

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut
Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida
Universitat Pompeu Fabra

CONTROL DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR *IN VITRO* EN CÉLULAS HT-29 M6 DE CANCER COLORRECTAL.

Memoria presentada por:

Clara de la Caridad Mayo de las Casas

para optar al grado de Doctor por el
Departament de Ciències Experimentals i de la Salut,
Universitat Pompeu fabra

Director: *Xavier Mayol Girbau*

Tutor: *Francisco X. Real*

Tesis doctoral realizada en la Unidad de biología Celular y Molecular
Institut Municipal d'Investigació Mèdica

Barcelona, diciembre de 2004

Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano.

Isaac Newton

A Sergi,

A Ariadna,

A toda mi familia cubana y catalana

Dipòsit legal: B.19841-2005

ISBN: 84-689-1854-7

AGRADECIMIENTOS

Nunca pensé que esta parte de la tesis fuese una de las más difíciles de escribir...

En primer lugar, tengo que agradecerle de forma especial a Paco el brindarme la posibilidad de poder trabajar en el laboratorio, por ayudarme tanto personal como profesionalmente cuando lo he necesitado, y por confiar en mí.

Gracias también a ti, Xavi, por enseñarme tanto en todos estos años, por transmitirme la ilusión y las ganas de investigar, por confiar en mí y no perder la paciencia (mira que es difícil a veces...) y por tratarme no solo como jefe sino también como un amigo.

Tengo que agradecerle infinitamente también a todas las personas del IMIM y de la Pompeu que, sin saberlo, han hecho que estos 6 años en la casa fuesen para mí una experiencia inolvidable:

A Merche y Yolanda, por ser dos personas encantadoras, siempre dispuestas a ayudar a todo el mundo.

A Montse Torá, por todo lo que me enseñó cuando estaba trabajando en el estudio de *"bufeta"*, a Balbina, por su preocupación y por su ayuda solidaria para con mi gente, a Nuria Malalts, por su apoyo y preocupación, a la Montse Nacher por sus consejos.

A Yolanda Tor, a mi Ali, al Fran y Dani, a Paco Fernandez, por todos los buenos momentos que pasamos juntos en el estudio de *"bufeta"* (*¡qué tiempos aquellos!*).

A la Carme Torns, por ser tan auténtica, y deleitarnos con sus historias, con sus tertulias, por enseñarme tanto de cultivo. A la Carme de Bolós, Clara Francí, Marta Garrido y Antonio, por sus consejos y por la ayuda brindada en la realización del trabajo experimental.

A la Arrate por toda las horas que pasamos en el confocal, al Oscar por su ayuda con el citómetro de flujo, a la Ana Perez del servicio de secuenciación, a la Marta Garrido y al Pep Lloreta por la ayuda con la microscopía electrónica, tanto en la preparación de las muestras como en la observación al microscopio y la interpretación de imágenes. A la Assumpta por perder horas de trabajo para explicarme la complejidad del cáncer.

A mis compañeros de grupo Josep María y Coral, por todos estos años que hemos estado juntos y por toda la inmensa ayuda que me han dado, especialmente Coral en la parte experimental. A Sara y Estela, por lo bien que conectamos, por esos pocos pero fructíferos meses en el laboratorio. A Edurne, por ayudarme en la última etapa de la tesis.

A la Anna Lopez, porque nos llevábamos muy bien, y por todos los ratos de charla que tuvimos. A Fausto, por su genialidad, por su acento tan familiar y por ayudarme con los northernns cuando no me salían. A la Mercé Marfín, a María del Mont, a Santi, a Silvia, a Edu y Elena. Al Jepy por ayudarme con la tesis y por ser tan buena gente. Al David, por tener siempre un hueco para ayudar a los demás, por todas las horas que pasamos en cultivos y por ser un tío que vale mucho.

No puedo dejar de mencionar a "les nenes"..., como dijo Susana, ese clan que formamos sin darnos cuenta y que ha dado sus frutos en una buena amistad: a Isa, Cristina, Montse, María, Bárbara por ser encantadoras, por saber que podía (y puedo) contar con ellas para lo que sea, por aguantarme

también en toda la etapa pre y post-parto, por las comidas juntas y porque cada una, aunque diferente, aportábamos un toque especial al grupo; a Sandra, Susana y Miki, además, por soportarme todos estos años de compañera de doctorado, por ser buenos amigos y compañeros de alegrías y desesperaciones, y por todo lo que hemos vivido juntos;... Al Jose y la Susana por ser muy buena gente, y porque guardo muy buen recuerdo de ellos aunque compartimos poco tiempo juntos.

A la Maria José, por ser mi compañera de embarazo, por esos nueve meses en los que compartimos miedos, alegrías, pataditas, y en los que hicimos una buena amistad. A la Ariadna, por enseñarme otra forma de vida, por todas las tardes en cultivo, y por esas entradas de Silvio...

A la Mercé Monfar, compañera de "poyata" una temporada, ejemplo de seriedad y responsabilidad.

A Leo y Alfonso, por el buen recuerdo que guardo de cuando estaban en el laboratorio. A la Montse, por ser una secretaria muy eficiente, por ayudarme muchísimo en todo, y por su disponibilidad.

A la Pilar Navarro y Sandra Peiró por sus consejos y ayuda desinteresada tanto en el ámbito profesional como personal.

A Gabriel, por sus sugerencias cuando habian experimentos que no salían. A Maurici, Laia, Andrea, Ramón, Francesc, Ester, Ibane, Elena, Mónica, Sandra, Tania, Yudit Pujal, Raquel, por todo lo que compartimos (además de pipetas y tampones) durante estos años de "poyata" en el laboratorio. Al Oriol, Manel, Yudit Grueso, a la Ana Merlos, Dani, Lidia, Jessica, por todos esos buenos momentos.

A la otra parte del "*páncreas team*": Anouska, Meritxell, Annie, Luisa, Elisabeth, Piedad, y el resto de las chicas, por compartir algo más que incubadores y campanas...

A mis nuevos compañeros de laboratorio, en Can Ruti, que han hecho posible que esta recta final fuese más facil para mí: el doctor Rosell, Miquel, Pepe, Cristina, Mónica, María, Pedro, Marta, Carmen, Mauricio, Eva, Ana, Maite y el resto del departamento.

A la Eva y al Edu, a Marc y Gretel, al Jordi y la Diana, a Gemma y Oriol, al Mateu, la Elena, Alicia y Noel, por ser como sois, y por brindarme vuestra amistad sincera.

Por último, quiero darle las gracias a toda mi familia, gran parte de este trabajo se lo debo a ella. A Sergi por estar a mi lado todos estos años, por ser tan paciente y por ayudarme a conseguir esta meta. A la Ariadna, por darle un nuevo sentido a mi vida. A mis padres y hermanos, a mis sobrinos, mis cuñados, mis abuelitos porque estando tan lejos están tan cerca...; a Pilar, Josep, Jordi, Gloria, Xavi, Mónica y la iaia, por abrirme vuestros corazones y estar siempre dispuestos a ayudarme en todo.

A todos, muchas gracias.

ABREVIATURAS

Abreviaturas más utilizadas

SI	Sucrasa-isomaltasa
APN	Aminopectidasa N
DPPIV	Dipeptidilpeptidasa IV
AP	Fosfatasa alcalina
CEA	Antígeno carcinoembrionario
MTX	Metotrexato
5-FU	5-fluorouracilo
BBAE	Enzimas asociadas al borde en cepillo
FAP	Poliposis Adenomatosa Familiar
HNPCC	Cáncer colorrectal hereditario no polipoideo
CCR	Cáncer colorrectal
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CKI	Inhibidor de CDK
CAK	Quinasa activadora de CDK
HDAC	Histonas deacetilasas
pRb	Proteína del retinoblastoma
DHFR	Dihidrofolato reductasa
TK	Timidina quinasa
TJ	Uniones estrechas
CEN	calcio extracelular normal
CEB	calcio extracelular bajo
FBS	Suero fetal bovino
CHX	Cicloheximida
ActD	Actinomicina D
TSA	Tricostatina A
LUC	Luciferasa
PMA	Forbol 12-miristato 13 acetato
BrdU	Bromo desoxiuridina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
PFA	Paraformaldehido

INDICE

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

1.- Diferenciación colónica y carcinogénesis	1
1.1- El epitelio colónico	1
1.2- Diferenciación terminal: un complejo camino hacia la muerte celular	3
1.3- Wnt: reguladores de la homeostasis del colon, que controlan la transición de proliferación a diferenciación en la cripta	4
1.4- Especificidad de linaje celular y diferenciación en las criptas colónicas. Implicación de la vía de Delta/Notch en su regulación	8
1.4.1- Otros factores de transcripción	10
1.5- El cáncer colorrectal	12
2.- Líneas derivadas de cáncer colorrectal como modelos de diferenciación in vitro	18
2.1- La línea celular HT-29	18
2.2- otros modelos celulares: Caco-2	20
2.3- Expresión de marcadores de diferenciación en colon normal y tumoral. Correlación con las líneas derivadas de CCR	21
2.4- Expresión de marcadores durante el desarrollo fetal	23
3.- Un breve recorrido a través del ciclo celular	27
3.1- Los grandes protagonistas de la regulación del ciclo celular	30
3.2- Una visión molecular del ciclo paso a paso	38
4.- Adhesión celular	40
4.1- Tipos de uniones célula-célula	40
4.2- E-cadherina: más allá de las uniones adherentes	45

Capítulo 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Antecedentes	47
Hipótesis de trabajo	48
Objetivos	48

Capítulo 3. RESULTADOS (estructurados por objetivos)

1.- Consecuencias de deplecionar parcialmente el calcio extracelular sobre el proceso de diferenciación in vitro de células HT-29 M6	50
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

1.1-En la epitelialización (formación del fenotipo epitelial polarizado)	50
1.2- En la inhibición por contacto	58
1.3- En la regulación de la expresión génica de marcadores de diferenciación	66
1.3.1- Una parte del proceso de diferenciación no se encuentra afectada por la depleción de calcio extracelular	72
1.4- En la capacidad de migración celular como parámetro de desdiferenciación hacia un fenotipo más invasivo	79
2.- Estudiar si el proceso de diferenciación in vitro es reversible y su relación con el estado de diferenciación terminal	84
2.1- Al resembrar a baja densidad cultivos postconfluyentes de HT-29 M6, hay una re-entrada en el ciclo celular asociada al silenciamiento transcripcional del programa de expresión génica	84
2.2- p21 ^{CIP1} no es inducido durante la diferenciación in vitro de las HT-29 M6	88
3.- Estudiar la posible implicación de moléculas controladoras del ciclo celular en la regulación de marcadores de diferenciación durante la diferenciación in vitro de las HT-29 M6	91
 Capítulo 4. DISCUSIÓN	
1- El programa de diferenciación in vitro dependiente de calcio extracelular	97
2- Papel de p27 ^{KIP1} en el control de la diferenciación de las HT-29 M6	110
3- Posible existencia de una vía de regulación de APC sobre p21 ^{CIP1} cuya inactivación es responsable de la reversibilidad del programa de diferenciación in vitro de HT-29 M6	114
4- Papel de ciclina D1 en el control de la diferenciación in vitro de las HT-29 M6	116
5- las HT-29 M6, modelo de células derivadas de CCR donde la desdiferenciación celular y la adquisición de capacidad invasiva podrían estar teniendo lugar por vías diferentes	119
 Capítulo 5. CONCLUSIONES	
Conclusiones	121

Capítulo 6. **ANEXOS**

Materiales y metodología empleada

123

Capítulo 7. **BIBLIOGRAFÍA**

Referencias bibliográficas utilizadas en el trabajo

135

1. DIFERENCIACIÓN COLÓNICA Y CARCINOGENÉISIS

1.1. El epitelio colónico

La región inferior del tracto gastrointestinal (colon y recto) tiene como principal función la reabsorción de iones y agua, posteriormente a la absorción de la mayor parte de los nutrientes en el intestino delgado. En este proceso, las células del epitelio colónico juegan un papel fundamental.

La pared del colon, representada en la figura 11A, está compuesta por diferentes capas: mucosa, submucosa, muscular, subserosa y serosa.

El epitelio de la mucosa del colon, ampliado en la figura 11B, es un epitelio columnar simple que forma un gran número de profundas invaginaciones hacia el interior de la lámina propia (formada por tejido conectivo laxo) denominadas criptas de *Lieberkühn*. Este epitelio es renovado cada 3-4 días aproximadamente, lo que supone un proceso constante de regeneración de las células que constituyen las criptas.

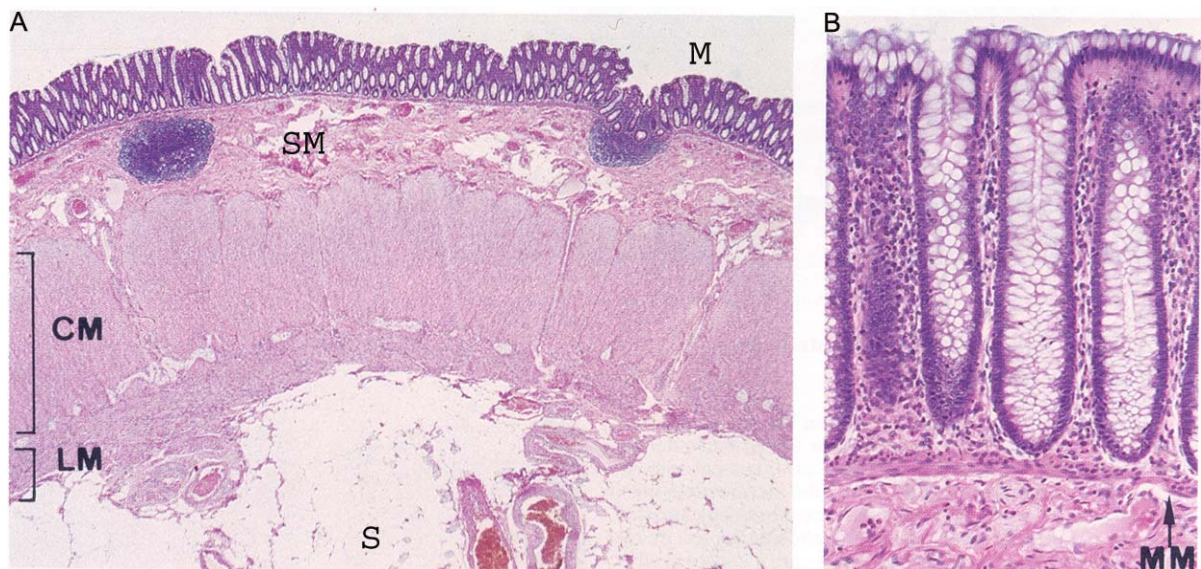


Figura 11: Histología del colon (tomado de Wheater PR, 1987) A: Representación de las diferentes capas presentes en la pared del colon (tinción hematoxilina-eosina): mucosa (M), integrada por el revestimiento epitelial superficial, y que contiene las criptas de *Lieberkühn*; submucosa (SM) caracterizada por la presencia de vasos sanguíneos y linfáticos; la muscular, formada por una capa circular interna (CM) y una capa longitudinal externa (LM) y por último, la serosa (S). B: Ampliación de la mucosa del colon, donde destacan las criptas de *Lieberkühn*. Entre la mucosa y la submucosa hay una fina capa de fibras musculares denominada muscular de la mucosa (MM), que puede observarse con claridad en esta ampliación.

Las células absortivas o enterocíticas son, junto con las células caliciformes (ver más adelante), las más abundantes en el epitelio colónico. Están polarizadas y se caracterizan por la presencia en la membrana apical de microvellosidades que forman un borde en cepillo, y donde se localizan hidrolasas como la sucrasa-isomaltasa (SI), la lactasa, la aminopeptidasa N (APN), la dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV) y la fosfatasa alcalina (AP), las cuales se utilizan como marcadores moleculares propios de este tipo celular.

Las células mucosecretoras o células caliciformes, al igual que las absortivas, son células polarizadas con un núcleo basal. Sin embargo, se caracterizan por la secreción del moco lubricante y protector del epitelio. Este moco está compuesto fundamentalmente por mucinas (de las cuales hablaremos más adelante), siendo MUC2 la mucina predominante del moco secretado por estas células en el colon.

Se postula que en el fondo de la cripta se encuentran las células pluripotentes o células *stem*, células indiferenciadas capaces de dividirse y responsables de la constante renovación del epitelio del colon.

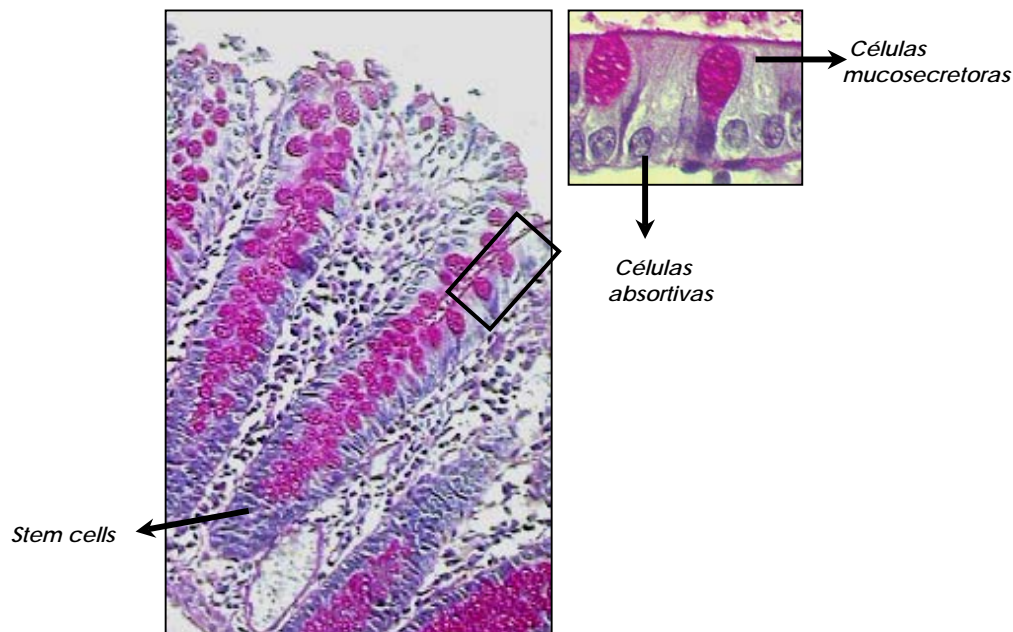


Figura I2: Corte transversal de la mucosa colónica humana donde se observan con más detalle las criptas de *Lieberkühn* (tinción hematoxilina-PAS), destacando con flechas los tipos celulares predominantes en el epitelio, mucosecretor y absortivo, así como el presunto compartimento de células *stem* en el fondo de la cripta, las cuales no son distinguibles a nivel histológico. La técnica histoquímica de PAS permite distinguir en rojo la presencia de acumulaciones de moco en las células goblet.

Una de las características que diferencia el epitelio colónico del de intestino delgado es la ausencia de células de Paneth (a excepción del colon ascendente), la poca representación de células enteroendocrinas, y su abundancia en células mucosecretoras. Existen referencias donde se describen con más detalle estos tipos celulares y su función en el epitelio intestinal y colónico (Wright NA, et al., 2000).

1.2. Diferenciación terminal: un complejo camino hacia la muerte celular

A lo largo del eje basal-apical de las criptas (referido a la posición apical de la luz intestinal), existen dos compartimentos celulares principales: un *compartimento proliferativo* que contiene, a su vez, (1) las células madre (*stem*) del epitelio en el fondo de la cripta, y (2) las células proliferantes precursoras de los tipos celulares diferenciados, y un *compartimento no proliferativo terminalmente diferenciado* conteniendo las células absortivas y mucosecretoras maduras en la mitad apical de la cripta (figura I3).

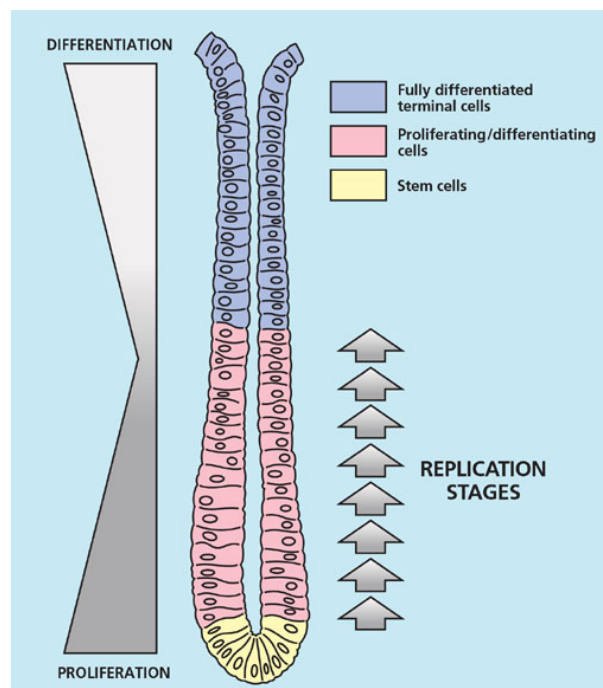


Figura I3: Representación esquemática de la direccionalidad del proceso de diferenciación a través de la cripta.

La homeostasis celular del epitelio es mantenida por un balance dinámico entre la división celular continua y el desprendimiento de células en la superficie de las criptas colónicas: las células precursoras proliferan en la parte baja de la cripta y van migrando de manera continua hacia las zonas más apicales. Durante esta migración tiene lugar una salida del ciclo celular, en paralelo a la activación de programas de expresión génica propios de cada tipo

celular diferenciado. El final de este trayecto culmina con la muerte celular por apoptosis y/o desprendimiento de las células hacia el lumen (revisado de Kyoung-Mee K, et al., 2002; Lamprecht SA, et al., 2002)

1.3 Wnt: Reguladores de la homeostasis del colon, que controlan la transición de proliferación a diferenciación en la cripta.

El desarrollo de tejidos y órganos en embriones está controlado por varias vías de señalización que interactúan para ofrecer información e inducir la especificación del destino celular. Uno de los sistemas principales de señalización es la vía Wnt (Huelsken J, et al., 2001). Las proteínas Wnt (del inglés "*wingless*") constituyen una familia de moléculas de señalización altamente conservadas que regulan las señalizaciones intercelulares durante la embriogénesis, estando descrito que los genes Wnt también están implicados en la progresión tumoral (Giles RH, et al., 2003).

La señalización de esta vía, detallada en la figura 14, se inicia por la activación de Frizzled (serie de receptores de siete fragmentos transmembranas) por parte de proteínas Wnt secretadas (figura 13b). Una vez activado el receptor otra proteína, Dishevelled (Dsh), es fosforilada e interacciona con la axina previniendo la actividad de la proteína GSK-3 β . La GSK-3 β es una proteína con actividad serina/treonina quinasa, y tiene como sustratos dentro de la vía a la axina, APC y a la β -catenina.

En células epiteliales de mamífero, la transducción de señales de Wnt tiene lugar, al menos en parte, mediante la inactivación del complejo multiproteico formado por APC, GSK3- β , axina/conductina. En células diferenciadas del epitelio intestinal, no existe señalización por Wnt, y este complejo participa en la degradación de β -catenina vía proteosoma al facilitar su fosforilación por GSK3- β , fosforilación que actúa como señal de reconocimiento por ubiquitina ligasas (revisado en Barth AI, et al., 1997; Eastman Q y Grosschedl R, 1999; Polakis P, 1999a). En estas condiciones, una fracción importante de β -catenina celular se encuentra formando parte del complejo de adhesión célula-célula mediado por E-cadherina (ver apartado 4 de la Introducción).

En presencia de señales Wnt, la inactivación de este complejo impide la degradación de β -catenina, y por tanto se acumula en el citoplasma, facilitándose su translocación al núcleo. Allí se une a proteínas de la familia TCF/LEF y actúa como coactivador transcripcional de la expresión de genes implicados en mantener el fenotipo indiferenciado de las células madre.

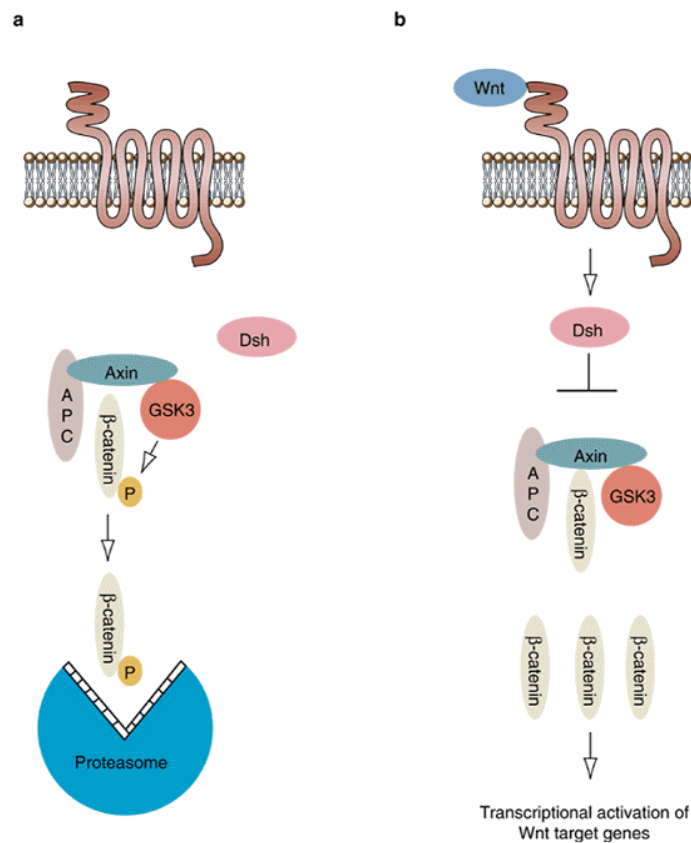


Figura 14: Vía canónica de señalización de Wnt (tomado de Clements WK, et al., 2003). En ausencia de señales de Wnt (a), GSK3 fosforila β -catenina en el complejo de destrucción, causando su degradación. Por el contrario, cuando las señales de Wnt activan Dsh (b), este impide la fosforilación de la β -catenina por GSK3, teniendo como resultado la acumulación de esta proteína en el citoplasma. De esta forma, β -catenina puede ir al núcleo y activar la transcripción de genes dianas de Wnt, como son c-myc o ciclina D1.

¿Cómo actúa la vía de Wnt en el control de la homeostasis del epitelio colónico?

La correcta señalización de Wnt, mediada por β -catenina-TCF, es esencial para el mantenimiento del estado proliferativo/no diferenciado de las células del epitelio colónico. Esto fue demostrado por Korinek y colaboradores, en estudios con ratones deficientes para TCF-4, los cuales mostraban ausencia total de compartimentos proliferativos en las criptas (Korinek V, et al., 1998). Las investigaciones posteriores derivadas de estos hallazgos han permitido definir mejor el papel de Wnt en la homeostasis del epitelio del colon (revisado de Van de Wetering M, et al., 2002; Battle E, et al., 2002; Peifer M, 2002; Sancho E, et al., 2003) (figura 15). Clevers y colaboradores sugieren que las proteínas de Wnt, provenientes probablemente de células mesenquimales o epiteliales de la parte inferior de la mucosa (debajo de la cripta) son las encargadas de mantener el potencial proliferativo de la cripta: garantizando por una parte la supervivencia y/o mantenimiento del nicho de *stem cells*, y

frenando por otra la transición de proliferación a diferenciación. Así pues, los genes activados por la vía de Wnt se expresan en el compartimento proliferativo de la cripta (y en la mayoría de los casos se encuentran sobre-expresados en tumores colorrectales; ver más adelante), mientras que los genes reprimidos por esta vía están restringidos al compartimento terminalmente diferenciado.

C-myc, diana directa de la actividad β -catenina-TCF, es uno de los mediadores del efecto proliferativo de la vía de Wnt ya que, al menos en parte, reprime la expresión de la molécula reguladora del ciclo celular p21^{CIP1} (de la cual hablaremos con más detenimiento en el apartado 3) al evitar la activación de su promotor génico por el factor de transcripción MIZ-1 (Wu S, et al., 2003). De forma similar, c-myc también puede reprimir la transcripción del inhibidor del ciclo p27^{KIP1} por unión directa del complejo Myc/Max al sitio Inr (elemento iniciador de la transcripción) presente en el promotor (revisado de Gartel AL, 2003), aunque se desconoce si este mecanismo ocurre en el epitelio colónico como efecto de la regulación por Wnt. Además de c-myc, existen otras proteínas reguladoras del ciclo celular cuya transcripción está regulada por β -catenina-TCF: ciclina D1 (Tetsu O & McCormick F, 1999), c-jun y fra-1 que son componentes del factor de transcripción AP-1 (Mann B, et al., 1999) y Id-2 (Rockman SP, et al., 2001).

El tránsito celular durante la migración a lo largo del eje basal-apical de la cripta puede ser explicado, al menos en parte, por la expresión de otro grupo de genes regulados también por β -catenina-TCF. La familia de receptores de Ephrina EphB2 y EphB3, están situados en las regiones más bajas de la cripta, y sus ligandos, las ephrinas, están localizadas en el compartimento diferenciado no proliferante. Los receptores EphB2 y EphB3 son inducidos por señales de Wnt, a diferencia de las Ephrinas, cuya expresión es reprimida por estas señales. Las interacciones repulsivas receptor-ligando, impuestas por Wnt a lo largo del eje de la cripta mediante el control de su expresión, determinan pues la migración celular hacia la zona apical de la cripta (Batlle E, et al., 2002).

A medida que las células migran hacia las zonas más apicales de la cripta, la actividad β -catenina-TCF es inhibida con lo que se favorece una salida del ciclo celular. El principal mecanismo que suprime la actividad β -catenina-TCF es la degradación de β -catenina y, quizás también, la traslocación núcleo-citoplasma de β -catenina por parte de APC. Por un lado, APC recluta en un mismo complejo a la quinasa GSK-3 β y a β -catenina, cuya fosforilación por parte de GSK-3 β dispara su reconocimiento por el proteasoma y su consecuente degradación (Peifer M, et al., 1994; Liu C, et al., 2002). Por otro lado ciertos dominios de la proteína APC favorecen la translocación de β -catenina al citoplasma, sugiriendo que la degradación citoplasmática de ésta podría estar modulada por el propio

APC dirigiendo o no su localización subcelular (Neufeld et al., 2000). Finalmente, también se ha sugerido que la modulación de los complejos de adhesión a nivel de membrana puede favorecer o impedir la actividad de β -catenina en el núcleo. Así, contactos de adhesión célula-célula mediados por E-cadherina podrían actuar secuestrando a β -catenina en la membrana (Barth AI, et al., 1997; Nelson WJ y Nusse R, 2004), y la acción de tirosina-quinastas moduladoras del complejo de adhesión podrían desestabilizar estos complejos con lo que se facilitaría la acumulación de β -catenina en el citosol (Gómez S, et al., 1999; Roura S, et al., 1999; Piedra J, et al., 2003). En conjunto, es probable que la acción combinada de éstos y otros mecanismos contribuyan a la regulación de los niveles de β -catenina en sus distintos compartimentos y a la consecuente supresión de la actividad β -catenina-TCF durante la diferenciación celular en la cripta.

