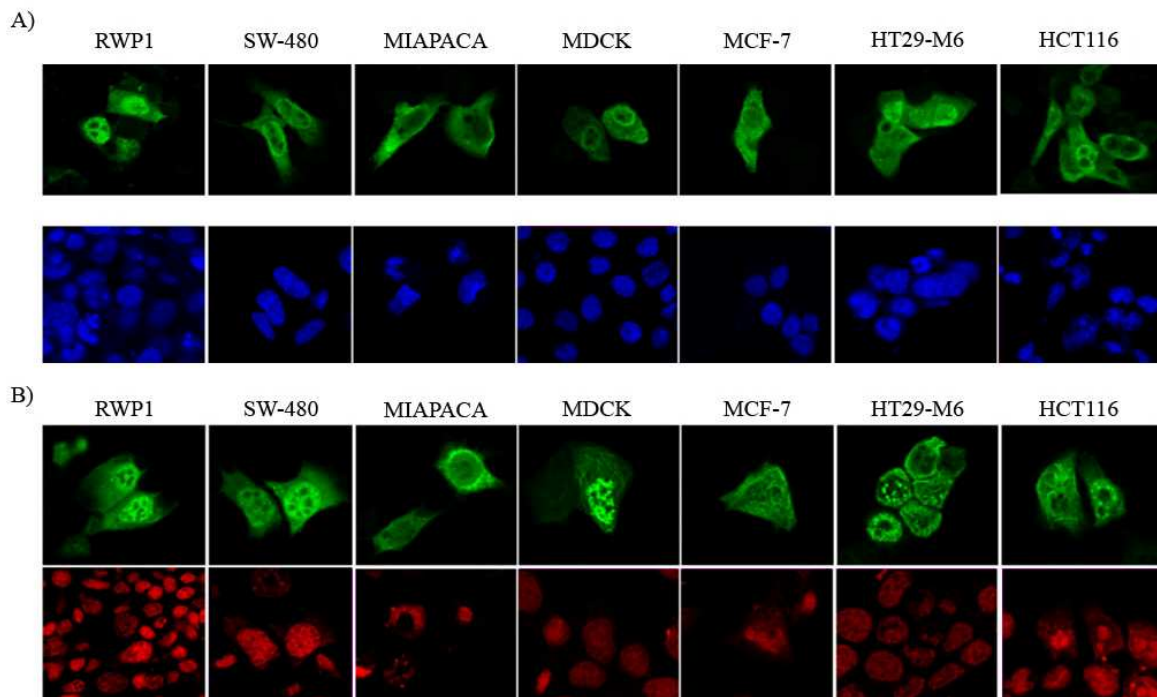


Figura R3. L'Snail exogen també es localitza dins i fora del nucli. L'estudi de la localització de l'Snail exògen es va realitzar **A)** per immunofluorescència de diferents línies cel·lulars sembrades sobre cobreobjectes, transfectades amb PCDNA3-SNA, fixades i incubades amb un anticòs primari anti-Snail de conill i un secundari FITC-anti-conill (verd). En el panell inferior podem veure els nuclis, que foren contratenyits amb TopRo (blau). **B)** Les mateixes línies cel·lulars foren sembrades sobre cobreobjectes, transfectades amb GFP-SNA i fixades després de 16-18 hores d'expressió. En el panell inferior es poden observar els nuclis contratenyits amb iodur de propidi.

Com es pot veure en la figura R3, en tots dos casos el resultat obtingut va ser el mateix que en l'anàlisi de la proteïna endògena per immunofluorescència, és a dir, que el marcatge positiu per a Snail no només es restringia al nucli, sinó que també s'observava al citosol. De la mateixa manera que en la figura R2, aquesta distribució dins la cèl·lula depenia de la línia cel·lular. S'observava que en les línies on s'havia vist l'expressió d'Snail i d'E-Cadherina per RT-PCR, com ara les cèl·lules MCF-7 i HCT-116, tenien marcatge predominantment citoplasmàtic (figura R3).

Tenint en compte que Snail és un factor de transcripció i que per tant n'esperàvem una localització citoplasmàtica, es va voler comparar aquesta localització d'Snail amb la d'altres factors de transcripció també units a GFP, entre ells un altre membre de la família d'Snail, Slug. Es van transfectar cèl·lules RWP1 amb les proteïnes de fusió GFP-Slug, GFP-Tcf-4 i GFP-Zeb1 i es va comprovar que l'expressió d'aquests factors de transcripció es restringia al nucli. Així doncs es va poder descartar que l'observació d'Snail al citoplasma fos deguda a una sobreexpressió de la proteïna, i confirmar que aquesta localització era específica d'Snail (figura R4).

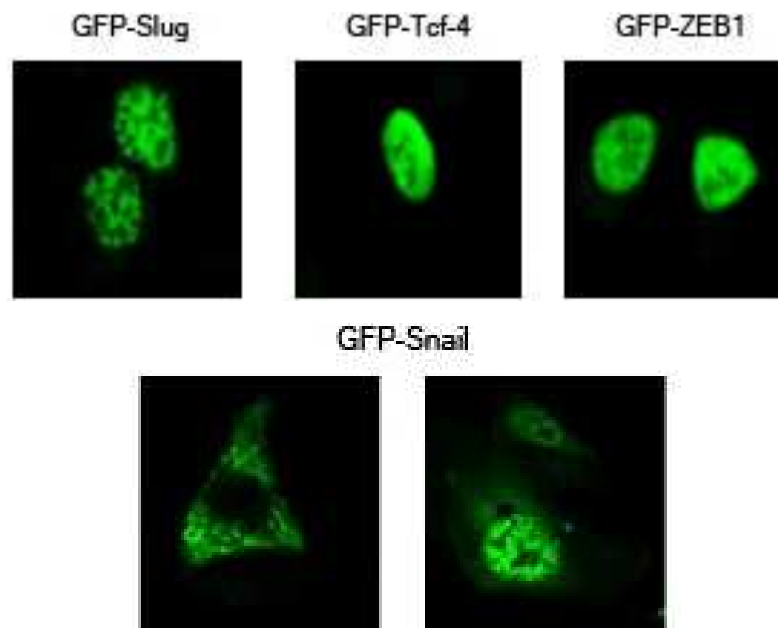


Figura R4. Slug, Tcf-4 i Zeb1 es localitzen exclusivament al nucli, mentre que Snail es localitza tant al nucli com al citoplasma. L'anàlisi de la localització subcel·lular d'Snail-GFP i altres factors de transcripció (GFP-Slug, GFP-Tcf-4 i GFP-Zeb1) es va realitzar transfectant-los en cèl·lules RWP1 sembrades sobre cobreobjectes. Les cèl·lules foren fixades després de 16-18 hores d'expressió. Per a Snail es mostren tant la localització citoplasmàtica com la nuclear.

2. Dos dominis diferents de la proteïna (aminoterminals i carboxiterminals) són els responsables de la localització subcel·lular alternativa d'Snail

Per intentar esbrinar quin o quins dominis de la proteïna eren els responsables de la diferent localització subcel·lular d'Snail, es van construir dues proteïnes de fusió unint les meitats carboxiterminal (Ct, aminoàcids 152-264) o aminoterminal (Nt, aminoàcids 1-151) de la proteïna a GFP (proteïnes de fusió GFP-SNA-Ct i GFP-SNA-Nt, respectivament). Es van transfectar transitòriament les dues proteïnes de fusió, que en expressar-se es localitzaven alternativament al nucli amb un marcatge difós i deixant els nucleòls exclosos (meitat carboxiterminal), o al citosol amb el nucli totalment exclòs (meitat aminoterminal). Aquest marcatge era independent de la línia on eren transfectades, i en cap cas difós com GFP (figura R5). D'aquests resultats se'n va concloure que en la meitat carboxiterminal hi devia haver alguna seqüència que dirigia la proteïna al nucli, mentre que en la meitat més aminoterminal n'hi devia haver alguna que la dirigia al citoplasma.

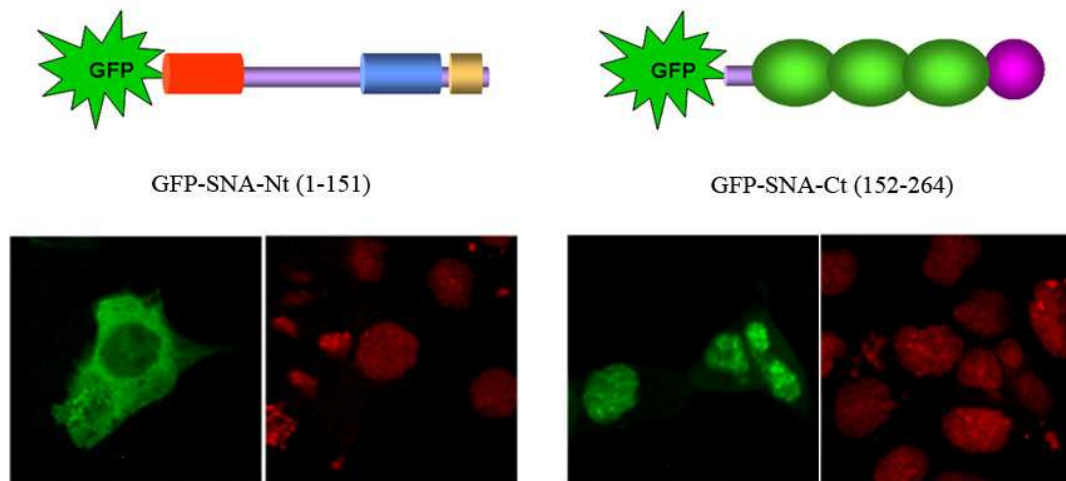


Figura R5. Diferent localització cel·lular dels constructes Nterminal i Cterminal d'Snail. Cèl·lules MDCK van ser transfectades amb els constructes carboxiterminal (151-264) i aminoterminals (1-151) units a GFP per visualitzar la seva localització cel·lular (Constructes GFP-SNA-Ct i GFP-SNA-Nt respectivament). Després de 16-18 hores d'expressió les cèl·lules foren fixades i analitzades amb el microscopi confocal. El nucli fou tenyit amb iodur de propidi.

3. Una seqüència rica en leucines és la responsable de l'export nuclear d'Snail mediat per CRM1

Com ja s'ha dit abans, s'esperava que Snail, com a factor de transcripció que és, es trobés al nucli, on exerceix la seva funció repressora. Però en certes línies cel·lulars s'observa una exclusió pràcticament total de la proteïna del nucli (per exemple en les cèl·lules MCF7, figura R3). La localització d'una proteïna nuclear al citosol pot ser el resultat de tres processos diferents. Primer, podria succeir que l'exclusió nuclear fos deguda a una retenció de la proteïna al citosol per unió a altres proteïnes de manera que el seu import fos inhibit. Una segona possibilitat fóra que el propi sistema d'import de la proteïna estigués inhibit, per un canvi posttraduccional, o bé per la falta d'un cofactor. Aquests dos mecanismes impedrien que la proteïna pogués entrar al nucli (ser importada). Una tercera possibilitat seria que la capacitat d'entrada al nucli no s'hagués perdut però el procés d'export fos tan ràpid respecte al d'import que com a balanç s'observés la proteïna fora del nucli. L'existència de drogues que bloquegen l'export permet discriminar, d'una manera fàcil, si la localització citoplasmàtica observada és deguda a una ràpida sortida o a la manca d'entrada al nucli. La majoria de processos d'export de proteïnes del nucli impliquen el que el complex CRM1-RanGTP reconegui una zona hidrofòbica rica en leucines de la proteïna susceptible a ser exportada (Fornerod et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Ullman et al., 1997). La formació d'aquest complex és impedit per la Leptomycin B (LMB) (Kudo et al., 1999), un compost que en unir-se covalentment a CRM1 bloqueja, de forma específica, l'export de proteïnes mitjançant aquest sistema. Així doncs, es van tractar amb LMB les cèl·lules transfectades transitòriament amb GFP-Snail i es va observar com en aquestes cèl·lules la localització d'Snail es restringia al nucli, cosa que indicava que el seu export era bloquejat, i que tenia lloc a través del complex CRM1. De la mateixa manera, el constructe GFP-SNA-Nt també era retingut al nucli (figura R6). Aquest fet assenyalava que no hi havia cap impediment per a la import sinó que, tant l'Snail com el seu extrem aminoterminal, s'estaven exportant ràpidament.

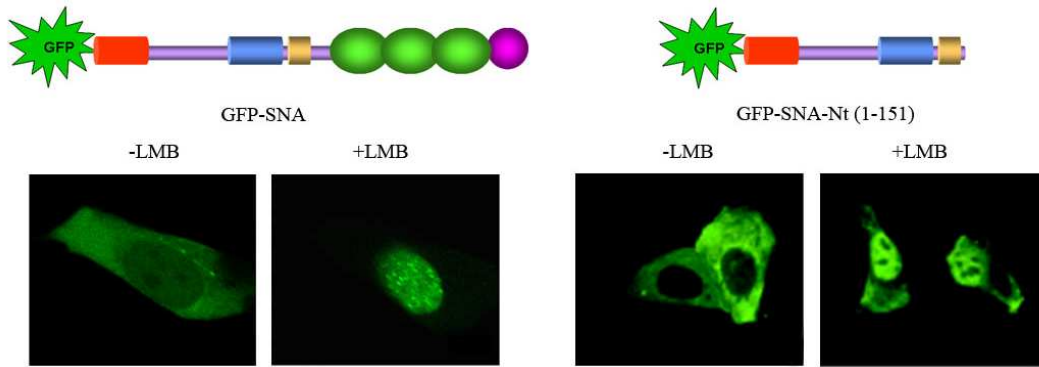


Figura R6. L'export nuclear d'Snail és dependent del sistema Exportina1/CRM1. L'inhibidor de l'export nuclear LMB és capaç de retenir Snail al nucli. El tractament de cèl·lules RWP1 transfectades amb la proteïna sencera GFP-SNA o amb la meitat aminoterminal GFP-SNA-Nt i tractades amb LMB (5ng/mL) fa que el seu export sigui impedit i quedin retingudes al nucli. En el cas del GFP-SNA, una cèl·lula amb localització citoplasmàtica fou seguida durant el tractament amb LMB per visualitzar el canvi de localització de la proteïna.

Un cop conegut el mecanisme de sortida, calia trobar la seqüència d'Snail implicada en aquest export, la seqüència d'export nuclear (NES, de l'anglès "Nuclear Export Sequence"). D'acord amb els nostres resultats, aquesta seqüència havia de trobar-se en la meitat aminoterminal d'Snail.

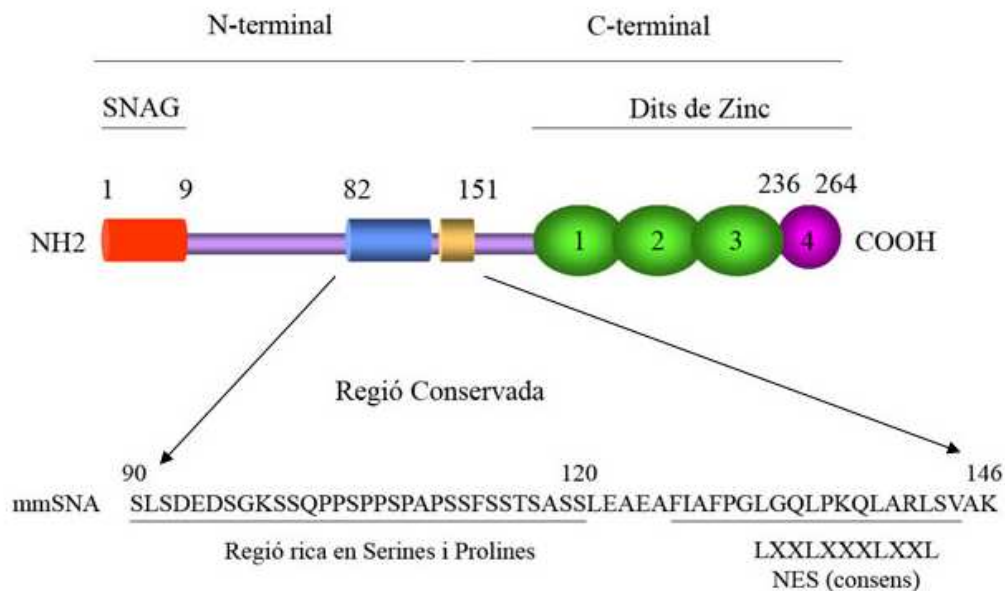


Figura R7. Representació de l'estructura primària d'Snail. Representació esquemàtica de la proteïna Snail on es mostra com es situen els diferents dominis de la proteïna. La meitat aminoterminal comprèn les regions conservades entre els aminoàcids 1-9 (domini SNAG), i 90-146 (regions rica en serines i d'export). En la meitat carboxiterminal es situen els dits de zinc.

Una anàlisi més acurada d'aquest domini ens indicà la presència d'una regió hidrofòbica rica en leucines que encaixava amb la seqüència consens de reconeixement del CRM1 (figura R7). Aquesta seqüència consens (NES) és $LX_{(1-3)}LX_{(1-3)}LXL$, on L són leucines (en la majoria de casos) o valines, isoleucines, fenilalanines o metionines; i X qualsevol aminoàcid (Lischka et al., 2001). La seqüència trobada en l'Snail murí (mmSNA aminoàcids 130-146) és PGLGQLPKQLARLSEAK (figura R7), i es troba conservada en els homòlegs de mamífers coneguts.

Per veure si aquesta seqüència putativa d'export era realment la responsable de l'exclusió d'Snail del nucli, es va fer un mutant puntual on dues de les leucines (L139 i L142), necessàries en la teòrica seqüència consens de reconeixement NES, es van mutar a alanines. En transfectar aquest mutant (GFP-SNA-LA) en cèl·lules RWP1 (Figura R8), s'observà que, efectivament, es perdia quasi en la seva totalitat la capacitat de la proteïna a ser exportada, la qual cosa indicava que l'export d'Snail era mediat per una seqüència hidrofòbica on almenys dues de les leucines eren completament necessàries. També el mutant GFP-SNA-Nt, de localització citoplasmàtica, es tornava nuclear si es mutaven a alanines les dues mateixes leucines que en el mutant GFP-SNA-LA (mutant GFP-SNA-LA-Nt) (Figura R8), i acabava de confirmar la importància d'aquests dos aminoàcids.

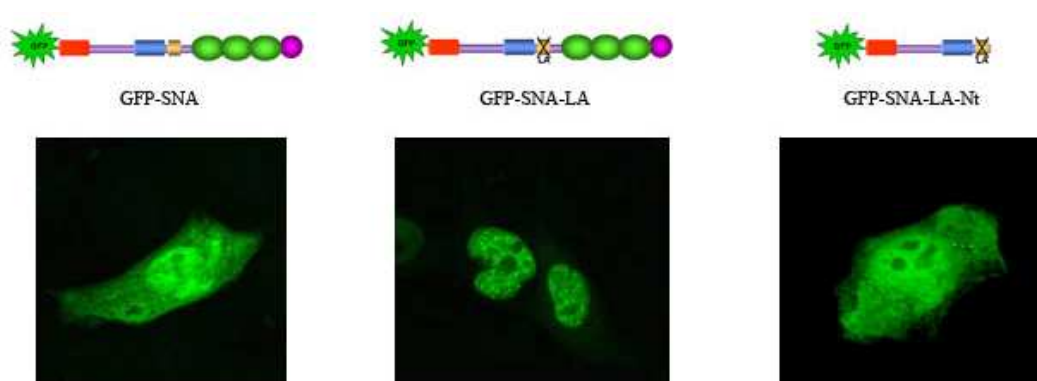


Figura R8. Snail té una seqüència de reconeixement per al seu export. La mutació a alanines de dues leucines d'una putativa seqüència consens per a l'export (mutació LA) impedeix la sortida del nucli d'Snail. Cèl·lules MDCK foren transfectades amb GFP-SNA, GFP-SNA-LA o bé GFP-SNA-LA-Nt i fixades després de 16-18 hores d'expressió per a l'anàlisi de la seva localització subcel·lular.

4. La fosforilació d'un domini ric en serines regula l'export nuclear

S'observà que en algunes de les línies cel·lulars hi havia una distribució subcel·lular d'Snail no homogènia, és a dir, que en una mateixa preparació es podien observar diferents patrons d'expressió, i que dues cèl·lules veïnes no tenien sempre patrons d'expressió idèntics. Per això es va pensar que hi havia quelcom que regulava la localització subcel·lular d'Snail. Una possibilitat fóra que aquest control tingués lloc per una modificació posttraduccional, probablement per fosforilació en la seqüència adjacent a la seqüència d'export (regió rica en serines i prolines mostrada en la figura R7).

A la figura R7 es pot veure que la seqüència NES es troba entre l'inici dels dits de zinc i la seqüència rica en serines i prolines amb força dianes hipotètiques per a la fosforilació. Per tant, és plausible que la fosforilació podria estar modulant la funcionalitat de la NES.

Una primera dada que indicava que Snail podia estar patint una modificació post-transcripcional, i que aquesta podria ser la fosforilació, va ser l'observació d'una doble banda en analitzar per "Western-blot" (WB) extractes cel·lulars de clons MDCK estables per a Snail-HA fent servir gels d'acrilamida d'alt percentatge (15%) (figura R9A). Com es pot veure en la figura R9B, si aquests extractes eren tractats amb una fosfatasa alcalina recombinant (CIP, de "Calf Intestinal Phosphatase") la banda de pes molecular més alt, que correspondria a la proteïna fosforilada, desapareixia.