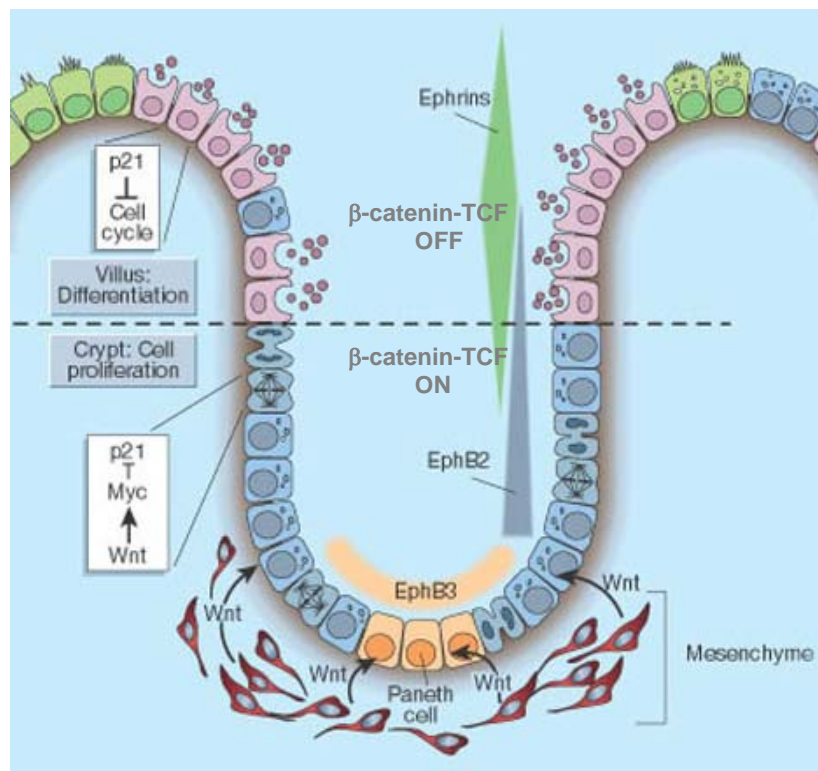


Figura 15: Contribución de la vía de Wnt en la transición de proliferación a diferenciación durante la diferenciación terminal en el epitelio intestinal. (Tomado de Peifer, 2002). La actividad β -catenina-TCF impone el fenotipo proliferante y marca la compartimentalización de la expresión génica en la zona proliferante *versus* la terminalmente diferenciada.

Además de las dianas mencionadas u otras que se mencionan más adelante, diversas aproximaciones experimentales han permitido describir un extenso programa genético bajo el control transcripcional de β -catenina-TCF (He TC, et al., 1998; Tetsu O & McCormick F, 1999;

Mann B, et al., 1999; He TC, et al., 1999; Takahashi M, et al., 2002; van de Wetering M, et al., 2002). Este programa de expresión génica ha revelado un control coordinado de genes implicados en el ciclo celular, en la expresión de proteínas propias del fenotipo diferenciado, en la adhesión al sustrato, en la movilidad e invasividad celulares, y en la apoptosis, de tal manera que la actividad β -catenina-TCF está encargada de mantener silenciado el programa de expresión génica asociado a la diferenciación celular. Por lo tanto, la proliferación y la diferenciación celular son procesos estrechamente relacionados en el epitelio colónico, y es la actividad de β -catenina-TCF uno de sus principales reguladores.

1.4 Especificidad de linaje celular y diferenciación en las criptas colónicas. Implicación de la vía de Delta/Notch en su regulación.

Aunque la vía reguladora de β -catenina-TCF controla el *switch* de proliferación a diferenciación en las criptas normales, esta señal no es suficiente para inducir la diferenciación de las células epiteliales progenitoras hacia los diferentes tipos celulares predominantes en las criptas maduras (mayoritariamente del tipo absortivo y mucosecretor en el epitelio colónico, además del enteroendocrino y las células de Paneth presentes en el epitelio intestinal). Sin embargo, ambos procesos – proliferación y diferenciación – se superponen en tiempo y espacio.

La hipótesis que se maneja en la actualidad es que los cuatro tipos celulares presentes en el epitelio intestinal adulto (absortivo, mucosecretor, enteroendocrino y células de Paneth) vienen determinados por, al menos, cuatro decisiones binarias consecutivas, que tienen lugar a partir de un mismo precursor: las células *stem* progenitoras (figura 18) (revisado de Sancho E, et al., 2003). Dos de los genes implicados en la toma de estas decisiones son los factores de transcripción del tipo b-HLH Math-1 y Neurogenina-3 (*ngn-3*), descritos recientemente. Math-1 interviene en la determinación de linaje celular en SNC (Birmingham NA, et al., 2001), y recientemente Yang y colaboradores observaron también que en intestino delgado de ratones deficientes para este factor de transcripción había una pérdida del linaje secretor (mucosecretor, enteroendocrino y de Paneth) sin afectarse el fenotipo absortivo. Por otra parte, la colocalización de Math-1 y Ki-67 en algunas células proliferantes indicaba que el linaje secretor provenía de un progenitor común que expresaba Math-1, mientras que las células absortivas lo hacían de un progenitor Math-1 independiente (Yang Q, et al., 2001). *Ngn-3*, por su parte, está implicada en el compromiso de las células hacia un fenotipo enteroendocrino. Evidencias de esto fueron descritas por Gradwohl y colaboradores en estudios con ratones deficientes para *Ngn-3*. El análisis de las criptas intestinales de estos

ratones reveló la ausencia de células enteroendocrinas, aunque el resto de tipos celulares (mucosecretoras, Paneth y absortivas) no presentaba alteraciones (Jenny M, et al., 2002).

La determinación de linajes en el epitelio parece estar funcionalmente asociada a la regulación por β -catenina-TCF ya que la inhibición de la vía de Wnt por Dickkopf-1 (Dkk-1) implica la represión de Math-1, con la consecuente pérdida del linaje secretor (Pinto D, et al., 2003). Estos resultados apuntan a favor de la cooperación de ambas vías de señalización durante el proceso de diferenciación, aunque se desconoce si los efectos producidos por este inhibidor de la vía de Wnt sobre Math-1 son directos o consecuencia de la pérdida del compartimento proliferativo (efecto observado al expresar Dkk-1 en embriones de ratones) (Glinka A, et al., 1998).

Recientemente, se ha descrito una inhibición de la expresión del ortólogo humano de Math-1, HATH-1, en tumores de colon indicando su relación con las vías oncogénicas y reforzando su importancia en la homeostasis del epitelio (Leow CC, et al., 2004). En este mismo trabajo, la inhibición de la vía de Wnt por APC o por un mutante dominante negativo de TCF también induce la expresión de HATH-1 en líneas celulares de cáncer de colon.

Investigaciones recientes sugieren que, al igual que ocurre durante el desarrollo de otros sistemas, la vía de señalización de Notch estaría jugando un papel muy importante en la especificación de tipo celular en el epitelio intestinal (Sander GR, et al., 2004). El nexo conector entre la vía de Notch y la diferenciación celular es el represor transcripcional HES-1 (*Hairy and Enhancer of Split 1*) (Thomas PQ y Rathjen PD, 1992; Jarriault S, et al., 1995). Hasta el momento se desconoce qué mecanismos estarían activando la vía de señalización mediada por Notch durante la diferenciación epitelial intestinal. De lo que sí hay evidencias experimentales es de que HES-1 reprime la expresión del factor de transcripción Math-1 en el intestino, estableciendo de esta forma, la primera decisión binaria entre el compromiso hacia el linaje absortivo *versus* el linaje secretor (revisado de Sancho E, et al., 2003) (ver figura 18).

Tampoco está claro si Notch estaría regulando de alguna manera la segunda decisión binaria que tiene lugar en estadios más avanzados de la migración celular hacia la zona apical de las criptas y que implicaría la decisión de las células comprometidas en el linaje secretor para diferenciarse hacia un fenotipo enteroendocrino o hacia un fenotipo mucosecretor, proceso mediado por el factor de transcripción ngn-3.

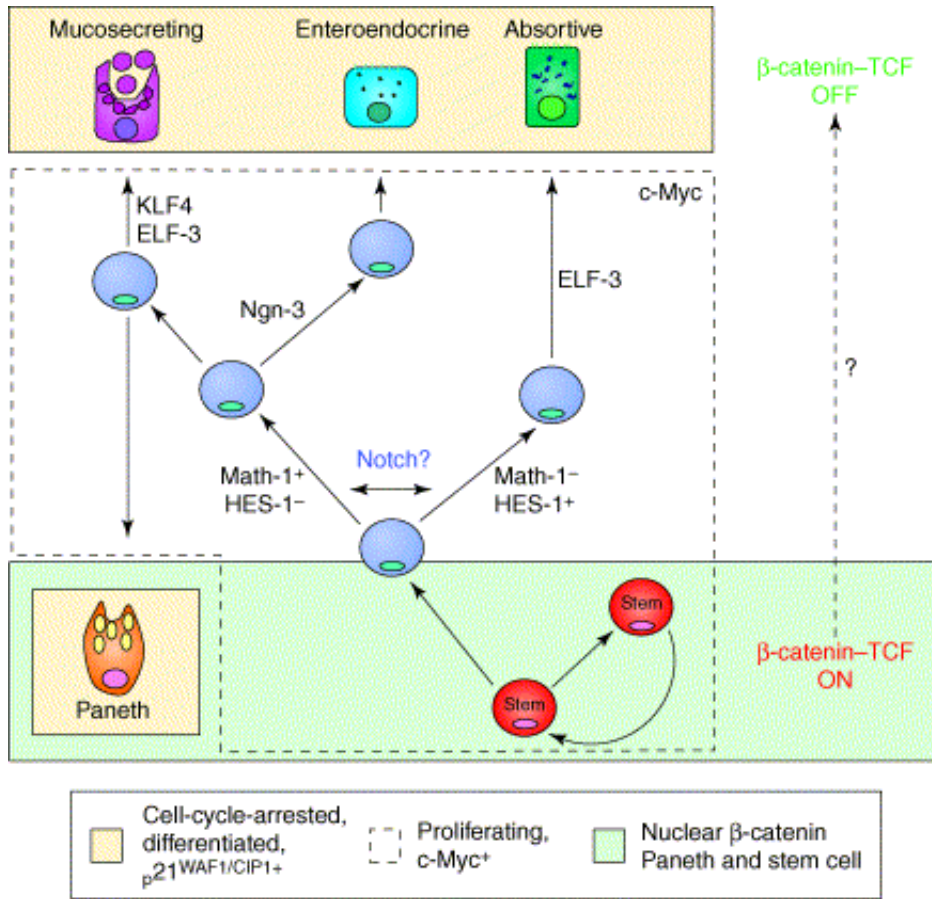


Figura 18: Papel de la señalización mediada por Notch en la regulación de genes implicados en la determinación del linaje celular durante la diferenciación intestinal. (Sancho E, et al., 2003).

Uno de los aspectos de la señalización mediada por Notch que ayudarían a entender este modelo y que poco se conoce en estos momentos, es como puede estar teniendo lugar la inhibición lateral en las criptas (característica del mecanismo de acción de Notch), y si la localización de estos precursores indiferenciados a lo largo del eje de la cripta se correlaciona con la expresión de estos genes implicados en la diferenciación terminal.

1.4.1 Otros factores de transcripción

Otros factores de transcripción implicados en la diferenciación terminal del epitelio intestinal han sido descritos recientemente: entre ellos se encuentran el factor de transcripción con dedos de zinc KLF4 (Kruppel-like factor 4) y el factor de transcripción ELF-3 (E74-like factor 3). Ambos fueron descritos como factores inducidos tempranamente durante la diferenciación epitelial y que estarían implicados en la maduración de las células mucosecretoras en colon y epitelio intestinal (Katz JP, et al., 2002; Ng AY, et al., 2002). KLF-4 se expresa en intestino delgado

y colon adulto y su sobreexpresión provoca una salida del ciclo celular mediada por p21^{CIP1}, encontrándose disminuida su expresión en tumores colorrectales (Zhao W, et al., 2004). Además, Hinnebusch y colaboradores demostraron que la fosfatasa alcalina intestinal, enzima utilizada como marcador de la diferenciación enterocítica, es un gen diana del factor de transcripción KLF-4 (Hinnebusch BF, et al., 2003). ELF-3 se identificó como un miembro de la familia de factores de transcripción EST, abundantemente expresado en intestino delgado, y cuya expresión, además, también se ha asociado a la maduración de células absortivas en el epitelio intestinal (Ng AY, et al., 2002). Asimismo, KLF4 y ELF-3 son inducidos en células de cáncer colorrectal deficientes para TCFs (Van de Wetering M, et al., 2002), indicando su posible implicación en la regulación de la transición proliferación/diferenciación mediada por β -catenina-TCF.

Cdx1 y Cdx2 forman parte de otra familia de factores de transcripción del tipo homeobox, que promueven la diferenciación intestinal (Suh E, et al., 1996; Mallo GV, et al., 1997). Cdx2 se ha descrito que actúa como supresor tumoral al inhibir la proliferación en células epiteliales intestinales (Suh E, et al., 1996) y promover la activación de genes implicados en el fenotipo diferenciado, como es el caso de la lactasa durante la diferenciación absortiva (Fang R, et al., 2000) o MUC2 en las células mucossecretoras (Yamamoto H, et al., 2003). Cdx1, por su parte, se expresa en las criptas intestinales y su expresión requiere de la señalización por Wnt (Lickert H, et al., 2000; Subramanian V, et al., 1998), lo que hizo pensar en un principio que participaba en la regulación de la proliferación. Sin embargo, la expresión de ambos factores se silenciaba preferencialmente durante la progresión de tumores colorrectales humanos (Silberg D, et al., 1997; Qualtrough D, et al., 2002) así como en modelos animales (Chawengsaksophak K, et al., 1997). Investigaciones recientes han permitido esclarecer el papel de estos factores de transcripción durante la diferenciación celular en las criptas colónicas. Primeramente, Lynch y colaboradores encontraron que Cdx1 inhibe la proliferación celular en células epiteliales intestinales mediante un bloqueo del ciclo celular en G1, implicando una disminución de la expresión de ciclina D1, la inhibición de la actividad CDK así como una acumulación de formas hipofosforiladas de las proteínas pockets pRB y p130 (Lynch J, et al., 2000). Trabajos posteriores han demostrado que tanto Cdx1 como Cdx2 inhiben la actividad transcripcional del complejo β -catenina-TCF en células de cáncer colorrectal y que este podría ser el mecanismo por el cual Cdx1 estaría modulando la expresión de ciclina D1 (Guo R-J, et al., 2004).

SOX9 forma parte de una familia de factores de transcripción que contienen la secuencia consenso HMG, y que están implicados en desarrollo y diferenciación (revisado de Wilson M, 2002). Se ha descrito que SOX9 juega un papel importante en la condrogénesis así como en el desarrollo de las gónadas masculinas. También está implicado en el desarrollo de la cresta

neural así como de las células gliales de la médula espinal (revisado de Blache P, et al., 2004). Recientemente, Clevers y colaboradores muestran que SOX9 también se expresa en la parte baja de las criptas tanto de intestino como colon adulto, correspondiente al compartimento proliferativo. Este factor de transcripción se encuentra fuertemente sobre-expresado en adenocarcinomas humanos, y su expresión es controlada por la actividad transcripcional de β -catenina-TCF4 en células de cáncer colorrectal, puesto que células deficientes para TCF4 muestran una reducción significativa de los niveles de RNA y proteína. (Blache P, et al., 2004). Aunque normalmente actúan como activadores transcripcionales, Clevers y colaboradores demuestran en su trabajo que SOX9 media la represión transcripcional de CDX2 y MUC2, dos genes implicados en diferenciación intestinal. Por lo tanto, la función de SOX9 en el epitelio intestinal contribuiría a mantener el potencial proliferativo de la cripta (conjuntamente con la vía de Wnt) mediante la represión de genes implicados en diferenciación celular.

1.5 El cáncer colorrectal

La carcinogénesis colorrectal (CCR) es un proceso multifactorial influenciado por factores ambientales, genéticos y epigenéticos. Aunque todavía se conoce poco sobre los mecanismos de control de la diferenciación celular y la homeostasis a lo largo de las criptas colonicas, se cree que las alteraciones que tienen lugar durante la transformación neoplásica ocurren en estadios del proceso de diferenciación donde las células deben decidir su destino en el tejido: continuar en el compartimento proliferativo *versus* transitar hacia el compartimento terminalmente diferenciado.

Atendiendo a su presentación, se conocen dos formas fundamentales de cáncer colorrectal: esporádico y hereditario. La mayoría de tumores colorrectales están considerados como tumores esporádicos, lo cual demuestra que existe un riesgo ambiental muy elevado que incide directamente sobre el desarrollo de este tipo de cáncer (revisado de Potter, 1999). Las formas hereditarias de CCR más conocidas son la FAP (Poliposis Adenomatosa Familiar) y el cáncer colorrectal hereditario no polipoideo (HNPCC), y son debidas a alteraciones genéticas transmitidas por la línea germinal que aumentan el riesgo a CCR.

La transformación tumoral se inicia en la mucosa colónica a nivel de las criptas. Durante la progresión tumoral, las células neoplásicas atraviesan la membrana basal e infiltran la capa muscular propia y la serosa (ver figura 11). El CCR tiene escasa tendencia al crecimiento longitudinal, excepto si existe infiltración perineural que permite la diseminación a través de la pared intestinal, en algunas ocasiones, más allá de 10 cm del tumor primario. En el colon, el crecimiento se produce hacia el mesocolon y la capa serosa peritoneal, pudiendo invadir órganos y tejidos adyacentes al espacio retroperitoneal.

Los CCR se desarrollan a través de etapas bien definidas a nivel histológico que van desde lesiones en la cripta del colon a través de la formación de pólipos o adenomas hasta manifestar el cáncer (figura 16).

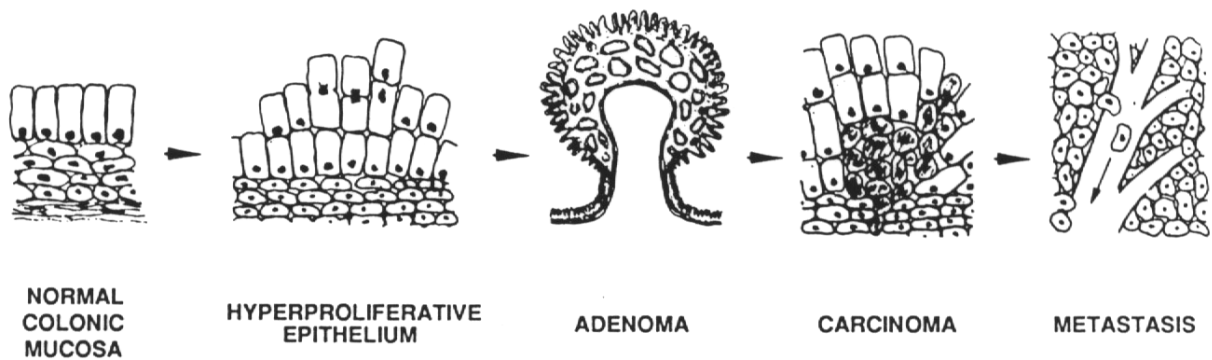


Figura 16: Representación de la carcinogénesis colorrectal, con la secuencia de alteraciones que tienen lugar en la mucosa del colon y que conllevan a la formación del tumor (adaptado de Kinzler kw & Vogelstein B, 1996).

El adenoma es una neoplasia benigna que tiene lugar en las criptas colónicas, caracterizada por una actividad mitótica continua, donde las células no se diferencian, de manera que el compartimiento proliferativo puede llegar a ocupar la cripta completa. Por su parte, dentro de los tipos histológicos de CCR, los adenocarcinomas son los más frecuentes, y se pueden clasificar en tres grados: bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados. Los tumores diferenciados mantienen la estructura glandular con la polaridad del núcleo conservada semejando el epitelio adenomatoso displásico. Los pobremente diferenciados, por el contrario, son estructuras sólidas con pérdida de la polaridad y gran pleomorfismo del núcleo. La división en grados histológicos tiene como principal limitación la subjetividad, ya que dicha clasificación depende, en gran medida, del criterio específico del patólogo. Los adenocarcinomas mucinosos representan el 17% de los tipos de CCR y están caracterizados por la acumulación de mucinas en el espacio extracelular. Normalmente este tipo de tumores tienen un peor pronóstico que los no mucinosos. Un subtipo especialmente agresivo, aunque poco frecuente, es el adenocarcinoma de células en "anillo de sello", caracterizado por la típica acumulación de mucinas intracitoplasmáticas que desplazan el núcleo a un extremo de la célula. Otros tipos de CCR más infrecuentes son el carcinoma de célula pequeña (mucho más agresivo que el adenocarcinoma y con tendencia a generar metástasis linfáticas y hepáticas) y el carcinoma adenoescamoso.

La secuencia adenoma-carcinoma se caracteriza por la acumulación de múltiples mutaciones que afectan a tres tipos diferentes de genes: a) *los proto-oncogenes*, cuya función es regular positivamente la proliferación celular y cuya activación constitutiva promueve la transformación tumoral; b) *los genes supresores tumorales*, que regulan negativamente la proliferación celular y cuya pérdida de función también promueve la carcinogénesis; y c) *los genes reparadores del DNA*, responsables de corregir los errores producidos durante la replicación del DNA y reparar las alteraciones inducidas en esta molécula por agentes mutagénicos externos (radiaciones UV, agentes químicos, etc...). Las alteraciones en este tipo de genes conducen a la aparición de múltiples mutaciones en el genoma (lo que se conoce como *fenotipo mutador*) (Loeb LA, 2001; Duval A y Hamelin R, 2002), y acaba afectando a los oncogenes y genes supresores tumorales, contribuyendo a la carcinogénesis. A esta última categoría de genes, podría añadirse los genes implicados en puntos de control del ciclo celular (*checkpoints*), cuyo estudio en los últimos años ha revelado que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Nigg EA, 2001). Cada uno de estos eventos mutacionales confiere a las células del tumor una ventaja de crecimiento de forma consecutiva, que trae como resultado la expansión clonal en múltiples etapas y al final, la progresión del tumor (figura 16).

Evidentemente la vía de carcinogénesis colorrectal no es una sola y probablemente existan varios caminos para el inicio, desarrollo y progresión de un tumor colorrectal. Los avances de la biología molecular y en concreto, el estudio de las neoplasias hereditarias ha permitido establecer actualmente, dos vías moleculares bastante bien establecidas por las que se produce la oncogénesis colorrectal (revisado de Grife R, 1998):

1) *La vía supresora de tumores o vía clásica*, está caracterizada por las alteraciones en el balance cromosómico (inestabilidad cromosómica), que se manifiesta en el desarrollo de tumores con alto grado de aneuploidía. Estos tumores presentan pérdidas de heterocigosidad frecuentes en múltiples loci, así como mutaciones que activan a oncogenes e inactivan o bloquean a genes supresores tumorales, encontrándose mutados con mayor frecuencia los oncogenes K-Ras así como los genes supresores tumorales APC y p53. El 85% de los tumores colorrectales esporádicos, al igual que la poliposis adenomatosa familiar, surgen como consecuencia de la acumulación de alteraciones en las células de la mucosa cólica, afectando principalmente genes clave del ciclo celular (p.e., *APC*, *K-RAS* y *TP53*) (figura 16).

2) *la vía mutadora*, caracterizada por la alteración de uno o más genes reparadores del DNA (*MMR*), y otras mutaciones secundarias que afectan a genes involucrados en las vías de señalización del crecimiento (p.e., *TGFBRII* y *IGFRII*), y de la apoptosis (p.e., *BAX*). Las células con deficiencias en los genes *MMR* pierden la capacidad de reparar debidamente los errores que ocurren espontáneamente durante el proceso de replicación del DNA, y por ello

acumulan mutaciones que afectan sobretodo a las secuencias microsatélites. De ahí que los tumores que pertenecen a este denominado fenotipo "*mutador*" presenten un patrón molecular característico que se conoce como de alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) (revisado de Fearon ER, 2004). Estos tumores (aproximadamente corresponden a un 15% del total de CCR) son en su mayoría diploides o pseudodiploides, observándose en ellos, además, la ausencia de mutaciones tumorales habituales de la vía supresora. Los tumores de esta vía comparten los mecanismos moleculares del cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (HNPCC).

Estas dos vías de carcinogénesis se diferencian porque los tumores correspondientes manifiestan divergencias claras en su fenotipo no solo a nivel celular (como es el grado de diferenciación, pobremente diferenciado en el caso de la *vía mutadora*) sino también en sus manifestaciones clínicas (como es el caso de la escasa capacidad invasiva de la *vía mutadora*). Las diferencias en el fenotipo son debidas en último término a diferencias en los genotipos correspondientes (oncogenes y genes supresores tumorales) implicados en el desarrollo del CCR.

¿ *Cómo está afectada la vía de Wnt durante la formación de un tumor ?*

El descubrimiento de las bases genéticas de la FAP, así como la presencia de alteraciones de APC en tumores colorrectales esporádicos permitieron establecer la mutación de APC como el paso crítico iniciador de la neoplasia colorrectal (Vogelstein B, et al., 1988; revisado de Jass JR, et al., 2002). El descubrimiento de un modelo murino que presenta mutaciones germinales en uno de los alelos del locus *Apc* (homólogo del humano) ha contribuído al estudio de los tumores colorrectales humanos y del papel de APC en la transformación neoplásica. Estos ratones APC^{Min/+} desarrollan espontáneamente numerosos adenomas a lo largo del intestino delgado y colon (Moser AR, et al., 1990). De hecho, muchos autores muestran a APC como "vigilante o guardián" de la homeostasis en las criptas colónicas y que en su ausencia, células que han empezado el proceso de diferenciación dejan de migrar longitudinalmente a través de la cripta y continúan proliferando, siendo de esta manera susceptibles a la formación de tumores (Kinzler KW & Vogelstein B, et al., 1996; Polakis P, et al., 1999b).

Aunque en más del 60% de los casos de cáncer colorrectales esporádicos existen mutaciones inactivadoras del gen de APC, también se han descrito con una frecuencia menor (12.5% en adenomas esporádicos pequeños, por ejemplo) mutaciones en la β -catenina que impiden que la proteína pueda ser fosforilada en los residuos Ser/Thr y por tanto, degradada (revisado de Bright-Thomas and Hargest, 2002), así como también se han descrito mutaciones en la axina u otros componentes de la vía de señalización de Wnt (revisado de Wong & Pignatelli, 2002).

Todas estas alteraciones contribuyen a la activación constitutiva del complejo β -catenina-TCF en las criptas, con las consecuencias que esto implica en la homeostasis del colon: bloqueo de la migración/diferenciación así como la proliferación descontrolada que contribuyen a la formación de pólipos, que son una de las primeras alteraciones neoplásicas durante la carcinogénesis del colon (revisado de Fodde R, et al., 2001), y que se resume en la figura 17.

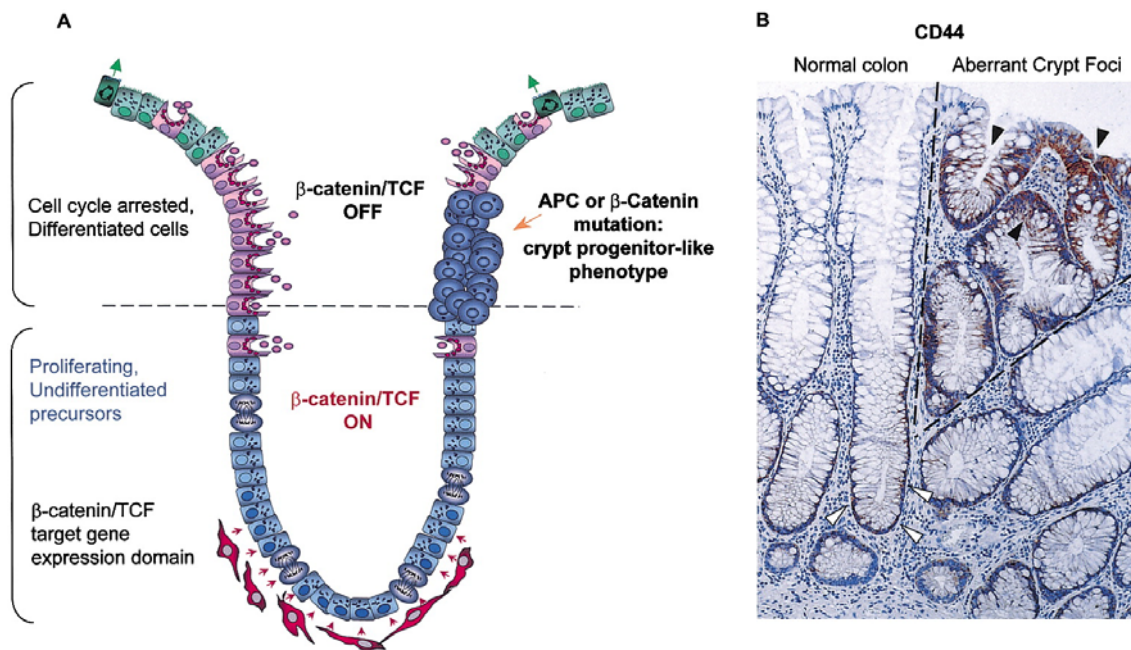


Figura 17: Modelo propuesto por Van de Wetering y colaboradores (Van de Wetering M, et al., 2002) del papel de la vía de Wnt, mediada por β -catenina-TCF, en los primeros estadios de la tumorigénesis colorrectal. A) representación esquemática de la cripta y el modelo que proponen para la formación de pólipos. B) Expresión de CD44, uno de los genes diana de la actividad β -catenina-TCF en criptas colónicas normales y tumorales.

Como ya es conocido, la expresión de algunos de los genes diana de β -catenina-TCF se encuentra alterada en tumores colorrectales. Por ejemplo tenemos:

- *C-myc*, cuya activación está mediada por TCF-4/LEF1 (He TC, et al., 1998). En muchos tumores colorrectales se ha descrito una sobre-expresión de sus niveles de mRNA y proteína (Smith DR, et al., 1993), y en algunas líneas celulares derivadas de tumores colorrectales incluyendo HT-29 se ha detectado una amplificación del número de copias del gen (Corzo C, et al., 2003). *C-myc* contribuye a la supresión de la salida del ciclo celular al reprimir la expresión de $p21^{CYP1}$ (ver figura 14).

- *Ciclina D1*, cuya activación está mediada también por TCF-4/LEF1 (Shtutman M, et al., 1999). Tanto en adenocarcinomas humanos como en pólipos adenomatosos se han descrito niveles elevados de esta proteína (revisado de Wong & Pignatelli, 2002), refiriéndose en muchos casos su localización en el frente de invasión (Jung A, et al., 2001). Estudios recientes han descrito que la deficiencia de ciclina D1 reduce el número de pólipos intestinales inducidos por la inactivación del gen APC en ratones APC^{min/+}, correlacionado con una menor proliferación celular y un incremento de la diferenciación (Hulit J, et al., 2004).