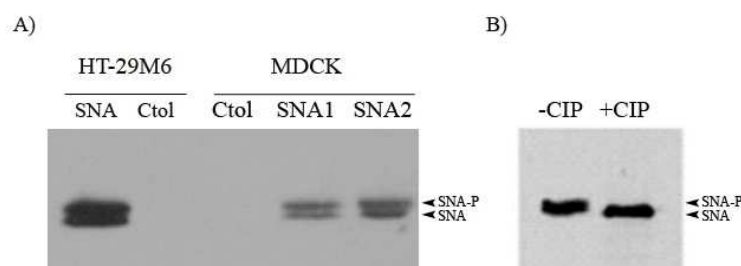


Figura R9. Snail és modificat posttraduccionalment. **A)** Anàlisi per "Western-blot" d'extractes cel·lulars obtinguts amb tampó 1% SDS de cèl·lules HT-29M6 i MDCK estables per a Snail usant un gel d'alt percentatge d'acrilamida (15%) on es veu una doble banda per Snail, i **B)** La banda superior desapareix en tractar l'extracte, en aquest cas de les cèl·lules MDCK, amb una fosfatasa alcalina recombinant (CIP, Calf intestinal phosphatase).

Per comprovar que Snail es fosforilava es van realitzar assaigs de marcatge metabòlic (figura R10). Aquests assaigs van poder confirmar que, efectivament, l'Snail sencer incorporava grups fosfat, mentre que un mutant que no tenia aquesta regió rica en serines (SNA Δ (90-120)) no ho feia. Aquest resultat indicava que Snail era fosforilat, i que aquesta fosforilació tenia lloc dins la regió situada entre els aminoàcids 90 i 120. Altres resultats del laboratori van confirmar que aquesta fosforilació tenia lloc en residus serina.

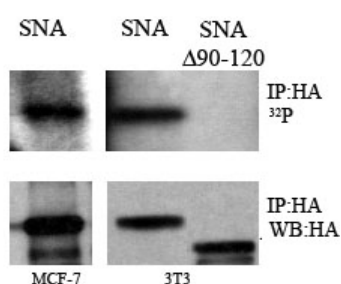


Figura R10. Snail es fosforila en una regió rica en serines.

Estudi de la regió de fosforilació d'Snail en cèl·lules MCF7 i RWP1 que foren transfectades amb el vector PCDNA-Snail-HA sencer o sense la regió rica en serines i marcades amb fòsfor radioactiu. posteriorment Snail-HA fou immunoprecipitat usant anticossos anti-HA. El fòsfor incorporat fou analitzat amb l'autoradiografia del gel (panell superior). Paral·lelament es va immunoprecipitar Snail-HA de cèl·lules no tractades amb radioactivitat com a control (panell inferior).

5. La fosforilació d'un domini ric en serines modula la interacció entre els fragments carboxiterminals i aminoterminals de la proteïna

La següent pregunta que es va plantejar va ser com podria la fosforilació del domini ric en serines adjacent a la seqüència NES regular-la. Una hipòtesi era que la proteïna tingués dos estats conformacionals, de manera que si es trobés plegada sobre si mateixa la NES quedés amagada, no accessible al complex CRM1/Exportina1, i per tant no pogués ser exportada. Aquesta conformació estaria estabilitzada per la interacció de la cua aminoterminal amb la carboxiterminal. Quan tingués lloc la fosforilació en la regió rica en serines, l'augment de càrrega negativa podria produir un desplegament de la proteïna, i es descobriria la NES de manera que permetria el seu export (figura R11).

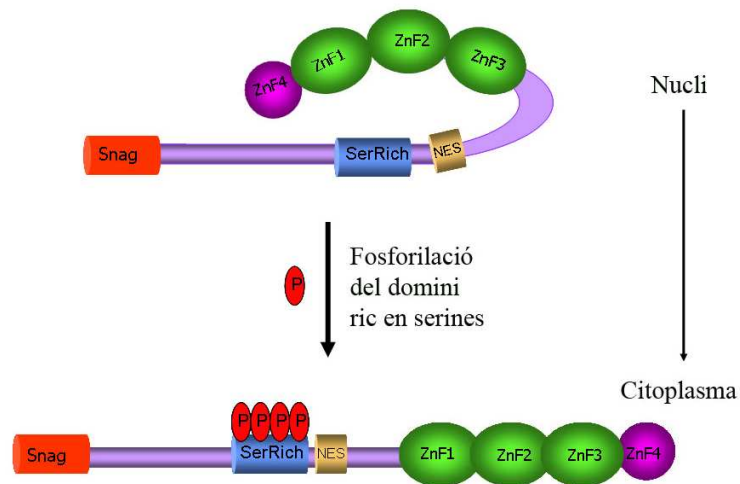


Figura R11. Hipòtesi de com la fosforilació pot modular l'export nuclear d'Snail. La proteïna no fosforilada es trobaria plegada sobre si mateixa estabilitzant la conformació amb interaccions entre les dues meitats de la molècula. La fosforilació en el domini ric en serines causaria una acumulació de càrrega negativa que donaria lloc a la inestabilització de l'estructura plegada de manera que s'obriria i deixaria al descobert la seqüència d'export nuclear, NES, i permetria la seva sortida del nucli al citoplasma.

Per comprovar si la hipòtesi era certa, es van construir dos mutants que simulaven l'estat fosforilat i no fosforilat de la proteïna on les 14 serines de la regió rica en serines (aminoàcids 90-120) van ser substituïdes per alanines (mutant SNA-SA, no fosforilable) o per aspàrtics (mutant SNA-SD, que mimetitzava la fosforilació). Primerament es va fer un assaig de marcatge metabòlic amb Snail i els mutants generats per comprovar que aquests no es fosforilaven i així reconfirmar que era sobre aquestes serines on tenia lloc la fosforilació (figura R12).

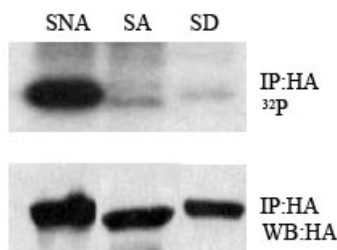


Figura R12. Els mutants SNA-SA i SNA-SD no es fosforilen. Assaig de marcatge metabòlic amb γ -³²-ATP i posterior immunoprecipitació amb un anticòs anti-HA on s'observa en la autoradiografia del gel que els mutants modificats en la regió rica en serines mimetitzant els estats no fosforilat (PCDNA3-SNA-SA-HA) i fosforilat (PCDNA3-SNA-SD-HA) perden la capacitat de ser fosforilats.

Un cop constatat que, efectivament, no es fosforilaven, calia veure la seva distribució subcel·lular. En transfectar transitòriament aquests mutants en cèl·lules RWP1, es va veure (figura R13) que el mutant GFP-SNA-SA era nuclear, mentre que el mutant GFP-SNA-SD es trobava al citosol. Si es tractava el mutant GFP-SNA-SD amb LMB, aquest era retingut al nucli, i indicava que la presència d'aquest al citoplasma era deguda a una alta eficiència en l'export i no a una entrada al nucli impedida.

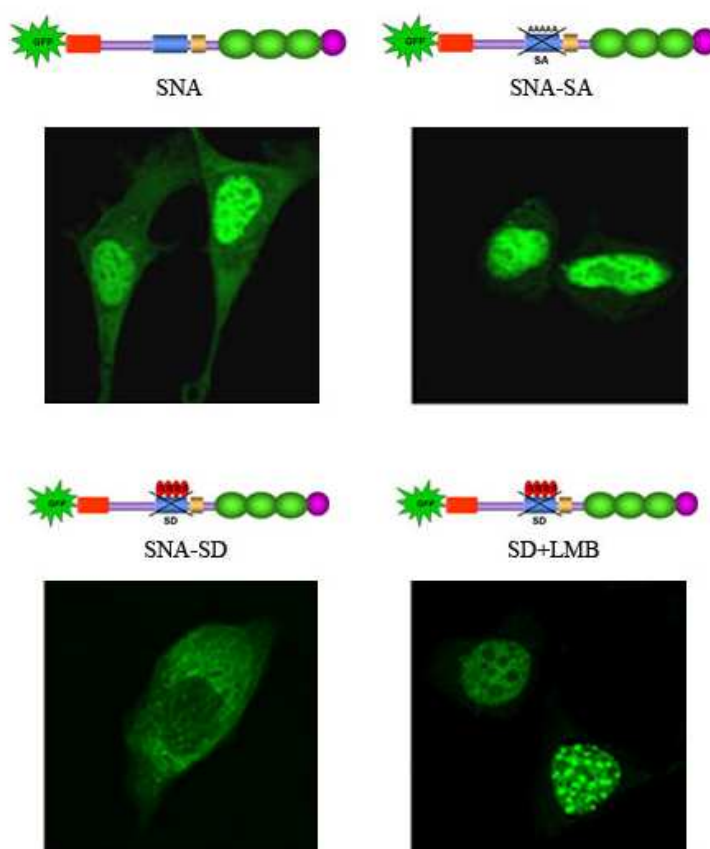


Figura R13. Diferents estats de fosforilació regulen la localització d'Snail. Estudi de la localització citoplasmàtica dels mutants en la regió rica en serines en cèl·lules RWP1 transfectades amb els mutants GFP-SNA-SA i GFP-SNA-SD. Es deixaven expressar 16-18 hores i s'observa que aquets es localitzaven al nucli i al citosol respectivament. Si el mutant GFP-SNA-SD era tractat amb LMB (5ng/mL), aquest es relocalitzava al nucli, la qual cosa indicava que no havia perdut la capacitat de ser importat sinó que la mutació augmenta la seva taxa d'export.

Aquestes dades concordaven amb la hipòtesi, ja que el mutant que simulava la proteïna fosforilada i que, per tant, estaria en la conformació desplegada amb la NES accessible, s'observava al citoplasma, mentre que

el mutant que simulava un estat no fosforilat, i per tant es trobaria en la conformació plegada amb la NES no accessible, es veia al nucli.

Altres dades suggerien que l'extrem més carboxiterminal d'Snail era rellevant per al manteniment de la proteïna al nucli, molt probablement mitjançant la interacció entre les dues meitats de la proteïna. L'expressió en cèl·lules RWP1 del mutant GFP-SNA(1-236), al qual se li havia suprimit l'últim dit de zinc, era majoritàriament citoplasmàtica (figura R14). Aquest fenomen era revertit en tractar les cèl·lules amb LMB. En conjunt, aquests resultats confirmaven que l'últim dit de zinc, juntament amb el domini ric en serines, eren essencials en la regulació del plegament i en conseqüència de la localització subcel·lular d'Snail.

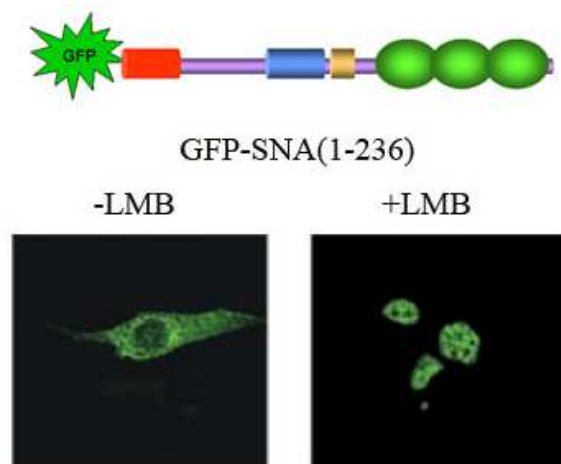


Figura R14. L'últim dit de zinc és important en la localització cel·lular. Estudi funcional de l'últim dit de zinc en la localització subcel·lular d'Snail, mitjançant la transfecció en cèl·lules RWP1 del mutant d'Snail sense l'últim dit de zinc (GFP-SNA(1-236)) i tractades o no amb LMB (5ng/mL) durant dues hores.

Per verificar la interacció entre els dos dominis es van realitzar assaigs de "pull-down" *in vitro* amb proteïnes recombinants purificades de bacteries, on la meitat aminoterminal d'Snail fusionada a GST era incubada amb la meitat carboxiterminal unida a MBP. Si realment existia interacció entre les dues meitats, en utilitzar-ne una com a esquer purificant-la amb la resina adient, s'hauria de poder detectar l'altra meitat. Les resines emprades per immobilitzar les proteïnes de fusió van ser glutatió-sefarosa per immobilitzar GST-SNA-Nt, detectant MBP-SNA-Ct amb un anticòs anti-MBP; i sefarosa-maltosa per immobilitzar MBP-SNA-Ct, detectant GST-SNA-

Nt amb l'anticòs anti-GST. En la figura R15A i 15B es mostren els "Western-blots" on s'observa que en tots dos casos una de les proteïnes s'unia a l'altra, i en cap cas a la resina sola (control negatiu). Això indicava que realment les meitats carboxiterminals i aminoterminals interaccionaven entre elles.

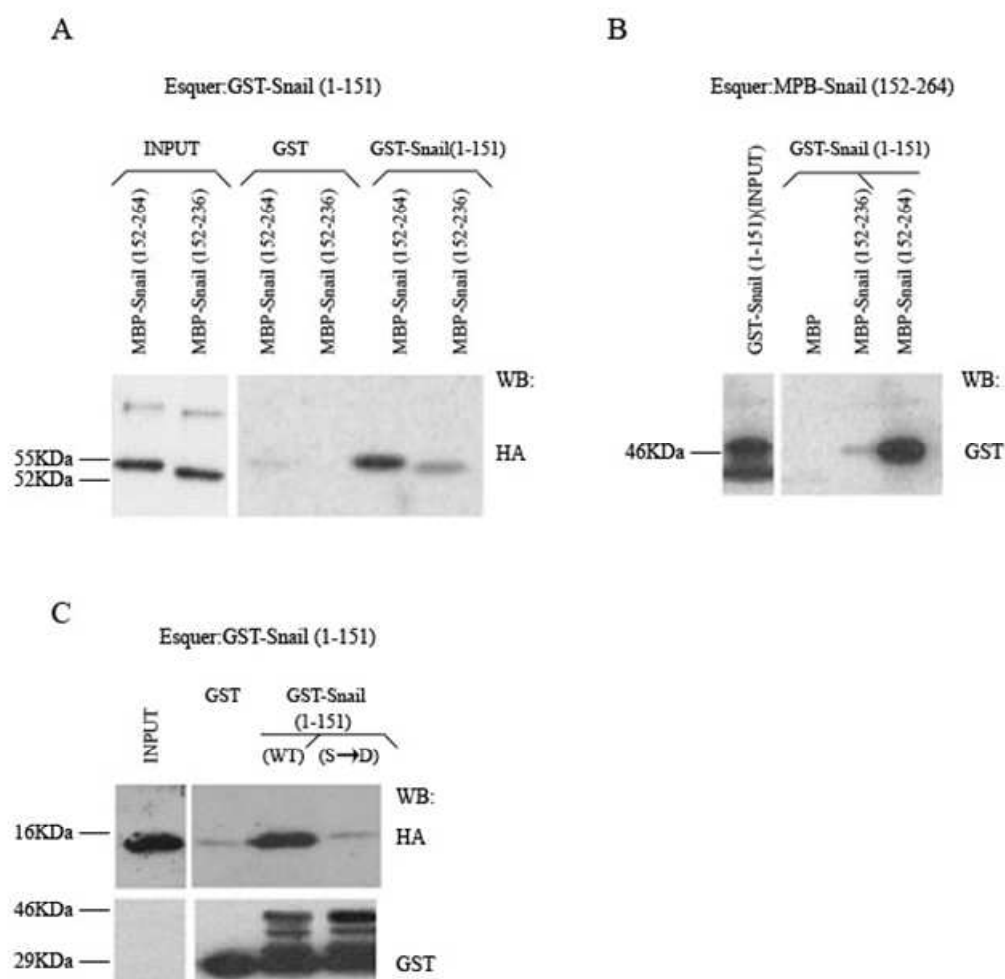


Figura R15. Les meitats aminoterminals i carboxiterminals interaccionen entre elles. Anàlisi de la interacció entre les dues meitats d'Snail mitjançant assaigs de "Pull down" *in vitro* realitzats amb GST-SNA-Nt (A i C) o bé amb MBP-SNA-Ct (B) com a esquers. A **A**) s'ha incubat la meitat aminoterminal (GST-SNA-Nt) immobilitzada amb les meitats carboxiterminal (MBP-SNA-Ct) o carboxiterminal sense l'últim dit de zinc (MBP-SNA(152-236)), mentre que a **B**) s'ha incubat la meitat carboxiterminal (MBP-SNA-Ct) immobilitzada amb l'aminoterminal (GST-SNA-Nt). En tots dos casos es veu com les dues meitats de la proteïna interaccionen i són detectades amb els anticossos adients. En **C**) s'ha transfectat el constructe PCDNA3-SNA-Ct-HA en cèl·lules RWP1 i els extractes s'han incubat amb GST-SNA-Nt o bé GST-SNA-SD-Nt-HA immobilitzats.

Per corroborar la importància de l'últim dit de zinc en la interacció, es va fer el mateix però amb el constructe carboxiterminal sense l'últim dit de zinc (MBP-SNA(152-236)), i es va veure que la interacció entre aquest constructe i la meitat aminoterminal (GST-SNA-Nt) era molt lleu (figura R15A i 15B).

Per analitzar el paper de la fosforilació en la interacció de les dues meitats de la proteïna es va realitzar un assaig de "pull down" incubant el fragment GST-SNA-Nt o bé GST-SNA-SD-Nt (mutant que mimetitzava la fosforilació) amb extractes cel·lulars de cèl·lules transfectades amb SNA-Ct-HA. En la figura R15C es mostra com, si la meitat aminoterminal de la proteïna es trobava en un estat equivalent a la fosforilació (GST-SNA-SD-Nt), no hi havia interacció amb la meitat carboxiterminal (SNA-Ct-HA).

Aquestes dades suggerien que, efectivament, la fosforilació del domini ric en serines pertorbaria el plegament i impediria la interacció entre les dues meitats de la proteïna. En aquesta interacció l'últim dit de zinc esdevindria essencial ja fos a nivell funcional (per la seva implicació en la unió directa a la meitat aminoterminal) o a nivell estructural (necessari per al correcte plegament dels dits de zinc).

Per acabar de confirmar que aquest plegament, on hi intervenien tant el domini ric en serines com l'últim dit de zinc, tenia lloc *in vivo* i tenia la capacitat de modular la localització subcel·lular d'Snail, es van cotransfectar les dues meitats de la proteïna (aminoterminal i carboxiterminal) com a proteïnes de fusió amb la GFP (proteïna verda fluorescent) i la RFP (proteïna vermella fluorescent) respectivament (mutants GFP-SNA-Nt i SNA-Ct-RFP). En la figura R16, en el panell esquerre superior es pot veure com en aquelles cèl·lules on no hi havia hagut cotransfecció, i per tant en el panell inferior no es veu la meitat carboxiterminal (en vermell), la localització de GFP-SNA-Nt (en verd) era totalment citoplasmàtica. En canvi en aquelles cèl·lules on sí que hi havia hagut cotransfecció, i per tant en el panell inferior es detecta la meitat carboxiterminal, GFP-SNA-Nt es localitzava al nucli. Així doncs, en aquelles cèl·lules on s'expressaven les dues meitats d'Snail (cèl·lules indicades amb fletxes grogues), la meitat carboxiterminal era capaç de modificar la localització de l'aminoterminal. Probablement la interacció entre les dues meitats de la proteïna deixa la seqüència NES inaccessible i impedeix el seu export.

Es va realitzar el mateix assaig, però cotransfectant la meitat carboxiterminal (SNA-Ct-RFP) amb la meitat aminoterminal, on les serines de la regió rica en serines havien estat mutades a àcids aspàrtics per simular la seva fosforilació (GFP-SNA-Nt-SD) (figura R16, panells drets). S'observava com la coexpressió de les dues meitats d'Snail (cèl·lules indicades amb fletxes grogues) no revertia la localització citoplasmàtica de la meitat aminoterminal, la qual cosa indicava que s'havia perdut la capacitat d'interaccionar entre les dues meitats i, per tant, la carboxiterminal no era capaç d'evitar l'export de la meitat aminoterminal.