- *CD44*, mediador importante de la interacción célula-matriz extracelular y cuya sobre-expresión conduce a un incremento en la movilidad celular, progresión tumoral y metástasis (revisado en Bright-Thomas & Hargest, 2002). Se ha descrito un incremento de los niveles de RNA y proteína tanto en ratones APC^{min/+} como en un gran número de tumores colorrectales, asociado, en estos últimos, el grado de expresión con un peor pronóstico (revisado de Wong & Pignatelli, 2002). Estos datos, unidos a las evidencias de que ratones deficientes para TCF-4 no expresan CD44 en el tracto gastrointestinal, sugieren que la regulación de su expresión está mediada por la actividad del complejo β -catenina-TCF (Wielenga VJ, et al., 1999).

- *Receptor de Ephrina (EphB2)*, junto con EphB3 se ha descrito que está implicado en la segregación y posicionalidad celular a lo largo del eje de las criptas intestinales y que es diana de la actividad mediada por β -catenina-TCF (Batlle E, et al., 2002). Su expresión se encuentra inducida de manera considerable en tumores colorrectales (Batlle E, et al; 2002; Mao W, et al., 2004).

-*Matrilisina (MMP-7)*, metaloproteínasa sobre-expresada en más del 90% de tumores colorrectales. Aunque se ha asociado su expresión a la invasión estromal y metástasis (Adachi Y, et al., 1999), también se piensa que pueda tener un papel importante en estadios tempranos de la carcinogénesis, puesto que la pérdida de expresión de esta proteína reduce el número de adenomas intestinales en ratones APC^{min/+} (Wilson CL, et al., 1997). La sobreactivación de su expresión en tumores colorrectales humanos está mediada por β -catenina-TCF, a través de sitios de unión a este factor presentes en el promotor (Brabletz T, et al., 1999; Crawford HC, et al., 1999).

2. LINEAS DERIVADAS DE CANCER COLORRECTAL COMO MODELOS DE DIFERENCIACIÓN *IN VITRO*

Las líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal han proporcionado una herramienta muy útil para el estudio de genes reguladores de la diferenciación intestinal y su implicación en el cáncer, en gran parte debido a la dificultad de obtener cultivos primarios a partir de células epiteliales normales de intestino. En particular, algunas líneas celulares colorrectales tienen conservadas partes del programa de diferenciación epitelial del intestino, expresando muchos de los genes característicos de las células del epitelio colónico diferenciado (por ejemplo de células absortivas o mucosecretoras), y mantienen la capacidad de formar monocapas de células polarizadas una vez que han alcanzado la confluencia en cultivos *in vitro*. Por otra parte, muchas de estas líneas celulares presentan mutaciones genéticas, así como inestabilidad cromosómica y de microsatélites similares a lo que ocurre en tumores colorrectales, lo cual es muy interesante a la hora de estudiar la conservación o pérdida de mecanismos de diferenciación celular durante la progresión tumoral. En consecuencia, estas líneas celulares son muy útiles como modelos de diferenciación celular, normal y tumoral.

2.1. La línea celular HT-29

La línea celular HT-29 fue establecida en 1975, derivada de células de adenocarcinoma de colon humano (Fogh J, 1975). A nivel morfológico, los cultivos de esta línea celular son heterogéneos y contienen subpoblaciones de células con diversa capacidad de diferenciación. Así pues, en condiciones estándar de cultivo, la población HT-29 contiene más de un 95% de células morfológicamente indiferenciadas: durante el crecimiento hacia postconfluencia, las células se van apilando y no se polarizan, formando multicapas, y no expresan marcadores de diferenciación característicos de células del epitelio intestinal adultas. Sin embargo, el 5-10% restante de la población total desarrolla características diferenciadas: expresan enzimas como la aminopeptidasa N (APN), dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV), antígeno carcinoembrionario (CEA), la glicoproteína membranal MUC1 así como otras mucinas (Lesuffleur T et al., 1990).

A nivel genético, las células HT-29 presentan alteraciones típicas de tumores colorrectales, como son mutaciones en APC y Tp53 con la consiguiente pérdida de sus funciones, la amplificación de c-myc, descrita recientemente en colaboración con investigadores de nuestro laboratorio (Corzo C, et al., 2003), así como un fenotipo de inestabilidad cromosómica y aneuploidía.

Bajo diferentes condiciones de estrés celular, como por ejemplo la deprivación de glucosa o de suero fetal en el medio de cultivo, o el tratamiento con antimetabolitos como el

metotrexato (MTX) o el 5-fluorouracilo (5-FU), fueron aisladas diversas poblaciones HT-29 que desarrollaban fenotipos más homogéneamente diferenciados, siendo el grupo del doctor A. Zweibaum pionero en esta línea de investigación (Lesuffleur T, et al., 1990, 1991a, 1991b).

El tratamiento prolongado de HT-29 con 10^{-7} M de MTX más el tratamiento con 10^{-6} M de la población resistente obtenida permitió la selección de una población con capacidad de diferenciación hacia un fenotipo mucosecretor, a la cual se le llamó **HT-29 M6** (figura 19). A nivel cinético, estas células activan espontáneamente, durante el crecimiento a postconfluencia, un programa de diferenciación caracterizado por el establecimiento de contactos de adhesión, la formación de una monocapa de células mucosecretoras polarizadas, con un núcleo basal, numerosas vacuolas de moco acumuladas en el citoplasma de la región apical de las células y algunas microvellosidades apicales que no llegan a formar un borde en cepillo maduro.

A diferencia de lo que ocurre en el colon normal, la principal mucina secretada que se expresa en estas células es la mucina gástrica MUC5AC, aunque también es posible detectar MUC5B y MUC2 (Lesuffleur T, et al., 1993, 1995). Este cambio en el patrón de expresión de las mucinas secretadas ha llevado a sugerir que la diferenciación de las HT-29 M6 podría considerarse como un modelo de metaplasia gástrica incompleta. A nivel de las microvellosidades, las HT-29 M6 presentan, además, hidrolasas típicas del borde en cepillo de epitelio adulto como la dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV), la aminopeptidasa N, así como otras glicoproteínas de membrana apical expresadas en el epitelio fetal, como MUC1 y CEA. El patrón de expresión génica de estas células recuerda al de las células de colon fetal (Lesuffleur T, et al., 1990)

Por otra parte, el tratamiento secuencial con concentraciones mayores de MTX, a partir del orden de 10^{-5} M, permitió la selección de poblaciones y clones con capacidad de diferenciación *in vitro* hacia un fenotipo columnar o absortivo (Lesuffleur T, et al., 1991; 1998), destacando las aisladas hasta la concentración 10^{-3} M y denominadas **HT-29 M3** (figura 19). Estas células, de forma similar a las HT-29 M6, forman en postconfluencia monocapas de células con características diferenciadas con estructuras de borde en cepillo poco maduras, y expresan las glicoproteínas apicales APN, DPPIV y MUC1, aunque otras como CEA y sacarasa-isomaltasa prácticamente no se detectan. Los niveles de expresión de mucinas, como MUC2 y MUC5AC son mucho más bajos que en HT-29 M6, y no se producen vesículas de moco (Lesuffleur T, et al, 1991; 1998).

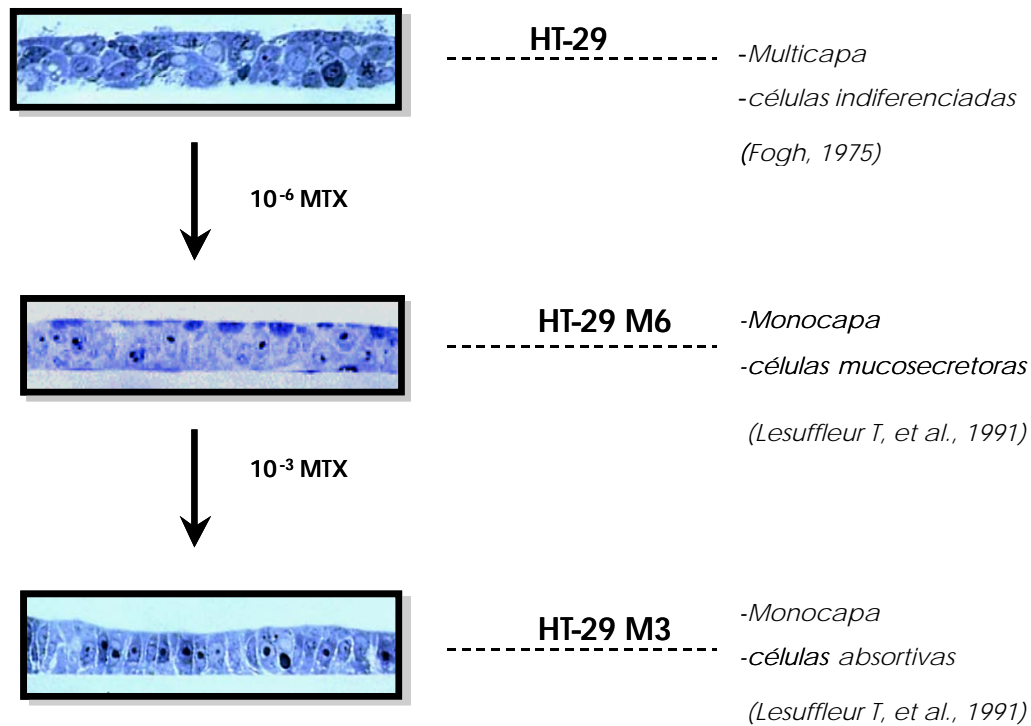


Figura I9: Figura I9: Representación de las poblaciones HT-29 M6 y HT-29 M3, seleccionadas establemente por tratamientos secuenciales con dosis incrementadas de MTX a partir de las células parentales indiferenciadas HT-29. En las figuras están representados cortes semifinos de cultivos postconfluentes perpendiculares al plano de adhesión al sustrato y teñidos con azul de metileno. En la mayoría de células HT-29 M6 destaca el citoplasma apical hipercromático conteniendo acumulación de vesículas de moco.

2.2 Otros modelos celulares: Caco-2

La línea celular Caco-2 también fue establecida por Fogh y Trempe (Fogh J, 1975), derivada de un carcinoma de colon humano. A nivel morfológico, las células Caco-2 presentan unas propiedades de diferenciación *in vitro* similares a las poblaciones derivadas de las HT-29: con el crecimiento hacia confluencia dejan de proliferar, desarrollando monocapas de células polarizadas con un fenotipo absortivo, en el cual destaca la presencia de un borde en cepillo mejor definido que en poblaciones diferenciadas de HT-29, con altos niveles de expresión de hidrolasas como sucrasa-isomaltasa, APN, DPPIV, fosfatasa alcalina, y bajos niveles de lactasa (Zweibaum A, et al., 1983). A nivel genético, también presenta mutaciones en APC, p53, e inestabilidad cromosómica.

2.3. Expresión de marcadores de diferenciación en colon normal y tumoral. Correlación con las líneas derivadas de CCR.

Como habíamos descrito anteriormente, las células del epitelio colónico maduro son mayoritariamente del tipo mucosecretor y absortivo. Ambos tipos celulares se caracterizan por la expresión de proteínas que son utilizadas frecuentemente como marcadores de diferenciación. Las células mucosecretoras, por excelencia, expresan diferentes tipos de mucinas, mientras que las absortivas se caracterizan por la expresión de diferentes enzimas hidrolasas y peptidasas ubicadas en el borde en cepillo. En este apartado haremos un breve repaso de estos marcadores, de cómo está afectada su expresión durante la progresión tumoral y qué se conoce sobre la regulación de su expresión.

Mucinas: Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular; más del 50% de su masa son carbohidratos unidos a la parte proteica, llamada también apomucina, por enlaces O-glucosídicos. Tienen en común la presencia de secuencias ricas en residuos serina, treonina y prolina repetidas en tándem de forma variable a lo largo de la secuencia primaria, lo que origina polimorfismos genéticos característicos de estas proteínas. Es en estos dominios repetidos en tándem, que además son específicos para cada mucina, donde tiene lugar el proceso de O-glucosilación. Existen dos clases de mucinas estructural y funcionalmente distintas: las mucinas secretadas, componentes del moco lubricante del epitelio (MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6) y las mucinas transmembrana (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC17). Además, se han descrito otras mucinas (MUC7, MUC8, MUC9, MUC13, MUC15 y MUC16) cuya clasificación no está del todo definida (revisado de Byrd JC & Bresalier RS, 2004). Cada uno de los genes de mucinas tiene un patrón de expresión tisular característico, el cual se encuentra alterado, en muchas ocasiones, en procesos neoplásicos.

MUC2 es la mucina expresada mayoritariamente en las células mucosecretoras de colon e intestino delgado (Allen A, et al., 1998). Su peso molecular oscila entre los 600-5000 KDa, teniendo grandes subdominios repetitivos potencialmente susceptibles a ser regulados postraduccionalmente. Otras mucinas presentes, además, en el epitelio colónico normal son MUC4, MUC3 (su expresión es mayoritaria en las células absortivas) y MUC1, aunque recientemente se han descrito MUC11 y MUC12 como mucinas colónicas cuya expresión está disminuída en tumores colorectales (Williams SJ, et al., 1999). Las mucinas transmembranas MUC3 y MUC4 presentan en su región citoplasmática dominios del tipo EGF, que podrían estar implicados en la modulación del crecimiento epitelial (revisado de Byrd JC & Bresalier RS, 2004).

MUC1, por su parte, presenta varios residuos tirosina susceptibles de ser fosforilados *in vitro* (Zrihan-Licht S, et al., 1994) que podrían estar involucrados en la transducción de señales. De hecho, Kufe y colaboradores han mostrado que MUC1 puede unirse a β -catenina y con ello inhibir la interacción β -catenina/E-cadherina a la vez que co-activar la actividad transcripcional β -catenina/TCF (Yamamoto M, et al., 1997; Li Y, et al., 1998; Huang L, et al., 2003). Esta interacción con β -catenina está regulada negativamente mediante fosforilación por GSK-3 β (Li Y, et al., 1998) y positivamente mediante fosforilación por el receptor de EGF, c-Src y PKC δ (Li Y, et al., 2001a y 2001b; Ren J, et al., 2002). Esta mucina se encuentra expresada en la superficie apical de la gran mayoría de epitelios glandulares, y se encuentra sobreexpresado en diversos tipos tumorales incluido el cáncer colorrectal durante la progresión adenoma-carcinoma (Ho SB, et al., 1993; Limburg PJ, et al., 2000). Mientras que en algunos de estos tumores MUC1 puede funcionar como oncogen, por ejemplo en cáncer de mama (Spicer AP, et al., 1995; Li Y, et al., 2003), en cáncer colorrectal su expresión está asociada a criptas colónicas proliferantes durante el desarrollo y a diferenciación celular en algunas líneas celulares tumorales (Chambers JA, et al., 1994; ver más adelante). También se ha descrito la existencia de una isoforma soluble, carente de dominios transmembrana y citoplasmático (MUC1/SEC), la cual es generada por *splicing* alternativo y que se ha encontrado presente en tumores de mama y ovarios, aunque no existen evidencias de su expresión en tumores colorrectales (Smorodinsky N, et al., 1996; revisado de Byrd JC & Bresalier RS, 2004).

Enzimas asociadas al borde en cepillo o (BBAE): Constituyen un grupo de enzimas, principalmente peptidasas y disacaridasas, abundantemente representadas en el borde en cepillo apical de células enterocíticas diferenciadas de intestino y colon normal, y que están implicadas en la absorción de nutrientes. Dentro de este grupo podemos destacar la sucrasa-isomaltasa, la lactasa, la dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV), la fosfatasa alcalina intestinal así como la aminopeptidasa N. Aunque la expresión de estas enzimas, utilizadas normalmente como marcadores del fenotipo absorptivo diferenciado, está restringida al epitelio intestinal y colon adultos, podemos encontrar además presencia en otros tejidos y tipos celulares. El ejemplo más claro lo tenemos en DPPIV, glicoproteína multifuncional presente también en células epiteliales del hígado, riñón, y que está implicada además en la regulación del sistema inmune (como molécula activadora de células T). Su expresión se encuentra alterada tanto en procesos de autoinmunidad como en la carcinogénesis de diversos tejidos (Iwata & Morimoto, 1999; Boonacker E, 2003). El carácter multifuncional de DPPIV, en parte dependiente del tipo celular, así como los procesos que regulan su expresión y su función en procesos de transformación neoplásica son objeto de intenso estudio (Iwata & Morimoto, 1999).

2.4. Expresión de marcadores durante el desarrollo fetal

Estudios realizados en embriones y fetos humanos obtenidos por abortión espontánea o terapéutica (Buisine MP, et al., 1998) muestran que todas las mucinas expresadas en el intestino y colon adulto normal, se expresan también durante el desarrollo fetal.

MUC2, es la mucina predominante también en el intestino y colon fetal, siendo su expresión dependiente de linaje celular: mientras que durante los primeros estadios del desarrollo intestinal hay expresión en las criptas epiteliales indiferenciadas, su expresión está restringida solamente a las células mucosecretoras maduras del intestino y colon adulto (Buisine MP, et al., 1998).

MUC3 y MUC4 se expresan en estadios muy tempranos de la edad gestacional en el intestino primitivo endodérmico (estratificado e indiferenciado), anterior a la citodiferenciación epitelial. En adultos, a diferencia de MUC2, MUC3 y MUC4 están presentes tanto en células mucosecretoras como en células no mucosecretoras, por ejemplo células absortivas o células ciliadas del epitelio bronquial. Por lo tanto, además brindar protección epitelial en el organismo adulto, ambas mucinas podrían estar implicadas en el proceso de citodiferenciación epitelial (Buisine MP, et al., 1998).

MUC1 se expresa en el colon de embriones de aproximadamente 18 semanas de gestación (Chambers JA, et al., 1994), y se encuentra pobremente expresado en tejido adulto comparado con la sobre-expresión observada en algunos tumores.

De forma interesante, MUC5AC se expresa de forma temprana (entre las primeras 8-12 semanas de gestación) en el intestino fetal, mientras que su expresión es silenciada posteriormente en la región intestinal de embriones a partir de la semana 13, así como en intestino y colon adulto. Sin embargo, está ampliamente descrito en la literatura que MUC5AC se expresa en diferentes tipos de adenocarcinomas de intestino y colon (Sylvester PA, et al., 2001; Byrd JC & Bresalier RS, 2004).

Por otra parte, la expresión de diferentes enzimas asociadas al borde en cepillo está regulada de forma transitoria durante el desarrollo del epitelio intestinal: DPPIV, APN y SI se expresan en colon fetal, y su expresión disminuye en estadios más avanzados de la gestación (Real FX, et al., 1992; Tung J, et al., 1997). La expresión transitoria de estos marcadores durante el desarrollo fetal se recupera durante la carcinogénesis colorrectal, con la sobre-expresión de estas enzimas en la mayoría de pólipos adenomatosos y adenocarcinomas.

Las células HT-29 M6 forman una multicapa de células mucosecretoras polarizadas, que en algunas ocasiones adopta el aspecto de una monocapa pseudoestratificada con núcleos basales o apicales despolarizados, muestran un discreto borde en cepillo apical muy inmaduro, expresan MUC1 y secretan mayoritariamente la mucina gástrica MUC5AC. Estas características son reminiscencias de ciertos estadios de la diferenciación del epitelio colónico fetal humano mencionados, los cuales preceden a la diferenciación de las criptas adultas. Esta similitud sugiere pues que los mecanismos de transformación neoplásica en HT-29 M6 implican la activación de un programa de diferenciación fetal que pudiera ser responsable, al menos en parte, de su fenotipo diferenciado.

¿Cómo se ve afectada la expresión de estos marcadores durante la formación del tumor colorrectal?

Numerosos estudios muestran cambios en los niveles de transcritos así como la inmunoreactividad de las mucinas durante la progresión tumoral en comparación con la mucosa normal. Sin embargo, con frecuencia se observan discrepancias en los resultados obtenidos, especialmente en cuanto a la inmunoreactividad de la proteína, teniendo en cuenta el anticuerpo utilizado para su detección. Así pues, se ha descrito un incremento o disminución de MUC1, MUC3 así como MUC4 en dependencia del método empleado (revisado de Sylvester PA, et al., 2001). Existe una asociación directa entre la sobre-expresión de MUC1 y la presencia de metástasis en tumores de colon (revisado de Byrd JC & Bresalier RS, 2004). Además del incremento de la expresión de MUC1, también se ha descrito alteraciones importantes en el grado de glicosilación de esta mucina. Por ejemplo, en adenocarcinomas colorrectales y en menor extensión, en pólipos adenomatosos, se han descrito estructuras glúcidas más cortas comparadas con el patrón de glicosilación presente en células normales (Cao Y, et al., 1997).

Sin embargo, las alteraciones más destacadas se encuentran en la expresión de las mucinas secretadas. Numerosos estudios han descrito una bajada significativa de los niveles de mRNA de MUC2 en adenocarcinomas colorrectales no mucinosos (Chang S-K, et al., 1994; Sylvester PA, et al., 2001; Gambus G, et al., 1993). Estudios realizados en ratones deficientes para esta mucina, muestran que la inactivación de MUC2 propicia la formación de tumores tanto en intestino delgado como en colon, acompañado de un incremento en la proliferación y una disminución de la apoptosis (Velcich A, et al., 2002). Estos datos sugieren pues que, además de su valor informador de la diferenciación celular, las mucinas podrían desempeñar un importante papel regulador de la homeostasis intestinal, y que alteraciones en su expresión podrían contribuir a la transformación celular.

La disminución de los niveles de expresión de MUC2 está correlacionada, en la gran mayoría de adenocarcinomas colorrectales no mucinosos, con la síntesis “de novo” de MUC5AC, mucina gástrica que no se expresa normalmente en el colon normal (Sylvester PA, et al., 2001; Byrd JC & Bresalier RS, 2004). En estudios realizados en pacientes con cáncer colorrectal, Corfield y colaboradores observaron, además, que estos cambios en la expresión génica están correlacionados con el grado de diferenciación tumoral, refiriendo una sobre-expresión de MUC2 y MUC5AC en tumores moderadamente/bien diferenciados así como una disminución de su expresión en tumores poco diferenciados comparados con la expresión en colon normal (Sylvester PA, et al., 2001).

El significado de la alteración en el patrón de expresión de las enzimas del borde en cepillo durante la carcinogénesis es, sin embargo, más confuso que en el caso de las mucinas (Real FX, et al., 1992). Algunos pocos estudios han descrito una expresión alterada de estas enzimas en tumores colorrectales. Por ejemplo, existe un incremento de la expresión de sucroamilomaltasa asociado con una mortalidad incrementada en pacientes con carcinomas colorrectales (Jessup JM, et al., 1995).

¿Qué mecanismos pueden estar implicados en la regulación de la expresión de estos marcadores durante la progresión tumoral?

Todavía se desconocen muchos aspectos de la regulación de la expresión génica en el colon adulto. La caracterización molecular de los marcadores de diferenciación, el estudio de sus promotores génicos y el uso de líneas celulares que conservan parte del programa de diferenciación celular han contribuido particularmente a nuestro conocimiento sobre su regulación. Tal como se describe a continuación, existen diversos mecanismos de regulación de la expresión génica durante la diferenciación en las criptas colónicas. Durante la transformación neoplásica, muchos de estos mecanismos están alterados contribuyendo de esta forma, a la formación del tumor.

Por ejemplo, se ha descrito que en la expresión disminuída de MUC2 durante la progresión tumoral pueden estar implicados mecanismos de metilación del promotor (Hanski C, et al., 1997; Gratchev A, et al., 2001): Estudios realizados utilizando líneas celulares de carcinomas colorrectales que expresan o no altos niveles de MUC2 (LS174T y Colo 205, respectivamente) y el posterior análisis con endonucleasas específicas mostró que en las secuencias del promotor estudiadas el incremento de la metilación se correspondió con la disminución de los niveles de RNA de MUC2. Además, la inhibición de la metilación por 5-aza-2'-deoxycitidina incrementó la expresión de MUC2 en estas células (Hanski C, et al., 1997).

Otro de los factores de transcripción que se ha relacionado más con la regulación génica de marcadores de diferenciación es el factor de transcripción con dedos de zinc Sp1. Este factor de transcripción se une a secuencias consenso "CG" presentes en muchas de las regiones 5' flanqueante de los promotores génicos. Se ha descrito, por ejemplo, que la sobre-expresión de Sp1 y también Sp3, induce la expresión de MUC2 en células HT-29 indiferenciadas (Aslam F, et al., 2001). Adicionalmente, Sp1 puede prevenir la metilación del promotor de MUC2 al competir por la unión a las secuencias CG presentes en el promotor. Esto podría constituir otro nivel de regulación durante la diferenciación en las criptas colónicas y que puede tener especial relevancia durante el proceso de transformación neoplásica.

Otro de los mecanismos por los cuales la expresión de MUC2 podría ser silenciada en muchos tumores colorrectales es por una pérdida de funcionalidad del gen supresor tumoral p53. Se ha descrito que la expresión de MUC2 en varias líneas celulares es regulada transcripcionalmente por la proteína p53 (Ookawa K, et al., 2002) y esta posible regulación se ha confirmado en estudios clínicos que muestran una correlación inversa entre la inmunoreactividad a MUC2 y la alteración de p53 (revisado de Byrd JC & Bresalier RS, 2004).

Por otra parte, también se ha descrito que la región 5' flanqueante de varios promotores génicos implicados en la diferenciación intestinal y colorrectal presentan una o varias secuencias consenso de unión al factor de transcripción CDX2 (TTTAC/T), y que son requeridas para la inducción de su expresión. Recientemente Yamamoto y colaboradores mostraron que la expresión de CDX2 activa el promotor de MUC2 e incrementa sus niveles de RNA mensajero endógenos (Yamamoto H, et al., 2003). Resultados similares fueron comunicados también en referencia al gen de la lactasa (Fang R, et al., 2000) y sucrasa-isomaltasa (Suh E, et al., 1994), ambos marcadores del fenotipo absortivo. Puesto que la expresión de CDX2 se encuentra significativamente disminuida en adenocarcinomas colorrectales (Kaimaktchiev V, et al., 2004), la desregulación de la expresión de este factor de transcripción se ha asociado con la génesis de un gran número de tumores gastrointestinales. Recientemente, se ha descrito SOX-9 como un factor de transcripción que reprime la expresión de CDX2 (Blache P, et al., 2004) (ver apartado 1.4). La expresión elevada de SOX-9 en tumores colorrectales en los cuales hay una activación constitutiva de la vía de Wnt podría estar contribuyendo a la progresión tumoral mediando de forma indirecta, la represión de algunos de los marcadores de diferenciación así como también la determinación del grado de diferenciación tumoral.

Curiosamente, estudios recientes muestran evidencias de la correlación inversa entre la expresión de SOX-2 y la expresión de CDX2 durante la metaplasia intestinal. La metaplasia intestinal es un tipo de transición tumoral que tiene lugar durante la progresión de tumores gástricos. Está caracterizada por la expresión de un fenotipo intestinal (entre ellos incluido la

expresión de MUC2) en el epitelio del estómago, a detrimento de la expresión del programa de expresión génica característico de este epitelio (entre ellos la expresión de MUC5AC y MUC6) (Tsukamoto T, et al., 2003; Li XL, et al., 2004). Pues bien, un mecanismo recíproco podría estar contribuyendo al “*switch*” de MUC2 a MUC5AC observado en muchos tumores colorrectales, de manera que podría implicar a SOX-2 y/o SOX-9, aunque no existen evidencias experimentales al respecto.

Para finalizar, también está descrito que los promotores génicos de diversas enzimas asociadas al borde en cepillo, como por ejemplo sucrosa-isomaltasa (Wu G, et al., 1994), lactasa (Spodsberg N, et al., 1999), DPPIV (Erickson R, et al., 1999) así como APN (Olsen J, et al., 1994) contienen elementos que interaccionan con el factor nuclear de hepatocitos (HNF-1), promoviendo la activación génica de estos marcadores durante la diferenciación enterocítica. Estudios recientes realizados en células Caco-2 como modelo de diferenciación enterocítica, muestran evidencias de que durante la diferenciación *in vitro* de esta línea tiene lugar un rápido incremento de los niveles de HNF-1 α (no así los de HNF-1 β), estimulando la transcripción de DPPIV (Erickson R, et al., 2000). Se sabe que la proporción de HNF-1 α / HNF-1 β varía en intestino delgado y colon y que, en el epitelio colónico normal, predomina la variante β , lo cual sugiere que alteraciones en el ratio de expresión de estas proteínas nucleares puede afectar a la expresión de las enzimas del borde en cepillo en tumores colorrectales y sus líneas celulares derivadas .

3. UN BREVE RECORRIDO A TRAVÉS DEL CICLO CELULAR

El ciclo celular es el conjunto ordenado de procesos que tienen lugar en la célula con la finalidad de dividirse. A pesar de que es un proceso contínuo, se puede considerar que hay diversas fases, siendo las principales la fase S o de replicación del DNA y la mitosis o fase M. Entre estas fases hay unos agujeros (“*gaps*”, en inglés) que se denominan G1 y G2.

La transición de una fase a otra del ciclo celular es el resultado de la integración de diferentes señales. Por una parte, señales externas que llegan desde el entorno celular como son los factores de crecimiento, citoquinas y hormonas, los contactos intercelulares y la adhesión a la matriz extracelular, y por otra parte, las señales intracelulares, que constituyen los mecanismos de control o vigilancia (*checkpoints*) de que dispone la célula para evitar el iniciar una fase si la anterior está incompleta o mal realizada. Estas señales externas son en general, las que activan las diversas rutas de transducción que, ya sea por cambios en la expresión de ciertos genes o por modificación de moléculas, determinan la entrada/permanencia o salida del ciclo celular.

La fase G1 es un período de duración variable que sigue a una división celular y es previo a la síntesis o replicación del DNA. Esta es la única fase del ciclo celular que está influenciada por señales externas. Durante esta fase, hay una intensa actividad de síntesis de proteínas y RNA, lo que permite a la célula producir toda la "maquinaria" necesaria para la síntesis del DNA. Antes de la transición hacia la fase S existe un punto de control llamado el punto de restricción (R), considerado por muchos como el más importante del ciclo celular. En el punto R, la célula valora el entorno celular y, si éste es adecuado, reconoce a R como un punto "de no retorno" a partir del cual la progresión del ciclo ocurrirá independientemente de la estimulación por factores de crecimiento extracelulares. En la mayoría de los organismos pluricelulares, las células que están en G1, antes de comprometerse hacia la replicación del DNA (o sea, antes de pasar el punto de restricción) entran en un estado de reposo llamado quiescencia o G0, en el cual no proliferan; G0 coincide normalmente con el estado de diferenciación celular en los tejidos. Existen determinados tipos celulares como las neuronas o las células del músculo estriado, que siempre se encuentran en G0 de manera irreversible, lo que se ha dado en llamar diferenciación terminal. Otros como los hepatocitos, de recambio lento, son mayoritariamente quiescentes, pero pueden re-entrar en el ciclo celular en respuesta a determinados estímulos (por ejemplo, durante la regeneración hepática). Finalmente, existen tejidos con poblaciones mixtas, por ejemplo el epitelio intestinal (ver Introducción, apartado 1), donde un compartimento proliferante contiene células progenitoras que se diferencian y salen del ciclo hacia otro compartimento terminalmente diferenciado; la homeostasis celular es mantenida mediante un proceso de pérdida celular en el compartimento diferenciado.