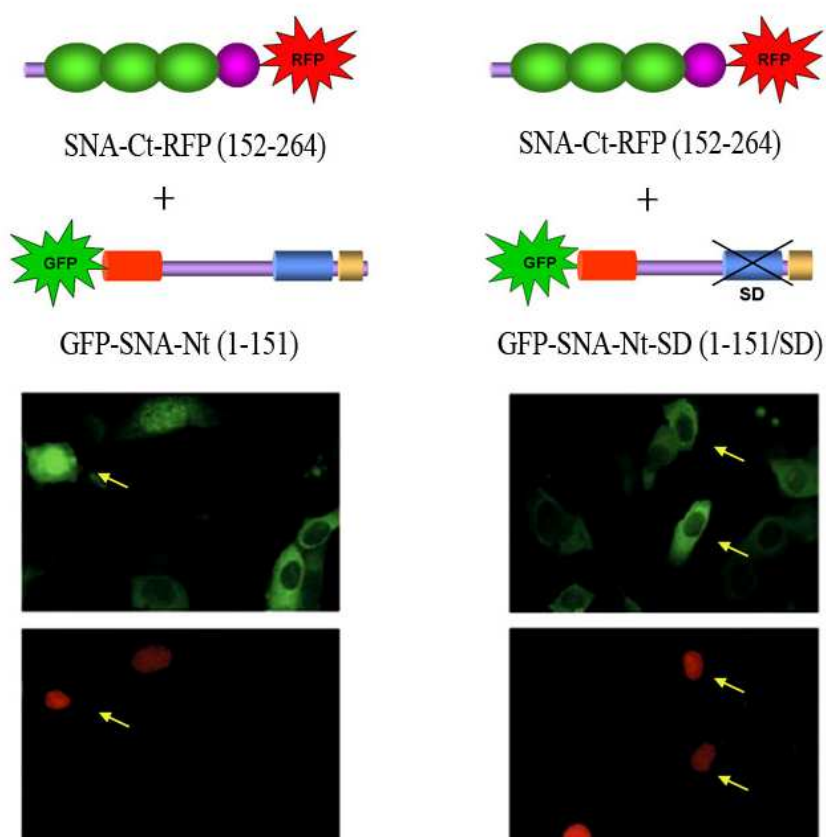


Figura R16. La coexpressió de les dues meitats d'Snail dirigeix la meitat aminoterminal de la proteïna al nucli. Per a visualitzar la interacció que té lloc *in vivo* entre les dues meitats de Snail on cèl·lules RWP1 foren cotransfectades amb els mutants GFP-SNA-Nt (panell esquerre) o GFP-SNA-Nt-SD (panell dret) i SNA-Ct-RFP. Després de 16-18 hores d'expressió, les cèl·lules foren fixades i analitzades amb el microscopi confocal. En els panells superiors es mostra les imatges obtingudes pel canal verd, corresponents a GFP, mentre que en els inferiors les obtingudes pel vermell, corresponents a RFP.

6. La localització d'Snail modifica la seva funcionalitat

Per valorar la funcionalitat d'Snail com a factor transcripcional es va provar la capacitat d'Snail de modular els promotors de dos gens diana, l'E-Cadherina i la Fibronectina. Per això es van realitzar assaigs de transfecció transitòria amb els corresponents promotors i el gen de la luciferasa com a gen reporter. Es va emprar un promotor proximal de 300pb d'E-Cadherina humà, que conté tres caixes E-box, a les quals ja s'havia descrit que Snail s'hi unia ((Batlle et al., 2000; Guaita et al., 2002), fragment -178/+92), i un fragment del promotor de Fibronectina (-637/+92).

Com es mostra en els gràfics de la figura R17, la capacitat transcripcional d'Snail, repressora sobre el promotor d'E-Cadherina o activadora sobre el promotor de Fibronectina, era mantinguda en aquells mutants que es localitzaven al nucli, mentre que aquells que es situaven al citoplasma no eren eficients a l'hora de modular l'activitat transcripcional.

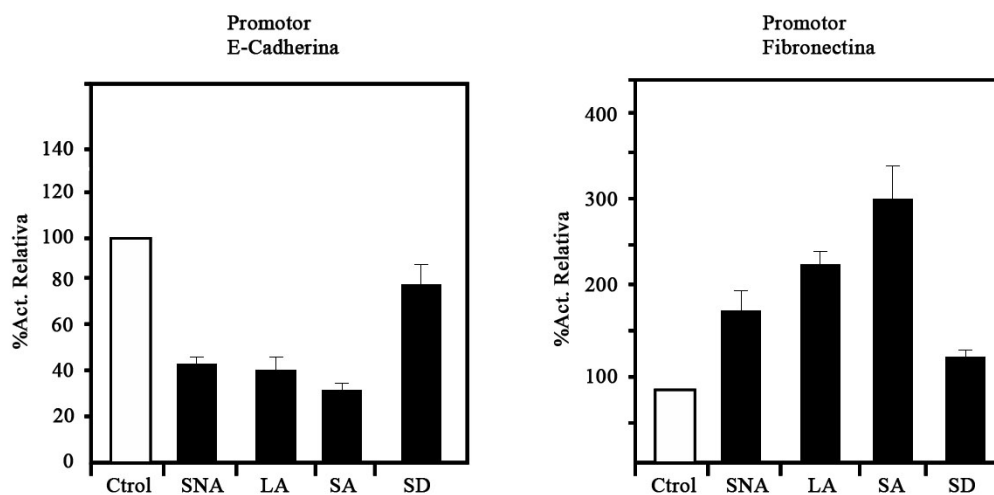


Figura R17. L'activitat d'Snail com a factor de transcripció depèn de la seva localització cel·lular. Mesura de l'activitat transcripcional d'Snail mitjançant un assaig reporter sobre els promotors d'E-Cadherina i Fibronectina. L'assaig fou realitzat amb cèl·lules RWP1 cotransfectant 25 ng del promotor proximal de l'E-Cadherina humana (panell esquerre) o bé del promotor de Fibronectina (panell dret) en el vector PGL3, amb 1 ng o 25 ng respectivament dels diferents mutants d'Snail en PCDNA3. 0.5 ng de SV40-Renilla foren cotransfectats com a control. Després de 24 hores posttransfecció les cèl·lules foren lisades i les activitats luciferasa i firefly mesurades. Els mutants que es localitzen al nucli (SNA-LA i SNA-SA) mantenen la capacitat repressora i activadora d'Snail, mentre que els mutants que es localitzen al citoplasma (SNA-SD i SNA (1-236)) perden aquesta capacitat.

Així, els mutants SNA-SA (no fosforilable) i SNA-LA (amb la seqüència d'export mutada) bloquejaven o activaven els promotors d'E-Cadherina i Fibronectina respectivament de manera semblant a la proteïna salvatge, mentre que els mutants sense l'últim dit de zinc (SNA(1-236) i el mutant que mimetitzava la fosforilació (PCDNA3-SNA-SD) no presentaven activitat o ho feien molt pitjor.

Així doncs, semblava que, com calia esperar, la funcionalitat d'Snail com a factor de transcripció estava condicionada a la seva localització cel·lular.

7. La fosforilació d'Snail i la seva distribució subcel·lular està regulada per les unions de la cèl·lula a la matriu extracel·lular

Un cop s'havia vist com Snail entrava i sortia del nucli de forma regulada mitjançant el canvi conformacional produït per la fosforilació en un fragment ric en serines, calia veure quina o quines eren les quinases responsables d'aquesta fosforilació i quins senyals la induïen.

Les unions cel·lulars a la matriu extracel·lular són capaces d'afectar les característiques de les cèl·lules epitelials, ja que les seves proteïnes són capaces de regular, mitjançant la família de les integrines i les molècules associades a elles, com ara la quinasa associada a les integrines (ILK, de l'anglès Integrin-Linked Kinase), processos tan diversos com la diferenciació, la migració o la supervivència (Dedhar, 2000). Per comprovar si les unions cel·lulars a la matriu podrien estar afectant la capacitat transcripcional d'Snail modulant la seva fosforilació, es va realitzar un assaig de marcatge metabòlic amb cèl·lules MDCK transfectades establement amb Snail i sembrades en plaques a les quals es podien o no adherir. Per això en alguns casos les cèl·lules van ser tripsinitzades durant 20 minuts abans de lisar-les, amb la finalitat d'eliminar la seva interacció amb la matriu (cèl·lules suspeses). Un altre "pool" cel·lular va ser lisat directament sobre la placa (cèl·lules adherides). Tal i com es pot veure en l'autoradiografia del gel, en la figura R18A del panell inferior, la fosforilació d'Snail en les cèl·lules suspeses era superior al de les cèl·lules adherides.

En el panell superior es mostra com aquesta diferència en la fosforilació quedava també reflectida en analitzar la relació d'Snail fosforilat/Snail no fosforilat dels extractes cel·lulars en un gel d'alt

percentatge d'acrilamida (15%). Així mateix, aquesta diferència també era evident quan comparàvem cèl·lules crescudes sobre plaques de cultiu comunes (cèl·lules adherides) o cèl·lules crescudes sobre plaques no tractades a les quals no es poden adherir (cèl·lules suspeses) (figura R18B).

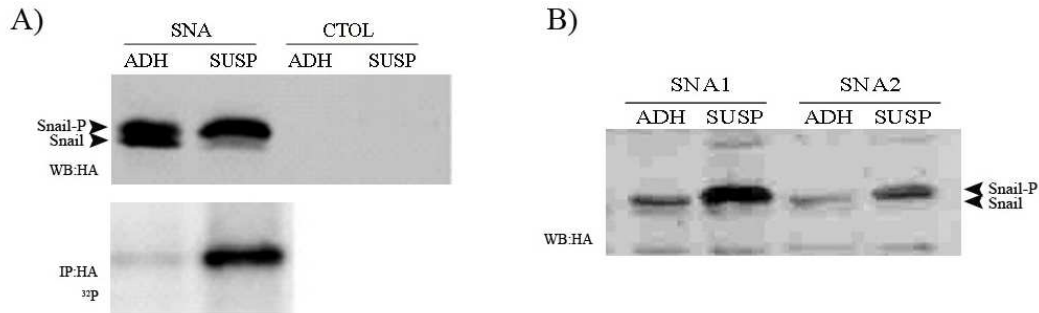


Figura R18. Les cèl·lules que creixen en suspensió tenen més Snail fosforilat. A) Western Blot (panell superior) i marcatge metabòlic (panell inferior) d'un clon de MDCK estable per a Snail on es mostra la diferència en el grau de fosforilació d'Snail entre lisats de cèl·lules lisades sobre la placa (ADH) o tripsinitzades durant 20 minuts abans de ser lisades, per simular l'estat de suspensió (SUSP). **B)** Western Blot on es veu com les cèl·lules crescudes en suspensió (SUSP) tenen una relació d'Snail fosforilat/Snail no fosforilat major que els extractes de cèl·lules crescudes adherides sobre una placa (ADH). SNA1 i SNA2 representen dos clons diferents de cèl·lules MDCK estables per a Snail.

Per comprovar si aquest major grau de fosforilació de la proteïna en les cèl·lules en suspensió es traduïa en el seu major export, tal i com havíem vist amb els mutants que la mimetitzaven, es va analitzar la localització d'Snail per immunofluorescència (figura R19).

Les cèl·lules adherides als cobreobjectes presentaven un marcatge d'Snail principalment nuclear, mentre les cèl·lules suspeses el tenien predominantment citosòlic, la qual cosa confirmava que *in vivo*, l'export d'Snail del nucli es trobava regulat.

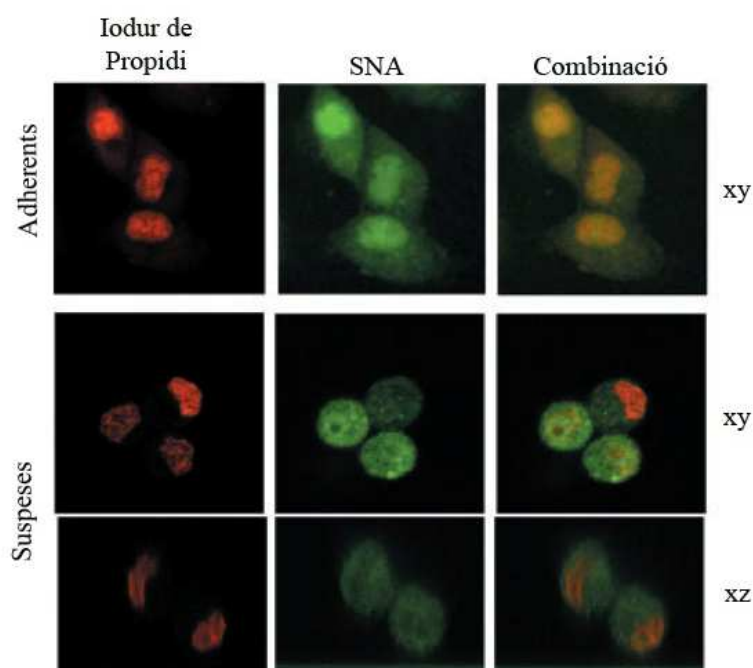


Figura R19. L'adhesió cel·lular a la matriu modula l'estat de fosforilació i en conseqüència la localització d'Snail. Immunofluorescència amb un anticòs anti-Snail de cèl·lules d'un clo MDCK estable per a Snail crescudes sobre cobreobjectes (cèl·lules adherides) o tripsinitzades (cèl·lules suspeses) on es fa evident que la diferència en el grau de fosforilació comporta un canvi en la localització cel·lular. L'estudi de la localització es va realitzar amb un microscopi confocal sobre el pla horitzontal (XY) i el vertical (XZ). Els nuclis foren tenyits amb iodur de propidi.

Es va voler determinar si la regulació de la fosforilació d'Snail per l'adhesió era un procés ràpid i reversible. Cèl·lules MDCK estables per a Snail foren sembrades en plaques i lisades després de 6 hores, temps necessari perquè aquestes cèl·lules es tornessin a adherir. El seu estat de fosforilació va ser indirectament determinat per "Western-blot", comparant l'abundància relativa de les bandes corresponents a Snail i Snail fosforilat (figura R20). La fosforilació que presenten aquestes cèl·lules (figura R20, punt 6L) és l'equivalent a la de les cèl·lules adherides (figura R20, punt 48L, cèl·lules lisades 48 hores després de la seva sembra), i diferent a les cèl·lules tripsinitzades (punt 48T, tripsinitzades després de 48 hores de ser sembrades) o no adherides (punt 48S, cèl·lules mantingudes en plaques on no es podien adherir, passades 48 hores després de la sembra). Aquest

experiment indicava que les cèl·lules, passades sis hores, que era el temps necessari perquè es tornessin a adherir al substrat, recuperaven l'estat de fosforilació basal, és a dir, el que tenien quan estaven adherides a la placa.

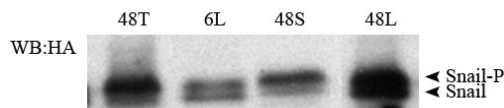


Figura R20. L'augment en l'estat de fosforilació de les cèl·lules suspeses es perd tan bon punt les cèl·lules es tornen a adherir. Estudi de la

reversibilitat en la fosforilació per Western Blot d'extractes cel·lulars totals de cèl·lules MDCK on 6L i 48L corresponen a les cèl·lules crescudes adherides durant 6 i 48 hores respectivament i lisades directament sobre la placa. 48T correspon als extractes de cèl·lules crescudes adherides durant 48 hores, però tripsinitzades durant 20 minuts abans de ser lisades (simulant l'estat de suspensió). 48S correspon a cèl·lules crescudes durant 48 hores en suspensió.

Així doncs, es podia afirmar que les unions cel·lulars a la matriu regulaven la fosforilació d'Snail en un procés reversible que modulava la seva localització i en conseqüència la seva capacitat transcripcional.

8. Snail és fosforilat *in vitro* per les quinases GSK3 β i CK2

El següent pas era descriure la quinasa o quinases responsables de la fosforilació causada per la regulació de les unions a la matriu. Com ja hem mencionat anteriorment, les integrines poden mediar el senyal entre la matriu extracel·lular i els efectors intracel·lulars que canvien el patró d'expressió cel·lular. La quinasa associada a les integrines (ILK) és estimulada ràpidament i de forma transitòria per la unió de les integrines a la matriu extracel·lular (Dedhar, 2000). Aquesta activació, per un costat, és capaç de regular a la baixa l'expressió de l'E-Cadherina (Somasiri et al., 2001; Tan et al., 2001) i per l'altre pot induir la fosforilació de la GSK3 β (Delcomenne M. Et al., PNAS 1998) i causar-ne la seva inhibició. En condicions on la cèl·lula perd els contactes amb la matriu extracel·lular, la ILK s'inactiva i deixa de fosforilar la GSK3 β , que d'aquesta manera perd la seva repressió per fosforilació i torna a estar activa. Així doncs, una de les hipòtesis de treball fou que, en absència de contactes, la GSK3 β podria estar fosforilant Snail, i causar-ne el seu export i, per tant, la pèrdua de la seva capacitat com a factor de transcripció.

Per comprovar si la GSK3 β podia fosforilar Snail, es va realitzar un assaig quinasa *in vitro* utilitzant la GSK3 β recombinant comercial i la proteïna de fusió GST-Snail. Es va poder comprovar com, efectivament, la GSK3 β fosforilava *in vitro* a Snail-GST i ho feia més eficientment sobre dues de les bandes de degradació de la proteïna que sobre la proteïna sencera (figura R21).

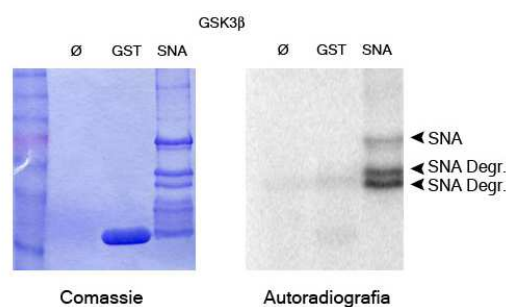


Figura R21. GSK3 β fosforila SNA *in vitro*. Assaig quinasa *in vitro* realitzat amb la GSK3 β i les proteïnes GST-Snail i GST (emprat com a control), en presència de γ - 32 P-ATP. La reacció fou duta a terme tal i com es descriu en l'apartat Materials i mètodes. A la figura es mostren el gel tenyit amb blau de comassie (esquerra) i l'autoradiografia d'aquest gel (dreta).

Aquestes bandes de degradació molt probablement corresponien a la part més aminoterminal de la proteïna, unida a GST, i serien el resultat de la pèrdua progressiva de fragments situats en l'extrem més carboxiterminal. Això suggeria que la fosforilació era més eficient quan la proteïna es trobava en una conformació desplegada o oberta.

La GSK3 β , amb alguna excepció (Li et al., 2006), fosforila residus de proteïnes que han patit una fosforilació encebadora quatre aminoàcids més cap a la cua carboxiterminal del residu a fosforilar de la proteïna diana (Fiol et al., 1987). És a dir, la GSK3 β té una especificitat de substrat que requereix una fosforilació prèvia d'aquest substrat en un context del tipus SXXXS(p), on S és el residu a fosforilar per la GSK3 β i S(p) és el residu encebador fosforilat (en la figura R22 es mostren dos exemples, el de la Glicogen sintasa i el de la β -Catenina).

Es va voler, doncs, cercar quina altra quinasa podia estar fosforilant Snail de manera que afavorís la fosforilació feta per la GSK3 β . En diversos treballs s'ha descrit com tant la CK2 com la CK1 poden realitzar aquesta tasca.

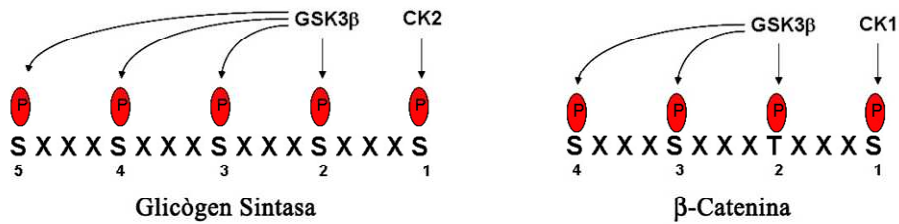


Figura R22. La GSK3β presenta una especificitat de substrat que requereix una fosforilació prèvia. Representació esquemàtica on es mostra com la majoria de substrats de la GSK3β necessiten ser fosforilats prèviament per una altra quinasa en una serina o una treonina situada quatre residus més cap a l'extrem carboxiterminal de la proteïna. En la figura es mostren dos exemples (la glicogen sintasa i la β-Catenina) on la fosforilació per part de la CK2 o la CK1 respectivament de la Serina en posició 1 permet la fosforilació duta a terme per la GSK3β sobre la serina o la troenina en posició 2, que alhora permet la fosforilació de la Serina en posició 3, i així successivament.

En la figura R22 es troben esquematitzats dos exemples, el de la β-Catenina, que requereix la fosforilació de la CK1, i el de la glicogen sintasa, que requereix la fosforilació de la CK2 perquè puguin ser fosforilades posteriorment per la GSK3β. Els assaigs quinasa *in vitro* realitzats amb les quinases CK1 i CK2 mostraren (figura R23) que de les dues quinases provades, només la CK2 podia fosforilar Snail-GST, amb la qual cosa es descarta la CK1 com a possible quinasa encebadora.

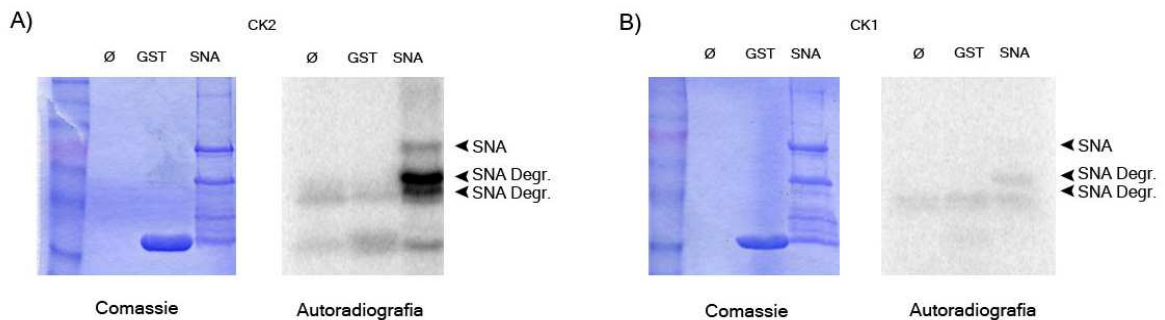


Figura R23. GST-Snail és fosforilat *in vitro* per la quinasa CK2, però no per la CK1. Assaig quinasa *in vitro* realitzat amb les quinases CK2 i CK1 i les proteïnes GST-Snail i GST en presència de γ -³²P-ATP. A la figura es mostren el gel tenyit amb blau de comassie (esquerra) i l'autoradiografia d'aquest (dreta), on podem veure com la proteïna és fosforilada per CK2, però no per CK1.