La fase S (de Síntesis del DNA) corresponde al tiempo durante el cual tiene lugar la replicación del DNA. Cada cromosoma pasa a tener dos cromátidas, es decir, dos moléculas de DNA de cadena doble, que son copia una de la otra. El período comprendido entre la finalización de la replicación del DNA y el inicio de la mitosis es la fase G2. Durante esta fase, las células se preparan para la escisión en dos células hijas. En esta fase además, existe un punto de control (control G2-M), donde la célula debe comprobar, como mínimo, dos condiciones antes de dividirse: que ha completado la replicación del DNA y solo lo ha hecho una vez, y que en el DNA no se han producido errores estructurales.

Finalmente, las células entran en la fase de mitosis: los cromosomas se condensan enormemente, haciéndose visibles al microscopio óptico como entidades individuales, y los microtúbulos se organizan a partir de dos cuerpos polares que se sitúan en ambos extremos de la célula y forman el huso acromático que va a servir de guía a los cromosomas. En primer lugar, desaparece la membrana nuclear (profase). A continuación, los cromosomas se unen por los cinetocoros a los microtúbulos en la zona media celular formando la placa ecuatorial (metafase). En este momento otro punto de control (*checkpoint* del huso mitótico), permite

que se siga adelante solo si todos los cromosomas están alineados sobre el huso. Si es así, las cromátidas hermanas se separan yendo cada una hacia un polo de la célula (anafase). Cuando llegan a los extremos (telofase), la célula comienza a escindirse por la zona media, dando lugar a dos células hijas, proceso conocido como citocinesis. La membrana nuclear vuelve a formarse y los cromosomas a descondensarse, originándose dos células hijas idénticas en principio a la progenitora.

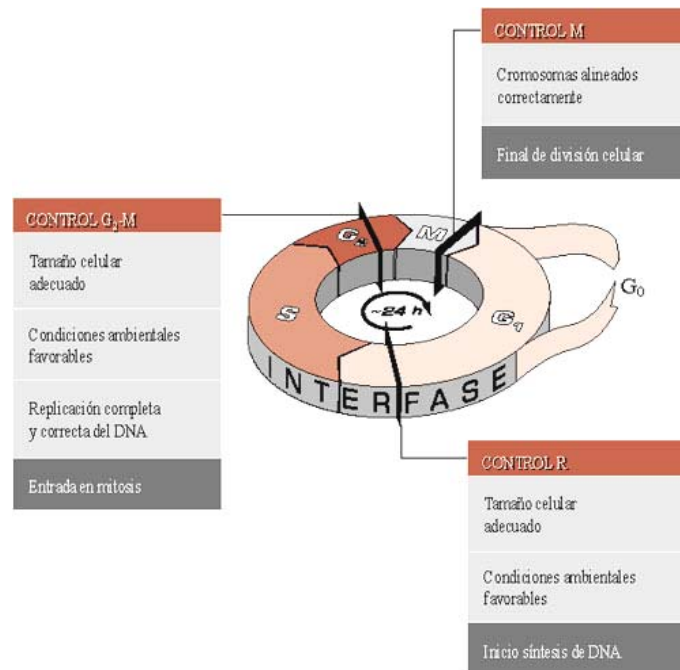


Figura 110: Esquema de las diferentes fases del ciclo celular. En recuadro, los diferentes puntos de control del ciclo celular. (Tomado de Muñoz A, et al., 1997)

Los puntos de control del ciclo celular aseguran la fidelidad e integridad de la replicación y segregación genómica. Si estos puntos de control están dañados (alteración frecuente en células tumorales), las células prosiguen el ciclo celular aún cuando existan errores en la progresión del ciclo (daño en el DNA, por ejemplo), pudiendo originar de esta forma mutaciones que favorecen la evolución del proceso neoplásico. A este fenómeno se le denomina inestabilidad genómica. El gen supresor tumoral Tp53, regulador negativo del ciclo celular, ha sido considerado por muchos investigadores como el "guardian del genoma" (Lane DP, 1992), por su importante papel en la reparación del DNA. En respuesta a un daño en el DNA hay una activación de Tp53, que induce el bloqueo del ciclo celular en la fase G₁ y posiblemente en la fase G₂, permitiendo que la reparación del material genético tenga lugar

antes del comienzo de la síntesis de DNA y de la mitosis, promoviendo también apoptosis, si el daño ocasionado es muy severo. Se han descrito alteraciones en este gen en diversos tipos de neoplasias, entre ellos en tumores colorrectales, donde más del 50% de estos tumores presentan Tp53 mutado (Vogelstein B, et al., 1989; Iacopetta B, 2003).

3.1. Los grandes protagonistas de la regulación del ciclo celular

Complejos CDKs-ciclinas: Son considerados "relojes moleculares", pues controlan la sucesión temporal y la progresión de las diferentes fases del ciclo celular (McDonald ER y El-Deiry WS, 2000). Son complejos holoenzimáticos formados por dos subunidades: la subunidad catalítica o quinasa dependiente de ciclinas (CDK) y la subunidad reguladora, o ciclina. Las CDKs forman parte de una familia de serina/treonina quinasas de unos 300 aminoácidos, que presentan una alta homología estructural y de secuencia. Se caracterizan por presentar varios dominios altamente conservados que le confieren especificidad funcional y de sustrato. Uno de estos dominios (T-loop), formado por 18 aminoácidos, contiene un sitio de fosforilación en la treonina 161 en el caso de CDK1, necesario para bloquear el dominio catalítico de la quinasa en ausencia de la unión a ciclinas y haciéndolo inaccesible a otros sustratos potenciales. El otro dominio característico de las CDKs lo forma una región de 16 aminoácidos homólogo a la secuencia EGVNSTAIRSLLKE, llamada región PSTAIRE, que confiere la especificidad de unión a las ciclinas.

Las ciclinas constituyen la subunidad reguladora del complejo, formando parte de una familia de proteínas estructuralmente más diversa con un peso aproximado de 35-90 KDa, que recibieron este nombre debido a que sus niveles oscilaban durante las diferentes fases del ciclo celular (Evans T, et al., 1983). Se caracterizan por presentar un dominio estructural conservado de aproximadamente 100 aminoácidos (*cyclin box*) localizado en la parte central de la proteína y que es necesario y suficiente para la unión a CDK y su consecuente activación. Otro dominio conservado en estas proteínas está formado por una secuencia proteica en la región amino terminal (*destruction box*) que como su nombre indica, es necesaria para la proteólisis mediada por ubiquitinación una vez hayan cumplido su función dentro del ciclo celular. Sin embargo, este dominio de destrucción sólo está presente en algunas de las ciclinas, como por ejemplo la A y la B. Las ciclinas tipo D y E, a diferencia, presentan secuencias PEST (secuencias ricas en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T)) en sus extremos carboxi-terminal que les confieren inestabilidad, y cuya degradación involucra mecanismos alternativos de proteólisis mediada por ubiquitinación (revisado de McDonald ER & El-Deiry WS, 2000).

Tanto la familia de las CDKs como de las ciclinas constan de diversos miembros. La asociación CDK-ciclina se da por parejas concretas que forman un complejo proteico activo con características y funciones diferentes que van desde la entrada y progresión del ciclo celular hasta la diferenciación de algunos tipos celulares (figura 111).

CDK	CICLINA	FASES DEL CICLO
CDK1	Ciclina B	M
CDK2	Ciclina E	G1/S
	Ciclina A	S/G2
CDK4	Ciclina D	G1
CDK5	p35	Diferenciación neuronal
CDK6	Ciclina D	G1
CDK7	Ciclina H	CAK, Transcripción
CDK8	Ciclina C	Transcripción
CDK9	Ciclina T	Transcripción, diferenciación

Figura 111: Complejos CDKs-Ciclinas presentes en humanos, y su función dentro del ciclo celular.

La formación del complejo proteico funcional depende de cada CDK y ciclina implicada y es uno de los puntos críticos de la regulación del ciclo, por lo que está finamente controlado. La regulación de la actividad de las CDKs tiene lugar a varios niveles, con tal de asegurar un estricto control de su actividad quinasa. Como se muestra en el esquema de la figura 112, los puntos más importantes de esta regulación son : 1) disponibilidad de la ciclina para formar el complejo funcional, 2) fosforilación y desfosforilación de la subunidad CDK, 3) unión de proteínas inhibitoras de las CDKs (CKIs) y 4) localización subcelular del complejo.

Uno de los puntos más importantes de control de la actividad CDK es la regulación de los niveles de ciclina, para garantizar la disponibilidad y la formación del complejo activo. El balance de la síntesis y la degradación de las ciclinas garantiza los niveles de estas proteínas a lo largo del ciclo celular. Por ejemplo, ciclina D1 es un sensor de la presencia de factores de crecimiento, siendo su síntesis inducida por estos. Una vez finalizado el estímulo mitogénico, la síntesis disminuye e incrementa su degradación, produciendo una reducción muy rápida de sus niveles de expresión. La síntesis de ciclina E, por el contrario, depende de la actividad de la familia de factores de transcripción E2F, que se activan como consecuencia de la actividad de los complejos CDK4/6-ciclina D1 durante la fase G1. Sin embargo, en su degradación intervienen mecanismos de autofosforilación, que garantizan una rápida disminución de sus niveles al final de la fase S.

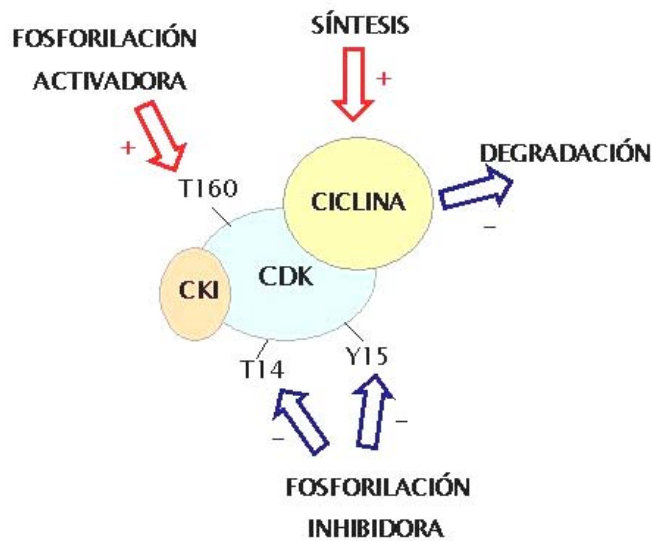


Figura I12: Mecanismos de regulación de los complejos CDK-Ciclinas a lo largo del ciclo celular.

Otro nivel de regulación es la fosforilación y defosforilación de la subunidad CDK, lo cual implica la activación o inactivación del complejo. La activación es consecuencia de la fosforilación en el residuo Thr-161 de la región T-loop de la quinasa, siendo la CAK (quinasa activadora de CDKs) la enzima responsable de esta activación y que en eucariotas superiores está formada por el complejo CDK7- ciclina H -Mat1 (Fisher RP & Morgan DO, 1994). Por otra parte, las principales CDKs implicadas en la regulación del ciclo celular pueden ser inhibidas por fosforilación de la subunidad CDK en los residuos conservados Thr14 y Tyr15, siendo las responsables de esta fosforilación las quinasas Wee1 y Myt1. La defosforilación de estos residuos es catalizada por miembros de la familia de fosfatasas CDC25: CDC25A, CDC25B y CDC25C. Estas fosfatasas participan secuencialmente durante las fases S, G2 y M para defosforilar y activar los diversos complejos CDK-Ciclinas que participan en la regulación del ciclo (revisado de Vermeulen K, et al., 2003).

La localización celular de los complejos CDKs-Ciclinas y de sus elementos reguladores en los diferentes compartimentos subcelulares responde a un nivel adicional de control de toda la maquinaria del ciclo celular. Por ejemplo, es importante que los complejos CDK4/6-ciclina D1 estén en el núcleo durante la fase G1, en un proceso que requiere la actividad de las ERKs, mientras que cuando comienza la fase S, son exportados al citoplasma, donde tiene lugar la degradación de ciclina D1. La localización intracelular de las diferentes proteínas reguladoras del ciclo también contribuye a la correcta progresión de la fase M. Este es el caso de ciclina B,

que contiene una señal de exclusión nuclear y es exportada activamente del núcleo al principio de la profase. Por otra parte, las quinasas inhibitoras de CDKs Wee1 y Myt1 están localizadas, respectivamente, en el núcleo y Golgi, y protegen a la célula de una mitosis prematura. De la misma manera, en respuesta a daños en el DNA tiene lugar un secuestro del complejo CDK1-ciclina B en el citoplasma mediado por las proteínas del complejo 14-3-3 (revisado de Vermeulen K, et al., 2003).

Inhibidores de CDKs: La actividad CDK también es regulada por proteínas inhibitoras del ciclo celular, llamadas inhibidores de CDKs (CKIs), las cuales son inducidas en respuesta a señales antiproliferativas, y que también oscilan durante la progresión del ciclo. Estas proteínas se han agrupado en dos familias distintas, en base a su estructura y a las CDKs que son capaces de inhibir: la familia INK4 y la familia CIP/KIP (Sherr C & Roberts J, 1999).

La familia INK4 incluye las proteínas p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}, las cuales inactivan única y exclusivamente las quinasas de la fase G1, CDK4/CDK6, compitiendo con la ciclina D por la unión a CDK. Debido a la especificidad de sustrato, la acción inhibitoria de estas proteínas es dependiente de la presencia de pRb en la célula. Por ejemplo, en ausencia de pRb, hay una mayor expresión de ciclina E, y la inhibición del complejo CDK4-ciclina D1 no es suficiente para impedir la entrada en la fase S (revisado de Vidal A & Koff A, 2000). La expresión de los miembros de esta familia es dependiente de tipo celular, aunque se conoce muy poco acerca de las vías que pueden regular su expresión, a excepción de p15^{INK4b}, el cual es inducido por TGF-beta (Hannon GJ & Beach D, 1994).

La familia CIP/KIP incluye a p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, y p57^{KIP2}. Estas proteínas contienen un dominio inhibitor N-terminal, el cual es necesario y suficiente para unir e inactivar los complejos formados por CDK4 y CDK2 con sus respectivas ciclinas, actuando como inhibidores estequiométricos. Aunque *in vitro* pueden inhibir todos los complejos de la fase G1, y en menor extensión, el complejo CDK1-ciclina B, estudios *in vivo* muestran la unión preferencial al complejo CDK2-ciclina E (revisado de Vidal A & Koff A, 2000).

Tanto en respuesta a señales anti-mitogénicas como a daño en el DNA, p21^{CIP1} y p27^{KIP1} se unen a los complejos CDKs-ciclinas inhibiendo su actividad catalítica e induciendo un arresto del ciclo celular. p21^{CIP1} fue el primer CKI identificado, y se describió como una proteína asociada a CDK2 en un sistema de doble híbrido (Harper JW, et al., 1993), unida al complejo CDK2-ciclina (Xiong Y, et al., 1993), como inhibidor del crecimiento en células senescentes (Noda A, et al., 1994), o como inhibidor en células donde está activada la vía de p53 (El-Deiry WS, et al., 1993). La regulación de su expresión es básicamente a nivel transcripcional aunque pueden estar implicados también mecanismos de estabilidad del RNA mensajero (revisado de

Vidal A & Koff A, 2003). p21^{CIP1} está implicada en el arresto del ciclo celular mediado por p53 en respuesta a daño en el DNA, conteniendo su promotor sitios de unión a p53 implicados en la inducción transcripcional de este inhibidor (El-Deiry WS, et al., 1993). Además, es capaz de asociarse con PCNA, la subunidad delta de la DNA polimerasa, en un mecanismo adicional por el cual puede inhibir la síntesis de DNA (Zhang, et al., 1993).

Tanto por su implicación en el *checkpoint* de daño al DNA como en su posible papel en la inactivación de PCNA, se plantea como posible papel de p21^{CIP1} el control de la replicación del DNA, siendo este hecho consistente con la observación de que la expresión de este inhibidor se induce con la entrada en el ciclo celular en numerosos tipos celulares (revisado de Vidal A & Koff A, 2003). Entre otras funciones de p21^{CIP1} como regulador positivo del ciclo celular, y que en este caso son compartidas por p27^{KIP1}, están las de facilitar el ensamblaje y la localización nuclear de complejos CDK4-ciclina D, así como incrementar la estabilidad de las ciclinas D (Sherr C & Roberts J, 1999).

p27^{KIP1}, por su parte, fue descrita como un inhibidor de la actividad de CDK2 en células inhibidas por contacto o tratadas con TGF-beta (Polyak K, et al., 1994 a y b; Koff A, et al., 1993). Al mismo tiempo, fue clonada en un sistema tri-híbrido como una proteína que interactuaba con el complejo CDK4-ciclina D (Toyoshima and Hunter, 1994). La regulación de la expresión de este inhibidor es algo compleja y puede variar en dependencia del estímulo, el tipo celular o incluso, la fase del ciclo celular. A modo de ejemplo, Koff y colaboradores describieron que en células HL-60 los niveles de mRNA de p27^{KIP1} se mantenían constantes a lo largo del ciclo celular, mientras que los niveles de proteína eran máximos en células diferenciadas (acumuladas en G0) y disminuían al re-entrar nuevamente en el ciclo celular hasta desaparecer durante el tránsito G1-S, demostrando que en estas células, p27^{KIP1} es regulada durante el ciclo celular básicamente por mecanismos post-transcripcionales. Durante la fase S, el mecanismo de regulación predominante en p27^{KIP1} es la degradación vía proteasoma, mientras que la acumulación de proteína observada en células paradas en G0 es una consecuencia del incremento de los niveles de mRNA en los polirribosomas (Millard S, et al., 1997). Otros trabajos han descrito además una regulación transcripcional (Zhang Y et al., 1997), traduccional (Hengst L & Reed SI, 1996), y más recientemente una regulación de la localización subcelular de p27 (Sgambato A, et al., 2000; Kim TY, et al., 2001) como mecanismos implicados en la expresión de los niveles de este inhibidor a lo largo del ciclo celular.

Los estudios realizados en los últimos años han permitido dilucidar la importancia de la localización subcelular en la regulación de la actividad de p27. Puesto que sólo el componente nuclear de p27 es capaz de unir e inhibir la actividad de los complejos CDKs-

ciclinas presentes en el núcleo, el secuestro de esta proteína al citosol podría inactivar la función de este inhibidor. Este mecanismo es importante para el mantenimiento de la actividad de los complejos CDKs-ciclinas en células transformadas (revisado de Sgambato A, et al., 2000). Estudios recientes realizados en células endoteliales de la córnea de conejo (CEC), muestran que TGF-beta2 inhibe la expresión de CDK4 impidiendo de esta forma la fosforilación de p27, lo cual es un pre-requisito indispensable para el transporte nuclear de este inhibidor y su consiguiente degradación, bloqueando de esta forma la progresión del ciclo celular al mantener p27 de forma activa en el núcleo (Kim TY, et al., 2001).

Complejo proteínas pockets-E₂Fs: La familia de proteínas pockets constituyen uno de los sustratos más importantes de las CDKs durante la fase G1 del ciclo celular y son reguladores negativos del ciclo celular (revisado en Graña X, et al., 1998; Vidal A & Koff A, 2000). La forman el producto del gen supresor tumoral de retinoblastoma (pRb), p107 y p130. Todas estas proteínas comparten homología de secuencia en el dominio C-terminal (o dominio pocket), el cual es necesario para la interacción con oncoproteínas virales así como para la asociación con miembros de la familia de factores de transcripción E2Fs, conteniendo, además, múltiples sitios para la fosforilación por CDKs. Sin embargo, tanto p107 como p130 difieren de Rb en algunos aspectos como son, por ejemplo, la existencia de secuencias de unión a los complejos ciclina E/ciclina A-CDK2 (de alta afinidad), los cuales no están presentes en Rb, y que se ha demostrado que estarían implicados en el bloqueo del ciclo celular mediado por p107 (Zhu L, et al., 1995), así como la presencia en p130 y p107 de una secuencia próxima a la región N-terminal y que podría estar implicada en la función asociada a estas proteínas como inhibidoras de CDKs (Woo M, et al., 1997; Castano E, et al., 1998). Otra de las características que diferencian a los miembros de esta familia es su patrón de expresión a lo largo del ciclo celular así como la especificidad de unión a los diferentes miembros de la familia de E2F (ver más adelante).

Los factores de transcripción E2Fs, por su parte, constituyen una familia formada por al menos 8 miembros, divididos en dos grupos: E2F1, E2F2, E2F3, E2F4, E2F5 y E2F6 por una parte, mientras que DP1 y DP2 constituye el otro grupo. El producto proteico de estos grupos heterodimeriza para dar lugar al complejo funcionalmente activo E2F-DP, existiendo *in vivo*, todas las combinaciones posibles de estos complejos (revisado de Trimarchi JM, et al., 2002). Recientemente se ha descrito a E2F7 como un nuevo miembro de esta familia que se une al DNA de forma DP-independiente (Logan N, et al., 2004).

Los diferentes miembros de la familia de E2Fs se subdividen en dos grupos de acuerdo a sus propiedades transcripcionales: E2F1, E2F2 y E2F3 son potentes activadores transcripcionales

considerados actualmente como los E2Fs “activadores”. En las células normales, la actividad de este subgrupo está regulada específicamente por su asociación con pRb, pero no con p107 o p130 (Lees J, et al., 1993) y su función “activadora” viene dada por la fosforilación de pRb en la fase G1 tardía que propicia la disociación del complejo pRb-E2F y la activación de la transcripción de genes dianas.

Por el contrario, E2F4 y E2F5 están implicados en la “represión activa” de genes con respuesta a E2F reclutando a proteínas pockets y asociándose a histonas deacetilasas. Ambos E2Fs se expresan abundantemente en células quiescentes, a diferencia de los E2Fs activadores, cuya expresión es característica de células proliferando. Por otra parte, E2F5 es básicamente regulada por p130, mientras que E2F4, cuyos niveles de expresión son mayores que los de otros miembros de la familia, puede unirse tanto a p130, p107 y pRb en los diferentes puntos del ciclo celular (revisado de Trimarchi JM, et al., 2002). Finalmente, E2F6 actúa también como un represor transcripcional, aunque su actividad represora es independiente de la regulación por las proteínas pockets (Trimarchi JM, et al., 1998) (figura 113).

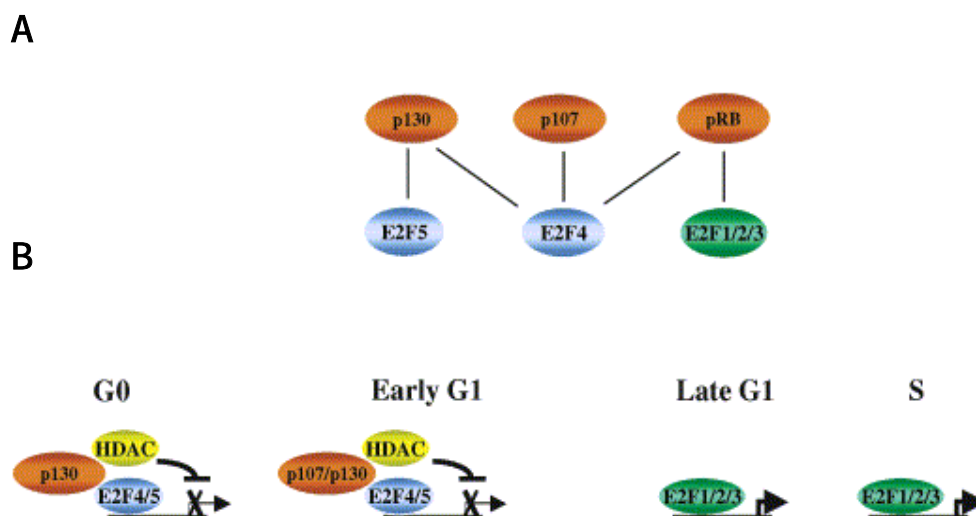


Figura 113: A) Especificidad de unión de las proteínas pockets a los diferentes miembros de la familia de E2Fs.

B) Papel de los complejos proteínas pockets-E2Fs como represores o activadores transcripcionales durante la progresión del ciclo celular. (Cam H & Dynlacht BD, 2003)

Está ampliamente aceptado que el estado de fosforilación de las proteínas pockets es responsable de la regulación de su interacción con los factores de transcripción E2Fs y esta fosforilación es mediada por la actividad de los complejos CDKs-ciclinas a lo largo del ciclo celular. Así pues la hiperfosforilación de las proteínas pockets hacia la mitad de la fase G1 es

funcionalmente importante pues está asociada con la pérdida de la actividad inhibidora del crecimiento de estas proteínas, la cual es mediada a través de su asociación específica con los diferentes miembros de la familia de E2Fs. Por el contrario, el estado hipofosforilado de las proteínas p130 mantiene secuestrado los factores E2Fs, bloqueando de esta manera la progresión del ciclo celular. En células quiescentes y/o diferenciadas p130 se expresa abundantemente en dos formas fosforiladas (1 y 2), coincidiendo con la acumulación del complejo p130-E2Fs (Mayol X, et al., 1995; Garriga J, et al., 1998); a diferencia de p107 cuyos niveles son prácticamente indetectables y de pRb, que permanece hipofosforilado (Graña X, et al., 1998). Por el contrario, cuando las células progresan en el ciclo celular, las tres proteínas p130, p107 y pRb son hiperfosforiladas por los complejos CDKs-ciclinas durante la transición de G0-G1 y hacia la mitad de la fase G1, produciéndose cambios, además, en sus niveles de proteína: mientras la hiperfosforilación de p130 hacia la forma 3 viene acompañada de una bajada dramática de sus niveles de expresión durante la progresión hacia la fase S (Mayol X, et al., 1995, 1996), p107 se induce rápidamente en un proceso regulado transcripcionalmente (Hurford RK, et al., 1997) mientras que los niveles de pRb permanecen más o menos constantes durante todo el ciclo celular (figura I14).

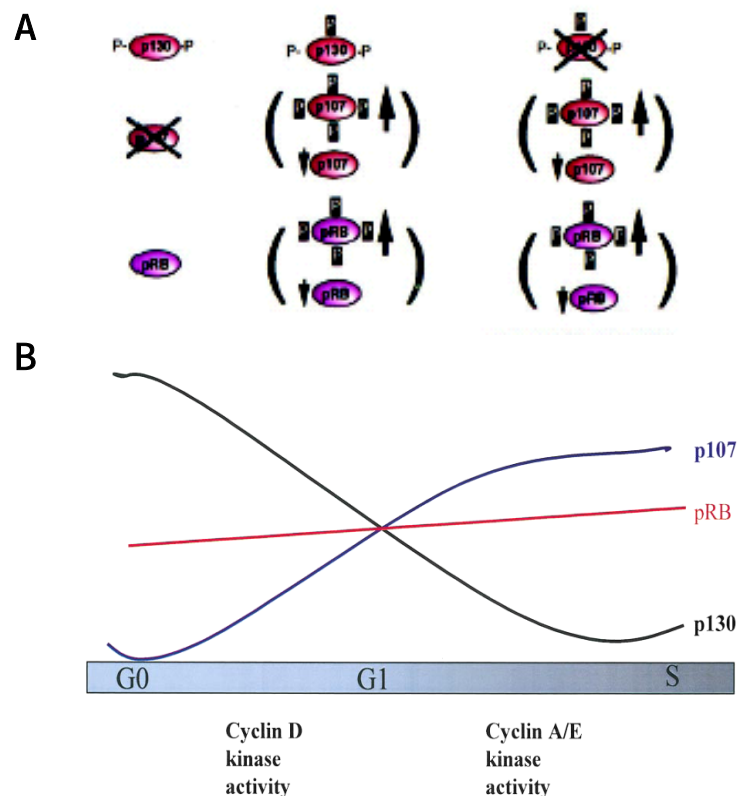


Figura I14: Esquema simplificado de la modulación del grado de fosforilación de las proteínas p130, p107 y pRb (A) así como del patrón de expresión de estas proteínas durante la progresión del ciclo celular (B). (adaptado de Graña X, et al., 1998).

3.2. Una visión molecular del ciclo paso a paso.

Cuando las células son inducidas a proliferar en respuesta a señales procedentes de factores de crecimiento, hay una activación del oncogén Ras, y de las diferentes vías de transducción de señales derivadas de su activación, produciéndose un cambio en el patrón de expresión génica que implica la inducción de los llamados genes tempranos ("*early genes*"), como por ejemplo los factores de transcripción CREB, c-Jun y c-Fos. De esta manera se activa la expresión de los genes que codifican para las ciclinas D (D1, D2 y D3). El aumento y estabilidad de los niveles de estas ciclinas permite su acoplamiento con las subunidades catalíticas específicas CDK4 y CDK6, cuyo complejo es esencial para la entrada en la fase G1 (Sherr CJ, 1994).

Hacia la mitad de la fase G1, el complejo CDK4/6-ciclina D1 activo fosforila el producto del gen supresor tumoral del retinoblastoma (pRb), así como también el de otros miembros de la familia génica de "proteínas pockets" p107 y p130. Esta fosforilación, aunque es parcial, suprime la actividad transcripcional represora de la proteína histona deacetilasa (HDAC) asociada al complejo pRB-E2F lo cual es suficiente para inducir la transcripción temprana de algunos genes necesarios para la progresión hacia la fase S como es el caso de ciclina E. Así pues, la inducción transcripcional de ciclina E favorecerá la formación del complejo CDK2-ciclina E. La actividad quinasa de este complejo es capaz de hiperfosforilar completamente pRB, disociando el complejo pRB-E2F y liberando los factores de transcripción E2F1 y DP-1, los cuales regulan positivamente la transcripción de genes cuyos productos son elementos reguladores del ciclo entre los que están ciclina A, CDC2, Cdc25, o enzimas implicadas en la síntesis de nucleótidos y la replicación del DNA como por ejemplo la dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina quinasa (TK) o la DNA polimerasa α así como del propio E2F1 (Johnson DG, et al., 1998; Vidal A & Koff A, et al., 2000). Otro de los sustratos del complejo CDK2-ciclina E es su inhibidor p27^{KIP1}, cuya fosforilación en la Thr-187 induce su degradación vía proteasoma (Montagnoli A, et al., 1999) incrementando de esta forma la actividad de estos complejos. Además, los complejos CDK4/6-ciclina D secuestran p27^{KIP1} haciendo menor la inhibición que este ejerce sobre los complejos CDK2-ciclina E que se están formando. Por otra parte, NPAT, una proteína nuclear mapeada en el locus ATM y que está asociada con p27 también es fosforilada por el complejo CDK2-ciclina E. NPAT, cuyos niveles de expresión incrementan hacia el final de la fase G1, se ha descrito que puede jugar un papel importante en la entrada en la fase S (revisado de Vermeulen K, et al., 2003). Así pues, la actividad del complejo CDK2-ciclina E es importante para iniciar la fase S. Durante la fase S, el complejo CDK2-ciclina E es también importante para la replicación del centrosoma (revisado en Hinchcliffe EH y Sluder G, 2000).