Tal com succeïa amb la GSK3 β , la CK2 també fosforilava amb major eficiència l'Snail parcialment degradat; per tant, semblava que en tots dos casos una conformació oberta afavoriria la fosforilació.

Com es pot apreciar en la figura R24, on es mostren les cinètiques corresponents a les reaccions de fosforilació d'Snail per la CK2 i la GSK3 β , la fosforilació és màxima després d'una hora d'incubació. Dades preliminars sobre la quantitat de fòsfat incorporat en la reacció amb la CK2 indiquen que la estequiometria de la reacció seria d'un fòsfat per molècula d'Snail.

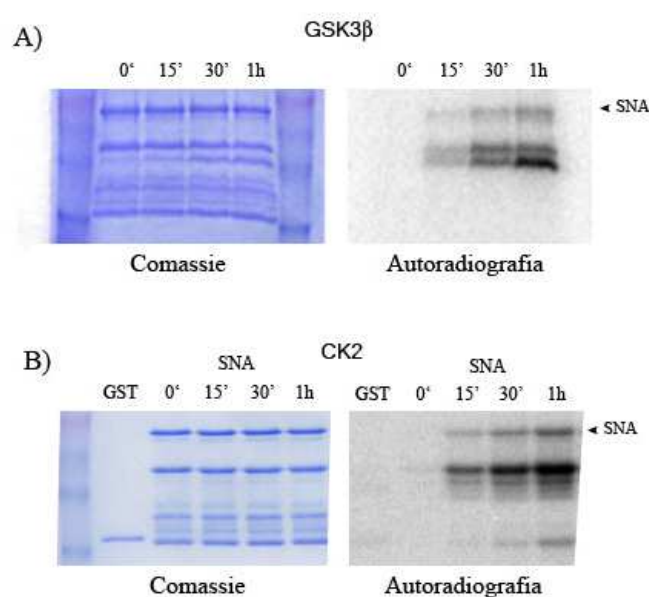


Figura R24. La fosforilació d'Snail de la CK2 i la GSK3 β augmenta amb el temps. Assaig quinasa *in vitro* realitzat amb les quinases **A)** GSK3 β i **B)** CK2 sobre GST-Snail en presència de γ -³²P-ATP, aturant la reacció a diferents temps. En la figura es mostren el gel tenyit amb blau de comassie (esquerra) i la seva autoradiografia (dreta).

9. CK2 estimula la fosforilació d'Snail per GSK3 β

Per comprovar si la fosforilació d'Snail per la CK2 afavoria la fosforilació posterior per la GSK3 β , es va realitzar un assaig quinasa amb la CK2 sobre GST-Snail, però utilitzant ATP no radioactiu, de manera que aquesta fosforilació no fos detectable en l'autoradiografia del gel. Seguidament es va inhibir la CK2 amb heparina per evitar la seva acció en el pas següent, un segon assaig quinasa sobre el mateix substrat i amb la GSK3 β en presència de γ -³²P-ATP, de manera que el senyal obtingut en l'autoradiografia del gel només fos degut a la fosforilació de GST-Snail per part de la GSK3 β . En la figura R26, si es comparen els senyals obtinguts en

l'autoradiografia del gel corresponents al tercer carril (reacció de fosforilació seqüencial de la CK2 i la GSK3 β) i al quart o cinquè carril (on no hi havia hagut la fosforilació de la CK2), es pot apreciar un augment en la fosforilació de GST-Snail per part de la GSK3 β quan havia tingut lloc la pre-fosforilació per la CK2. Aquesta augment en la fosforilació no es podia atribuir a una activitat residual de la CK2 ja que, com es pot veure en el segon carril, l'heparina l'inhibia pràcticament en la seva totalitat. Aquest resultat indicava que la CK2 estava afavorint la fosforilació feta per la GSK3 β .

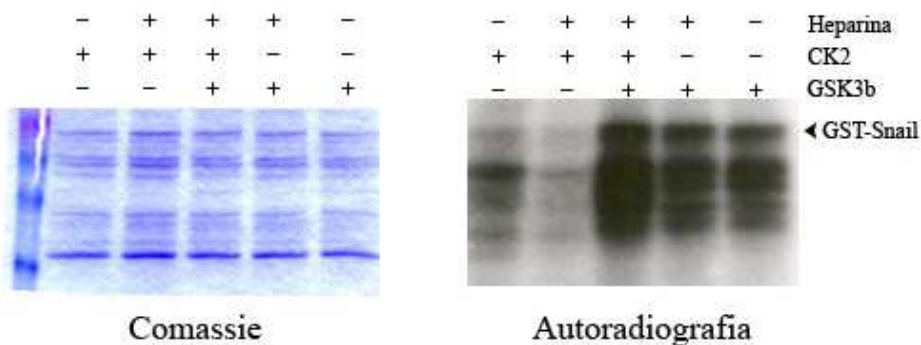


Figura R26. La quinasa CK2 promou la fosforilació de GST-Snail per la quinasa GSK3 β *in vitro*. Estudi de la fosforilació encebadora de GSK3 β per part de la CK2 mitjançant un assaig quinasa seqüencial de GST-SNA amb les quinases CK2 i GSK3 β . Primer es va realitzar un assaig quinasa amb la CK2 en presència d'ATP no radioactiu. Seguidament es va inhibir la CK2 amb heparina (3 μ g/mL) per a dur a terme un segon assaig quinasa amb la GSK3 β en presència de γ -³²P-ATP. En la figura es mostren el gel tenyit amb blau de comassie (esquerra) i la seva autoradiografia (dreta), on es veu com la fosforilació d'Snail per la CK2 afavoreix la fosforilació feta per la GSK3 β (carril 3).

Per intentar acotar la regió de fosforilació d'Snail duta a terme per la CK2 i la GSK3 β , es van realitzar assaigs quinasa utilitzant els mutants corresponents a les meitats carboxiterminal i aminoterminals de la proteïna unides a GST (GST-SNA-Ct i GST-SNA-Nt, respectivament). Com es pot veure en la figura R27, la GSK3 β fosforilava la meitat aminoterminal d'Snail, però ho feia amb menys eficiència que sobre la proteïna sencera. Per altra banda, la CK2 podia fosforilar totes dues meitats de la proteïna tot i que, com en el cas de la GSK3 β , ho feia també amb poca eficiència. Aquesta

dada indicava que regions compreses en ambdues meitats eren importants perquè la CK2 i la GSK3 β realitzessin la fosforilació de forma eficient.

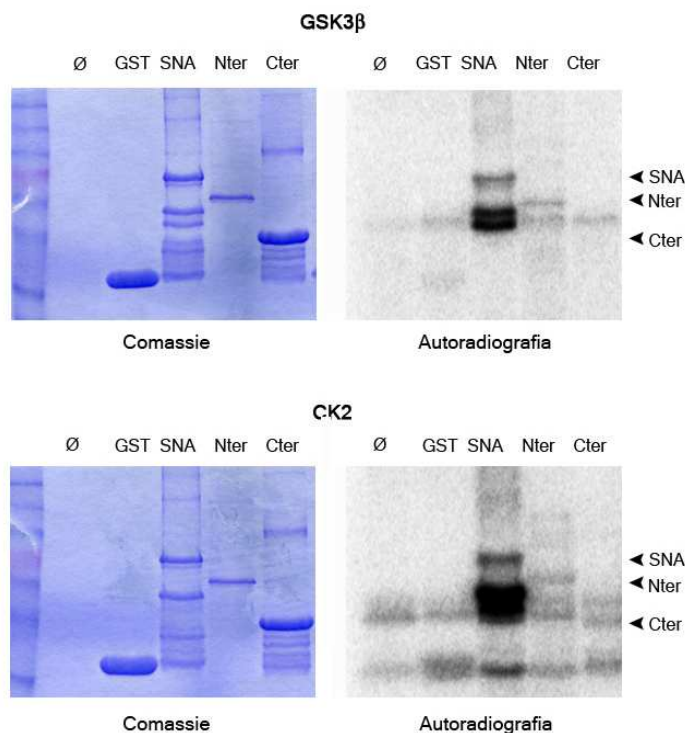


Figura R27. Fosforilació de les dues meitats d'Snail per les quinases GSK3 β i CK2. Anàlisi de la fosforilació de les meitats aminoterminal (GST-SNA-Nt) i carboxiterminal (GST-SNA-Ct) per mitjà d'un assaig quinasa realitzat com ja s'ha descrit anteriorment amb la GST-SNA i les seves meitats aminoterminal i carboxiterminal, en presència de γ -³²P-ATP i les quinases GSK3 β (panells superiors) i CK2 (panells inferiors). A l'esquerra es mostren els gels tenyits amb blau de comassie i a la dreta les seves autoradiografies, on podem veure com aquestes quinases fosforilen, a part de la proteïna sencera, les meitats aminoterminal (GSK3 β i CK2) i carboxiterminal (CK2).

10. El mutant Snail-119SA es fosforila pitjor que l'Snail Wt i es localitza preferentment al citosol

Fins al moment, respecte a les quinases CK2 i GSK3 β , s'havia vist que la primera promovia la fosforilació de la segona, i pel que se sap de la GSK3 β , es podia suposar que la CK2 fosforilava quatre aminoàcids més enllà de l'aminoàcid fosforilat per la GSK3 β .

Durant el transcurs de la realització d'aquesta tesi doctoral, i després de la nostra descripció d'Snail com a una fosfoproteïna, van aparèixer dos articles on es mostrava la fosforilació d'Snail per part de GSK3 β (Yook et al., 2005; Zhou et al., 2004). En Zhou et al., 2004, els autors descriuen dos dominis de fosforilació per aquesta quinasa (primer domini S96, S100; segon domini S107, S111, S115, S119; en la figura R28 es mostra un esquema d'aquests dominis), compresos dins el que en aquesta tesi s'ha anomenat regió rica en serines (aminoàcids 90-120). En l'article es mostrava com Snail era fosforilat per GSK3 β en el segon domini (S119, S115, S111, S107), de manera que la proteïna era exportada fora del nucli, on tornava a ser fosforilada per GSK3 β en el primer domini (S100 i S96). Aquesta primer domini de fosforilació és homòleg al domini de destrucció de β -Catenina, i com aquesta, quan és fosforilat per la GSK3 β , Snail és reconegut pel β -TrCP i degradat pel sistema del proteasoma.

A.- Esquema d'Snail



B.- Seqüència rica en serines i dominis de fosforilació per GSK3 β .

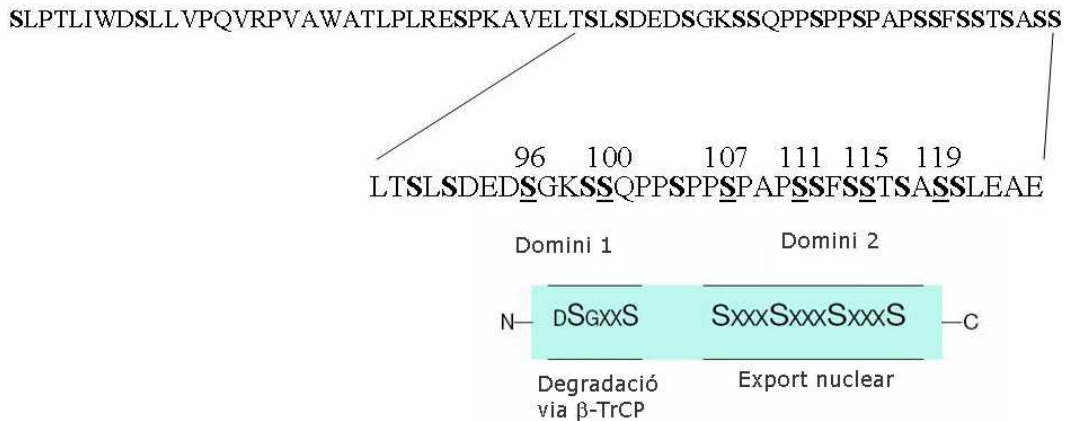


Figura R28. Snail té dos dominis de fosforilació per GSK3 β . Esquema d'Snail on es mostren els dominis de fosforilació per GSK3 β descrits en Zhou et al., 2004. La fosforilació del primer domini que és fosforilat cronològicament, (domini 2, domini d'export nuclear) provoca la sortida d'Snail del nucli al citoplasma, on és fosforilat en el domini anomenat de destrucció (domini 1), de manera que és reconegut per β -TrCP i degradat pel sistema del proteasoma.

En el cas de la β -Catenina la fosforilació encebadora és duta a terme per la CK1 i desencadena tres fosforilacions seqüencials de GSK3 β que acaben marcant la proteïna per a la seva degradació (vegeu esquema de la figura R22). En Snail, si es mirava la seqüència aminoacídica del segon domini de fosforilació per GSK3 β (cronològicament el primer que és fosforilat) (figura R28), es veia com l'aminoàcid que podria ser l'acceptor de la fosforilació encebadora per a una possible fosforilació de la S119 per la GSK3 β (primera serina del domini a ser fosforilada) no podia ser fosforilat (és una alanina). Per tant, calia pensar que la serina 119 mateixa havia de ser l'acceptora de la fosforilació encebadora, de manera que les altres tres serines fossin fosforilades, seqüencialment, per la GSK3 β . Es podia pensar, doncs que Snail era fosforilat per CK2 en el residu S119 per després ser fosforilat en la resta de serines per la GSK3 β . De fet, el predictor NetPhos1.0 (Blom et al., 2004) dona una alta probabilitat a la serina 119 per ser fosforilada per la CK2. Per comprovar si aquesta hipòtesi era certa, es va fer un mutant, SNA-119SA on la serina 119 va ser substituïda per una alanina, per tal d'evitar la seva possible fosforilació.

En els assajos quinasa realitzats amb aquest mutant (GST-SNA-119SA) i CK2 es va poder observar com, efectivament, aquest era fosforilat amb menor eficiència que l'Snail "wild-type" (figura R29).

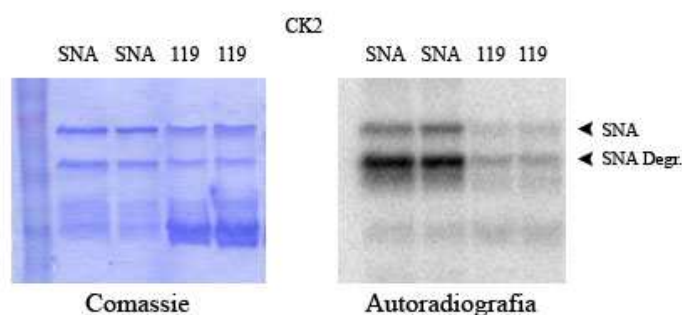


Figura R29. El mutant GST-SNA-119SA es fosforilat per la CK2 amb menor eficiència que el GST-Snail-SA. Assaig quinasa realitzat amb les proteïnes GST-Snail i GST-SNA-119SA amb la quinasa CK2 i en presència de γ - 32 P-ATP on es pot veure com la proteïna GST-SNA-119SA es fosforila amb menor eficiència que la GST-SNA. En la figura podem veure el gel tenyit amb blau de comassie (esquerra) i la seva autoradiografia (dreta).

Tenint en compte els resultats de Zhou et al., 2004 on la fosforilació del segon domini porta a l'export de la proteïna fora el nucli, calia esperar que el mutant SNA-119SA no pogués ser exportat a causa de la prevenció de la fosforilació. Quan es transfectava el mutant GFP-SNA-119SA en cèl·lules RWP1, s'observava com la mutació, lluny d'afavorir la localització nuclear de la proteïna, en facilitava la seva localització citoplasmàtica (figura R30). Una explicació d'això es donarà en la discussió.

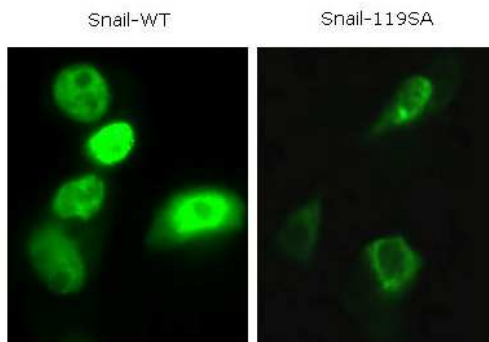


Figura R30. El mutant GFP-Snail-119SA es localitza preferentment al citoplasma. Anàlisi de la localització subcel·lular del mutant 119SA amb cèl·lules RWP1 sembrades sobre cobreobjectes que foren transfectades amb GFP-SNA i GFP-SNA-119SA, i fixades després de 16-18 hores d'expressió.

11. L'Snail no fosforilable es comporta com l'Snail "wild-type".

Paral·lelament a la feina realitzada per esclarir les quinases responsables de la fosforilació, hi havia altres qüestions obertes respecte a la fosforilació que ens interessava resoldre. Fins aleshores havíem comprovat que Snail era fosforilat, que aquesta fosforilació causava el seu export nuclear i d'aquesta manera Snail perdia la seva capacitat repressora. Però l'Snail fosforilat tenia alguna funció específica? Havíem vist com tant el mutant Snail-SD (mutant que mimetitza l'estat fosforilat) com l'Snail "wild-type", però mai el mutant SA (mutant no fosforilable), en ser transfectats i en tractar les cèl·lules amb LMB (que causa la seva retenció al nucli) apareixien formant uns cossos puntiformes presumiblement corresponents a llocs de transcripció activa. Així doncs, vam voler analitzar una possible funcionalitat d'Snail fosforilat. Per això es van preparar uns clons estables en MDCK per als mutants Snail-SA i Snail-SD (mutants que mimetitzen els estats no fosforilat i fosforilat de la proteïna respectivament) transfectant els plasmidis a les cèl·lules i seleccionant-les amb antibiòtic per a una posterior cerca de clons positius per "Western blot" amb anticòs anti-HA. Per facilitar l'anàlisi dels clons SNA-SD es van tractar les cèl·lules amb MG132, un inhibidor del proteasoma, que és el sistema de degradació

implicat en la inestabilització d'Snail al citoplasma. Fenotípicament, els clons Snail-SA i Snail-WT són equivalents entre ells, i mostren un fenotip "scattered" mentre que els clons Snail-SD són semblants als control (figura R31A). D'acord amb el que s'havia vist transfectant els mutants SNA-SA i SNA-SD respecte a la seva capacitat repressora sobre el promotor d'E-Cadherina, es constatava que els clons estables per a Snail-SA reprimien l'expressió de l'E-Cadherina endògena, mentre que els clons Snail-SD sí que expressaven E-Cadherina (figura R31B).

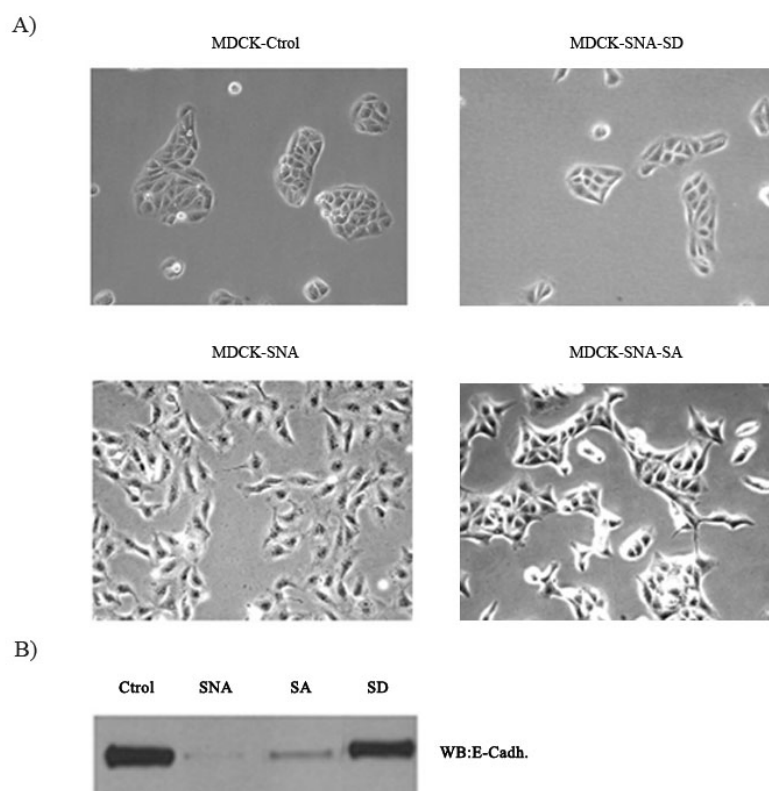


Figura R31. Estudi fenotípic dels clons MDCK estables per a Snail, Snail-SA i Snail-SD. En A) es mostren fotografies a 20X dels clons estables per a Snail, Snail-SA i Snail-SD, així com les cèl·lules control. B) "Western blot" per a E-Cadherina per als diferents mutants.

12. Snail es degrada al nucli i de manera independent a la fosforilació en el domini ric en serines

Tenint en compte la inestabilitat d'Snail al citoplasma, es va voler comparar l'estabilitat dels tres clons, Snail "wild-type", Snail-SA i Snail-SD en un assaig on les cèl·lules eren tractades amb o sense l'inhibidor del proteasoma MG132. Com més estable era la proteïna en condicions normals, menys sensible a l'MG132 i, per tant, s'esperava una menor diferència en la quantitat de proteïna entre les cèl·lules tractades amb o

sense la droga. L'objectiu era veure diferències en l'estabilitat del tres clons, on l'Snail-SA fos completament estable, l'Snail "wild-type" relativament inestable, i l'Snail-SD molt inestable (Zhou et al., 2004). Tot i observar allò que s'esperava per a l'Snail "wild-type" i l'Snail-SD, per sorpresa nostra es va veure que l'Snail-SA no era totalment estable, sinó que, com es pot veure en la figura R32A, es comportava de manera similar a l'Snail "wild-type". Així doncs, tenint en compte la localització nuclear de l'Snail-SA, es va evidenciar que Snail podia ser degradat també al nucli.