Una vez iniciada la fase S, tiene lugar un bloqueo de la actividad del complejo CDK2-ciclina E pues sino podría haber problemas de re-replicación por un inicio repetitivo de la síntesis del DNA. Para ello, hay un mecanismo de retroalimentación negativa, donde la propia actividad del complejo fosforila la ciclina E en la treonina Thr380 y que conduce a su degradación por proteólisis mediada por ubiquitinación (Reed SI, 2003) provocando una bajada de los niveles de esta ciclina así como una significativa disminución de la actividad quinasa del complejo en el principio de la fase S. La hiperfosforilación sostenida de las proteínas pockets favorece la acumulación de ciclina A hacia el final de la fase G1 así como la formación del complejo CDK2-ciclina A al inicio de la fase S. La actividad del complejo CDK2-ciclina A regula la iniciación de la replicación del DNA por fosforilación de la DNA polimerasa alfa (revisado de Vermeulen K, et al., 2003). Además, este complejo es capaz de fosforilar DP1 e impedir la asociación del factor de transcripción E₂F1 al DNA, de forma tal que se inactivan todos los genes que han estado activos durante el final de la fase G1 (Sherr CJ, 1996).

Una vez concluida la replicación del DNA, se inicia la fase G2 del ciclo celular, donde la célula comprueba que la síntesis de DNA se ha producido correctamente. Hacia el final de la fase G2, la ciclina A2 puede unirse a CDK1, promoviendo la entrada en mitosis, para ser posteriormente degradada durante la metafase vía proteólisis mediada por ubiquitinación. Durante esta fase se va acumulando ciclina B. Esta ciclina también forma complejos con la CDK1, y aunque su síntesis se inicia durante la fase S tardía, el complejo se mantiene inactivo por fosforilación inhibitoria de los residuos Y15, T14 y T160 de la CDK1 llevada a cabo por la quinasa Wee1 (McDonald ER, 2000). La activación del complejo tiene lugar al iniciarse la mitosis, y en esta regulación está implicada la fosfatasa Cdc25C.

Esta activación del complejo CDK1-ciclina B actúa también como un mecanismo de retroalimentación positiva pues su propia actividad quinasa es capaz de activar la Cdc25C e inhibir Wee1 de manera que durante el inicio de la fase M hay una acumulación importante del complejo activo, esencial para la progresión de la mitosis. Otros sustratos del complejo CDK1-ciclina B son proteínas del citoesqueleto, como son las que forman la lámina nuclear, los microtúbulos y la vimentina, que también son requeridas para una correcta mitosis. Un mecanismo de retroalimentación negativa provoca la degradación de la ciclina B antes de finalizar la mitosis, de manera similar a lo que ocurre con ciclina E antes de finalizar la fase S. Una vez es completada la mitosis, pRB es defosforilado y las células comienzan a sintetizar nuevamente ciclina E, mientras que las señales mitogénicas se encargan de inducir las ciclinas D. De esta manera, comienza otra tanda de división celular.

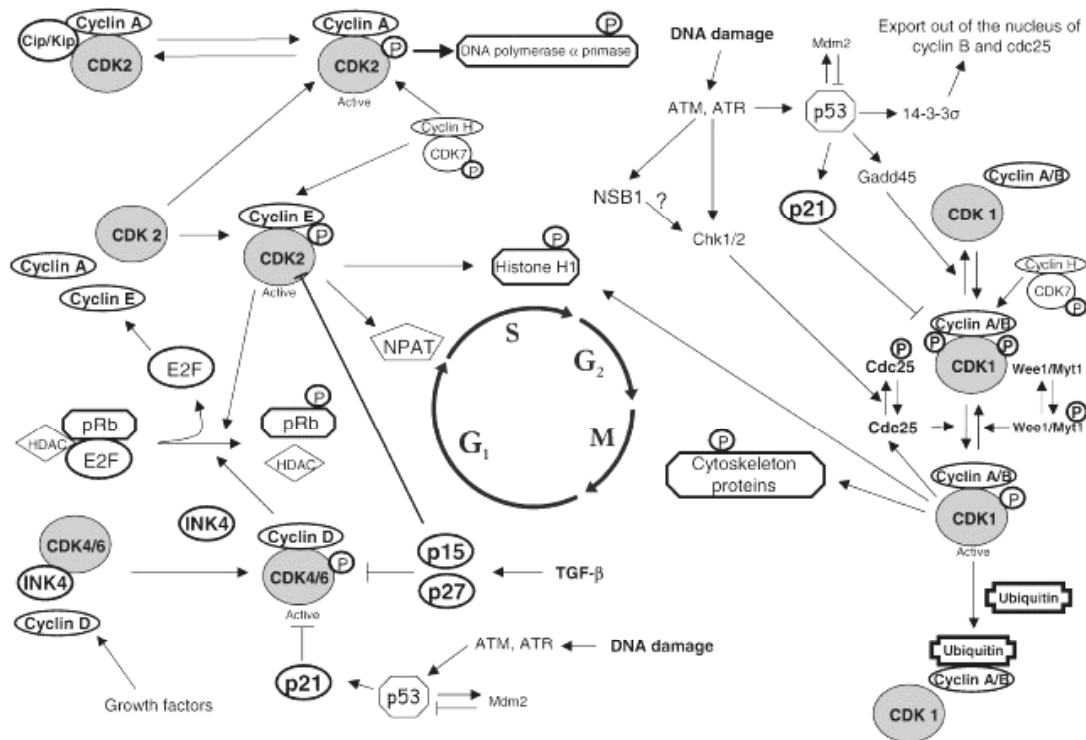


Figura 115: Esquema representativo de los puntos más relevantes de regulación del ciclo celular (tomado de Vermeulen K, et al., 2003).

4. ADHESIÓN CELULAR

Las uniones intercelulares proporcionan la cohesión, la permeabilidad selectiva y la resistencia características del tejido epitelial. Las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular intervienen en la formación de los dominios membranales apical y basolateral. Estos dominios, estructural y funcionalmente distintos, están caracterizados por la expresión diferencial de proteínas, lípidos y estructuras de anclaje célula-célula que se disponen de manera asimétrica en el eje basal-apical y que determinan tanto el destino celular como su fenotipo.

4.1. Tipos de uniones célula-célula

La adhesión entre células epiteliales está mediada, de forma general en mamíferos, por tres tipos de uniones: las uniones estrechas, las uniones adherentes y los desmosomas, las cuales constituyen el complejo de unión intercelular (figura 116):

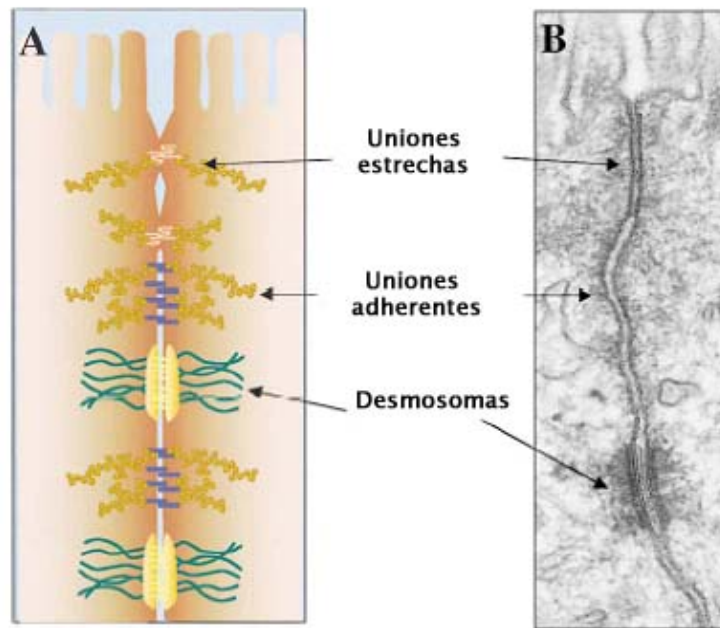


Figura 116. Composición del complejo de unión intercelular en el epitelio polarizado. A: diagrama representativo de los tres tipos de uniones presentes en las células epiteliales: comenzando por la zona más apical encontramos primeramente las uniones estrechas, después las uniones adherentes y por último los desmosomas. B: foto de microscopía electrónica que permite mostrar detalles de la ultraestructura de estas uniones entre dos células epiteliales intestinales de ratón (tomada de Perez-Moreno M, et al., Cell 2003).

Las uniones estrechas (TJ) forman una especie de cinturón continuo situado en la zona más luminal del espacio intercelular, el cual sirve como barrera de difusión entre las células que regula el paso de iones, agua y algunas macromoléculas a través del espacio paracelular, restringiendo de esta forma también la difusión lateral de lípidos y proteínas entre los distintos dominios de la membrana y contribuyendo de forma importante al mantenimiento de la asimetría basal-apical. Adicionalmente, se ha descrito que las TJs juegan un papel importante en la organización de procesos como la morfogénesis, polaridad celular, proliferación y diferenciación celular (revisado de Schneeberger EE & Lynch RD, 2004).

Estas uniones están formadas por proteínas integrales de membrana como las ocludinas y claudinas (Furuse M, et al., 1993, 1998) o por miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas JAM1-4 (Martin-Padura I, et al., 1998), que enlazan el espacio apical entre dos células vecinas formando una barrera de difusión intercelular. También existen las proteínas de la placa TJ, muchas de las cuales expresan los dominios PDZ (ZO-1, ZO-2, ZONAB, PAR-3 y PAR-6 entre otras) y que sirven de puente entre las proteínas transmembranas y el citoesqueleto de actina,

y también como adaptadores para el reclutamiento molecular implicado en señalización celular (revisado de Schneeberger EE & Lynch RD, 2004).

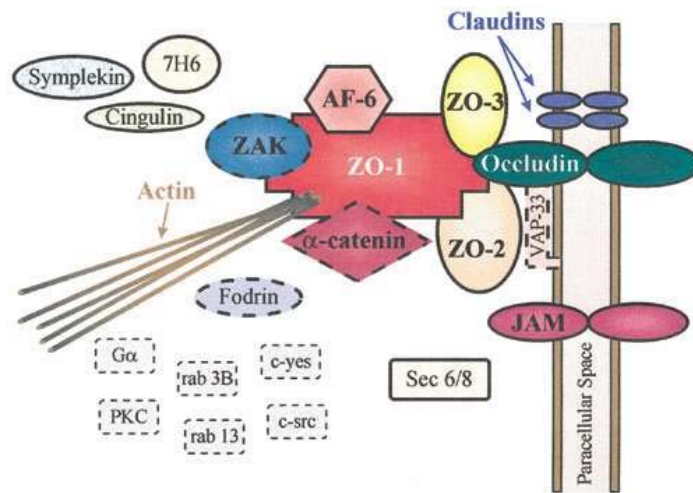


Figura I17: Representación de las diferentes proteínas que forman parte de las uniones estrechas.

El inicio del ensamblaje de las uniones estrechas requiere de los contactos adherentes mediados por la E-cadherina (Siliciano JD, et al., 1988). Más recientemente, Zahraoui y colaboradores han mostrado que diferentes proteínas implicadas en el tráfico de membranas, como son la familia de Rab-GTPasas (específicamente Rab13) también juegan un papel activo en la dinámica del ensamblaje de estas uniones (Marzesco AM, et al., 2002; Kohler K, et al., 2004).

Existen evidencias experimentales que muestran que las interacciones homofílicas y/o heterofílicas que se establecen entre las proteínas transmembrana de las TJ no requieren de calcio extracelular (Kubota K, et al., 1999; Hirabayashi S, et al., 2003). No obstante, trabajos recientes sugieren que este catión juega un papel importante en el mantenimiento y funcionalidad de estas uniones intercelulares, tanto en el epitelio intestinal (Ma TY, et al., 2000), como en células endoteliales de la barrera hematoencefálica (BBB), presumiblemente de manera indirecta, a través de señalización mediada por PKCs (Brown RC, 2002).

Las uniones adherentes se establecen entre células adyacentes en forma de contactos puntuales o asociadas en cintas alrededor de las células (*adhesion belts*). A través de estas uniones se ponen en contacto los citoesqueletos de las células vecinas confiriendo, de esta forma, resistencia mecánica al tejido y proporcionando puntos de anclaje para los propios movimientos del citoesqueleto.

Las proteínas que forman los contactos homotípicos en las uniones adherentes son las cadherinas. Las cadherinas constituyen una superfamilia de proteínas transmembranas (descritas alrededor de 80 miembros), entre las que destaca la E-cadherina, expresada principalmente en células epiteliales maduras (revisado de Tepass U, et al., 2000; Gooding JM, et al., 2004).

En las células epiteliales, la adhesión entre células vecinas tiene lugar a través de los homodímeros de E-cadherina expresados en la membrana de células adyacentes, los cuales interaccionan entre sí formando una especie de cremallera, siendo los iones de calcio del medio extracelular esenciales para la correcta conformación y estabilidad entre moléculas de E-cadherina.

Para la correcta funcionalidad de las uniones adherentes, la E-cadherina interacciona, además, con el citoesqueleto de actina. Esta interacción tiene lugar a través del extremo citosólico de la E-cadherina, que forma complejos con las cateninas α , β , γ (Cowin P & Burke B, 1996), tal y como se ilustra en la figura I18. A su vez, la α -catenina se une a través del extremo carboxilo terminal a los filamentos de actina del citoesqueleto (figura I18). La E-cadherina también interacciona a través de su dominio citosólico con otra catenina, p120^{ctn}, la cual recientemente se ha descrito como un regulador positivo de la función de esta molécula en células tumorales intestinales (Roura S, et al., 2004; Gout S, et al., 2004).

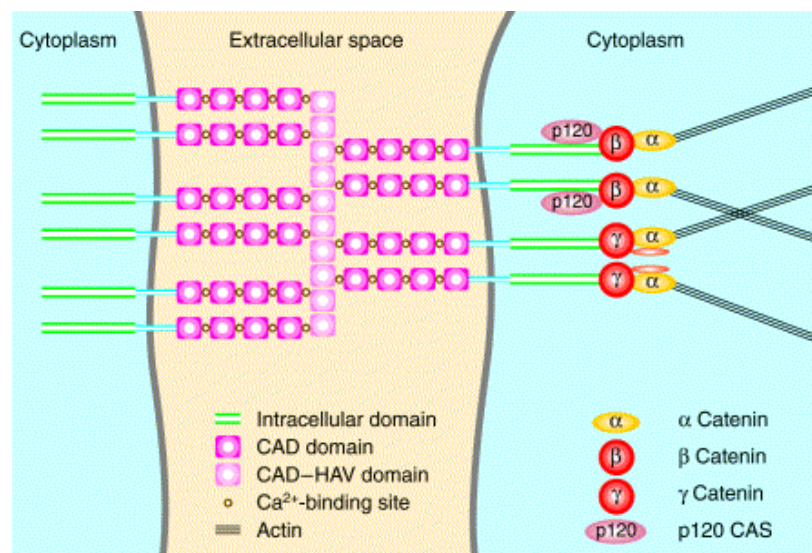


Figura I18: Contactos adherentes mediados por la E-cadherina. (Tomado de Christofori G & Semb H, 1999). La E-cadherina se asocia lateralmente en la superficie de la membrana formando homodímeros (*cis* dímeros), los cuales interaccionan con los homodímeros de células adyacentes (*trans*-dímeros) formando una especie de cremallera. El calcio es esencial para la formación de los *cis* y *trans*-dímeros. Por otra parte, el complejo de adhesión intracelular sirve de conexión a la E-cadherina con el citoesqueleto de actina.

Las cadherinas y las uniones adherentes no solo mantienen la integridad de células y tejidos. El hecho de que algunos de sus elementos estén implicados en la transducción de señales amplía sus posibilidades funcionales, desde la adhesión celular y morfogénesis hasta la señalización y diferenciación celular (ver apartado 4.2).

Los desmosomas son regiones engrosadas de la membrana plasmática donde las células están estrechamente unidas con sus vecinas. Aumentan la rigidez de los tejidos manteniendo las células firmemente unidas y actúan como sitios de anclaje de los filamentos intermedios, necesarios para el mantenimiento de la arquitectura celular. Son heterogéneos en composición, aunque muestran el modelo clásico de adhesión célula-célula mediado por glicoproteínas de la superfamilia de las cadherinas, siendo la desmogleína y desmocolina las principales cadherinas desmosomales presentes en estas uniones. Estas proteínas, que muestran múltiples isoformas y presentan gran heterogeneidad dependiendo del tipo de tejido (Kljuic A, et al., 2003), conectan con los filamentos intermedios principalmente a través de las desmoplakinas, plakoglobinas y plakofilinas (Kowalczyk AP, et al., 1999).

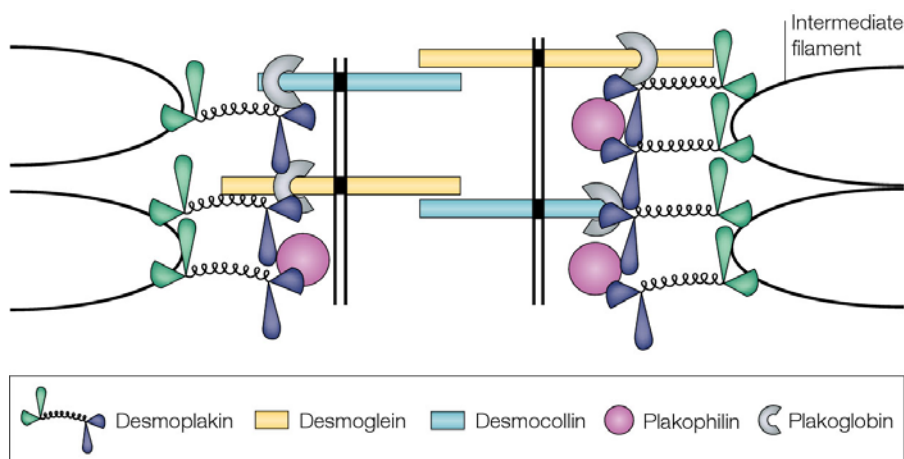


Figura 119: Representación esquemática de los desmosomas. Las regiones extracelulares de las desmogleínas y desmocolinas de células adyacentes forman interacciones homotípicas y/o heterotípicas, las cuales también son dependientes de calcio extracelular. Los dominios citoplasmáticos de estas proteínas interaccionan con las proteínas de la placa desmosomal sirviendo de anclaje a los filamentos intermedios.

Las interacciones homotípicas y/o heterotípicas entre los dominios extracelulares de las cadherinas desmosomales de células adyacentes depende directamente de calcio extracelular (Chitaev NA, et al., 1997; Syed S, et al., 2002). Aunque existen evidencias experimentales a favor de que la formación de las uniones adherentes es un requisito para el ensamblaje de los desmosomas (Keiffer-Combeau S, et al., 2001), cada vez hay más trabajos

que sugieren una interdependencia recíproca entre ambos tipos de uniones celulares. Así pues, por ejemplo, Huen y colaboradores mostraron el desensamblaje de los dos tipos de uniones celulares, desmosomas y uniones adherentes, al sobre-expresar una forma mutada de desmoplakina a la que le faltaba el dominio de interacción con los filamentos intermedios (Huen AC, et al., 2002). De forma similar, experimentos realizados en embriones de ratón carentes de desmoplakina mostraban la imposibilidad de formar desmosomas en la epidermis y en consecuencia, la pérdida de adhesión, incluida la mediada por uniones adherentes (Vasioukhin V, et al., 2001).

4.2. E-cadherina: más allá de las uniones adherentes

Más allá de su función en el establecimiento y estabilidad de las uniones adherentes, la E-cadherina es considerada como un gen supresor tumoral, por su capacidad de interaccionar con la β -catenina y limitar así su concentración en el citosol. Numerosos estudios han mostrado la pérdida de la funcionalidad de la E-cadherina durante el desarrollo de la mayoría de los carcinomas epiteliales, incluyendo los carcinomas de mama, intestino, colon, hígado, próstata, estómago, esófago, piel, riñón así como pulmón (revisado de Christofori G & Semb H, 1999).

Aunque el mecanismo responsable de su pérdida de funcionalidad parece ser epigenético, en algunos tumores se han encontrado delecciones o mutaciones inactivadoras en el gen de la E-cadherina. De forma destacada, se han descrito la presencia de mutaciones germinales en casos de cáncer gástrico familiar que indican que la presencia de mutaciones en el gen de la E-cadherina es suficiente para predisponer a los individuos al desarrollo de tumores malignos (Guilford P, et al., 1998; Oliveira C, et al., 2002; Suriano G, et al., 2003). Otros mecanismos pueden estar afectando directamente la expresión y función de la E-cadherina. Por ejemplo, se han descrito reordenamientos de la cromatina e hipermetilación del promotor en varios tumores epiteliales con la consecuente inactivación transcripcional de la expresión de este gen (Yoshiura K, et al., 1995; Hirohashi and Kanai, 2003). Por otra parte, estudios recientes han descrito la implicación del factor de transcripción Snail como represor transcripcional de la E-cadherina tanto *in vitro* como *in vivo* al unirse a una secuencia específica del promotor (Cano A, et al., 2000; Batlle E, et al., 2000).

Todos estos mecanismos afectan negativamente la expresión de la E-cadherina y comprometen el mantenimiento de las uniones adherentes (Hirohashi S, 1998), contribuyendo a la pérdida de la polaridad epitelial y la adquisición de propiedades invasivas por parte de las células tumorales. Por ejemplo, la invasión y la diseminación de carcinomas bien diferenciados está asociado frecuentemente con la pérdida de la diferenciación epitelial y la ganancia de capacidades mesenquimales de las células tumorales en el frente invasivo.

Estudios realizados en tumores colorrectales bien diferenciados han mostrado que aunque la zona central del tumor expresa niveles elevados de E-cadherina unida a la β -catenina, el frente invasivo presenta mayoritariamente β -catenina nuclear así como una expresión inapreciable de E-cadherina (Brabletz T, et al., 2001). Por otra parte, García de Herreros y colaboradores, en estudios realizados en células HT-29 derivadas de tumores colorrectales que expresan establemente el factor de transcripción Snail, mostraron cambios en el fenotipo de estas células acompañado de alteraciones en la expresión génica propias del fenotipo epitelial: la pérdida del fenotipo epitelial se correspondió con la inhibición de la expresión de marcadores de diferenciación epitelial como MUC1 o citokeratina 18, a cambio de la inducción de genes mesenquimales como fibronectina o el factor de transcripción LEF1 (Guaita S, et al., 2002).

El objetivo general de esta tesis ha sido estudiar los mecanismos celulares y moleculares que controlan el proceso de diferenciación celular de las células de cáncer de colon HT-29 M6 *in vitro*, como modelo experimental de diferenciación celular conservada en el cáncer.

Antecedentes

La línea celular HT-29 M6 activa espontáneamente un programa de diferenciación epitelial *in vitro* de fenotipo mucosecretor, reminiscente de células caliciformes, durante el cultivo en postconfluencia. Este programa de diferenciación está caracterizado por una inhibición de la proliferación celular, aparentemente mediante el fenómeno de inhibición por contacto, que es concomitante con la adquisición de características diferenciadas ya descritas anteriormente, entre otros, en trabajos nuestros de laboratorio y el del Dr. Alain Zweibaum: complejos de unión célula-célula, polarización membranal en dominios apical y basolateral, expresión de proteínas asociadas a estos dominios – particularmente al borde en cepillo apical – y expresión variable de diversas proteínas propias del epitelio intestinal normal (por ejemplo mucinas).

Nuestra hipótesis de trabajo inicial parte de la importancia funcional de los contactos de adhesión, y particularmente de la E-cadherina como molécula de adhesión homotípica, en la diferenciación epitelial. Por un lado, estos contactos son necesarios para la formación del complejo de unión intercelular en los epitelios y para la polarización celular epitelial. Por otro lado, durante la desdiferenciación de células tumorales hacia fenotipos mesenquimales e invasivos, existe una pérdida de los contactos de adhesión, en particular los mediados por E-cadherina; la re-introducción ectópica de E-cadherina en estas células puede por sí misma ser suficiente para revertir el fenotipo invasivo hacia el fenotipo epitelial. Por último, la E-cadherina interacciona con otras moléculas reguladoras de la proliferación y diferenciación celulares (receptores de membrana como el EGF, quinasas transductoras de señales extracelulares, complejos reguladores de la transcripción como β -catenina/TCF-4).

Al contrario de la línea parental HT-29 que presenta mayoritariamente muy pocas características diferenciadas, el proceso de diferenciación en HT-29 M6 incluye la formación de uniones intercelulares homotípicas de E-cadherina, que son dependientes de calcio extracelular. Estudios previos del grupo del Dr. Antonio García de Herreros en nuestra Unidad han mostrado que métodos con los que se suprime este proceso de diferenciación conllevan bien la disociación de complejos E-cadherina con el citoesqueleto de actina y la consecuente pérdida de funcionalidad de estos contactos, por ejemplo durante la inducción de *scattering* por el éster de forbol PMA (Llosas MD, et al., 1996), o bien la no expresión de E-cadherina durante la inducción de un fenotipo mesenquimal por expresión

ectópica del factor de transcripción *Snail* (Batlle E, et al., 2000). Por tanto, el modelo de HT-29 M6 constituye un buen sistema donde estudiar la implicación de tales contactos en la diferenciación celular.

Finalmente, el hecho de que la línea celular HT-29 M6 presente mutaciones en APC y p53, así como un fenotipo de inestabilidad cromosómica y aneuploidía, de forma similar a lo que ocurre en la mayoría de tumores colorrectales, hace que constituya un modelo representativo del cáncer colorrectal donde estudiar la conservación o pérdida de mecanismos de diferenciación celular durante la progresión tumoral.

Hipótesis de trabajo

En nuestra hipótesis de trabajo inicial proponemos la posibilidad de que los contactos de adhesión actúen como señales inductoras y/o permisivas de todo o parte del programa de diferenciación celular *in vitro* de HT-29 M6. Debido a que la diferenciación *in vitro* incluye diversos procesos (inhibición por contacto, polarización celular y expresión génica), nos preguntamos como se coordinan estos procesos durante la diferenciación y si, manipulando la formación de los contactos de adhesión, podemos diseccionar algunas de sus vías de regulación.

Sobre la base de esta hipótesis, nuestro propósito inicial ha sido estudiar qué consecuencias tiene sobre la diferenciación *in vitro* de HT-29 M6 el disminuir la concentración extracelular de calcio hasta niveles ($<100 \mu\text{M}$) que no permiten la formación de contactos adherentes. Esta supresión de la adhesión intercelular ha sido puesta a punto anteriormente por otros laboratorios (Hennings H, et al., 1980) y es el método comúnmente usado para estudiar la cinética de reformación de contactos al restablecer la concentración estándar de calcio extracelular (2 mM). A partir de los efectos observados mediante esta primera aproximación, hemos desarrollado un proyecto con la intención de revelar algunas de las vías de regulación implicadas en el proceso de diferenciación *in vitro*.

Objetivos

Así pues, los objetivos planteados en este trabajo son los siguientes:

1. Estudiar las consecuencias de deplecionar parcialmente el calcio extracelular sobre el proceso de diferenciación *in vitro* de HT-29 M6:
 - 1.1- En la epitelialización (formación del fenotipo epitelial polarizado).
 - 1.2- En la inhibición por contacto.

- 1.3- En la regulación de la expresión génica de marcadores de diferenciación.
- 1.4- En la capacidad de migración celular como parámetro de desdiferenciación hacia un fenotipo invasivo.

2. Estudiar si el proceso de diferenciación *in vitro* es reversible y su relación con el estado de diferenciación terminal.

3. Estudiar la posible implicación de moléculas controladoras del ciclo celular en la regulación de la expresión génica durante la diferenciación *in vitro* de las HT-29 M6.

1. CONSECUENCIAS DE DEPLECIONAR PARCIALMENTE EL CALCIO EXTRACELULAR SOBRE EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS HT-29 M6:

Para inhibir la formación de contactos intercelulares dependientes de calcio durante la diferenciación *in vitro* de HT-29 M6 utilizamos unas condiciones de cultivo limitantes en calcio extracelular. El método utilizado consistió en someter el FBS a una columna de intercambio de cationes divalentes (ver Materiales y Métodos), la cual depleciona parcialmente los iones de calcio, y usar este FBS como única fuente de calcio extracelular en el medio de cultivo, según ya se ha descrito anteriormente (Hennings H et al., 1980). Las medidas realizadas sobre el medio de cultivo suplementado con un 10% de FBS así procesado dieron una concentración de calcio aproximada de 20-100 μM en los diferentes lotes de depleción, mientras que el mismo medio conteniendo FBS sin tratar dio una concentración de 2 mM, aproximadamente. Al estar la concentración intracelular de calcio en un rango 100-200 nM (Bou-Hanna et al., 1994), estos datos indican que el gradiente extracelular-intracelular de calcio se encuentra conservado en proporción 1/200 como mínimo. Llamaremos CEN a las condiciones de calcio extracelular normales (2 mM) y CEB a las condiciones de calcio extracelular bajo (<100 μM).

1.1- EN LA EPITELIALIZACIÓN (FORMACIÓN DEL FENOTIPO EPITELIAL POLARIZADO)

Puesto que al limitar la concentración de calcio extracelular pretendemos evitar la formación de contactos célula-célula dependientes de esta molécula, nuestro primer objetivo fue analizar cómo este tratamiento afecta a la adhesión intercelular y a la polarización epitelial durante el crecimiento hacia confluencia de células HT-29 M6, previa caracterización morfológica del proceso de diferenciación.

RESULTADOS

Las células HT-29 M6 muestran un fenotipo de diferenciación epitelial mucosecretora en cultivos postconfluentes

El cultivo en condiciones estándar (CEN) de células HT-29 M6 conduce a un 100% de confluencia a los 3-4 días después de una siembra realizada a 2×10^5 células/cm² (50% de confluencia, aproximadamente), según descrito anteriormente (Navarro E, et al., 1999). Al estudiar la cinética de crecimiento en los días siguientes, comprobamos que la población todavía pudo duplicarse una vez (ver figura R7B), de manera que a los 9 días de la siembra se había formado una multicapa de 2 ó 3 células de grosor aparentemente poco organizada, que también podría corresponder a una monocapa pseudoestratificada, tal

como puede observarse en cortes semifinos transversales a la superficie de cultivo (figura R1, ver también figura R2A). Definimos esta etapa como el *estadio temprano* del proceso de diferenciación *in vitro*. Durante los días siguientes y sin producirse ningún cambio en el número de células del cultivo, esta multicapa/monocapa pseudoestratificada se reorganizaba gradualmente para formar una monocapa de células columnares más compactada, la cual llegaba a abarcar el 80-90% de la superficie del cultivo después de las 2-3 semanas de la siembra (Figura R1, ver también figura R2C). A esta etapa del proceso de diferenciación *in vitro* la hemos denominado *estadio tardío* de la diferenciación.