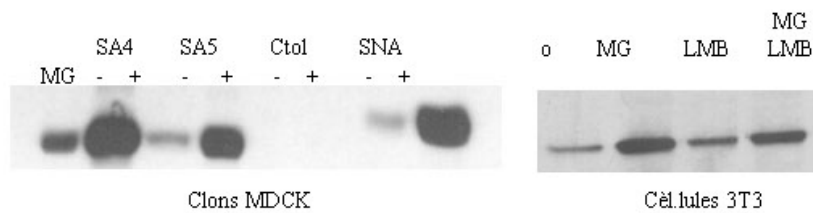


Figura R32. Snail també és degradada al nucli. A) Western Blot amb anticòs anti-HA de lisats cel·lulars totals de clons MDCK estables per a Snail (SNA) i per a Snail-SA (SA4 i SA5) (mutant no fosforilable i per tant nuclear d'Snail) on les cèl·lules han estat tractades o no amb MG132 (50 μ M) durant cinc hores per estudiar l'estabilitat de la proteïna. **B)** Western Blot amb anticòs monoclonal de ratolí anti-Snail de lisats cel·lulars totals de cèl·lules NIH-3T3 tractades amb MG132 (50 μ M) i/o LMB (5 ng/mL).

Per comprovar que aquesta degradació independent de la fosforilació i, per tant, presumiblement nuclear també tenia lloc amb l'Snail endogen, es van tractar cèl·lules NIH-3T3 amb LMB, per retenir Snail al nucli, i amb MG132 per analitzar la seva estabilitat. En la figura R32B es pot veure que quan les cèl·lules eren tractades només amb LMB i, per tant, la proteïna era retinguda al nucli (tercer carril), hi havia un petit augment de proteïna endògena present en aquestes cèl·lules si es comparava amb les cèl·lules que no havien estat tractades (primer carril). Aquest petit augment corresponia a l'Snail que presumiblement s'estava degradant al citosol. Però si es comparaven les cèl·lules tractades amb LMB i les tractades amb l'inhibidor del proteasoma MG132 (segon carril), es veia una acumulació de la proteïna que no es corresponia amb l'Snail citoplasmàtic. Si es tractaven les cèl·lules amb LMB i MG132, es veia com l'Snail nuclear (que en aquest cas era tot l'Snail cel·lular, ja que la LMB el retenia al nucli) era sensible a l'inhibidor del proteasoma, la qual cosa indicava que efectivament, l'Snail

endogen també podia ser degradat al nucli. Així doncs, es podia afirmar que Snail es degradava al citosol i al nucli.

A més a més, es podia afirmar que aquesta degradació nuclear era independent de la fosforilació en les serines situades dins el que s'havia anomenat domini ric en serines, ja que en el mutant Snail-SA aquestes serines havien estat substituïdes per alanines. Tot i així, es va voler comprovar que aquesta degradació era independent de GSK3 β i es van incubar els clons amb LiCl, un inhibidor de la GSK3 β (Klein and Melton, 1996; Stambolic et al., 1996). Com es pot veure en la figura R33, quan es tractaven les cèl·lules MDCK-Snail-WT amb LiCl, es veia un augment en la quantitat de proteïna atribuïble a la inhibició de la fosforilació per GSK3 β que conduiria a la seva degradació. En canvi, si aquestes cèl·lules eren tractades amb MG132, hi havia un major augment en la quantitat de proteïna, el qual indicava que el LiCl no era capaç d'inhibir tota la degradació d'Snail. La diferència entre les cèl·lules tractades amb LiCl i MG132 es podia atribuir a la degradació que tenia lloc al nucli. Si es comparaven els punts corresponents a les cèl·lules tractades o sense tractar amb LiCl dels dos clons Snail-SA que es mostren en la figura R33, s'observava com no hi havia diferències en la quantitat de proteïna. Això indicava que, tal com s'esperava, l'Snail-SA no era sensible al LiCl i, per tant, la seva degradació no depenia de la GSK3 β . En canvi, si aquests clons eren tractats amb MG132 sí que es veia pertorbada la degradació de l'Snail-SA. Per tant, existia un sistema de degradació d'Snail que tenia lloc al nucli i era independent de GSK3 β i de la fosforilació en els residus serina del domini 90-120. Aquest sistema de degradació era sensible a MG132.

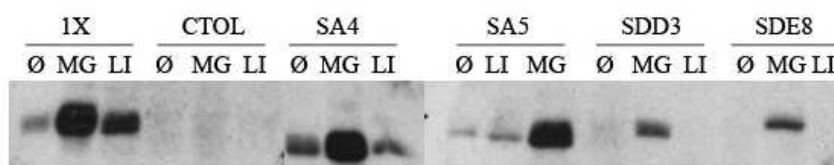


Figura R33. Snail és degradat al nucli independentment de GSK3 β . Western Blot amb anticòs anti-HA de lisats cel·lulars totals de clons MDCK estables per a Snail (SNA), per a Snail-SA (SA4 i SA5) i per a Snail-SD (SDD3 i SDD8) on les cèl·lules han estat tractades amb MG132 (inhibidor del proteasoma) o LiCl (inhibidor de la GSK3 β) durant cinc hores per estudiar l'estabilitat de la proteïna.

Tot i que en general aquesta droga s'utilitza per inhibir el sistema del proteasoma, s'ha descrit que també és capaç d'inhibir altres sistemes de degradació, com ara el de les calpaines (Lee and Goldberg, 1998). Per a verificar que el proteasoma era el sistema de degradació d'Snail dins del nucli, es van tractar les cèl·lules amb Lactacistina, un inhibidor més específic d'aquest sistema. Com es pot veure en la figura R34, el tractament de les cèl·lules amb la lactacistina inhibeix la degradació tant de l'Snail-WT com de l'Snail-SA, en proporcions similars. Per tant, podem afirmar que la degradació nuclear d'Snail també tenia lloc pel sistema del proteasoma. Si es compara la quantitat de proteïna en cèl·lules tractades amb MG132 amb la de tractades amb Lactacistina, s'observa una diferència atribuïble a una més baixa activitat de la Lactacistina en les condicions emprades.

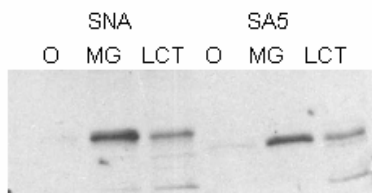


Figura R34. Snail és degradat al nucli pel sistema del proteasoma. Estudi de la degradació nuclear d'Snail

mitjançant l'anàlisi per Western Blot amb anticòs monoclonal de ratolí anti-Snail de lisats cel·lulars totals de clons MDCK estables per a Snail i Snail-SA tractades amb MG132 (50 μ M) o Lactacistina (10 μ M) (LCT).

Estudi de la degradació nuclear d'Snail mitjançant l'anàlisi per Western Blot amb anticòs monoclonal de ratolí anti-Snail de lisats cel·lulars totals de clons MDCK estables per a Snail i Snail-SA tractades amb MG132 (50 μ M) o Lactacistina (10 μ M) (LCT).

Durant la realització dels diferents assajos per caracteritzar la degradació d'Snail nuclear, es va veure que no hi havia gaires diferències en el comportament, entre els clons estables en MDCK d'Snail i d'Snail-SA, excepte en l'assaig on les cèl·lules eren tractades amb l'inhibidor específic de GSK3 β (LiCl) (figura R33). Es va realitzar una cinètica de la degradació dels clons estables en les cèl·lules MDCK-SNA i MDCK-SNA-SA tractant-les amb Cicloheximida, una droga que inhibeix la traducció, durant diferents temps. Amb aquesta droga no hi síntesi *de novo* de proteïna i, per tant, es pot observar com la que existeix ja dins la cèl·lula es va degradant al llarg del temps. Com es pot veure en la figura R35, les dues proteïnes eren degradades a una velocitat similar, la qual cosa suggeria que en aquestes cèl·lules el sistema de degradació que domina és el nuclear.

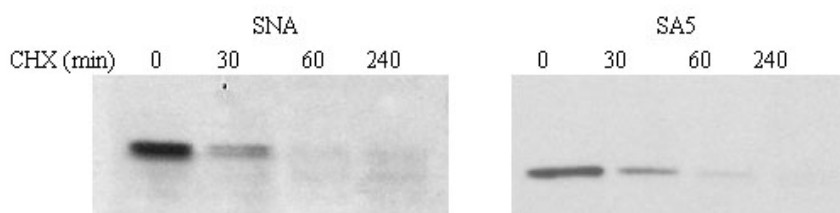


Figura R35. MDCK Snail es degrada majoritàriament al nucli. L'estudi de la cinètica de la degradació d'Snail i Snail-SA en cèl·lules MDCK transfectades establement es va realitzar tractant les cèl·lules amb Cicloheximida (25 µg/mL) a diferents temps i analitzant per Western Blot nivells d'Snail ectòpic.

13. La regió 108-151 d'Snail és la responsable de la inestabilitat dins el nucli

Per determinar quina regió d'Snail era la responsable d'aquesta degradació nuclear mitjançada pel proteasoma, es van realitzar assajos d'estabilitat amb cèl·lules MDCK transfectades amb els diferents mutants units a GFP. Un cop transfectades, les cèl·lules van ser tractades amb Cicloheximida, per aturar la síntesi de proteïnes, i MG132 per poder comparar la degradació per a cada un dels mutants. Primer es va analitzar la degradació dels mutants corresponents a les dues meitats d'Snail (mutants GFP-SNA-Nt i GFP-SNA-Ct), comparant-los amb la proteïna sencera. Com es pot veure en la figura R36A, el mutant GFP-SNA-Ct no era sensible a la l'MG132, hi havia la mateixa quantitat de proteïna en cèl·lules tractades i sense tractar, i es posava en evidència que aquest mutant no estava sotmès a degradació dependent del proteasoma. Per altra banda, els mutant GFP-SNA-Nt i GFP-SNA sí que eren sensibles a l'MG132. Aquesta sensibilitat enfront la droga indicava que aquests constructes contenien una regió que era reconeguda pel sistema de degradació que no estava present en el constructe no sensible (GFP-SNA-Ct).

Es va voler descartar que aquesta degradació observada fos la degradació citoplasmàtica mitjançada per la fosforilació de GSK3β en les serines compreses entre els aminoàcids 90 i 120 ja descrita anteriorment. Per això es va analitzar la sensibilitat a MG132 en cèl·lules MDCK dels constructes GFP-SNA-Nt-LA i GFP-SNA-Nt-Δ(90-120). El primer no podia ser exportat, ja que tenia mutada la seqüència d'export nuclear (NES), i el segon no contenia la regió rica en serines on es troben les dianes de GSK3β.

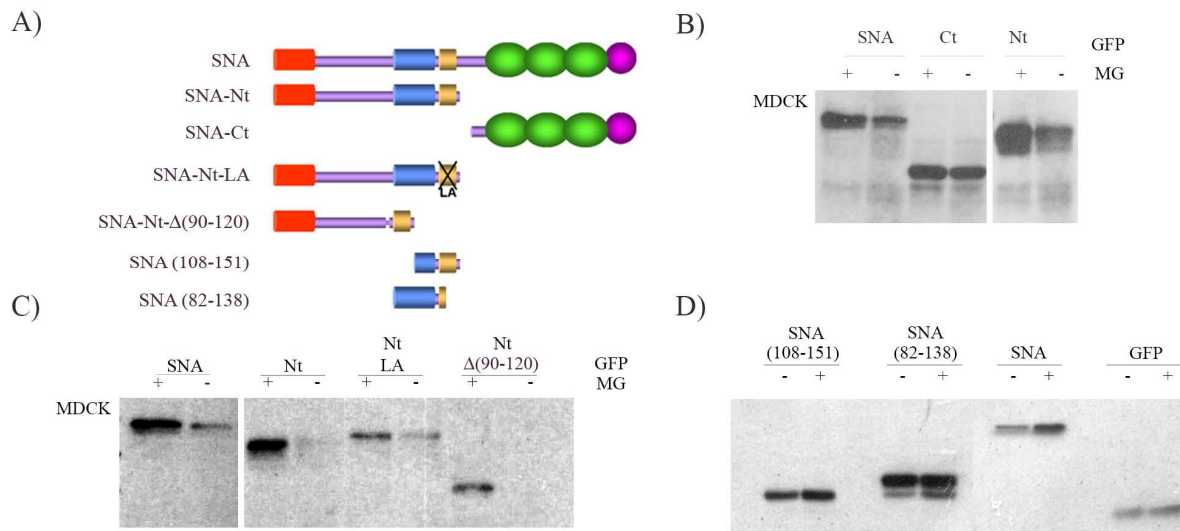


Figura R36. La regió d'Snail (108-158) és la responsable de la degradació nuclear d'Snail en el nucli. Estudi de la regió responsable de la degradació nuclear d'Snail per Western Blot amb anticòs anti-GFP de lisats cel·lulars totals de cèl·lules MDCK transfectades amb diferents mutants de GFP-Snail i tractades durant tres hores amb Cicloheximida (25 µg/mL) i MG132 (50 µM). Els mutants emprats es mostren esquematitzats en **A)** i són, a part de GFP-SNA **B)** GFP-SNA-Nt, GFP-SNA-Ct **C)** GFP-SNA-Nt, GFP-SNA-Nt-LA, GFP-SNA-NtΔ(80-120) **D)** GFP-SNA(108-151), GFP-SNA(82-138).

Com es pot veure en la figura R36B, tots dos mutants eren sensibles a l'MG132 i, per tant, contenien la regió responsable de la degradació nuclear d'Snail. Per acotar-ne la seva localització dins la meitat aminoterminal, es va realitzar el mateix assaig fent servir altres mutants: GFP-SNA-(108-151) i GFP-SNA-(82-138). Com es pot veure en la figura R36C, el mutant que contenia la regió 82-138 d'Snail mantenia els nivells de quantitat de proteïna independentment de si les cèl·lules eren tractades o no, mentre que el mutant GFP-SNA-(108-151), sensible a l'MG132, augmentava la quantitat de proteïna amb el tractament. Això indicava que dins el fragment 138-151 hi havia la regió que conferia inestabilitat a la proteïna dins del nucli.

14. L'Akt regula la degradació nuclear

L'Akt, també coneguda com PKB, és una serin/treoninquinasa quinasa que participa dins la via de senyalització de la PI3K. Quan aquesta via és activada, la PI3K indueix l'activació per fosforilació de l'Akt, que alhora fosforila altres substrats, entre ells la GSK3β. Aquesta, quan és fosforilada

en la serina 9, s'inhibeix i, per tant, deixa de fosforilar entre d'altres a Snail, de manera que la seva degradació citosòlica queda inhibida. Així doncs, caldria esperar que tenint més Akt actiu dins la cèl·lula hi hauria més quantitat d'Snail, ja que aquest es degradaria en menor grau.

Per veure l'efecte d'Akt sobre la degradació d'Snail es van cotransfectar en cèl·lules RWP1 una forma constitutivament activa d'Akt (Akt miristoilada, Akt-myr) amb Snail o Snail-SA. Com es pot veure en la figura R37, al contrari del que s'esperava, la presència d'Akt promovia tant la degradació d'Snail com la del mutant Snail-SA. Aquest efecte era més pronunciat sobre el mutant Snail-SA que sobre la proteïna "wild-type", sobretot a temps més curts (una hora). Si es té en compte la localització nuclear d'aquest mutant, això ens indicava que aquest efecte promotor de l'Akt sobre la degradació tenia lloc a dins del nucli.

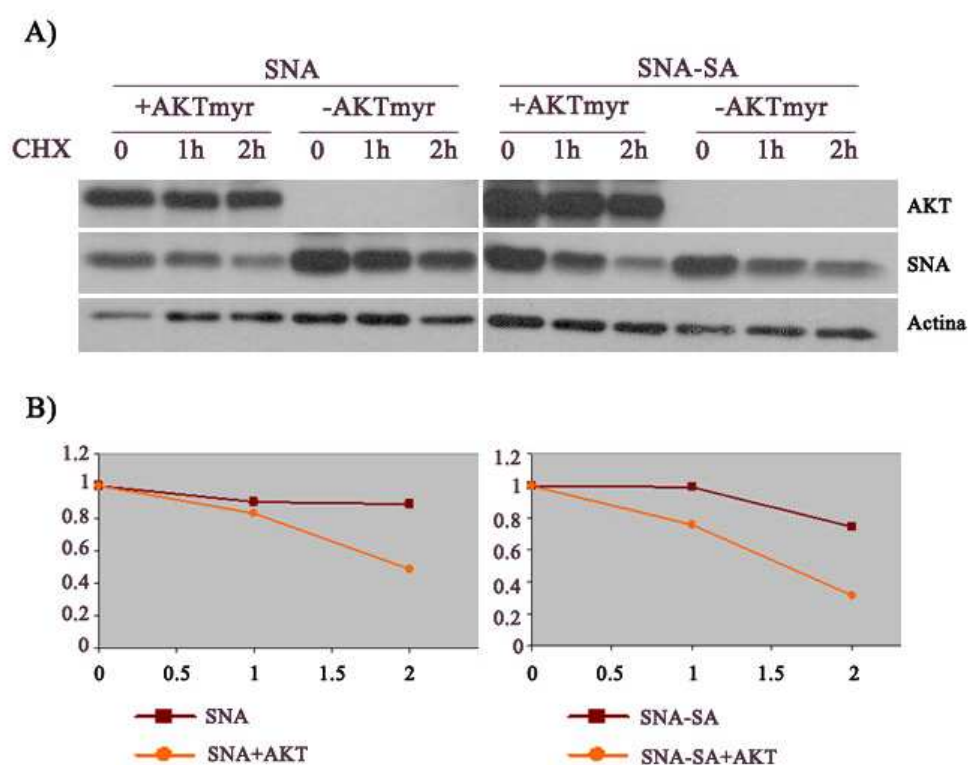


Figura R37. Akt regula la degradació d'Snail al nucli. A) Anàlisi de l'efecte d'Akt sobre la degradació d'Snail per "Western blot" amb un anticòs anti-HA on cèl·lules RWP1 foren cotransfectades amb PCDNA3-SNA o PCDNA3-SNA-SA amb una forma constitutivament activa d'Akt (AKTmyr) i tractades amb MG132 (50 μ M) i Cicloheximida (25 μ g/mL) durant 0, una o dues hores per estudiar la seva degradació. En **B)** es representen les quantitats de proteïna densitometrades per a cada punt.

Discussió

1. Snail es localitza al nucli i al citoplasma

Els processos de transició epitelí-mesènquima (EMT) són essencials en diversos estadis del desenvolupament embrionari, des de la gastrulació a la formació de la cresta neural, òrgans i teixits (Thiery, 2002). Però l'EMT també té lloc en processos patològics, com ara la fibrosi i en etapes primerenques en que els carcinomes adquireixen capacitats invasives i metastàsiques. Funcionalment, podríem dir que l'EMT és el mecanisme pel qual cèl·lules epitelials generades en una regió particular es poden dissociar de l'epitelí i migrar per dirigir-se a diferents localitzacions. Així doncs, cèl·lules immòbils, adherides entre elles i a la matriu extracel·lular, prenen la capacitat de moure's com a cèl·lules individuals (Nieto, 2002).

L'E-Cadherina és el component central de l'adhesió cel·lular i és necessària per a la formació de l'epitelí en l'embrió i per mantenir l'homeostasi epitelial en l'adult. S'ha descrit, tant *in vitro* com *in vivo*, que la pèrdua de l'expressió de l'E-Cadherina està fortament implicada en els processos d'EMT. La seva regulació a la baixa té lloc, principalment, mitjançant repressors transcripcionals, on Snail s'ha descrit com el principal.

Snail, factor de transcripció del tipus dit de zinc, s'uneix a seqüències consens del DNA del tipus E-box, presents en els promotors de diverses proteïnes, com ara el de l'E-Cadherina, entre d'altres. El paper més ben descrit i estudiat per a Snail és d'inductor de l'EMT, principalment com a repressor de l'E-Cadherina. Però, tot i que s'ha descrit àmpliament la correlació inversa entre totes dues proteïnes, hi ha evidències de la seva coexpressió.

Així doncs, inicialment es va voler veure la funcionalitat d'Snail en aquelles cèl·lules on s'havia observat una coexistència amb l'E-Cadherina. Al laboratori s'havia generat un anticòs anti-Snail amb el qual es van realitzar immunofluorescències sobre diverses línies tumorals. Tot i que l'anticòs anti-Snail permetia veure una tinció específica de l'Snail endogen, com que els nivells de proteïna eren petits, es va decidir transfectar la proteïna exògena. Aquesta aproximació també ens va permetre, més endavant, treballar amb els diferents mutants generats. Com a resultat d'aquestes transfeccions, es va poder veure que l'Snail es localitzava tant al citoplasma com al nucli, amb certes preferències depenent de la línia cel·lular (MCF7,

citoplasmàtica; NIH-3T3, nuclear). En diverses línies (RWP1, MDCK) tot i que hi havia un marcatge d'Snail majoritàriament nuclear, hi havia una minoria de cèl·lules que presentava un marcatge nuclear i citoplasmàtic a l'hora. En general, quan Snail es troba al nucli i actua reprimint el gen de l'E-Cadherina, no s'observa expressió d'aquesta (Cano et al., 2000; Batlle et al., 2000; Yokoyama et al., 2001; Poser et al., 2001; Cheng et al., 2001; Jiao et al., 2002). Però en certes línies cel·lulars hi ha una quantitat elevada d'ambdós transcrits corresponents a les dues proteïnes ((Hajra et al., 2002); figura 1 dels resultats), i s'ha pogut constatar que és en aquests casos quan s'observa Snail al citoplasma.

Obtenir marcatge d'Snail al citoplasma era quelcom que no s'esperava per la seva condició de factor de transcripció, però, encaixava amb el fet que en certes línies cel·lulars hi havia l'expressió d'Snail i E-Cadherina alhora. Aquesta coexpressió podia explicar-se com a una pèrdua de la funcionalitat d'Snail com a factor de transcripció quan es troba al citoplasma. De fet s'han descrit altres factors de transcripció que regulen la seva activitat mitjançant l'exclusió nuclear, com ara la p53 (Ryan et al., 2001) o l'NFAT (Crabtree and Olson, 2002).

La transfecció amb la GFP-Snail va permetre veure amb més precisió les diferents localitzacions subcel·lulars en què es podia trobar Snail. Quan la proteïna era al citoplasma es podia trobar distribuïda de formes diferents: difosa (cèl·lules MiaPaCa, figura 3), disposada en forma de filaments marcant els microtúbuls (cèl·lules MCF-7, figura 3), o, fins i tot, també en forma de petits grànuls. Quan Snail es trobava al nucli, també es podia observar difós amb els nucleols exclosos (cèl·lules RWP1 i SW480 en la figura 3) o bé formant uns cossos puntiformes (cèl·lules HT29-M6 i HCT116 en la figura 3). La localització en aquests cossos era molt evident quan les cèl·lules eren tractades amb Leptomycin B (LMB), droga que no permet l'export nuclear. D'altra banda, el mutant Snail-SA (que mimetitzava l'estat no fosforilat de la proteïna) en cap ocasió es disposava en aquest puntejat nuclear, ni tan sols quan les cèl·lules eren tractades amb la droga. En canvi, en les cèl·lules transfectades amb el mutant Snail-SD (que mimetitzava l'estat fosforilat de la proteïna), en ser tractades amb LMB per retenir la proteïna al nucli, aquesta sempre es disposava en punts. Aquestes dades apunten que la distribució en aquests cossos puntiformes té lloc com a pas previ a

l'export, un cop la proteïna és fosforilada. Amb posterioritat es va observar que Snail colocalitza en aquests cossos amb la proteïna U2AF65 en els llocs de transcripció activa (Gama-Carvalho et al., 1997). La colocalització, però, no és total i no es pot descartar que Snail també es trobi en alguna altra agrupació subnuclear. La disposició d'Snail recorda a la que tenen els "PML bodies" i no es pot descartar doncs, que en formi part.

Amb l'ús dels mutants i la LMB s'ha pogut observar que el marcatge citoplasmàtic era degut a una alta eficiència en el mecanisme de sortida de la proteïna. Les cèl·lules transfectades amb qualsevol dels mutants i tractades amb la droga retenien la proteïna al nucli. Això indicava que hi havia una entrada a nucli constitutiva i, per tant, un recanvi continuat de la proteïna entre nucli i citosol. El tipus de marcatge observat (nuclear o citoplasmàtic) era degut a la menor o major eficiència en l'export.

S'ha comprovat que a la meitat aminoterminal hi ha una seqüència d'export nuclear (NES) que és la responsable de l'export mediada pel sistema CRM1/exportina1. Aquesta seqüència es troba conservada entre els Snails de mamífer, però no en Slug ni els altres Snails, la qual cosa suggereix que l'adquisició de la característica de ser exportat i les conseqüències que se'n poden derivar (guany o pèrdua de funcions,...) han tingut lloc en el mateix punt de l'evolució en què es van separar aquests llinatges. Tenint en compte que la única "funció" descrita per a Snail al citoplasma és la seva degradació, podem pensar, en primer lloc, que la degradació al nucli és el sistema de degradació ancestral per als membres de la família d'Snail. En segon lloc, l'adquisició de la capacitat de ser degradada al citoplasma configuraria un sistema més complex de regulació de l'activitat d'Snail, que podria estar associat a les noves funcions de la proteïna en vertebrats o mamífers (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005).

D'altra banda, en aquest treball no s'ha descrit cap seqüència responsable de l'import cap al nucli (NLS, de l'anglès "nuclear localization sequence"), tot i que tots els mutants analitzats, encara que tinguessin tendència citoplasmàtica, eren retinguts al nucli en ser tractats amb LMB. Es podria pensar que Snail (32 KDa) pot entrar al nucli per difusió, ja que s'ha descrit que només a les proteïnes més grans de 50 KDa els calen seqüències NES o NLS per travessar el complex del porus nuclear (Poon and Jans, 2005b). Però hi ha raons per pensar que això no és cert. Per una

banda, en unir l'Snail a la GFP (60 KDa), veiem el mateix patró de localització i per grandària a aquesta proteïna de fusió sí que li caldria un transportador per al canvi de localització. D'altra banda, si entrés al nucli per difusió, podríem pensar que també en pot sortir d'aquesta manera i, com ja hem vist, la sortida del nucli està mitjançada per un transportador, el complex CRM1/exportina, que en ser bloquejat reté la proteïna totalment al nucli. Per tant podem pensar que sí que hi ha un sistema de transport d'Snail cap al nucli. Aquest sistema ha de reconèixer més d'una seqüència d'Snail que dirigeixi la proteïna cap al nucli, com a mínim una en cada meitat de la proteïna.

Altres grups han mostrat que la meitat carboxiterminal de la proteïna és essencial en aquest import. Així, s'ha descrit que l'import d'Snail al nucli té lloc mitjançant la interacció directa de la meitat carboxiterminal (que inclou els dits de zinc) amb la importina β de forma dependent de RanGTP (Yamasaki et al., 2005). Però, com ja hem mencionat anteriorment, els mutants que contenen la part aminoterminal també són importats, tot i la seva observació citoplasmàtica, perquè el tractament de les cèl·lules amb LMB reté la proteïna al nucli. Mutacions en el domini SNAG de la proteïna Gfi-1, on inicialment es va descriure aquest domini també present en Snail, demostren que en aquests set aminoàcids hi ha una NLS. En el cas del Gli-1, no és suficient per dirigir els 20 primers aminoàcids al nucli, i es suggereix que per al reconeixement cal una estructura terciària que inclogui residus de les dues meitats de la proteïna, que, per tant, tindria una NLS bipartida on l'altra part estaria en la regió dels dits de zinc del Gfi-1 (Grimes et al., 1996). Per a Snail, però, caldria que hi hagués dues NLS, una a cada meitat de la proteïna, on cada una per separat fos funcional i pogués actuar com a tal. Així doncs, encara falta per localitzar una NLS funcional en l'extrem aminoterminal.

Hem observat que la funcionalitat d'aquesta NES està condicionada a l'estructura de la proteïna. L'emascament intramolecular de les NLS o NES és un mecanisme molt comú per regular l'eficiència del transport nuclear (Poon and Jans, 2005a), emprat per exemple per les proteïnes NF κ B p50 (Riviere et al., 1991) i INI1 (Craig et al., 2002). Una conformació plegada d'Snail, on la meitat aminoterminal interaccionaria amb la

carboxiterminal, és essencial per a l'emascament de la NES i, per tant, la retenció d'Snail al nucli.

Aquesta seqüència NES es troba contigua a una regió rica en serines força conservada. Les regions riques en serines i prolines tenen una baixa complexitat estructural i s'ha descrit que es poden comportar com a una regió frontissa entre dos dominis proteics. Aquestes dades i el fet que aquesta regió acumulés tantes serines fosforilables ens van dur a pensar que la regió rica en serines podria actuar de manera que la fosforilació, i més concretament l'augment de càrrega neta, provocaria un canvi conformacional cap a un estat que permetria la interacció entre la seqüència responsable de l'export i el complex que la reconeix. En la nostra hipòtesi, per tant, Snail podria tenir una conformació plegada, on la proteïna no estaria fosforilada, i les meitats aminoterminals i carboxiterminals interaccionarien entre elles per establir o mantenir aquesta conformació. La fosforilació del domini ric en serines causaria tal augment de la càrrega que afavoriria el desplegament d'Snail i la seqüència d'export nuclear NES quedaria accessible a la maquinària d'export (Figura D1).

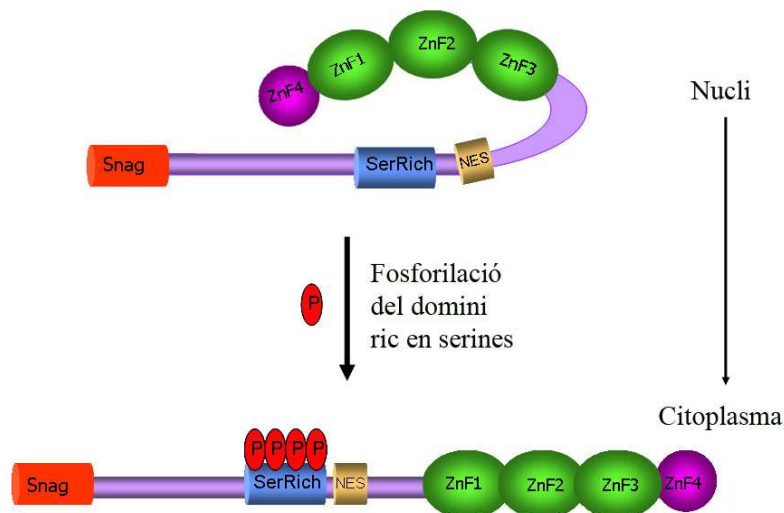


Figura D1. Hipòtesi de l'export nuclear d'Snail. Esquema on es mostra com la fosforilació pot modular l'export nuclear d'Snail. Tal i com s'explica en l'apartat de resultats (vegeu el punt numero cinc, "La fosforilació d'un domini ric en serines modula la interacció entre els fragments carboxiterminals i aminoterminals de la proteïna") la proteïna no fosforilada es trobaria plegada sobre si mateixa i emascararia la NES. La fosforilació en el domini ric en serines causaria una acumulació de càrrega negativa que donaria lloc a la inestabilització de l'estructura plegada de manera que s'obriria i deixaria al descobert la seqüència NES, i permetria així la seva sortida del nucli al citoplasma.

Per al manteniment d'aquesta conformació plegada són essencials dos dominis, situats cadascun en una meitat d'Snail: el domini ric en serines (meitat aminoterminal) i el quart i últim dit de zinc (meitat carboxiterminal), ja que l'eliminació d'aquest darrer causa un export gairebé total de la proteïna. Els assajos realitzats amb les meitats de la proteïna units a la GFP i la RFP van confirmar que realment existeix *in vivo* una interacció entre els fragments aminoterminal i carboxiterminals, i que aquesta interacció regula la localització cel·lular de la proteïna. En els assajos de "pull down" hem pogut confirmar que l'últim dit de zinc juga un paper molt important en aquesta interacció de les dues meitats de la proteïna. Com es veu en l'assaig (figura R15, de l'apartat de resultats), si aquest dit de zinc s'elimina, la interacció pràcticament desapareix. No podem afirmar, però, que aquesta interacció tingui lloc per una unió directa del quart dit de zinc amb la meitat aminoterminal, ja que altres dades (entre elles la funcionalitat del mutant en els assaigs reporter que es comentaran més endavant) apunten a una important funció estructural del darrer dit de zinc que afecta la funcionalitat del domini. Dades aportades per altres grups de recerca podrien recolzar la importància estructural dels dits de zinc per a un correcte funcionament de la proteïna. Així s'ha descrit la implicació d'un transportador de zinc, el LIV-1, en l'import nuclear d'Snail (Yamashita et al., 2004). L'augment del zinc nuclear podria afavorir una estructura més estable per als dits de zinc, de manera que un hipotètic equilibri entre els dos estats conformacionals de la proteïna estigués desplaçat cap a la proteïna plegada. D'aquesta manera l'accessibilitat als dominis centrals de la proteïna, implicats en el transport, quedarien menys accessibles i, per tant, la retenció nuclear d'Snail estaria afavorida.

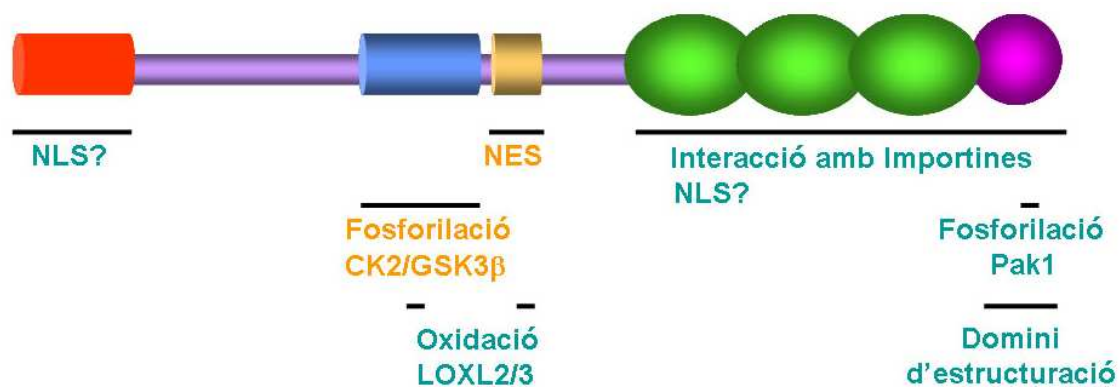
2. El transport nucleocitoplasmàtic d'Snail està regulat per fosforilació

El mecanisme més ben conegut per regular el transport nuclear de proteïnes són les modificacions posttraduccionals per fosforilació-defosforilació (Jans et al., 2000). De fet, la fosforilació és un sistema comú de regulació d'entrada i sortida de proteïnes del nucli (Okamura et al., 2000; Zhang and Xiong, 2001; Ishida et al., 2002), i hem constatat com Snail regula el seu trànsit nucleocitoplasmàtic mitjançant aquest sistema:

els mutants que mimetitzen els estats fosforilat o no fosforilat de la regió rica en serines es localitzen fora i dins del nucli respectivament.

Posteriorment, altres grups també han descrit com la fosforilació regula aquest trànsit nucleocitoplasmàtic d'Snail. Dos treballs diferents han descrit com la GSK3 β fosforila les serines de la regió rica en serines i provoca l'export de la proteïna (Zhou et al., 2004; Yook et al., 2005). A més a més, hi ha un article en premsa (Yang et al 2006) on es descriu com l'Axina regula la localització citoplasmàtica de la GSK3 β i, en conseqüència, controla la degradació d'Snail. Però no només aquesta regió pot regular l'export, sinó que també s'ha descrit com l'import, o la retenció nuclear, es veuen afavorides per la fosforilació per part de la quinasa PAK1 en la serina 246 d'Snail, situada en el quart dit de zinc (Yang et al., 2005). No queda clar, però, si la fosforilació provoca una retenció de la proteïna al nucli o un ràpid import.

A més a més, s'ha descrit com Snail interacciona amb les LOXL2/3, unes lisil-oxidases que estarien mediant una oxidació entre les lisines 98 i 137 d'Snail. Aquesta reacció estabilitzaria la conformació plegada de la proteïna i afavoriria la seva localització nuclear, amb la qual cosa es potenciarà la seva activitat transcripcional (Peinado et al., 2005a; Peinado et al., 2005b).



T

Figura D2. Diversos factors regulen la localització cel·lular d'Snail. Esquema on es mostren les diferents regions d'Snail implicades en la regulació de la seva localització, ja sigui per modificacions posttraduccionals (fosforilacions i oxidacions), per la presència de seqüències de reconeixement (NLS, NES), o bé per la seva importància estructural. En lletres carabasses es mostren les regions implicades en l'export.

Tots aquests treballs recolzen la nostra hipòtesi de la regulació de la localització d'Snail a través del plegament i desplegement de la proteïna per fosforilació, alhora que la complementen. També posen de manifest la complexitat del sistema de regulació d'Snail, que sembla que de mica en mica es va desxifrant (Figura D2).

L'objectiu de partida d'aquest treball era determinar la possible pèrdua de funcionalitat d'Snail en certes línies cel·lulars, en aquelles on s'expressaven tant Snail com E-Cadherina. Amb posterioritat vam veure que era en aquestes cèl·lules on Snail es localitzava al citoplasma i, per tant, on molt probablement no podria exercir la seva activitat com a factor de transcripció. Els assaigs funcionals amb els diferents mutants emprats demostraren que Snail pot funcionar com a factor de transcripció quan està dins del nucli i que, en canvi, quan és fora no és capaç de reprimir o activar els seus gens diana. Així doncs, podríem dir que la localització cel·lular d'Snail regula la seva activitat transcripcional. Cal mencionar, però, que dos dels mutants que es localitzen fora del nucli no tenen la mateixa capacitat transcripcional. En el procés de posada a punt de l'assaig vàrem observar que en treballar amb quantitats elevades de DNA, el mutant SNA-SD era capaç de reprimir el promotor d'E-Cadherina, mentre que el mutant sense l'últim dit de zinc (SNA(1-236)), no. La capacitat del mutant SNA-SD de reprimir, tot i que esperàvem que no fos així a causa de la seva localització cel·lular citoplasmàtica, la vam atribuir al fet de treballar amb quantitats elevades de promotor, de manera que "segrestava" la proteïna durant el seu pas pel nucli i impedia el seu export. En ajustar aquestes condicions, reduint la quantitat de promotor transfectat, la repressió no va tenir lloc. A diferència del mutant SNA-SD, l'SNA(1-236) no era capaç de reprimir ni tan sols amb quantitats elevades de plàsmid reporter, tot i que els assaigs amb LMB havien mostrat que també té un pas pel nucli. Això ens va dur a pensar que aquest últim dit de zinc, com ja s'ha apuntat anteriorment, és important per a l'estructura de la meitat carboxiterminal, la qual té capacitat d'unió a DNA. Per tant, una desestructuració suposa la pèrdua de funcionalitat, no només pel fet de la seva localització que de totes maneres és citoplasmàtica, sinó també per un problema a l'hora d'unir-se al DNA. També vam corroborar que la capacitat activadora d'Snail de gens mesenquimals seguia la mateixa tendència que la repressora, o sigui, que

els mutants nuclears tenen una activitat semblant o equivalent a l'Snail "wild type", mentre que els mutants que es disposen al citosol perden aquesta capacitat.

3. Snail és fosforilat per les quinases CK2 i GSK3 β

Existeixen altres factors de transcripció que regulen la seva activitat transcripcional per fosforilació modulant l'entrada i sortida del nucli, com per exemple FOXO (Zhao et al., 2004) o Dorsal (Briggs et al., 1998). Aquest tipus de regulació permet una ràpida resposta a estímuls extracel·lulars. Els assaigs on es compara l'estat de fosforilació entre els extractes adherits o en suspensió, mostren que la fosforilació d'Snail s'incrementa quan es les cèl·lules no tenen unions a la matriu, com quan estan suspeses, però un cop restableixen els contactes, tornen a l'estat basal. Es va pensar que la quinasa implicada en la fosforilació d'Snail havia de formar part d'una via de senyalització involucrada en la transmissió de senyals de la matriu cap al nucli, per a informar, en aquest cas, que el contacte cèl·lula-substrat ja no era el propi d'una cèl·lula adherida i que calia variar, en certa manera, l'equilibri de factors de transcripció que estaven actius. La ILK interacciona amb els dominis citoplasmàtics de les integrines $\beta 1$ i $\beta 3$ i regula les funcions cel·lulars que en depenen (Hannigan et al., 1996). La quinasa GSK3 β era una bona candidata per fosforilar Snail, ja que és inhibida per la ILK de manera que, quan es perden els contactes amb la matriu, la ILK s'inactiva i la GSK3 β recupera la seva activitat. En aquest treball s'ha descrit com, efectivament, la GSK3 β fosforila Snail *in vitro*.

Tal com hem mencionat en l'apartat de resultats, la GSK3 β requereix, en general, una fosforilació prèvia. Aquesta fosforilació permet una millor interacció enzim-substrat que s'ha descrit que *in vivo* pot fer augmentar l'eficiència de 100 a 1000 vegades (Thomas et al., 1999). Per tant, una reacció que *in vivo* només succeiria quan hagués tingut lloc la fosforilació encebadora, podria succeir *in vitro* sense cap més fosforilació.

D'altra banda, en l'assaig de les fosforilacions successives hem constatat com, efectivament, la GSK3 β fosforila millor Snail quan hi ha la fosforilació encebadora de la CK2, de manera que podem pensar que la fosforilació prèvia de la CK2 és un requisit perquè la GSK3 β pugui actuar.

Però en els assajos realitzats *in vitro* hem comprovat com la GSK3 β també pot fosforilar Snail sense cap altre modificació prèvia. Pensem, doncs, que la fosforilació observada en els assajos quinasa *in vitro* amb la GSK3 β sobre SNA-GST és atribuïble a les condicions de treball, on les concentracions de tots els elements que intervenen en la reacció no són les que trobaríem en condicions fisiològiques. En canvi, la fosforilació per la GSK3 β *in vivo* requeriria la de la CK2. En aquest sentit sabem que inicialment es va descriure que la GSK3 β fosforilava la β -Catenina tan *in vivo* com *in vitro*, i en cap cas es va parlar de cap fosforilació encebadora (Yost et al., 1996). Va ser més endavant quan es va descriure que la CK1 realitzava una fosforilació prèvia a la realitzada per la GSK3 β sobre la β -Catenina (Hagen and Vidal-Puig, 2002; Gao et al., 2002).