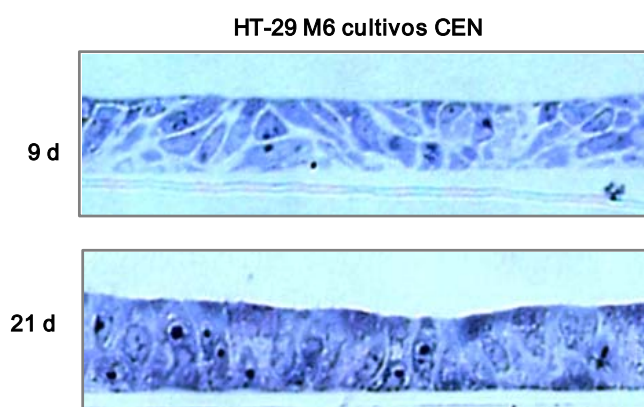


Figura R1: Cortes semifinos transversales al plano de adhesión al sustrato (teñidos con azul de metileno) de células HT-29 M6 a los 9 y 21 días de cultivo, donde se aprecia la reorganización morfológica que tiene lugar de 9 a 21 días, con la consecuente formación de una monocapa de células más compactada y organizada.

Para analizar en detalle los cambios morfológicos que ocurren durante este proceso realizamos un estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión a partir de cortes transversales al plano de adhesión celular al sustrato de cultivo.

A los 9 días de cultivo CEN, una vez alcanzado el estadio temprano de la diferenciación, la multicapa formada presentaba una capa apical de células que habían formado complejos de unión, incluyendo uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas (figura R2A, B), que son una estructura esencial para la polarización membranar en dominios apical y basolateral. La membrana apical presentaba numerosas microvillosidades en su totalidad, sin llegar al nivel de organización de un borde en cepillo maduro. Estas células apicales se mantenían unidas a las capas celulares más basales, y éstas entre sí, mediante desmosomas. Las zonas de membrana basolateral entre desmosomas adyacentes presentaban espacios intercelulares abiertos con presencia de microvillosidades, indicando inmadurez de la conexión lateral célula-célula (figura R2B).

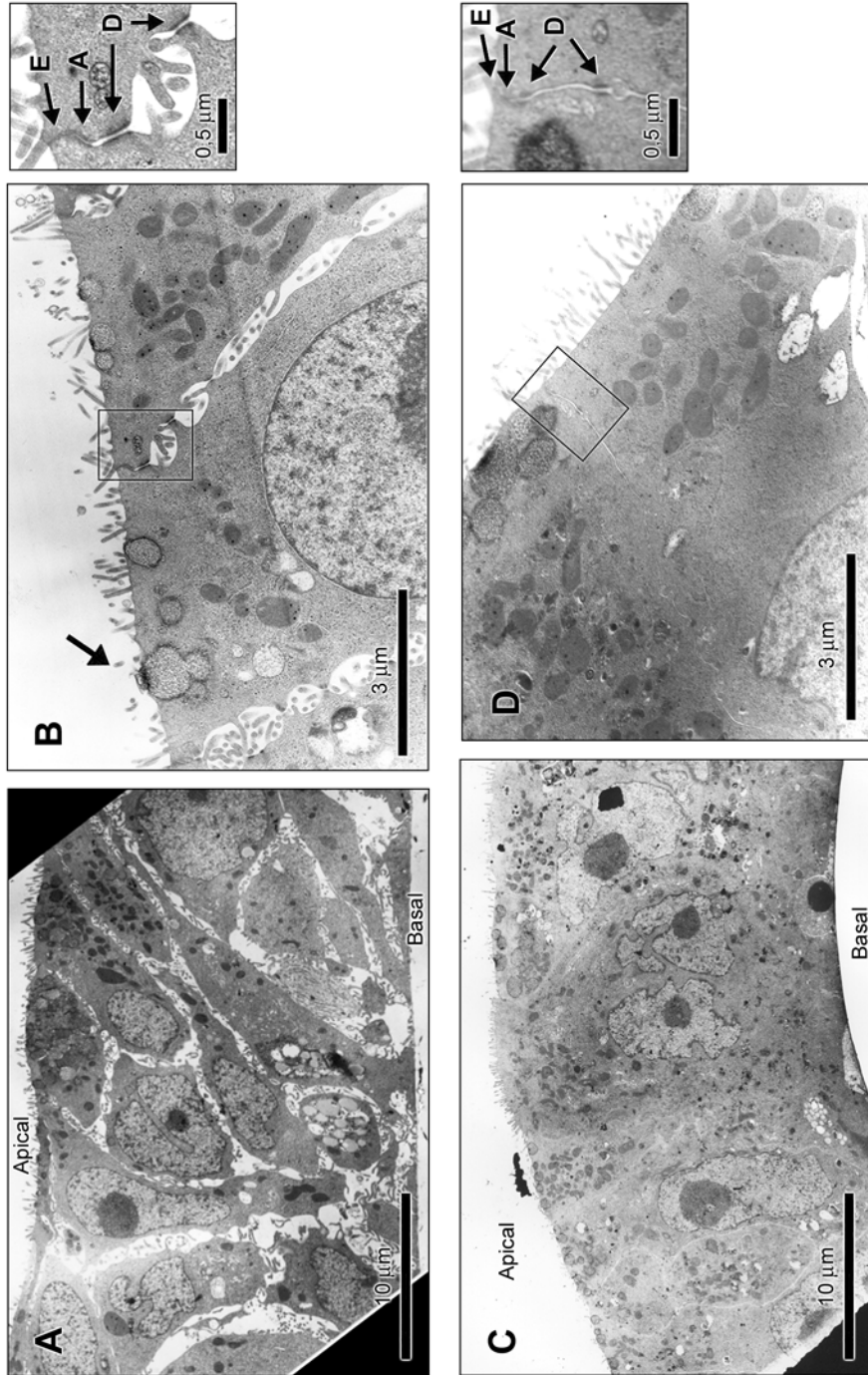


Figura R2: Análisis ultraestructural de cultivos CEN a los 9 y 21 días. A los 9 días de cultivo (A, B) hay inmadurez de la interacción lateral célula-célula, evidenciado por la presencia de espacios intercelulares abiertos. Destaca la presencia de figuras de secreción (B, con flecha) así como la formación de los complejos de unión intercelular: uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas (ampliación de la figura B, señalado con flechas). A los 21 días de cultivo (C, D) han desaparecido los espacios membranales, indicativo de la madurez en la conexión lateral célula-célula. Sin embargo, tanto a los 9 como a los 21 días las uniones estrechas, adherentes y los desmosomas no alcanzan el grado de madurez del tejido adulto normal.

Por otro lado, las células de la capa apical presentaban también vesículas de moco en el citoplasma apical, con figuras frecuentes de exocitosis y liberación del contenido al espacio extracelular (figura R2B), que son características de la diferenciación de HT-29 M6 (Lesuffleur T, et al, 1993).

El análisis ultraestructural de cultivos a los 21 días de la siembra mostró que, además de la presencia de las mismas características de diferenciación epitelial, el estadio tardío de la diferenciación implicaba la formación de una monocapa mayoritaria de células polarizadas y una mayor madurez de las uniones laterales célula-célula, desapareciendo los espacios intermembranales basolaterales (figura R2C, D). De acuerdo con la ultraestructura, el seguimiento visual de las placas de cultivo mostró la presencia de la capa de moco característica de los cultivos postconfluentes de HT-29 M6 a partir de los 4-5 días de cultivo.

Por tanto, después de 9 días de una siembra a 2×10^5 células/cm² (estadio temprano de la diferenciación) las uniones intercelulares ya han sido formadas (particularmente los contactos de adhesión), las células ya están polarizadas en dominios membranales, y la diferenciación mucosecretora ha sido ya inducida.

Bajas concentraciones de calcio extracelular en el medio de cultivo evitan la formación de uniones intercelulares e impiden la diferenciación morfológica característica de cultivos HT-29 M6 postconfluentes.

Con la intención de determinar si la depleción parcial del calcio extracelular afecta a la formación de contactos de adhesión, analizamos la localización subcelular de E-cadherina y β -catenina en células cultivadas sobre cubreobjetos durante 9 días en condiciones CEN o CEB. Las muestras fueron analizadas mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal.

El análisis de E-cadherina mostró una tinción específica a lo largo de la membrana lateral en condiciones de cultivo CEN, patrón característico de células epiteliales polarizadas (figura R3A). En cambio, cultivos CEB no mostraron una localización de E-cadherina membranal sino citoplasmática. Algo parecido se observó al analizar β -catenina: en condiciones CEN esta se localizó en el extremo más apical de la membrana basolateral, coincidiendo con la zona donde normalmente se encuentran las uniones adherentes, mientras que en condiciones CEB se localizó dispersa por todo el citoplasma (figura R3B).

Estos resultados muestran que el cultivo en condiciones limitantes de calcio impide la localización de E-cadherina y β -catenina en las zonas de membrana lateral donde

normalmente se encuentran los contactos de adhesión indicando la supresión de la formación de estos contactos.

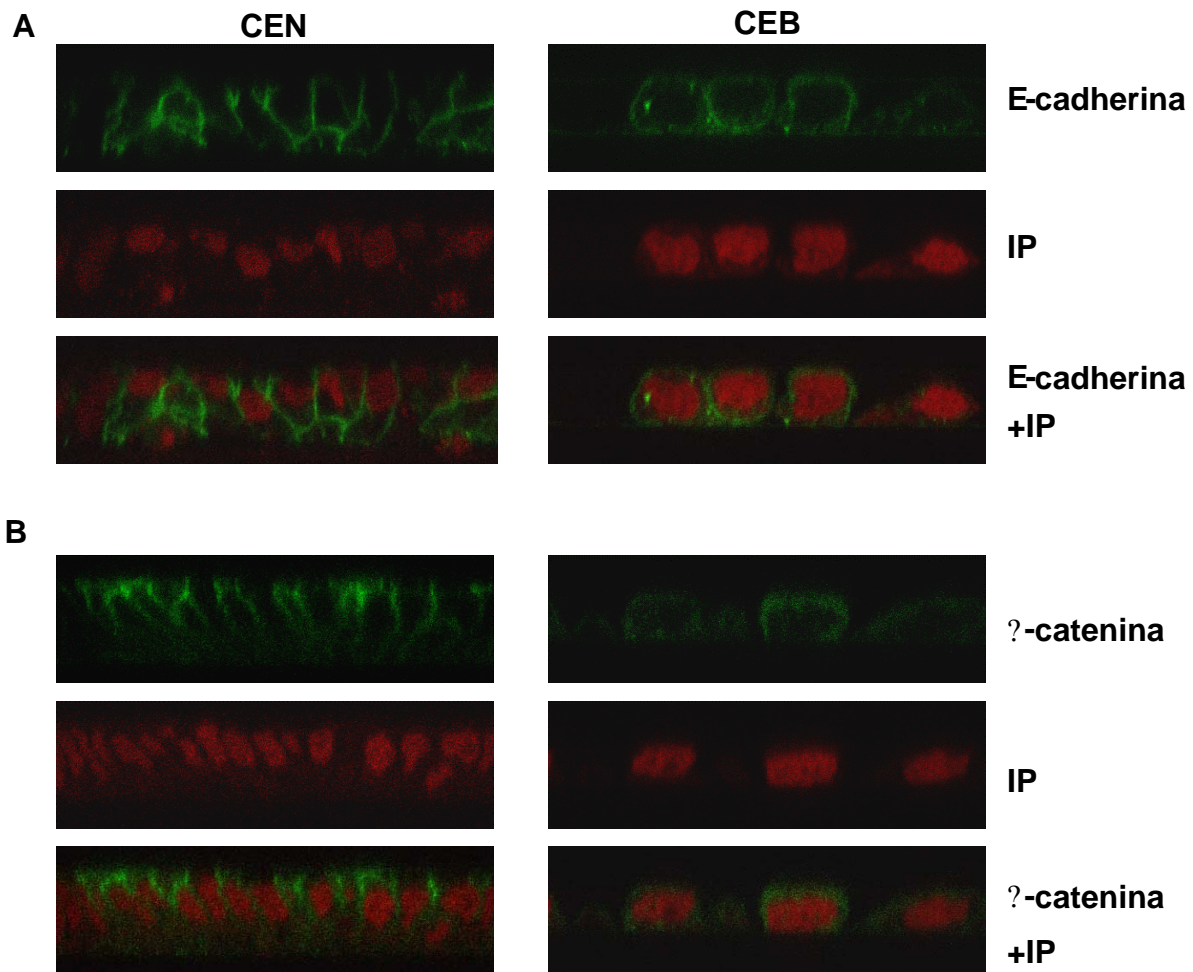


Figura R3: Alteración de la localización de la E-cadherina y la β -catenina en cultivos CEB. Cortes verticales de inmunofluorescencias a los 9 días de cultivo en condiciones CEN y CEB analizadas mediante microscopía confocal. En rojo destacan los núcleos teñidos con yoduro de propidio (IP). En verde, tinción específica contra E-cadherina o β -catenina utilizando anticuerpos secundarios acoplados a fluoresteína. Objetivo 63X.

El análisis ultraestructural de cultivos en condiciones CEB confirmó que a los 9 días de la siembra no sólo no existían contactos de adhesión sino que la formación del complejo de uniones intercelulares (uniones estrechas y desmosomas) había sido también suprimida (figura R4A, B). Además, las células presentaban una morfología redondeada sin aparente polarización, estando adheridas individualmente al sustrato de cultivo. Dicho aspecto se mantuvo invariable hasta los 21 días de cultivo (figura R4C, D), destacando con los días de confluencia la presencia y acumulación de vesículas de moco en el citoplasma celular (este último dato se describirá en su contexto en el apartado de resultados 1.3).

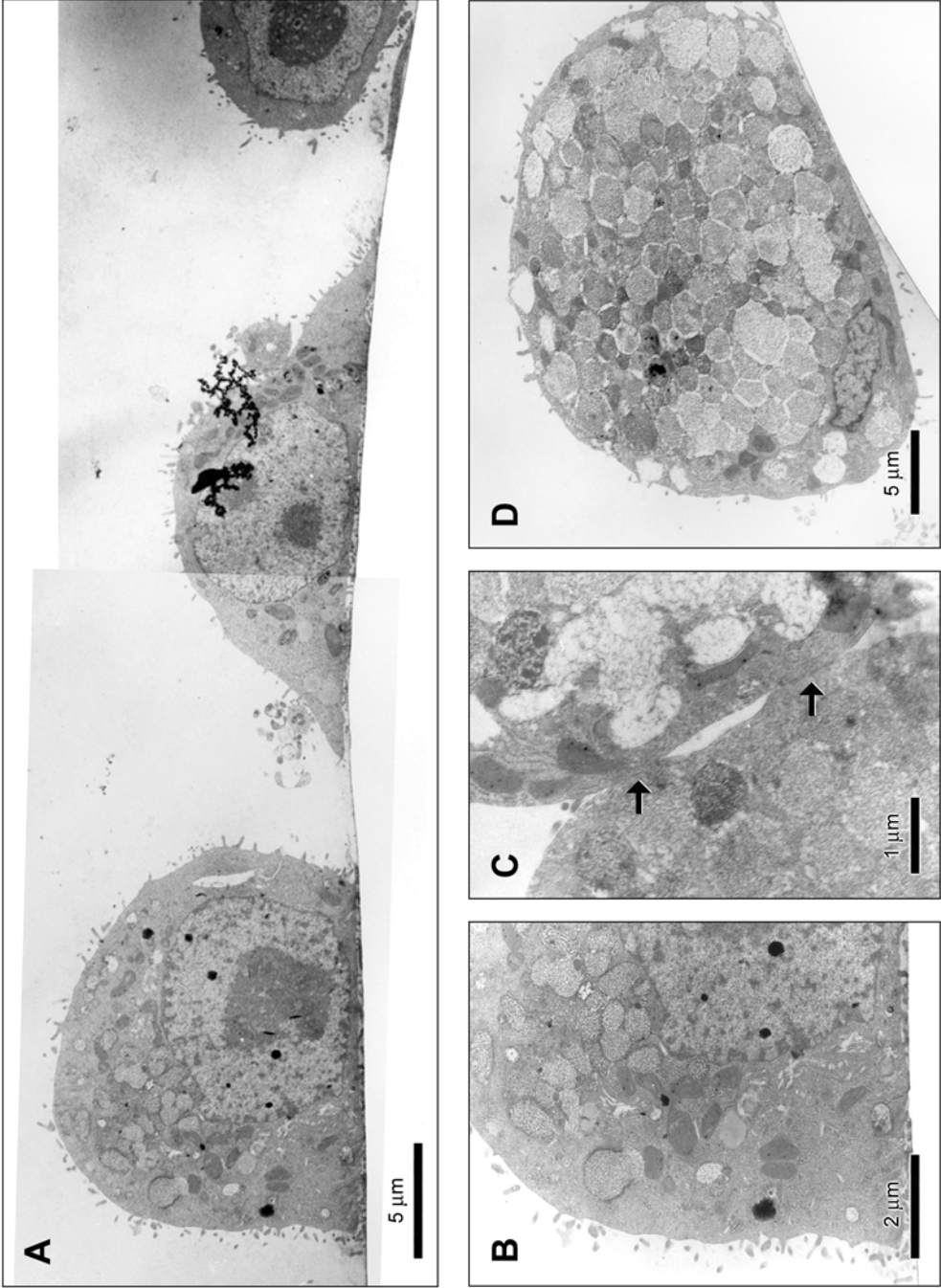


Figura R4: Análisis ultraestructural de cultivos CEB a los 9 y 21 días de cultivo. Tanto a los 9 días (A, B) como a los 21 (C, D) destaca la morfología redondeada de las células, sin aparente polarización membranal así como la formación y acumulación de vesículas de moco en el citoplasma celular con los días de cultivo. En C se detalla una zona de contacto entre dos células (infrecuente en estos cultivos), donde puede observarse la ausencia de uniones especializadas en la membrana.

Por otro lado, el seguimiento de los cultivos CEB por microscopía óptica de contraste de fases mostró una monocapa celular con los límites intercelulares muy bien definidos que se mantuvo a lo largo del cultivo, contrariamente a la apariencia compactada de cultivos CEN en los que los límites celulares se hacían indetectables poco después de llegar a confluencia (figura R5). La falta de compactación celular de los cultivos CEB es la causa de que alcancen la confluencia con una densidad celular semejante a la densidad de siembra (ver apartado 1.2).

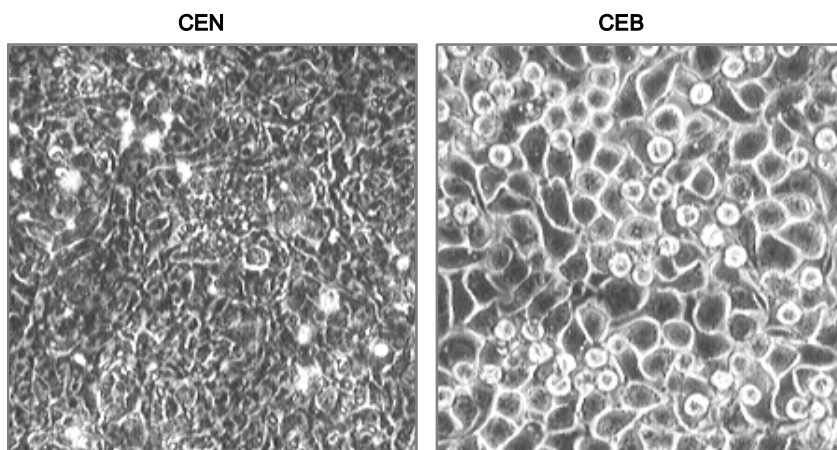


Figura R5: Apariencia de los cultivos CEN y CEB visto por microscopía de contraste de fases a los 5 días de cultivo. Presencia de una monocapa celular confluyente en los cultivos CEB, donde se definen los límites entre células, a diferencia de la apariencia compactada de los cultivos CEN en los que cuesta distinguir los límites celulares.

Por tanto, la disminución del contenido de calcio extracelular impide la epitelialización de HT-29 M6 (formación de complejos de unión y de dominios membranales) y sugiere que una parte importante del programa de diferenciación *in vitro* es dependiente de calcio extracelular.

Los efectos de la limitación de calcio extracelular son reversibles por adición de cloruro cálcico al medio de cultivo.

A continuación, nos propusimos averiguar si los efectos observados eran reversibles y, a la vez, si eran específicos de la falta de iones de calcio requeridos para las uniones intercelulares y no debidos a otras causas derivadas del tratamiento del FBS.

Las células HT-29 M6 fueron cultivadas sobre cubreobjetos durante 5 días a una densidad de 100 células/pozo, en condiciones CEB. Transcurrido este tiempo se habían formado colonias, y se añadió 2 mM de cloruro de calcio al medio de cultivo, tomándose muestras a las 0, 24, 72 horas y a los 5 días de re-establecida la concentración de calcio del medio de cultivo.

El análisis por microscopía de contraste de fases de las colonias mostró un cambio significativo en la morfología de las células al restablecer la concentración normal de calcio, de manera que la apariencia individualizada de las células en cultivos CEB se perdió y la separación entre células dejó de ser aparente a las 24 horas (figura R6A). Asimismo, E-cadherina y β -catenina volvieron a localizarse en la membrana lateral de forma ya apreciable a las 24 horas, indicando pues que se estaban volviendo a formar los contactos de adhesión (figura R6B).

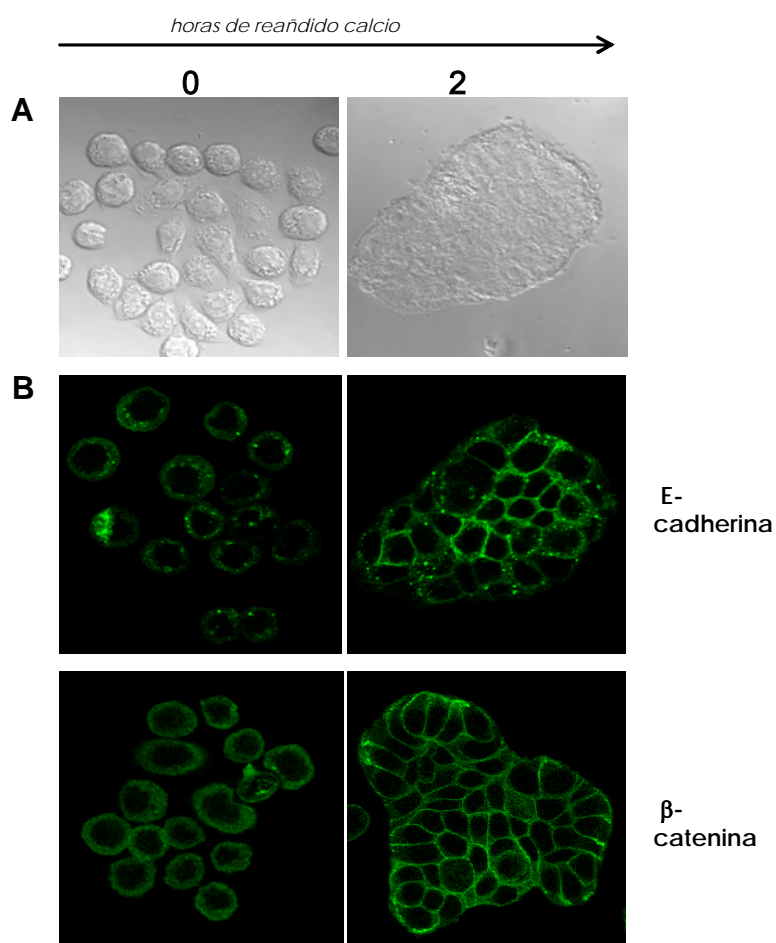


Figura R6: Restablecimiento de la morfología epitelial polarizada al añadir cloruro cálcico al medio de cultivo CEB. A: Cambios en la morfología de las células, vista por microscopía de contraste de fases. B: Redistribución de la E-cadherina y la β -catenina citoplasmática hacia la membrana lateral de cultivos CEB suplementados con 2 mM de cloruro cálcico. En verde, inmunofluorescencia contra E-cadherina o β -catenina utilizando anticuerpos secundarios acoplados a fluoresceína. Objetivo 63X.

Resultados similares se observaron en cultivos confluyentes en condiciones CEB tratados con 2mM de cloruro cálcico (datos no mostrados) aunque el alto grado de compactación provocado por el restablecimiento del calcio extracelular dificultaba la apreciación de la localización membrano-lateral de estos marcadores.

Estos resultados demuestran que los efectos sobre la adhesión intercelular derivados del tratamiento del FBS son específicos del calcio, y no de otros cationes divalentes u otros componentes del suero modificados por el tratamiento. Además, estos resultados muestran que los efectos provocados por la limitación de calcio extracelular no tienen consecuencias irreversibles para la célula en tanto que puede recuperarse el fenotipo de adhesión intercelular y de polarización característica de HT-29 M6 a las pocas horas de restablecer las condiciones CEN.

1.2- EN LA INHIBICIÓN POR CONTACTO

En el apartado anterior habíamos visto que una concentración limitante de calcio extracelular impide de manera reversible la formación de contactos célula-célula. Por otra parte, la inhibición por contacto es un fenómeno por el cual ciertas líneas celulares inhiben la proliferación celular a medida que los cultivos aumentan en densidad y, en particular, es bien conocido que los contactos de adhesión mediados por E-cadherina inducen inhibición por contacto en células epiteliales (St Croix B, et al., 1998; Stockinger A, et al., 2001). En este sentido, la inhibición por contacto es una de las características de la diferenciación *in vitro* de las células HT-29 M6. Por tanto, hipotetizamos que si la inhibición por contacto durante la diferenciación *in vitro* de HT-29 M6 es dependiente de la formación de contactos de adhesión, entonces también debería ser dependiente del calcio extracelular.

RESULTADOS

Durante la diferenciación in vitro de las HT-29 M6 hay una salida del ciclo celular en G0

En primer lugar, caracterizamos la inhibición por contacto como un fenómeno que tiene lugar primero en algunas células y a medida que avanza la edad del cultivo acaba teniendo lugar en toda la población celular. El análisis de la curva de crecimiento de la figura R7A nos indica que la tasa de división celular disminuye progresivamente a medida que avanza la edad del cultivo, mostrando que el número de células se estabiliza a partir de los 9-10 días, aproximadamente a una densidad de $0,9 \times 10^6$ células/cm².

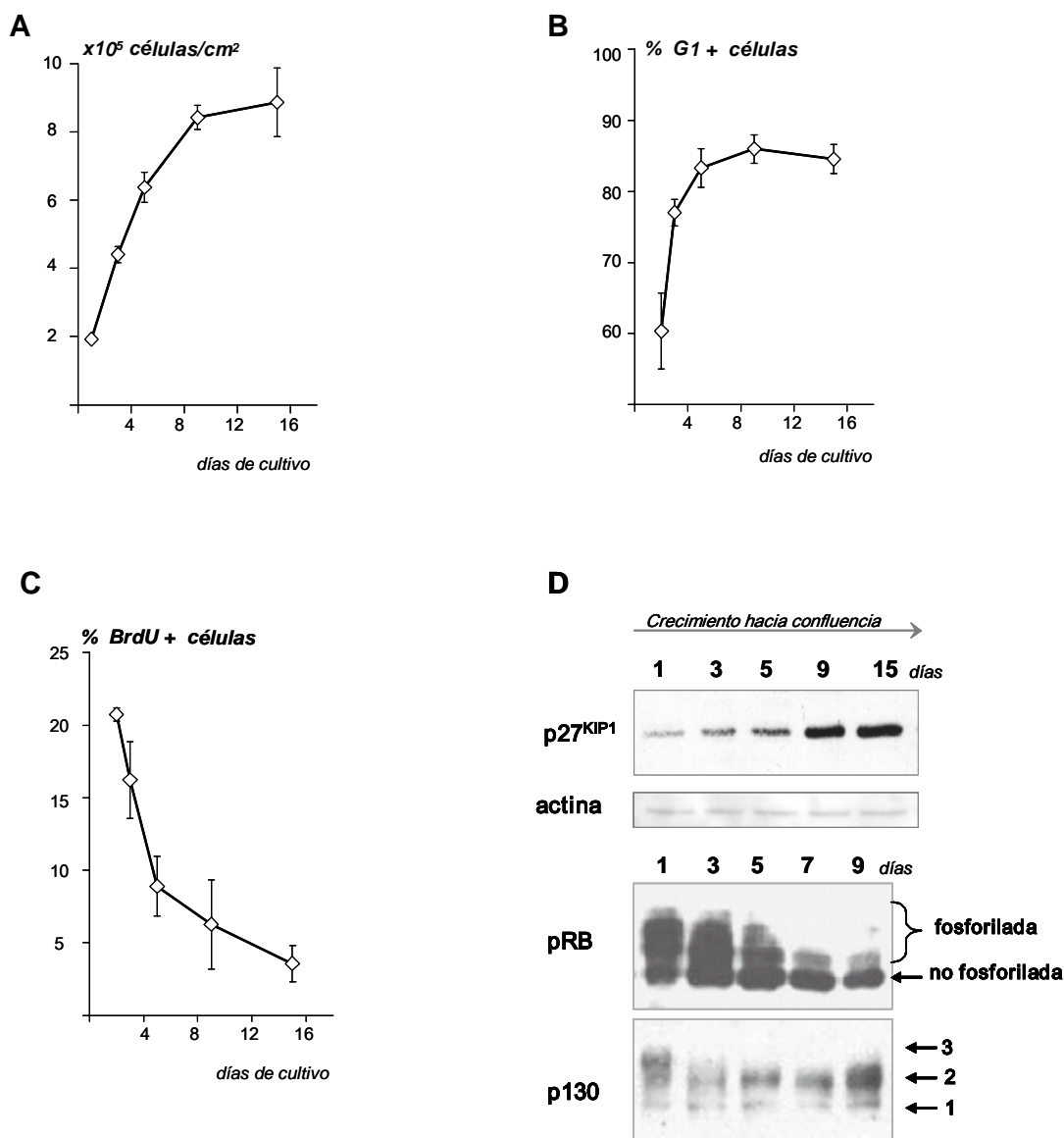


Figura R7: Salida del ciclo celular durante la diferenciación *in vitro* de cultivos HT-29 M6 CEN. Las células fueron cultivadas hasta 15 días, durante los cuales se tomaron muestras para analizar: A) el incremento en el número de células mediante conteo celular para realizar la curva de crecimiento, B) el porcentaje de células en G0/G1 mediante el análisis del contenido de DNA por citometría de flujo, C) la proporción de células que se encuentran en fase S, medido por la incorporación de BrdU; para ello, se realizaron pulsos de 1 hora con 10 μ M de BrdU, para ser posteriormente analizadas por citometría de flujo (para más detalles ver materiales y metodología); D) los niveles de proteína de p27^{KIP1}, pRb, p130 mediante análisis por western blot, para los cuales se realizaron extractos totales a partir de muestras lisadas con tampón SDS. En cada caso, 10 μ g de lisados proteicos totales fueron separados por SDS-PAGE (12% de acrilamida/bis respectivamente en el caso de p27 y 6% para las proteínas pockets pRb y p130), transferidos a un filtro de nitrocelulosa e incubados con anticuerpos específicos contra cada uno. Como control se usaron anticuerpos contra la actina.