Tenint en compte la seqüència de fosforilació per GSK3 β descrita per Zhou et al., 2004, era lògic pensar que el residu encebador havia de ser la serina 119. Si s'introdueix la seqüència d'Snail en els predictors de fosforilació disponibles a Internet, com per exemple NetPhos 1.0 (Blom et al., 2004), s'obté una predicció de fosforilació per a Snail on CK2 fosforilaria quatre residus (T89, S90, S92, S119) i la GSK3 β tres (S111, S107, S104), amb "scores" per a totes ells d'entre 0.51 i 0.54, excepte per a la CK2 en la S119 que és de 0.61. Hem constatat com en mutar aquest residu a alanina (no fosforilable), Snail era fosforilat per la CK2 *in vitro* amb molta menys eficiència si la comparem amb l'Snail "wild type". Tot i que caldria veure la funcionalitat de la mutació respecte a la fosforilació *in vivo*, vam concloure que aquesta serina podia jugar un paper important com a encebador de la fosforilació per la GSK3 β . Caldria mencionar, però, que la mutació no aboleix del tot la fosforilació per CK2 i indica que algun altre residu està sent fosforilat, tot i que amb menys eficiència.

Com ja s'ha mencionat anteriorment, s'ha descrit que la fosforilació d'Snail per la GSK3 β afavoreix el seu export. Però, en l'assaig de localització cel·lular amb el mutant Snail-119-SA, la proteïna es localitzava predominantment en el citosol. En substituir una serina per una alanina estem canviant de la cadena lateral de l'aminoàcid un grup alcohol per un hidrogen. Quan realitzem aquesta operació estem impeding la fosforilació, però a l'hora estem eliminant un grup -OH susceptible de formar un enllaç del tipus pont d'hidrògen. Aquesta modificació, en aquest cas, és possible

que afavoreixi el desplegament de la proteïna i en conseqüència el seu export. Aquest tipus de fenomen també s'ha descrit en la β -Catenina, on en mutar la tirosina 142 a alanina s'introdueix tal distorsió que es veu pertorbada la seva capacitat d'interaccionar amb la α -Catenina (Brembeck et al., 2004).

Hem observat com les fosforilacions dutes a terme per la GSK3 β i la CK2, però, són menys eficients en les proteïnes truncades, les meitats aminoterminal i carboxiterminal per separat. Això pot succeir per tres raons: Una primera opció seria que les quinases s'unissin en una regió de la proteïna i en fosforilessin l'altra. Una segona opció fóra que, tot i que la quinasa s'unís i fosforilés en un mateix domini, certs aminoàcids de l'altra meitat de la proteïna fossin requerits per a una major estabilitat en la unió i, per tant, sense aquests aminoàcids l'eficiència de fosforilació fos més baixa. Una tercera opció contemplaria la possibilitat que en dividir la proteïna es perdés l'estructura secundària de les meitats per separat, de manera que la quinasa no pogués reconèixer el lloc de fosforilació. També havíem vist que les bandes de degradació d'Snail eren fosforilades més eficientment. Tot plegat ens fa pensar que l'estructura terciària de la proteïna és molt important per a la fosforilació.

4. Juga algun paper Snail al citosol?

Diverses observacions ens van fer pensar que Snail podria tenir alguna funció al citoplasma. La localització citoplasmàtica d'Snail podia tenir diferents distribucions, difosa, als microtúbuls o en cossos puntiformes, depenent de les cèl·lules. Sovint es podia observar una barreja de tincions dins la mateixa preparació. No es podia descartar, doncs, la possibilitat de l'existència de diferents "pools" d'Snail amb diferents funcions. A més a més, diferents experiments realitzat al laboratori mostraven que Snail podia interaccionar amb la tubulina, de manera que podria estar estabilitzant els microtúbuls. Tot això ens va dur a pensar que Snail podria jugar un paper en el citosol, facilitant alguna de les funcions relacionades amb la TEM que se li associen, com ara la migració.

Es van realitzar clons estables en cèl·lules MDCK per als mutants Snail-SA i Snail-SD per veure si l'Snail citoplasmàtic desenvolupava alguna funció. Els fenotips i l'anàlisi d'expressió de marcadors moleculars

mostraren que no hi havia diferències entre l'Snail i l'Snail-SA. A més a més, tot i haver realitzat una anàlisi preliminar, aquests clons no presentaven diferències aparents en la capacitat motriu. Això ens va fer pensar que l'Snail del citoplasma no era requerit per a les funcions associades a Snail en les cèl·lules MDCK (Migració, EMT).

5. Snail és degradat al nucli pel sistema del proteasoma

Com ja s'ha mencionat anteriorment, en Zhou et al., 2004 es descriu com Snail pot ser degradat en el citoplasma amb una fosforilació prèvia per GSK3 β . En aquesta tesi també s'ha demostrat com Snail pot ser degradat al nucli pel sistema del proteasoma, de forma independent de GSK3 β i de la fosforilació en les serines de la regió compresa entre els aminoàcids 90-120. S'ha constatat com la regió responsable d'aquesta degradació es situa en la meitat aminoterminal de la proteïna. De fet, el mutant més petit de què s'ha disposat sensible a aquesta degradació és l'SNA(108-151), la qual cosa indica que els residus responsables de la degradació es troben en aquest fragment. Tenint en compte que el mutant SNA(82-138) no és degradat per aquest sistema, podem concloure que els aminoàcids importants es troben entre el residu 138 i el 151. El sistema del proteasoma, tot i que amb alguna excepció (Li et al., 2006), reconeix proteïnes poliubiquitinades en residus lisina. Dins el fragment 138-151, més concretament en la posició 146, es troba una lisina, que podria ser l'acceptora de les ubiquitines. Per altra banda, aquesta lisina, situada en la seqüència 145-AKDP-148, ha estat predita com a una bona diana de sumoilització per l'eina "on line" SUMOplot proporcionada per Abgent. Podem pensar, doncs, que aquesta lisina podria ser clau en la regulació de la degradació d'Snail al nucli. Si la proteïna és poliubiquitinada en aquest residu, quedaria marcada per a la seva degradació mentre que, si es troba sumoilitzada en aquest residu, no podrà ser reconeguda ni degradada.

Aquesta treball sobre la degradació nuclear d'Snail es veu recolzat per un article molt recent on principalment es descriu la degradació d'un altre membre de la família d'Snail, Slug. En aquest article es mostra com durant el desenvolupament de la cresta neural en *Xenopus*, Slug és degradat al nucli pel sistema del proteasoma de manera dependent de la proteïna F-box Ppa (Vernon and LaBonne, 2006). Aquesta ubiquitin-ligasa no reconeix

cap seqüència consens concreta sinó que identifica una regió d'Slug rica en aminoàcids hidrofòbics conservats entre els diferents homòlegs.

Finalment, hem comprovat com Akt és capaç de regular aquesta degradació intranuclear. Com es pot veure en la figura 36, al contrari del que s'esperava, la presència de l'Akt promovia tant la degradació d'Snail com la del mutant Snail-SA. Tenint en compte que es tractava del mutant "no fosforilable" localitzat al nucli i que l'efecte de l'Akt sobre aquest era més important que sobre l'Snail-WT, es va concloure que l'Akt estaria realitzant un doble control sobre l'estabilitat d'Snail. L'Akt promouria la degradació nuclear d'Snail, però inhibiria d'una manera indirecta, mitjançant la inhibició de la GSK3 β , la seva degradació citoplasmàtica. D'aquesta manera l'Akt actuaria sobre l'Snail-SA activant-ne la seva degradació, i sobre l'Snail-WT inhibint la seva degradació al citoplasma però activant-la al nucli. En aquest darrer cas, com a resultat, el que es veuria seria un balanç entre totes dues accions que dependria de la relació entre l'Akt citoplasmàtic i l'Akt nuclear. En les cèl·lules RWP1 i en les condicions utilitzades s'observava que el balanç entre l'activació i la inhibició de la degradació de l'Snail-WT es decantava cap a una activació de la degradació, però que no arribava als nivells de l'assolida per l'Snail-SA.

Un model per a la regulació de la degradació

Els resultats presentats en aquesta tesi suggereixen un model que prediu que la funció d'Snail com a factor de transcripció es troba regulat, en últim cas, per les unions a la matriu. En un sistema on les cèl·lules mesenquimals encara es troben adherides a una matriu extracel·lular i, per tant, no poden migrar, aquesta unió a la matriu per part de les integrines manté la ILK activa, de manera que la Akt també està activa i totes dues inhibeixen la GSK3 β . La GSK3 β reprimida no fosforila Snail, i per tant els dos processos dependents d'aquesta modificació, l'export nuclear i la degradació citoplasmàtica, es troben bloquejats. En aquestes circumstàncies Snail es troba al nucli i pot actuar com a factor de transcripció, i ho fa principalment reprimint l'expressió de gens epitelials, com ara l'E-Cadherina, i activant-ne de mesenquimals, com ara Fibronectina. Quan aquestes cèl·lules perden els contactes amb la matriu, les integrines senyalitzen la pèrdua de la unió, de manera que la ILK deixa d'estar activa.

La GSK3 β , aleshores, deixa d'estar reprimida, s'activa i fosforila Snail. Com a conseqüència Snail és exportat al citoplasma on torna a ser fosforilat, reconegut pel sistema del proteasoma i degradat.

Les unions a la matriu també regulen Snail a nivell transcripcional. S'ha descrit que l'activació de la ILK augmenta l'expressió de Snail i la baixada d'E-Cadherina (Tan et al., 2001). A l'hora, la GSK3 β inhibeix la via de NF κ B, activadora transcripcional d'Snail (Bachelder et al., 2005; Barbera et al., 2004).

L'activació d'Snail, tant a nivell transcripcional com a nivell posttranscripcional per les unions a la matriu i l'Akt es veu compensada per l'activació de la degradació nuclear d'Snail. Podem imaginar que en una cèl·lula mesenquimal amb la ILK activa i per tant nivells alts d'Snail pot arribar un moment en que hi hagi una hiperactivitat d'aquesta ruta que calgui tenir controlada. En aquestes circumstàncies, la translocació de l'Akt al nucli i el seu posterior efecte negatiu sobre l'estabilitat d'Snail suposaria un element de control addicional de la ruta. Cal destacar que l'activitat d'Snail està també subjecta a altres bucles de regulació transcripcional ja que Snail és capaç de reprimir la seva pròpia transcripció unint-se al seu propi promotor (Peiro et al., 2006) o al seu activador Egr1 (Grotegut et al., 2006)

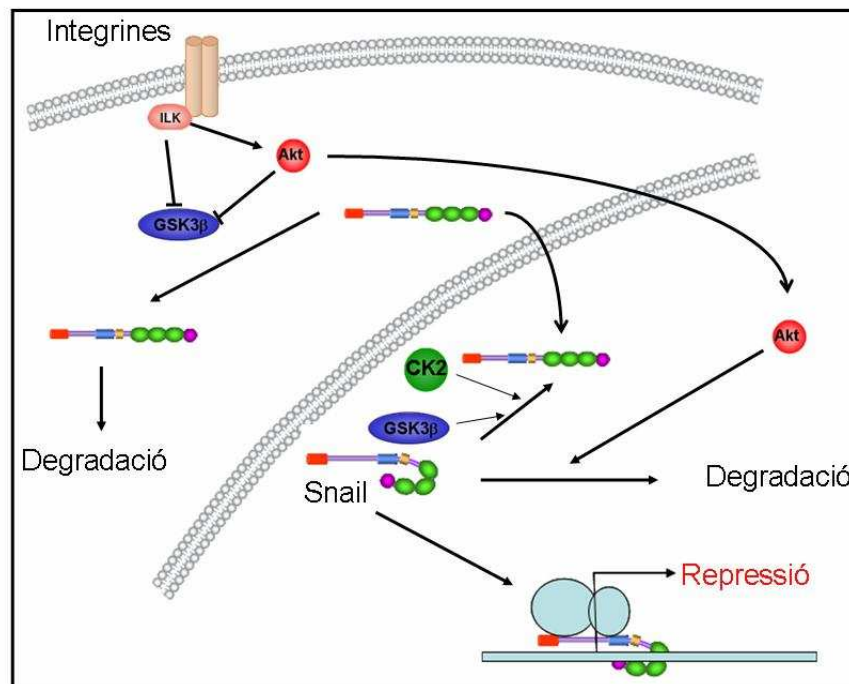


Figura D3. Model funcional per a la degradació d'Snail. Esquema on es mostra com les unions a la matriu regulen la degradació, nuclear i citoplasmàtica d'Snail.

Conclusions

Conclusions.

1. Snail es localitza al nucli i al citoplasma. El seu transport al citoplasma és mediat per una seqüència d'export nuclear (NES), i regulada per la fosforilació d'una seqüència rica en serines adjacent a aquesta NES.

2. La fosforilació d'Snail provoca un canvi conformacional de la proteïna que afavoreix la seva sortida del nucli. L'últim dit de zinc és essencial per al manteniment de la conformació plegada, on les dues meitats de la proteïna interaccionen entre elles. La fosforilació del domini ric en serines causa la pèrdua d'aquesta interacció deixant al descobert la NES, de manera que queda accessible al sistema d'export.

3. La localització cel·lular d'Snail és important per a la seva activitat com a factor de transcripció. Els mutants emprats que es localitzen al citoplasma han perdut la capacitat de reprimir i activar els gens diana d'Snail.

4. Les unions cel·lulars a la matriu extracel·lular regulen l'estat de fosforilació d'Snail i, en conseqüència, la seva localització subcel·lular i la seva activitat transcripcional.

5. La CK2 i la GSK3 β fosforilen Snail *in vitro*, on la fosforilació duta a terme per la CK2 afavoreix la feta per la GSK3 β . Un mutant en la serina 119 es fosforila pitjor que l'Snail-WT.

6. Snail també es degrada al nucli pel sistema del proteasoma, però de manera independent de la GSK3 β i de la fosforilació en el domini ric en serines. La regió 108-151 d'Snail és la responsable d'aquesta degradació.

7. La quinasa Akt afavoreix aquesta degradació nuclear, de manera que exerceix una regulació dual sobre l'estabilitat de la proteïna: inhibeix la degradació citoplasmàtica d'Snail, mediada per la GSK3 β , i activa la degradació nuclear.

Bibliografia

Bibliografia

1. Adams, C.L. and W.J.Nelson. 1998. Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:572-577.
2. Aguilera, A., M.Yanez-Mo, R.Selgas, F.Sanchez-Madrid, and M.Lopez-Cabrera. 2005. Epithelial to mesenchymal transition as a triggering factor of peritoneal membrane fibrosis and angiogenesis in peritoneal dialysis patients. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 6:262-268.
3. Ashraf, S.I. and Y.T.Ip. 2001. The Snail protein family regulates neuroblast expression of *inscuteable* and *string*, genes involved in asymmetry and cell division in *Drosophila*. *Development* 128:4757-4767.
4. Bachelder, R.E., S.O.Yoon, C.Franci, A.Garcia de Herreros, and A.M.Mercurio. 2005. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* 168:29-33.
5. Barbera, M.J., I.Puig, D.Dominguez, S.Julien-Grille, S.Guaita-Esteruelas, S.Peiro, J.Baulida, C.Franci, S.Dedhar, L.Larue, and A.Garcia de Herreros . 2004. Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene* 23:7345-7354.
6. Barrallo-Gimeno, A. and M.A.Nieto. 2005. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132:3151-3161.
7. Batlle, E., E.Sancho, C.Franci, D.Dominguez, M.Monfar, J.Baulida, and A.Garcia de Herreros . 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2:84-89.
8. Behrens, J., B.A.Jerchow, M.Wurtele, J.Grimm, C.Asbrand, R.Wirtz, M.Kuhl, D.Wedlich, and W.Birchmeier. 1998. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 280:596-599.
9. Behrens, J., O.Lowrick, L.Klein-Hitpass, and W.Birchmeier. 1991. The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:11495-11499.

10. Behrens, J., M.M.Mareel, F.M.Van Roy, and W.Birchmeier. 1989. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 108:2435-2447.
11. Blanco, M.J., G.Moreno-Bueno, D.Sarrio, A.Locascio, A.Cano, J.Palacios, and M.A.Nieto. 2002. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 21:3241-3246.
12. Blom, N., T.Sicheritz-Ponten, R.Gupta, S.Gammeltoft, and S.Brunak. 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics.* 4:1633-1649.
13. Brembeck, F.H., T.Schwarz-Romond, J.Bakkers, S.Wilhelm, M.Hammerschmidt, and W.Birchmeier. 2004. Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev.* 18:2225-2230.
14. Briggs, L.J., D.Stein, J.Goltz, V.C.Corrigan, A.Efthymiadis, S.Hubner, and D.A.Jans. 1998. The cAMP-dependent protein kinase site (Ser312) enhances dorsal nuclear import through facilitating nuclear localization sequence/importin interaction. *J. Biol. Chem.* 273:22745-22752.
15. Cano, A., M.A.Perez-Moreno, I.Rodrigo, A.Locascio, M.J.Blanco, M.G.Del Barrio, F.Portillo, and M.A.Nieto. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2:76-83.
16. Carver, E.A., R.Jiang, Y.Lan, K.F.Oram, and T.Gridley. 2001. The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol. Cell Biol.* 21:8184-8188.
17. Cheng, C.W., P.E.Wu, J.C.Yu, C.S.Huang, C.T.Yue, C.W.Wu, and C.Y.Shen. 2001. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene* 20:3814-3823.
18. Ciruna, B. and J.Rossant. 2001. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev. Cell* 1:37-49.

19. Comijn, J., G.Berx, P.Vermassen, K.Verschueren, L.van Grunsvan, E.Bruyneel, M.Mareel, D.Huylebroeck, and F.van Roy. 2001. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell* 7:1267-1278.
20. Crabtree, G.R. and E.N.Olson. 2002. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl:S67-S79.
21. Craig, E., Z.K.Zhang, K.P.Davies, and G.V.Kalpana. 2002. A masked NES in INI1/hSNF5 mediates hCRM1-dependent nuclear export: implications for tumorigenesis. *EMBO J.* 21:31-42.
22. De Craene, B., B.Gilbert, C.Stove, E.Bruyneel, F.van Roy, and G.Berx. 2005a. The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res.* 65:6237-6244.
23. De Craene, B., F.van Roy, and G.Berx. 2005b. Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal.* 17:535-547.
24. de Iongh, R.U., E.Wederell, F.J.Lovicu, and J.W.McAvoy. 2005. Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation. *Cells Tissues. Organs* 179:43-55.
25. Dedhar, S. 2000. Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:250-256.
26. Del Barrio, M.G. and M.A.Nieto. 2002. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development* 129:1583-1593.
27. Drees, F., S.Pokutta, S.Yamada, W.J.Nelson, and W.I.Weis. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123:903-915.
28. Elloul, S., M.B.Elstrand, J.M.Nesland, C.G.Trope, G.Kvalheim, I.Goldberg, R.Reich, and B.Davidson. 2005. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 103:1631-1643.
29. Espineda, C.E., J.H.Chang, J.Twiss, S.A.Rajasekaran, and A.K.Rajasekaran. 2004. Repression of Na,K-ATPase beta1-subunit by

- the transcription factor snail in carcinoma. *Mol. Biol. Cell* 15:1364-1373.
30. Fiol, C.J., A.M.Mahrenholz, Y.Wang, R.W.Roeske, and P.J.Roach. 1987. Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J. Biol. Chem.* 262:14042-14048.
 31. Flanders, K.C. 2004. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int. J. Exp. Pathol.* 85:47-64.
 32. Fornerod, M., M.Ohno, M.Yoshida, and I.W.Mattaj. 1997. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90:1051-1060.
 33. Franci, C., M.Takkunen, N.Dave, F.Alameda, S.Gomez, R.Rodriguez, M.Escriva, B.Montserrat-Sentis, T.Baro, M.Garrido, F.Bonilla, I.Virtanen, and A.Garcia de Herreros . 2006. Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene* 25:5134-5144.
 34. Friedl, P. 2004. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:14-23.
 35. Fujita, N., D.L.Jaye, M.Kajita, C.Geigerman, C.S.Moreno, and P.A.Wade. 2003. MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell* 113:207-219.
 36. Fukuda, M., S.Asano, T.Nakamura, M.Adachi, M.Yoshida, M.Yanagida, and E.Nishida. 1997. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390:308-311.
 37. Fuse, N., S.Hirose, and S.Hayashi. 1994. Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by escargot. *Genes Dev.* 8:2270-2281.
 38. Gama-Carvalho, M., R.D.Krauss, L.Chiang, J.Valcarcel, M.R.Green, and M.Carmo-Fonseca. 1997. Targeting of U2AF65 to sites of active splicing in the nucleus. *J. Cell Biol.* 137:975-987.
 39. Gao, Z.H., J.M.Seeling, V.Hill, A.Yochum, and D.M.Virshup. 2002. Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:1182-1187.