Este bloqueo de la proliferación celular coincide con el estadio temprano de la diferenciación (ver apartado de Resultados 1.1) e implica la acumulación de las células en la fase G0 del ciclo celular (figura R7B, página anterior), resultado concordante con la disminución del porcentaje de células capaces de incorporar bromodesoxiuridina (BrdU) (figura R7C, página anterior).

Para averiguar que tipos de vías de regulación están implicadas en la salida del ciclo celular durante la diferenciación, se analizó el patrón de expresión de ciertas proteínas reguladoras del ciclo celular asociadas a la diferenciación celular en otros modelos. El análisis del patrón de expresión de estas proteínas nos muestra que con el crecimiento hacia confluencia tiene lugar una inducción del inhibidor de CDKs p27^{KIP1}, tal y como se muestra en la figura R7D (página anterior). De manera similar, el análisis de algunos miembros de la familia de proteínas "pocket" nos muestra la hipofosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRB) así como la acumulación de las formas fosforiladas 1 y 2 de p130, en correspondencia con el patrón de fosforilación característico de la salida del ciclo celular en G0 (Graña et al., 1998). Por tanto, la diferenciación espontánea de HT-29 M6 *in vitro* implica una salida del ciclo celular en G0 durante el estadio temprano de la diferenciación.

La ausencia de contactos mediados por calcio suprime la inhibición por contacto así como la salida del ciclo celular en G0/G1

Con la intención de determinar si la ausencia de contactos de adhesión suprime la inhibición por contacto, analizamos el porcentaje de células capaces de incorporar BrdU en cultivos CEN o CEB.

A diferencia de lo que ocurre en cultivos CEN (figura R7C), el porcentaje de células BrdU positivas en condiciones CEB se mantuvo elevado y a niveles aproximadamente constantes durante los días de cultivo postconfluyente, indicando que no existen cambios en la actividad proliferativa de las células durante el cultivo (figura R8A). De hecho, el marcaje de cultivos CEB confluyentes con pulsos progresivamente prolongados de BrdU condujo a casi un 100% de células marcadas después de 24-36 horas de marcaje (figura R8B); debido a que el ciclo celular de HT-29 M6 tiene una duración aproximada entre 30 y 36 horas, este experimento demuestra que prácticamente el 100% de células en los cultivos CEB se encuentra dentro del ciclo celular y, por tanto, proliferando.

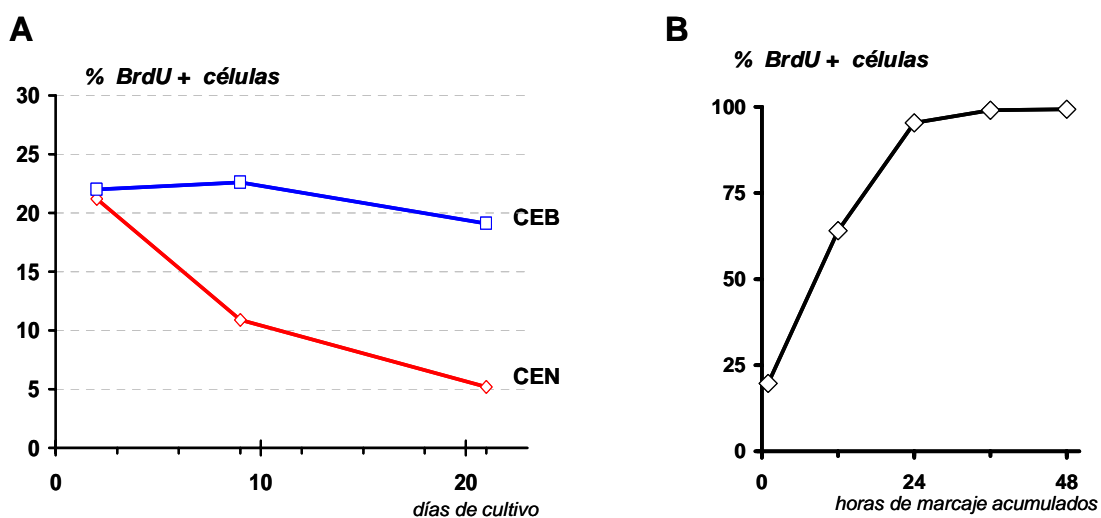


Figura R8: Supresión de la inhibición por contacto en cultivos CEB postconfluentes. A) Las células HT-29 M6 fueron cultivadas en paralelo en condiciones CEN y CEB durante 21 días, durante los cuales se realizaron pulsos con 10 μ M de BrdU, para determinar el porcentaje de células en fase S, analizado por citometría de flujo. B) La capacidad proliferativa de los cultivos CEB fue analizada mediante marcajes acumulativos con BrdU (más de 36 horas). En este experimento, se reañadió 10 μ M de BrdU cada 12 horas para garantizar la presencia continua de BrdU en el medio de cultivo.

En conclusión, estos resultados correlacionan la ausencia de contactos de adhesión con la supresión de la inhibición por contacto, sugiriendo que estos contactos constituyen una señal de salida del ciclo celular en cultivos confluentes de HT-29 M6. Además, agrupan los procesos de epitelialización y salida del ciclo celular dentro del programa de diferenciación dependiente de calcio.

Debido a que los efectos del medio CEB sobre la adhesión intercelular son revertidos cuando se restablece la concentración normal de calcio extracelular, comprobamos si la supresión de la inhibición por contacto observada también es reversible por calcio. Para ello, cultivos postconfluentes mantenidos en condiciones CEB (5 días después de la siembra) fueron suplementados o no con 2 mM de CaCl_2 (figura R9A). Durante los días siguientes, tal como se muestra en la figura R9B, el porcentaje de incorporación de BrdU se mantuvo estable si se mantuvieron las condiciones CEB, mientras que la adición de calcio provocó una disminución gradual en la fracción de células BrdU positivas hasta llegar a niveles basales después de 7-9 días.

Analizamos por Western blot los niveles de expresión de ciclina A, cuya actividad asociada a la quinasa CDK2 controla la adecuada progresión de la replicación del DNA, jugando un

papel importante, pues, en la progresión de la fase S a G2 del ciclo celular. La desaparición de la banda correspondiente a ciclina A al restablecer los contactos de adhesión, es consistente con la reducción significativa de los niveles de BrdU de 1 a 5 días, lo cual nos confirma que efectivamente, las células dejan de proliferar, mientras que en ausencia de contactos se mantienen en ciclo, lo cual se corresponde con niveles detectables de esta proteína (figura R9C).

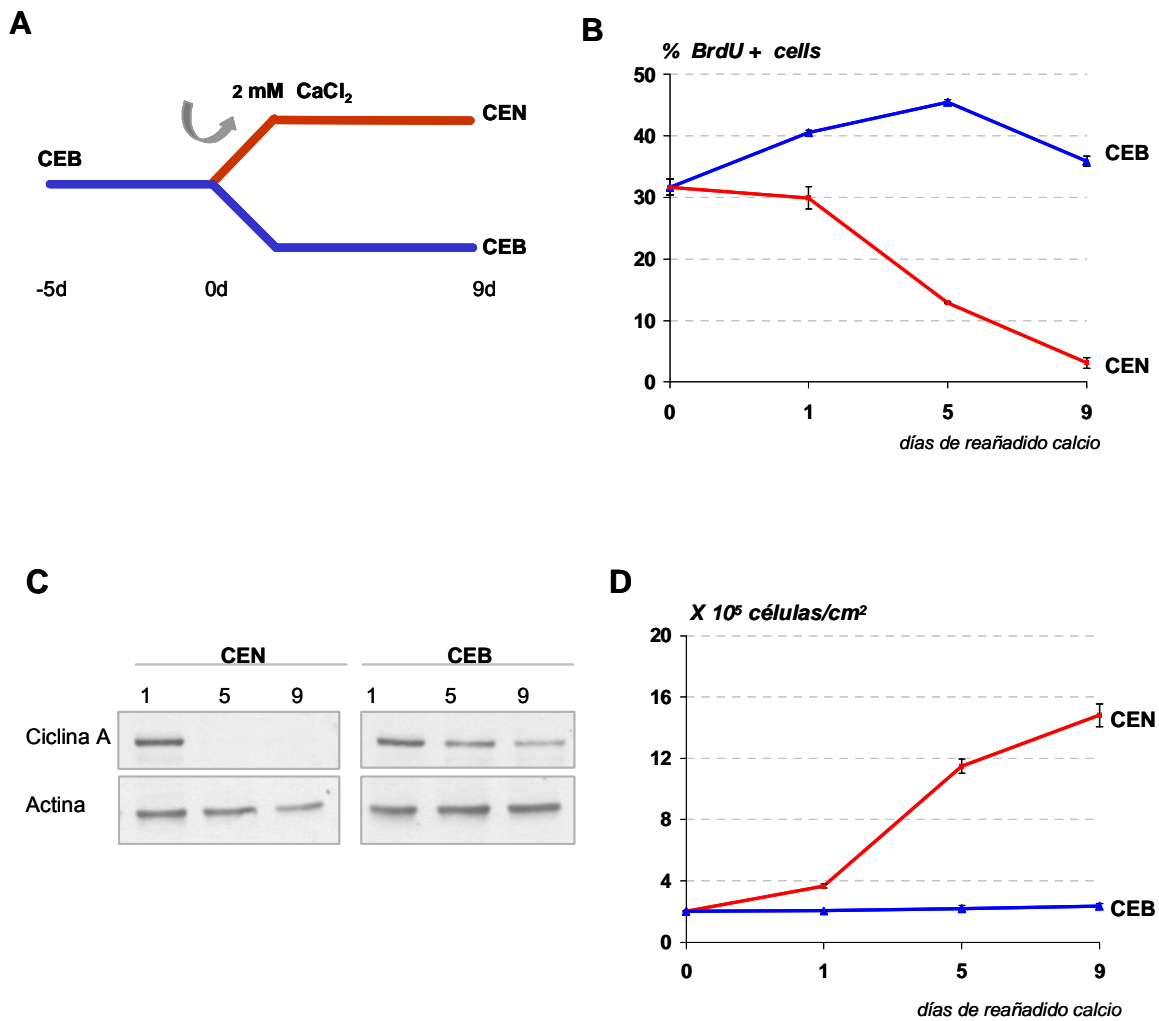


Figura R9A: Esquema del diseño experimental empleado. A) A los 5 días de cultivo CEB (azul) las células son suplementadas (rojo) o no (azul) con 2 mM de cloruro cálcico. B) Cinética de incorporación de BrdU de cultivos postconfluentes CEB con los días de reañadido calcio o no al medio de cultivo. Se siguió el mismo procedimiento que en experimentos anteriores, con pulsos de 1 hora con 10 μ M de BrdU, y posterior análisis mediante citometría de flujo. C) Western Blot de ciclina A durante los días que siguen a la readición de calcio: 10 μ g de lisados proteicos totales fueron separados por SDS-PAGE (12% de acrilamida/bis, transferidos a un filtro de nitrocelulosa e incubada la membrana con anticuerpo contra ciclina A. Como control se usaron anticuerpos contra actina. D) Curva de crecimiento de cultivos postconfluentes CEB con los días de reañadido calcio al medio de cultivo (solo se consideraron las células adheridas al sustrato; ver en el texto)

En paralelo, la reedición de calcio fue analizada en base al contenido de DNA por célula mediante citometría de flujo, confirmando que la re-epitelialización inducida se correlacionaba con la salida del ciclo en G0 (figura R10).

Por tanto, la supresión de la salida del ciclo celular por cultivo CEB es reversible y específica de la depleción parcial de calcio en correlación con la capacidad de adhesión intercelular.

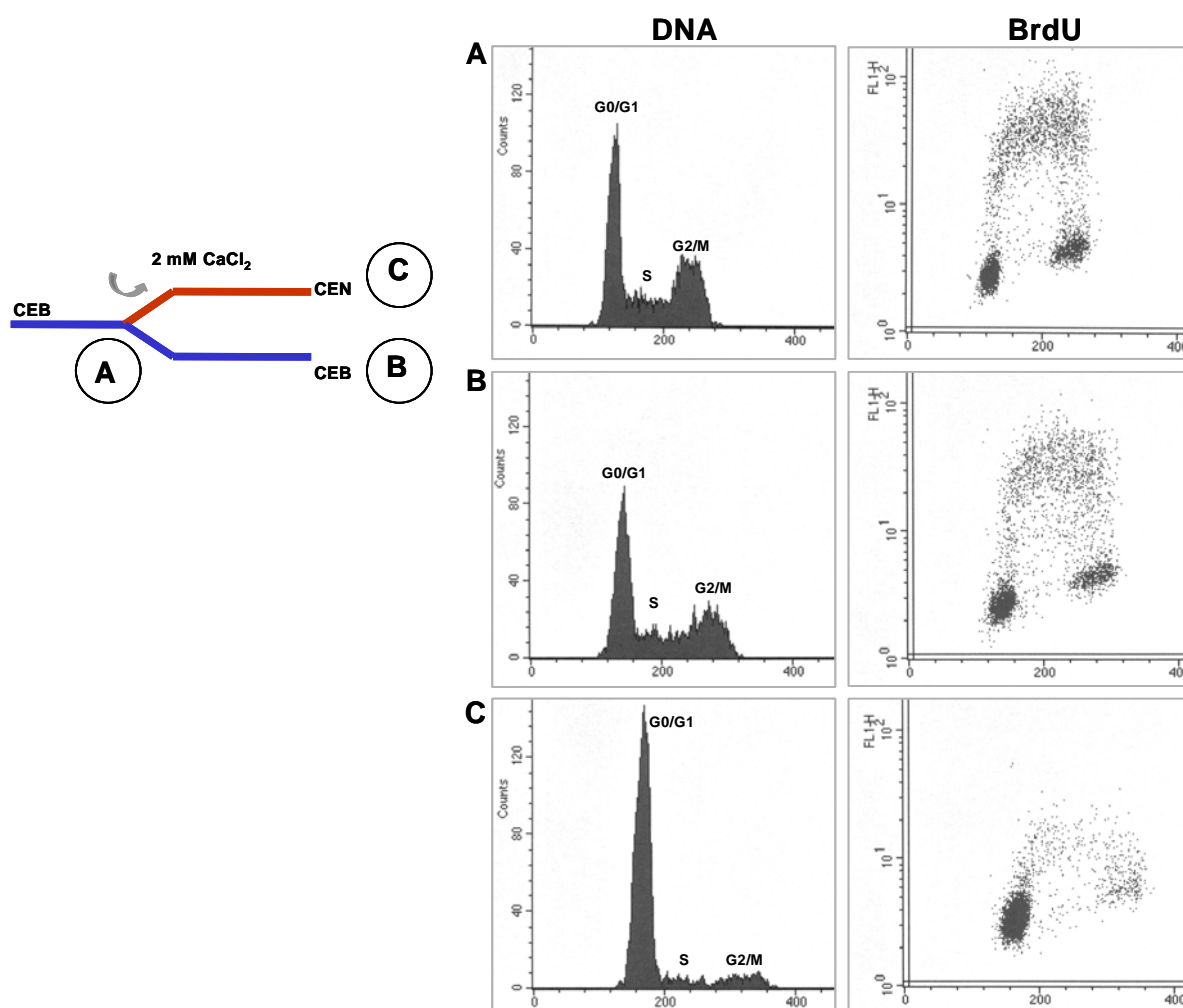


Figura R10: Reinducción de la salida del ciclo celular al reañadir cloruro cálcico a cultivos CEB. Indicado por letras A, B o C se muestra el patrón de distribución del contenido de DNA así como las células BrdU positivas en cada una de las situaciones experimentales: A) a los 5 días de cultivo CEB, B) a los 14 días de cultivo CEB, y C) después de 9 días de reañadir calcio. La acumulación en G0/G1 observada al restituir los niveles de calcio extracelular (C), es consistente con una disminución de células BrdU positivas. El procedimiento experimental es similar al descrito en la figura R9.

El conteo directo del número de células durante las condiciones de cultivo CEB del experimento anterior se muestra en la figura R9D. El número de células que se mantienen adheridas al sustrato de cultivo permanece constante a lo largo del tiempo, y se corresponde con la densidad de saturación del cultivo confluyente en ausencia de contactos (2×10^5 células/cm²). Sin embargo, el número de células adheridas aumenta en los días siguientes de restituir las condiciones CEN, a pesar de la inducción de inhibición por contacto. Estos datos, aparentemente contradictorios con el estado proliferativo de los cultivos inferido a partir de las medidas de incorporación de BrdU, pueden ser explicados a partir de dos fenómenos observables al microscopio:

- 1) en cultivos postconfluyentes bajo condiciones CEB, las células resultantes de la división no disponen de espacio físico para adherirse al sustrato ni capacidad de permanecer adheridas a células vecinas, por lo que se despegan y son liberadas al medio de cultivo (esquema R11). Esta liberación de células se observa de manera constante a lo largo del cultivo postconfluyente, e interpretamos que es indicativo de una proliferación celular continua.
- 2) al reañadir calcio a estos cultivos, por un lado se facilita que las células se adhieran entre ellas después de la división y, por otro lado, los cultivos se compactan con lo que la densidad de células que pueden adherirse al sustrato pasa a ser mayor. Proponemos que esta es la razón por la que los cultivos no detienen su crecimiento al llegar a confluencia en condiciones CEN (3-4 días después de la siembra) sino que siguen dividiéndose para formar la multicapa/monocapa pseudoestratificada hasta el día 9 (esquema R11).

Para comprobar que la liberación de células al medio de cultivo en condiciones CEB no es debida a defectos en la adhesión al sustrato ni a un efecto citotóxico del tratamiento recogimos las células liberadas al sobrenadante de cultivos postconfluyentes en condiciones CEB durante un período de 24 horas y, mediante resiembra en placas nuevas, comparamos su capacidad de adhesión y de proliferación con la de suspensiones celulares obtenidas por tripsinización de cultivos adherentes crecidos en condiciones CEN. A las 24 horas de la siembra, no existieron diferencias en el número de células adheridas al sustrato entre los dos tipos de cultivo (figura R12), lo cual demuestra que la liberación de células al medio de cultivo CEB no es debido a una incapacidad de adhesión al sustrato. Por otro lado, los conteos a las 48 horas muestran como en las dos condiciones experimentales el número de células aumenta hasta casi duplicarse, aproximadamente, indicando que las células despegadas durante el cultivo CEB conservan su viabilidad.

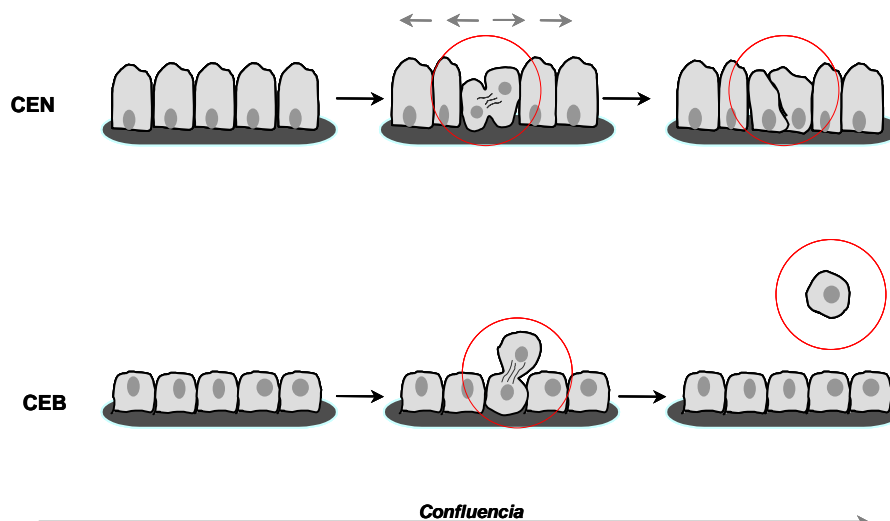


Figura R11: Esquema ilustrativo de lo que postulamos que ocurre en cultivos CEN o CEB durante el crecimiento hacia confluencia. CEN: Como consecuencia de las divisiones celulares las células se van compactando, gracias a que mantienen los contactos intercelulares después de la división, hasta formar una multicapa/monocapa pseudoestratificada donde las células ya no se dividen más. CEB: Una vez alcanzada la confluencia, las células "hijas" obtenidas de la división celular son incapaces de adherirse entre ellas y, por falta de espacio en el sustrato de adhesión, se despegan al medio de cultivo. En un círculo rojo está destacado este fenómeno en ambos casos.

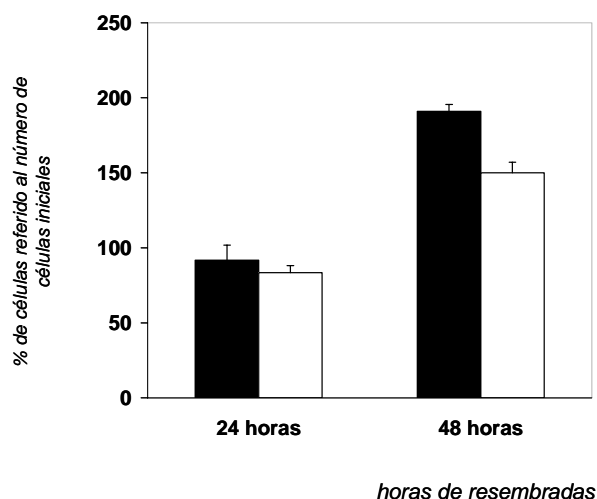


Figura R12: Capacidad de adhesión y proliferación de las células que se despegan en un cultivo CEB. Contaje a las 24 y 48 horas de células no adheridas provenientes de cultivos confluentes CEB (en blanco) *versus* células controles provenientes de cultivos confluentes CEN (negro). Los cultivos CEN confluentes (10 días) fueron tripsinizados de forma controlada hasta la obtención de suspensiones unicelulares, contados, y resembrados a una densidad de 5×10^4 células/cm². Los cultivos CEB confluentes se lavaron bien con PBS 1x para eliminar células flotando en el medio de cultivo, y se añadió medio fresco CEB durante 24 horas. Pasado este tiempo, se recogió el sobrenadante, se contó y se resembró a una densidad de 5×10^4 células/cm².

1.3- EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN

Después de comprobar la implicación del calcio extracelular en la diferenciación morfológica y en la salida del ciclo celular, estudiamos si su depleción parcial también afecta la expresión génica característica de la diferenciación *in vitro* de HT-29 M6 y, en tal caso, a que nivel tiene lugar su regulación.

Una de las características de la diferenciación *in vitro* en HT-29 M6 es la inducción de un programa de expresión génica que incluye la expresión de mucinas y proteínas asociadas al borde en cepillo. Tomando como referencia trabajos anteriores en nuestro laboratorio (Fabre M et al., 1999), estudiamos la expresión de 3 genes que se inducen específicamente durante la diferenciación: MUC1, MUC5AC y DPPIV (para más detalles ver Introducción, apartado 2.3)

RESULTADOS:

Durante la diferenciación in vitro, hay una inducción del programa de expresión génica dependiente de calcio extracelular

En experimentos preliminares, determinamos que las condiciones de cultivo estándar utilizadas en este trabajo (CEN y siembra al 50% de confluencia) daban lugar a una inducción de los diversos marcadores de diferenciación –específica de HT-29 M6, pero no de la línea parental HT-29 mayoritariamente incapaz de diferenciarse en monocapas epiteliales– con un pico de expresión de mRNA medido por *northern blot* en muestras tomadas después de una semana de cultivo, aproximadamente (figura R13). Por tanto, al igual que la epitelialización y que la salida del ciclo celular, el programa de expresión génica es inducido durante el estadio temprano de la diferenciación *in vitro*. El hecho de que cultivos HT-29 parentales inducen ligeramente los niveles de mRNA de DPPIV durante postconfluencia –aunque en mucho menor grado que los de HT-29 M6– nos sugiere que una parte de la expresión de DPPIV no es específica del programa de diferenciación celular de HT-29 M6.

A continuación, averiguamos si la inducción de estos genes pertenece también al programa de diferenciación dependiente de calcio extracelular. Comparamos mediante *northern blot* los niveles de mRNA de los tres marcadores de diferenciación a los 2 y 9 días de la siembra en condiciones de cultivo CEN o CEB. Tanto en el caso de MUC1, como de MUC5AC y

DPPIV, los niveles de mRNA para los tres marcadores analizados aumentaron en condiciones CEN, mientras que en condiciones CEB los bajos niveles de expresión a los 2 días permanecieron invariables hasta los 9 días (figura R14A).

A partir de los resultados anteriores, estudiamos si la inducción de estos marcadores podía recuperarse por la restitución de calcio extracelular sobre cultivos en condiciones CEB, al igual que ocurría con la diferenciación morfológica y la salida del ciclo celular. Así pues, el análisis mediante *northern blot* de los niveles de mRNA de MUC1, MUC5AC y DPPIV mostró que los bajos niveles observados en cultivos CEB postconfluentes aumentaban en paralelo con los días de haber restablecido las condiciones CEN (figura R14B).

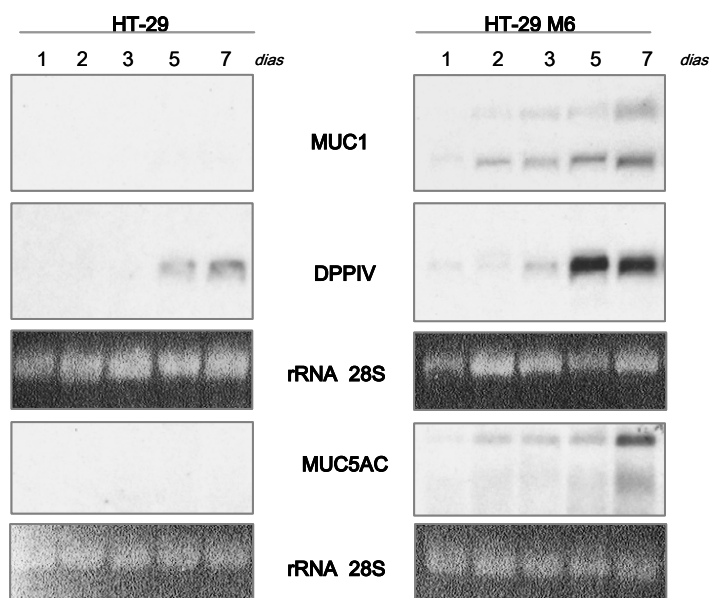


Figura R13: Comparación de los niveles de mRNA de los marcadores de diferenciación MUC1, MUC5AC y DPPIV con los días de cultivo, de la línea parental HT-29 indiferenciada vs. la línea HT-29 M6 con capacidad de diferenciación *in vitro*. Ambas líneas celulares fueron cultivadas de forma paralela en condiciones CEN durante 7 días, durante los cuales se fueron tomando muestras para analizar por northern blot la expresión del RNA mensajero. El northern blot fue realizado con 10 μ g de RNA total (para detalles ver anexo de materiales y metodología). Como normalizador se usó la subunidad 28S del RNA ribosomal.

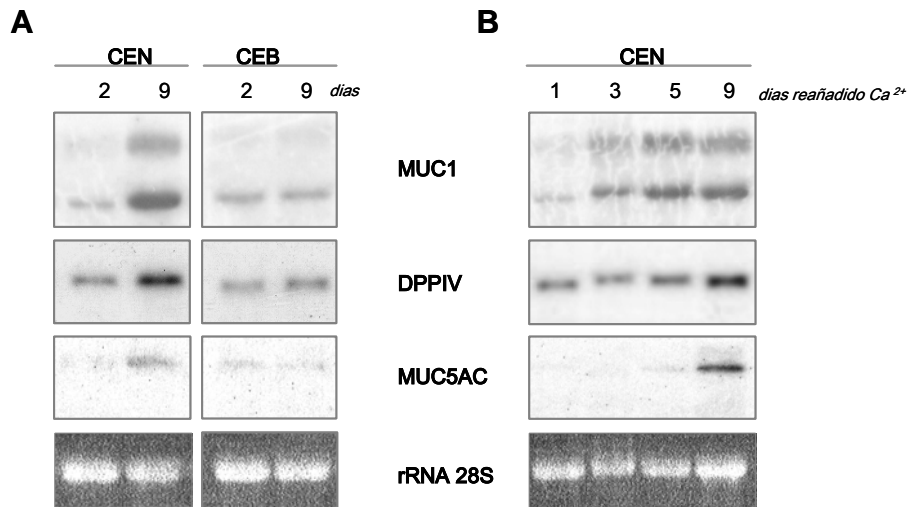


Figura R14: Niveles de RNA mensajero de MUC1, MUC5AC y DPPIV a diferentes días de cultivo en presencia o no de contactos mediados por calcio. A) Células HT-29 M6 a los 2 y 9 días de sembradas en medio CEN o CEB. B) Re-inducción de los niveles de RNA mensajero de MUC1, MUC5AC y DPPIV en cultivos CEB postconfluentes a los que se reañadió 2 mM de cloruro cálcico al medio de cultivo. En todos los casos se partió de 10 µg de RNA total. Como normalizador se usó el rRNA 28S.

Estos experimentos permiten asignar la inducción de la expresión génica al programa de diferenciación dependiente de calcio extracelular, correlacionando la expresión de estos marcadores con la formación de contactos de adhesión, con el proceso de epitelialización y con la salida del ciclo celular.

La regulación de la expresión génica tiene lugar a nivel transcripcional

Con la intención de estudiar tanto si la inducción de los mRNAs de MUC1, MUC5AC y DPPIV observada durante la diferenciación *in vitro* como si su regulación por calcio extracelular tienen lugar a nivel transcripcional, realizamos ensayos de la actividad *in vivo* de sus promotores génicos, mediante transfecciones transitorias utilizando la luciferasa como gen *reporter*. En estos ensayos, analizamos la actividad de fragmentos génicos 5'-UTR de los que previamente se había mostrado su implicación en la expresión en células diferenciadas epiteliales (ver detalles en materiales y metodología).

Por otro lado, los experimentos de restitución de calcio extracelular en cultivos postconfluentes CEB muestran que podemos inducir de manera sincrónica los procesos de epitelialización, de salida del ciclo celular y de expresión génica dependientes de contactos

de adhesión. Al ser la capacidad de incorporar DNA durante la transfección dependiente del estado proliferativo de las células y al ser la población en cultivo CEB homogénea en cuanto a que todas las células carecen de inhibición por contacto y están progresando a través del ciclo celular (figura R8B), utilizamos el procedimiento de transfección en cultivos postconfluentes CEB y el análisis de actividades de los promotores en los días posteriores al restituir o no el calcio extracelular. De esta manera nos aseguramos de que las células fueran aleatoriamente transfectadas y, por tanto, representativas de la población total en cultivo, así como de que no existieran diferencias en la eficiencia de transfección entre muestras a tratar como CEN y CEB.