40. Garrod, D., M.Chidgey, and A.North. 1996. Desmosomes: differentiation, development, dynamics and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:670-678.
41. Goldstein, B., M.W.Leviten, and D.A.Weisblat. 2001. Dorsal and snail homologs in leech development. *Dev. Genes Evol.* 211:329-337.
42. Grego-Bessa, J., J.Diez, L.Timmerman, and J.L.de la Pompa. 2004. Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw. *Cell Cycle* 3:718-721.
43. Grimes, H.L., T.O.Chan, P.A.Zweidler-McKay, B.Tong, and P.N.Tsichlis. 1996. The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol. Cell Biol.* 16:6263-6272.
44. Grotegut, S., D.von Schweinitz, G.Christofori, and F.Lehembre. 2006. Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *EMBO J.*
45. Grunert, S., M.Jechlinger, and H.Beug. 2003. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:657-665.
46. Guaita, S., I.Puig, C.Franci, M.Garrido, D.Dominguez, E.Batlle, E.Sancho, S.Dedhar, A.Garcia de Herreros, and J.Baulida. 2002. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J. Biol. Chem.* 277:39209-39216.
47. Hagen, T. and A.Vidal-Puig. 2002. Characterisation of the phosphorylation of beta-catenin at the GSK-3 priming site Ser45. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294:324-328.
48. Hajra, K.M., D.Y.Chen, and E.R.Fearon. 2002. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res.* 62:1613-1618.
49. Hannigan, G.E., C.Leung-Hagesteijn, L.Fitz-Gibbon, M.G.Coppolino, G.Radeva, J.Filmus, J.C.Bell, and S.Dedhar. 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379:91-96.

50. Hay, E.D. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)* 154:8-20.
51. Hay, E.D. 2005. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev. Dyn.* 233:706-720.
52. Hay, E.D. and A.Zuk. 1995. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am. J. Kidney Dis.* 26:678-690.
53. Hemavathy, K., S.I.Ashraf, and Y.T.Ip. 2000. Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* 257:1-12.
54. Huber, M.A., N.Kraut, and H.Beug. 2005. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:548-558.
55. Ikenouchi, J., M.Matsuda, M.Furuse, and S.Tsukita. 2003. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J. Cell Sci.* 116:1959-1967.
56. Imai, T., A.Horiuchi, C.Wang, K.Oka, S.Ohira, T.Nikaido, and I.Konishi. 2003. Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am. J. Pathol.* 163:1437-1447.
57. Imhof, B.A., H.P.Vollmers, S.L.Goodman, and W.Birchmeier. 1983. Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell* 35:667-675.
58. Isaac, A., M.G.Sargent, and J.Cooke. 1997. Control of vertebrate left-right asymmetry by a snail-related zinc finger gene. *Science* 275:1301-1304.
59. Ishida, N., T.Hara, T.Kamura, M.Yoshida, K.Nakayama, and K.I.Nakayama. 2002. Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J. Biol. Chem.* 277:14355-14358.

60. Iwano, M., D.Plieth, T.M.Danoff, C.Xue, H.Okada, and E.G.Neilson. 2002. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest* 110:341-350.
61. Jamora, C., P.Lee, P.Kocieniewski, M.Azhar, R.Hosokawa, Y.Chai, and E.Fuchs. 2005. A signaling pathway involving TGF-beta2 and snail in hair follicle morphogenesis. *PLoS. Biol.* 3:e11.
62. Janda, E., K.Lehmann, I.Killisch, M.Jechlinger, M.Herzig, J.Downward, H.Beug, and S.Grunert. 2002. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J. Cell Biol.* 156:299-313.
63. Janda, E., M.Nevolo, K.Lehmann, J.Downward, H.Beug, and M.Grieco. 2006. Raf plus TGFbeta-dependent EMT is initiated by endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin. *Oncogene*.
64. Jans, D.A., C.Y.Xiao, and M.H.Lam. 2000. Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* 22:532-544.
65. Jiao, W., K.Miyazaki, and Y.Kitajima. 2002. Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer* 86:98-101.
66. Kajita, M., K.N.McClinic, and P.A.Wade. 2004. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol. Cell Biol.* 24:7559-7566.
67. Kalluri, R. and E.G.Neilson. 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest* 112:1776-1784.
68. Kataoka, H., T.Murayama, M.Yokode, S.Mori, H.Sano, H.Ozaki, Y.Yokota, S.Nishikawa, and T.Kita. 2000. A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Res.* 28:626-633.
69. Kemler, R. 1993. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 9:317-321.

70. Klein, P.S. and D.A.Melton. 1996. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:8455-8459.
71. Kudo, N., N.Matsumori, H.Taoka, D.Fujiwara, E.P.Schreiner, B.Wolff, M.Yoshida, and S.Horinouchi. 1999. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:9112-9117.
72. Lee, D.H. and A.L.Goldberg. 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8:397-403.
73. Lee, J.M., S.Dedhar, R.Kalluri, and E.W.Thompson. 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* 172:973-981.
74. Lespinet, O., A.J.Nederbragt, M.Cassan, W.J.Dictus, A.E.van Loon, and A.Adoutte. 2002. Characterisation of two snail genes in the gastropod mollusc *Patella vulgata*. Implications for understanding the ancestral function of the snail-related genes in Bilateria. *Dev. Genes Evol.* 212:186-195.
75. Li, T., C.Hawkes, H.Y.Qureshi, S.Kar, and H.K.Paudel. 2006a. Cyclin-dependent protein kinase 5 primes microtubule-associated protein tau site-specifically for glycogen synthase kinase 3beta. *Biochemistry* 45:3134-3145.
76. Li, X., W.Deng, C.D.Nail, S.K.Bailey, M.H.Kraus, J.M.Ruppert, and S.M.Lobo-Ruppert. 2006b. Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene* 25:609-621.
77. Li, X., D.M.Lonard, S.Y.Jung, A.Malovannaya, Q.Feng, J.Qin, S.Y.Tsai, M.J.Tsai, and B.W.O'Malley. 2006c. The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGgamma proteasome. *Cell* 124:381-392.
78. Lischka, P., O.Rosorius, E.Trommer, and T.Stamminger. 2001. A novel transferable nuclear export signal mediates CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling of the human cytomegalovirus transactivator protein pUL69. *EMBO J.* 20:7271-7283.

79. Locascio, A., S.Vega, C.A.de Frutos, M.Manzanares, and M.A.Nieto. 2002. Biological potential of a functional human SNAIL retrogene. *J. Biol. Chem.* 277:38803-38809.
80. Lu, Z., S.Ghosh, Z.Wang, and T.Hunter. 2003. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 4:499-515.
81. Manzanares, M., A.Locascio, and M.A.Nieto. 2001. The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends Genet.* 17:178-181.
82. Margetts, P.J., P.Bonnaud, L.Liu, C.M.Hoff, C.J.Holmes, J.A.West-Mays, and M.M.Kelly. 2005. Transient overexpression of TGF- β 1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:425-436.
83. Martinez-Alvarez, C., M.J.Blanco, R.Perez, M.A.Rabadan, M.Aparicio, E.Resel, T.Martinez, and M.A.Nieto. 2004. Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates. *Dev. Biol.* 265:207-218.
84. Mauhin, V., Y.Lutz, C.Dennefeld, and A.Alberga. 1993. Definition of the DNA-binding site repertoire for the Drosophila transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res.* 21:3951-3957.
85. Moody, S.E., D.Perez, T.C.Pan, C.J.Sarkisian, C.P.Portocarrero, C.J.Sterner, K.L.Notorfrancesco, R.D.Cardiff, and L.A.Chodosh. 2005. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell* 8:197-209.
86. Moreno-Bueno, G., E.Cubillo, D.Sarrio, H.Peinado, S.M.Rodriguez-Pinilla, S.Villa, V.Bolos, M.Jorda, A.Fabra, F.Portillo, J.Palacios, and A.Cano. 2006. Genetic profiling of epithelial cells expressing e-cadherin repressors reveals a distinct role for snail, slug, and e47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 66:9543-9556.
87. Murray, S.A. and T.Gridley. 2006. Snail family genes are required for left-right asymmetry determination, but not neural crest formation, in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:10300-10304.

88. Nakamura, T., T.Nishizawa, M.Hagiya, T.Seki, M.Shimonishi, A.Sugimura, K.Tashiro, and S.Shimizu. 1989. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342:440-443.
89. Nakayama, H., I.C.Scott, and J.C.Cross. 1998. The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev. Biol.* 199:150-163.
90. Navarro, P., M.Gomez, A.Pizarro, C.Gamallo, M.Quintanilla, and A.Cano. 1991. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell Biol.* 115:517-533.
91. Nibu, Y., H.Zhang, E.Bajor, S.Barolo, S.Small, and M.Levine. 1998. dCtBP mediates transcriptional repression by Knirps, Kruppel and Snail in the Drosophila embryo. *EMBO J.* 17:7009-7020.
92. Nieto, M.A. 2002. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:155-166.
93. Ohkubo, T. and M.Ozawa. 2004. The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J. Cell Sci.* 117:1675-1685.
94. Okamura, H., J.Aramburu, C.Garcia-Rodriguez, J.P.Viola, A.Raghavan, M.Tahiliani, X.Zhang, J.Qin, P.G.Hogan, and A.Rao. 2000. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol. Cell* 6:539-550.
95. Palmer, H.G., M.J.Larriba, J.M.Garcia, P.Ordonez-Moran, C.Pena, S.Peiro, I.Puig, R.Rodriguez, F.R.de la, A.Bernad, M.Pollan, F.Bonilla, C.Gamallo, A.Garcia de Herreros, and A.Munoz. 2004. The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nat. Med.* 10:917-919.
96. Park, J.H., I.J.Sung, S.W.Lee, K.W.Kim, Y.S.Kim, and M.A.Yoo. 2005. The zinc-finger transcription factor Snail downregulates proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 26:1541-1547.
97. Patel, K., A.Isaac, and J.Cooke. 1999. Nodal signalling and the roles of the transcription factors SnR and Pitx2 in vertebrate left-right asymmetry. *Curr. Biol.* 9:609-612.

98. Paznekas, W.A., K.Okajima, M.Schertzer, S.Wood, and E.W.Jabs. 1999. Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAI1) and a related processed pseudogene (SNAI1P). *Genomics* 62:42-49.
99. Peinado, H., E.Ballestar, M.Esteller, and A.Cano. 2004a. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol. Cell Biol.* 24:306-319.
100. Peinado, H., Del Carmen Iglesias-de la Cruz, D.Olmeda, K.Csiszar, K.S.Fong, S.Vega, M.A.Nieto, A.Cano, and F.Portillo. 2005a. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* 24:3446-3458.
101. Peinado, H., F.Portillo, and A.Cano. 2004b. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 48:365-375.
102. Peinado, H., F.Portillo, and A.Cano. 2005b. Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta. *Cell Cycle* 4:1749-1752.
103. Peinado, H., M.Quintanilla, and A.Cano. 2003. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* 278:21113-21123.
104. Peiro, S., M.Escriva, I.Puig, M.J.Barbera, N.Dave, N.Herranz, M.J.Larriba, M.Takkunen, C.Franci, A.Munoz, I.Virtanen, J.Baulida, and A.Garcia de Herreros . 2006. Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression. *Nucleic Acids Res.* 34:2077-2084.
105. Pena, C., J.M.Garcia, V.Garcia, J.Silva, G.Dominguez, R.Rodriguez, C.Maximiano, A.Garcia de Herreros , A.Munoz, and F.Bonilla. 2006. The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas. *Int. J. Cancer* 119:2098-2104.
106. Pena, C., J.M.Garcia, J.Silva, V.Garcia, R.Rodriguez, I.Alonso, I.Millan, C.Salas, A.Garcia de Herreros, A.Munoz, and F.Bonilla. 2005. E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations. *Hum. Mol. Genet.* 14:3361-3370.

107. Perez-Moreno, M.A., A.Locascio, I.Rodrigo, G.Dhondt, F.Portillo, M.A.Nieto, and A.Cano. 2001. A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* 276:27424-27431.
108. Poon, I.K. and D.A.Jans. 2005. Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic.* 6:173-186.
109. Poser, I., D.Dominguez, A.Garcia de Herreros, A.Varnai, R.Buettner, and A.K.Bosserhoff. 2001. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J. Biol. Chem.* 276:24661-24666.
110. Radisky, D.C., D.D.Levy, L.E.Littlepage, H.Liu, C.M.Nelson, J.E.Fata, D.Leake, E.L.Godden, D.G.Albertson, M.A.Nieto, Z.Werb, and M.J.Bissell. 2005. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436:123-127.
111. Rastaldi, M.P., F.Ferrario, L.Giardino, G.Dell'Antonio, C.Grillo, P.Grillo, F.Strutz, G.A.Muller, G.Colasanti, and G.D'Amico. 2002. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int.* 62:137-146.
112. Riviere, Y., V.Blank, P.Kourilsky, and A.Israel. 1991. Processing of the precursor of NF-kappa B by the HIV-1 protease during acute infection. *Nature* 350:625-626.
113. Rosivatz, E., I.Becker, K.Specht, E.Fricke, B.Luber, R.Busch, H.Hofler, and K.F.Becker. 2002. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am. J. Pathol.* 161:1881-1891.
114. Ryan, K.M., A.C.Phillips, and K.H.Vousden. 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:332-337.
115. Saika, S., S.Kono-Saika, Y.Ohnishi, M.Sato, Y.Muragaki, A.Ooshima, K.C.Flanders, J.Yoo, M.Anzano, C.Y.Liu, W.W.Kao, and A.B.Roberts. 2004. Smad3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury. *Am. J. Pathol.* 164:651-663.
116. Sato, M., Y.Muragaki, S.Saika, A.B.Roberts, and A.Ooshima. 2003. Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J. Clin. Invest* 112:1486-1494.

117. Savagner, P. 2001. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 23:912-923.
118. Savagner, P., K.M.Yamada, and J.P.Thiery. 1997. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* 137:1403-1419.
119. Seki, K., T.Fujimori, P.Savagner, A.Hata, T.Aikawa, N.Ogata, Y.Nabeshima, and L.Kaechoong. 2003. Mouse Snail family transcription repressors regulate chondrocyte, extracellular matrix, type II collagen, and aggrecan. *J. Biol. Chem.* 278:41862-41870.
120. Somasiri, A., A.Howarth, D.Goswami, S.Dedhar, and C.D.Roskelley. 2001. Overexpression of the integrin-linked kinase mesenchymally transforms mammary epithelial cells. *J. Cell Sci.* 114:1125-1136.
121. Spagnoli, F.M., C.Cicchini, M.Tripodi, and M.C.Weiss. 2000. Inhibition of MMH (Met murine hepatocyte) cell differentiation by TGF(beta) is abrogated by pre-treatment with the heritable differentiation effector FGF1. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 20):3639-3647.
122. Stambolic, V., L.Ruel, and J.R.Woodgett. 1996. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr. Biol.* 6:1664-1668.
123. Stoker, M. and M.Perryman. 1985. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J. Cell Sci.* 77:209-223.
124. Strizzi, L., C.Bianco, N.Normanno, M.Seno, C.Wechselberger, B.Wallace-Jones, N.I.Khan, M.Hirota, Y.Sun, M.Sanicola, and D.S.Salomon. 2004. Epithelial mesenchymal transition is a characteristic of hyperplasias and tumors in mammary gland from MMTV-Cripto-1 transgenic mice. *J. Cell Physiol* 201:266-276.
125. Sugimachi, K., S.Tanaka, T.Kameyama, K.Taguchi, S.Aishima, M.Shimada, K.Sugimachi, and M.Tsuneyoshi. 2003. Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 9:2657-2664.
126. Takeichi, M. 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:619-627.

127. Tan, C., P.Costello, J.Sanghera, D.Dominguez, J.Baulida, A.Garcia de Herreros, and S.Dedhar. 2001. Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC^{-/-} human colon carcinoma cells. *Oncogene* 20:133-140.
128. Tarin, D., E.W.Thompson, and D.F.Newgreen. 2005. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res.* 65:5996-6000.
129. Thiery, J.P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2:442-454.
130. Thiery, J.P. and J.P.Sleeman. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:131-142.
131. Thomas, G.M., S.Frame, M.Goedert, I.Nathke, P.Polakakis, and P.Cohen. 1999. A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin. *FEBS Lett.* 458:247-251.
132. Timmerman, L.A., J.Grego-Bessa, A.Raya, E.Bertran, J.M.Perez-Pomares, J.Diez, S.Aranda, S.Palomo, F.McCormick, J.C.Izpisua-Belmonte, and J.L.de la Pompa. 2004. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* 18:99-115.
133. Tsutsumi, S., T.Yanagawa, T.Shimura, H.Kuwano, and A.Raz. 2004. Autocrine motility factor signaling enhances pancreatic cancer metastasis. *Clin. Cancer Res.* 10:7775-7784.
134. Ullman, K.S., M.A.Powers, and D.J.Forbes. 1997. Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell* 90:967-970.
135. Valdes, F., A.M.Alvarez, A.Locascio, S.Vega, B.Herrera, M.Fernandez, M.Benito, M.A.Nieto, and I.Fabregat. 2002. The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes. *Mol. Cancer Res.* 1:68-78.
136. Vega, S., A.V.Morales, O.H.Ocana, F.Valdes, I.Fabregat, and M.A.Nieto. 2004. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 18:1131-1143.

137. Veltmaat, J.M., C.C.Orelia, D.Ward-Van Oostwaard, M.A.Van Rooijen, C.L.Mummery, and L.H.Defize. 2000. Snail is an immediate early target gene of parathyroid hormone related peptide signaling in parietal endoderm formation. *Int. J. Dev. Biol.* 44:297-307.
138. Vernon, A.E. and C.LaBonne. 2006. Slug stability is dynamically regulated during neural crest development by the F-box protein Ppa. *Development* 133:3359-3370.
139. Vleminckx, K., L.Vakaet, Jr., M.Mareel, W.Fiers, and F.van Roy. 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66:107-119.
140. Willis, B.C., J.M.Liebler, K.Luby-Phelps, A.G.Nicholson, E.D.Crandall, R.M.du Bois, and Z.Borok. 2005. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 166:1321-1332.
141. Yamada, S., S.Pokutta, F.Drees, W.I.Weis, and W.J.Nelson. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 123:889-901.
142. Yamasaki, H., T.Sekimoto, T.Ohkubo, T.Douchi, Y.Nagata, M.Ozawa, and Y.Yoneda. 2005. Zinc finger domain of Snail functions as a nuclear localization signal for importin beta-mediated nuclear import pathway. *Genes Cells* 10:455-464.
143. Yamashita, S., C.Miyagi, T.Fukada, N.Kagara, Y.S.Che, and T.Hirano. 2004. Zinc transporter LIVI controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature* 429:298-302.
144. Yamazaki, K., Y.Akiyama-Oda, and H.Oda. 2005. Expression patterns of a twist-related gene in embryos of the spider *Achaearanea tepidariorum* reveal divergent aspects of mesoderm development in the fly and spider. *Zoolog. Sci.* 22:177-185.
145. Yanez-Mo, M., E.Lara-Pezzi, R.Selgas, M.Ramirez-Huesca, C.Dominguez-Jimenez, J.A.Jimenez-Heffernan, A.Aguilera, J.A.Sanchez-Tomero, M.A.Bajo, V.Alvarez, M.A.Castro, G.del Peso, A.Cirujeda, C.Gamallo, F.Sanchez-Madrid, and M.Lopez-Cabrera. 2003. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N. Engl. J. Med.* 348:403-413.

146. Yang, A.D., E.R.Camp, F.Fan, L.Shen, M.J.Gray, W.Liu, R.Somcio, T.W.Bauer, Y.Wu, D.J.Hicklin, and L.M.Ellis. 2006. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 66:46-51.
147. Yang, J., S.A.Mani, J.L.Donaher, S.Ramaswamy, R.A.Itzykson, C.Come, P.Savagner, I.Gitelman, A.Richardson, and R.A.Weinberg. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117:927-939.
148. Yang, Z., S.Rayala, D.Nguyen, R.K.Vadlamudi, S.Chen, and R.Kumar. 2005. Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. *Cancer Res.* 65:3179-3184.
149. Yao, H.W., Q.M.Xie, J.Q.Chen, Y.M.Deng, and H.F.Tang. 2004. TGF-beta1 induces alveolar epithelial to mesenchymal transition in vitro. *Life Sci.* 76:29-37.
150. Yokoyama, K., N.Kamata, E.Hayashi, T.Hoteiya, N.Ueda, R.Fujimoto, and M.Nagayama. 2001. Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol.* 37:65-71.
151. Yook, J.I., X.Y.Li, I.Ota, E.R.Fearon, and S.J.Weiss. 2005. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J. Biol. Chem.* 280:11740-11748.
152. Yook, J.I., X.Y.Li, I.Ota, C.Hu, H.S.Kim, N.H.Kim, S.Y.Cha, J.K.Ryu, Y.J. Choi, J.Kim, E.R.Fearon, S.J.Weiss. 2006. A Wnt-Axin2-GSK3 β cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat. Cell Biol.*
153. Yost, C., M.Torres, J.R.Miller, E.Huang, D.Kimelman, and R.T.Moon. 1996. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* 10:1443-1454.
154. Zavadil, J. and E.P.Bottinger. 2005. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24:5764-5774.
155. Zavadil, J., L.Cermak, N.Soto-Nieves, and E.P.Bottinger. 2004. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J.* 23:1155-1165.

-
156. Zhang, Y. and Y.Xiong. 2001. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 292:1910-1915.
 157. Zhao, X., L.Gan, H.Pan, D.Kan, M.Majeski, S.A.Adam, and T.G.Unterman. 2004. Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *Biochem. J.* 378:839-849.
 158. Zhou, B.P., J.Deng, W.Xia, J.Xu, Y.M.Li, M.Gunduz, and M.C.Hung. 2004. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* 6:931-940.
 159. Zoltan-Jones, A., L.Huang, S.Ghatak, and B.P.Toole. 2003. Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278:45801-45810.