Así pues, los promotores génicos de MUC1, MUC5AC y DPPIV, clonados en el vector *reporter* pGL3, fueron transfectados en células HT-29 M6 a los 5 días de cultivo en condiciones CEB (cultivos confluentes). Inmediatamente después de la transfección, o bien se restableció la concentración normal de calcio o bien se prosiguió el cultivo bajo condiciones CEB, y durante los siguientes días se analizó la cinética de actividad luciferasa en lisados celulares de estos cultivos como medida de la actividad transcripcional ejercida por los promotores correspondientes.

Tal como se muestra en la figura R15, durante los días siguientes al restablecimiento de contactos adherentes, se produce un incremento progresivo de la actividad de los promotores en los tres casos analizados. En cambio, la actividad de estos mismos promotores cuando se continúan las condiciones de cultivo CEB permanece invariable o, a lo sumo, aumenta ligeramente. La actividad de los promotores en presencia de contactos de adhesión alcanza su mayor valor a los 9 días de haber restituido los niveles normales de calcio y se observan incrementos del orden de 6,5 veces en el caso de MUC1, de 4 veces para MUC5AC y de 7,5 veces para DPPIV, comparado con su actividad en condiciones CEB. Existe pues una correlación entre la inducción de los niveles de mRNA endógeno de los marcadores durante la diferenciación, así como su supresión en condiciones CEB, y la actividad de sus promotores génicos.

Para comprobar que el incremento de actividad luciferasa después de restituir los niveles de calcio extracelular no es debido a una acumulación de RNA o de proteína luciferasa durante los días de cultivo, sino que en realidad está reflejando una actividad incrementada de los promotores, realizamos tratamientos con el inhibidor de síntesis proteica cicloheximida y también con el antibiótico actinomicina D, que actúa intercalándose en el DNA, suprimiendo la transcripción génica. En ambos casos, los tratamientos se realizaron 48 horas antes de recoger las muestras con las que se medirían las actividades luciferasa (figura R16).

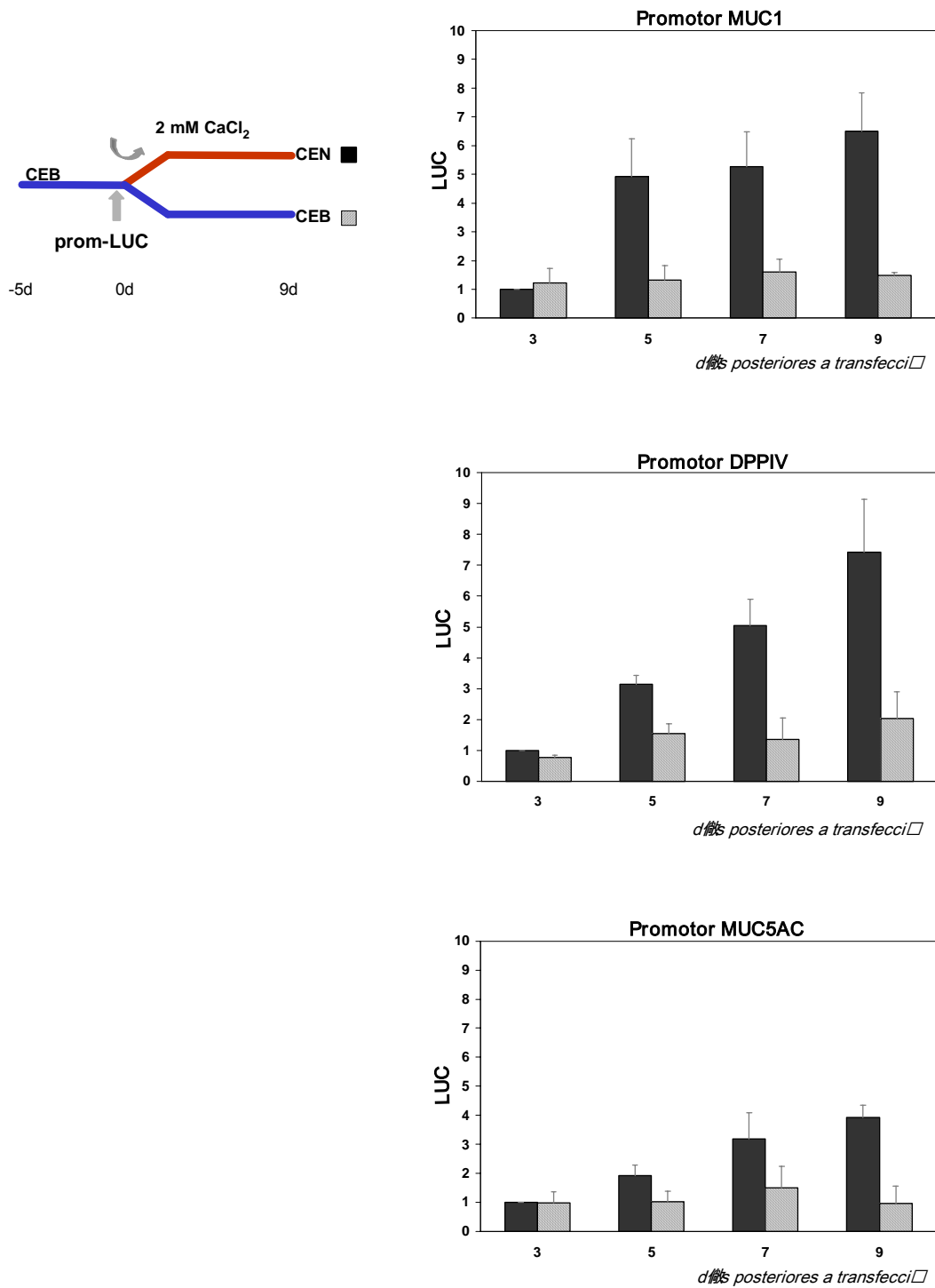


Figura R15: Cinética de actividad de los promotores de MUC1, MUC5AC y DPPiV con los días de transfección. A la izquierda, esquema de cómo se realizó el experimento. En negro, células a las que se les reañadió 2 mM de cloruro cálcico inmediatamente después de la transfección. En rayado, células mantenidas en condiciones CEB. El valor de luciferasa (LUC) representa valores relativos de la actividad de cada promotor génico referido a los 3 días de transfección en condiciones CEN.

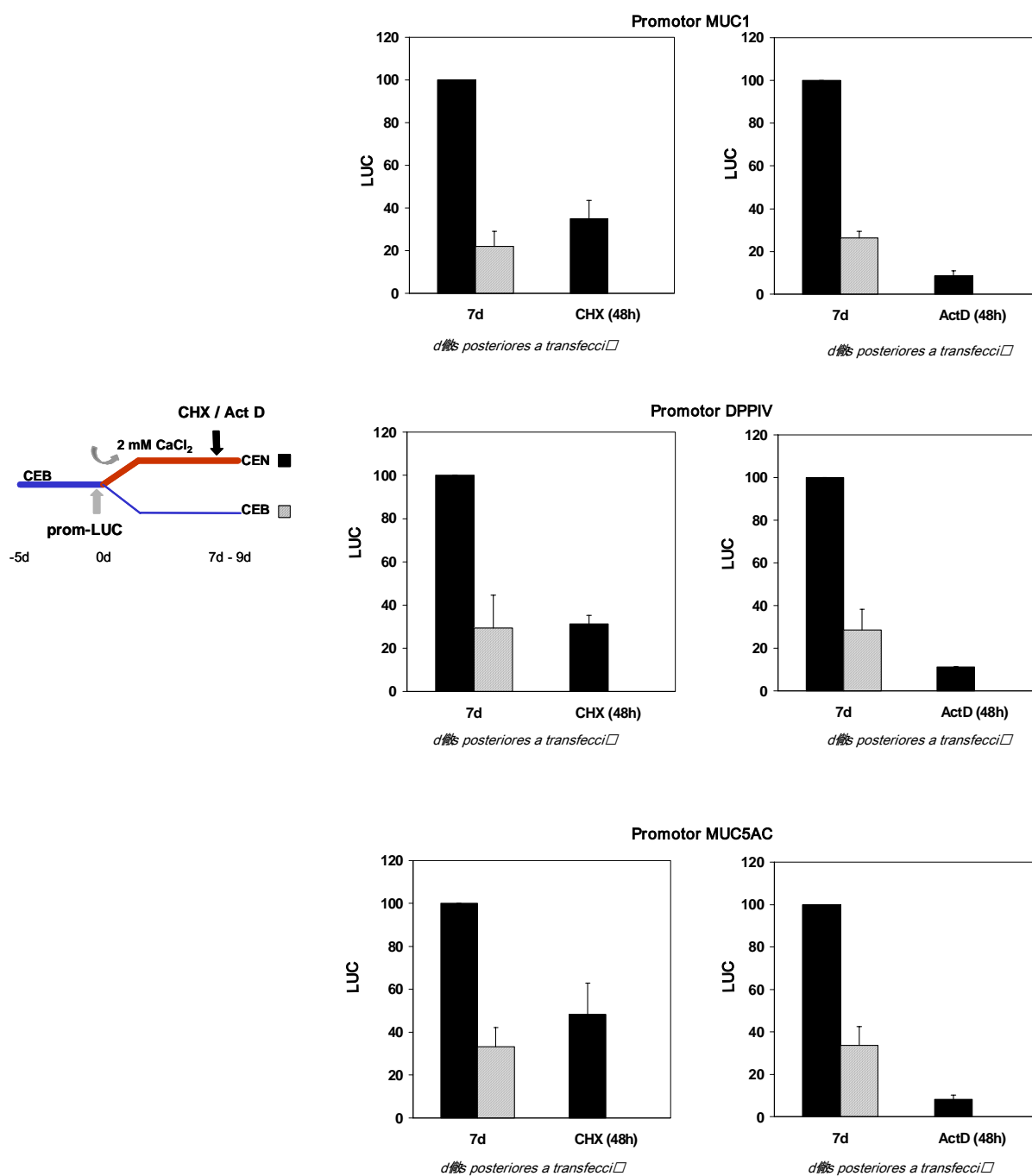


Figura R16: Efecto del tratamiento con cicloheximida (CHX) y actinomicina D (ActD) sobre la actividad de los promotores de MUC1, MUC5AC y DPPIV. Tras 7 días de transfección, las células fueron tratadas durante 48 horas con 10 ng/μl de cicloheximida o 1 μg/ml de actinomicina D, tal y como se indica en el esquema de la izquierda. En negro, células a las que se les reañadió 2 mM de cloruro cálcico inmediatamente después de la transfección. En rayado, células mantenidas en condiciones CEB. El valor de luciferasa (LUC) representa valores relativos de la actividad de cada promotor génico referido a los 7 días de transfección en condiciones CEN.

Como se muestra en la figura R16, tanto el tratamiento con cicloheximida como con actinomicina D provocan una bajada significativa de los valores de actividad luciferasa, parecidos o menores a los obtenidos en cultivos CEB, indicando que el incremento relativo de luciferasa es debido a proteína sintetizada durante las 48 horas previas a la recogida de la muestra.

La no inducción de la actividad transcripcional de los promotores en condiciones CEB sugiere que en ausencia de contactos de adhesión estos promotores están reprimidos o que falta una actividad celular que los active. Para valorar estas posibilidades, realizamos experimentos tratando con tricostatina A (TSA) los cultivos de 9 días que estaban en condiciones CEB 12 horas antes de tomar las muestras. El TSA es un inhibidor de deacetilasas de histonas, enzimas cuya actividad está asociada al silenciamiento de promotores génicos.

El tratamiento con TSA durante las 12 horas previas a la recogida de muestras, dió lugar a un incremento en las actividades de los promotores de MUC5AC y de DPPIV hasta valores parecidos a los que se observaban después de 9 días de la inducción por restitución del calcio extracelular; en el caso del promotor de MUC1, este incremento constituyó el 70% de la actividad inducida por calcio (figura R17). Por tanto, la baja actividad de los promotores génicos en ausencia de contactos de adhesión es atribuible – en el caso de MUC1, al menos casi totalmente– a un mecanismo de represión mediado por deacetilasas de histonas.

En conjunto, estos resultados demuestran que existe un programa de expresión génica durante la diferenciación *in vitro* de HT-29 M6, que es dependiente de calcio extracelular y que es inducido a nivel transcripcional a partir de los promotores génicos estudiados. En condiciones de calcio extracelular limitantes para la formación de contactos de adhesión, este programa permanece inactivo mediante un mecanismo de represión sensible al inhibidor de deacetilasas de histonas TSA.

1.3.1 UNA PARTE DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN NO SE ENCUENTRA AFECTADA POR LA DEPLECIÓN DEL CALCIO EXTRACELULAR

Para estudiar si el programa de expresión génica inducido por calcio extracelular se traducía en un incremento de los niveles totales de proteína MUC1, MUC5AC y DPPIV durante la diferenciación *in vitro*, realizamos un estudio del patrón de expresión de estos marcadores de diferenciación mediante ensayos de *western blot* y por inmunofluorescencia y posterior análisis al microscopio. No nos fue posible analizar los niveles de proteína DPPIV por *western blot* (aunque sí por inmunofluorescencia) por no contar con anticuerpos específicos útiles para esta técnica.

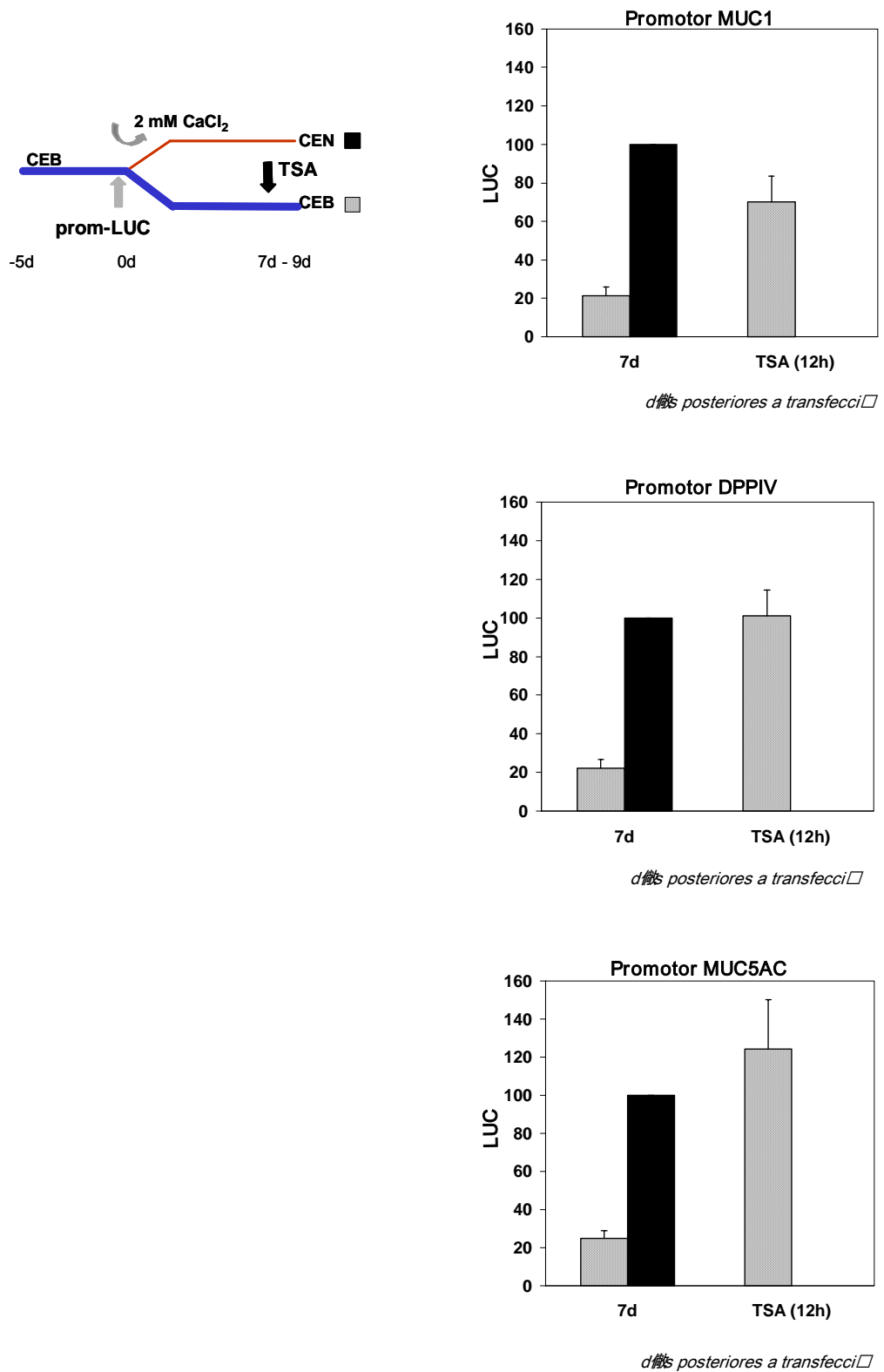


Figura R17: Efecto del tratamiento de las células con TSA sobre la actividad de los promotores de MUC1, MUC5AC y DPPIV en condiciones CEB. A los 7 días de transfectadas las células, estas fueron tratadas con 5 μ M de TSA durante 12 horas, como se representa en el esquema de la figura. En negro, células a las que se les reañadió 2 mM de cloruro cálcico inmediatamente después de la transfección. El valor de luciferasa (LUC) representa valores relativos de la actividad de cada promotor génico referido a los 7 días de transfección en condiciones CEN.

RESULTADOS

La depleción de calcio extracelular inhibe la inducción, pero no inhibe totalmente la expresión, de las mucinas características del fenotipo diferenciado

Efectivamente, la inducción génica de MUC1 y MUC5AC se correspondió con un incremento de los niveles totales de ambas mucinas en condiciones de cultivo CEN. En cambio, cultivos mantenidos bajo condiciones CEB no mostraron tal incremento en el caso de MUC1, y solamente un ligero incremento en el caso de MUC5AC a días muy tardíos (figura R18).

Por otro lado, la limitación del calcio extracelular, y particularmente la supresión de la epitelialización, no resultó en una inhibición total de la expresión de estas mucinas, sino que bajos niveles de proteína observados en los primeros días de cultivo se mantuvieron durante el crecimiento en postconfluencia. En el caso de MUC1, destaca la presencia a días tardíos de cultivos de formas de menor movilidad electroforética en condiciones de cultivo CEN, que podrían corresponderse con formas más glicosiladas de la proteína. Estas formas no se detectan en ausencia de contactos, sugiriendo que el programa de diferenciación celular también afecta el procesamiento post-traducciona l de MUC1.

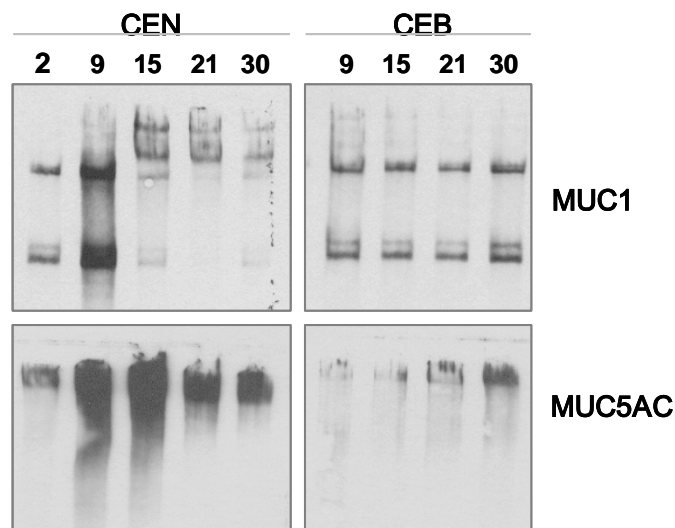


Figura R18: Niveles totales de proteína MUC1 y MUC5AC de cultivos HT-29 M6 postconfluyentes mantenidos en condiciones CEB o CEN: 50 µg de lisados proteicos totales fueron separados por SDS-PAGE (3% de acrilamida/bis, transferidos a un filtro de nitrocelulosa e incubada la membrana con anticuerpos específicos contra MUC1 o MUC5AC.

En su conjunto, estos resultados sugieren que, a pesar de la supresión de su inducción transcripcional, una parte de la expresión génica de tales marcadores es independiente del calcio extracelular y/o de los contactos de adhesión dependientes de esta molécula, bien sea por una actividad transcripcional basal en sus genes y/o por mecanismos de regulación postranscripcionales compensadores.

La producción de vesículas de moco es independiente de la epitelialización

Aunque no se profundizó en el apartado correspondiente, es de destacar la presencia de vesículas de moco en el citoplasma de células mantenidas bajo condiciones CEB, las cuales incrementan su densidad por célula durante el crecimiento en postconfluencia (ver figuras R4B, D). Por tanto, la producción de vesículas citoplasmáticas de moco y, presumiblemente, la síntesis de las mucinas que lo componen es independiente de la epitelialización. Puesto que MUC5AC es el componente mayoritario del moco secretado por las HT-29 M6, estos resultados podrían justificar el ligero incremento que vemos en los niveles de esta proteína a días postconfluyentes en condiciones CEB (figura R18). Sin embargo, la gran cantidad de vesículas de moco que se acumulan a días tardíos de la diferenciación sugiere que otras mucinas diferentes pudieran estar sobreexpresándose en estas condiciones y fueran, al menos en parte, responsables de la formación de estas vesículas.

En relación también al análisis ultraestructural mencionado, nos llamó la atención que en condiciones de cultivo CEB no se observaban figuras de exocitosis de las vesículas de moco, las cuales son típicas de las células HT-29 M6 con fenotipo mucosecretor (comparar figuras R2B, D con R4B, D). Este hecho, junto con la gradual acumulación de estas vesículas en el citoplasma, sugiere que la maquinaria de secreción se encuentra parcial o totalmente impedida en ausencia de epitelialización (ver más adelante).

La falta de epitelialización altera la correcta localización de las proteínas marcadoras de diferenciación

Defectos en el tráfico intracelular de vesículas, incluyendo la exocitosis, podrían estar afectando el transporte de proteínas hacia la membrana. Debido a que las mucinas siguen sintetizándose y a que los dominios membranales desaparecen en condiciones CEB, decidimos estudiar la localización subcelular de MUC1, MUC5AC y DPPIV mediante detección por inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal en células HT-29 M6 cultivadas sobre cubreobjetos bajo condiciones CEN o CEB (figuras R19, R20, R21).

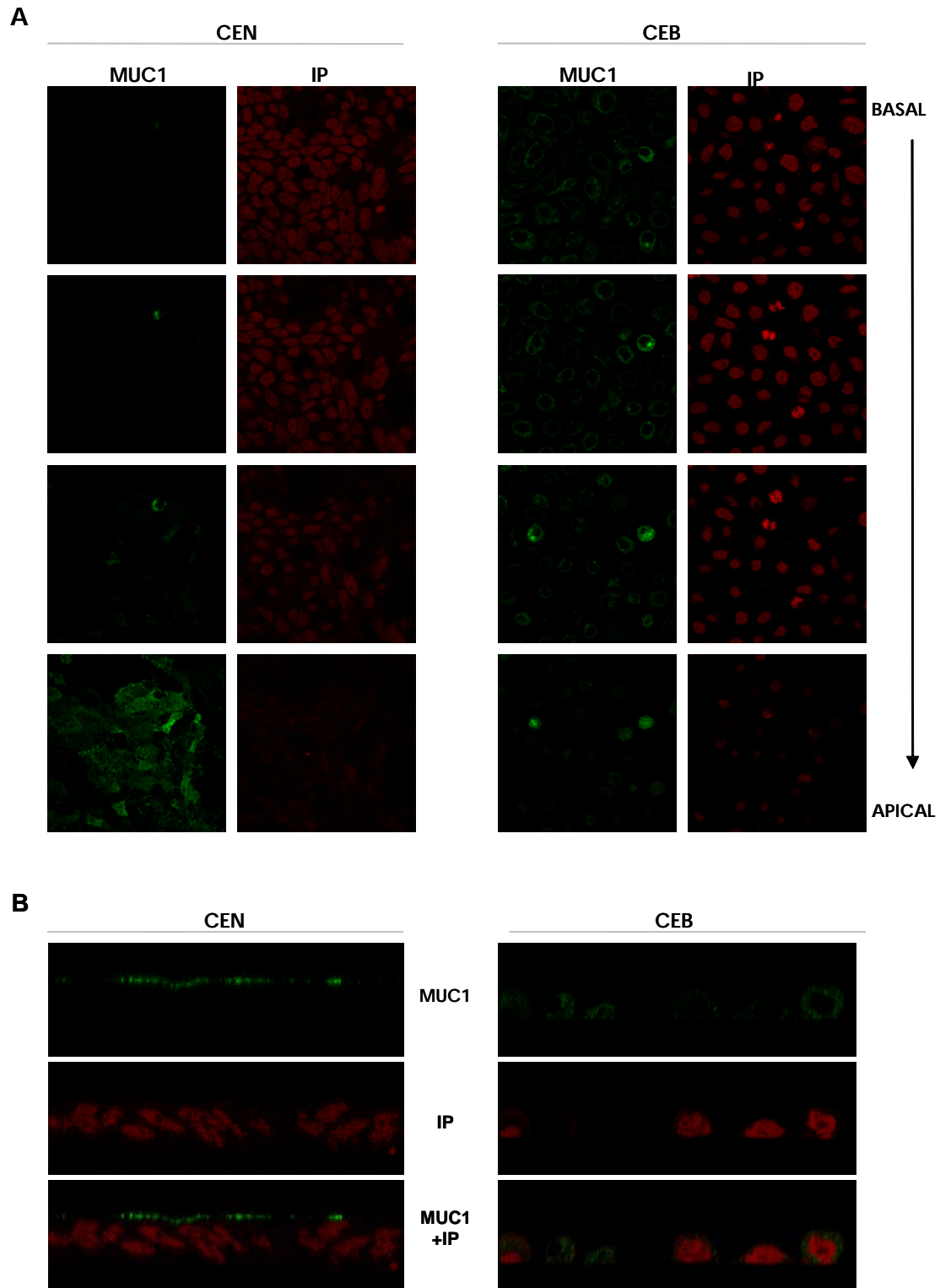


Figura R19: Localización subcelular de MUC1 en cultivos CEN y CEB, analizada por microscopía confocal. A: cortes horizontales seriados a lo largo de todo el eje basal-apical, donde se distingue la localización apical de MUC1 en cultivos CEN, a diferencia de los cultivos CEB, donde observamos marcaje en todos los planos del eje. B: Cortes verticales en ambas condiciones, que muestran también las diferencias en la localización de este marcador. En verde, tinción específica contra MUC1. En rojo contrastados los núcleos con yoduro de propidio. Objetivo 63X.

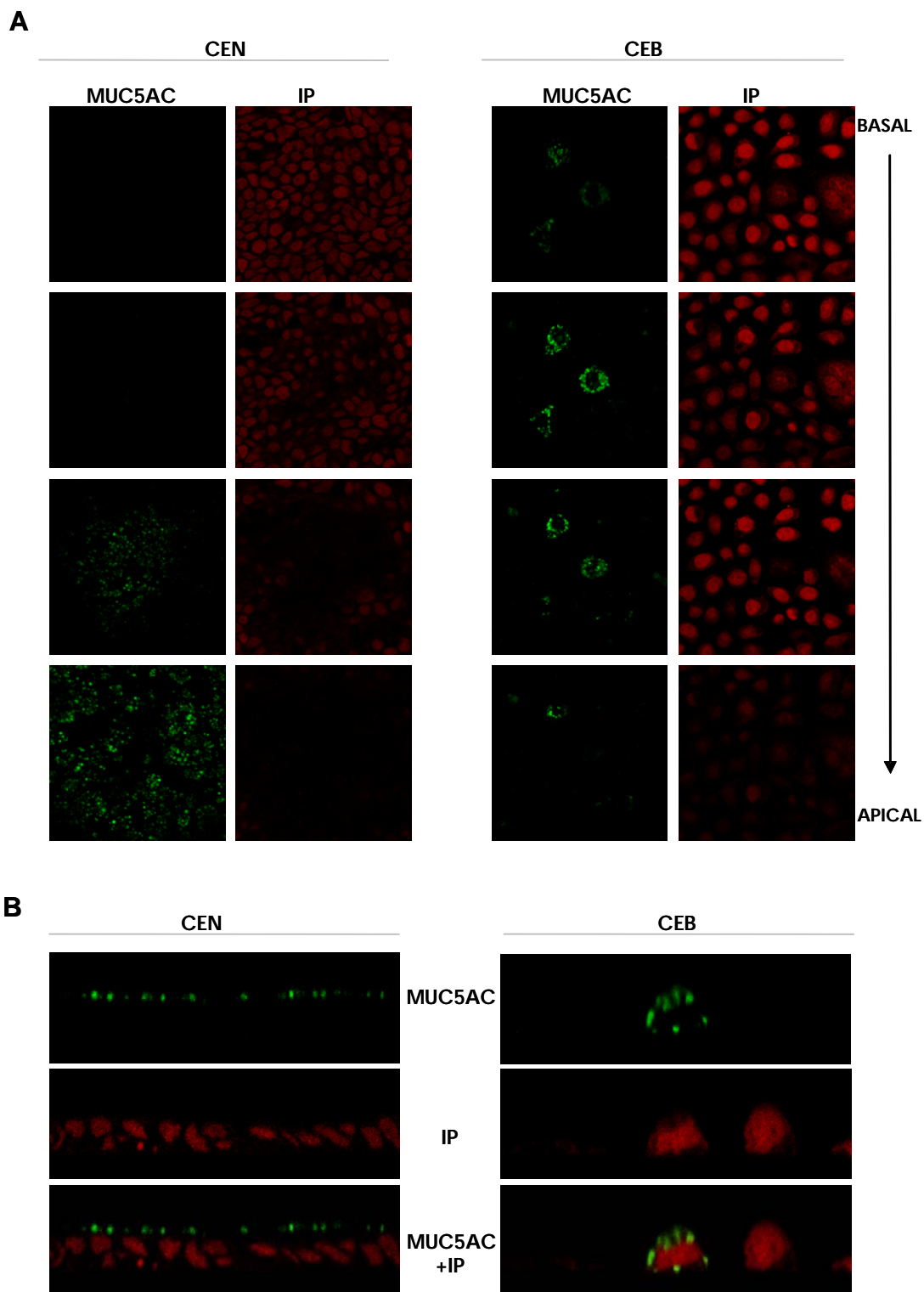


Figura R20: Localización subcelular de MUC5AC en cultivos CEN y CEB, analizada por microscopía confocal. A: cortes horizontales seriados a lo largo de todo el eje basal-apical, donde se distingue la localización de MUC5AC en las vesículas del citoplasma apical en cultivos CEN, a diferencia de los cultivos CEB, donde observamos marcaje en todos los planos del eje. B: Cortes verticales en ambas condiciones, que muestran también las diferencias en la localización de este marcador. En verde, tinción específica contra MUC5AC. En rojo contrastados los núcleos con yoduro de propidio. Objetivo 63X.

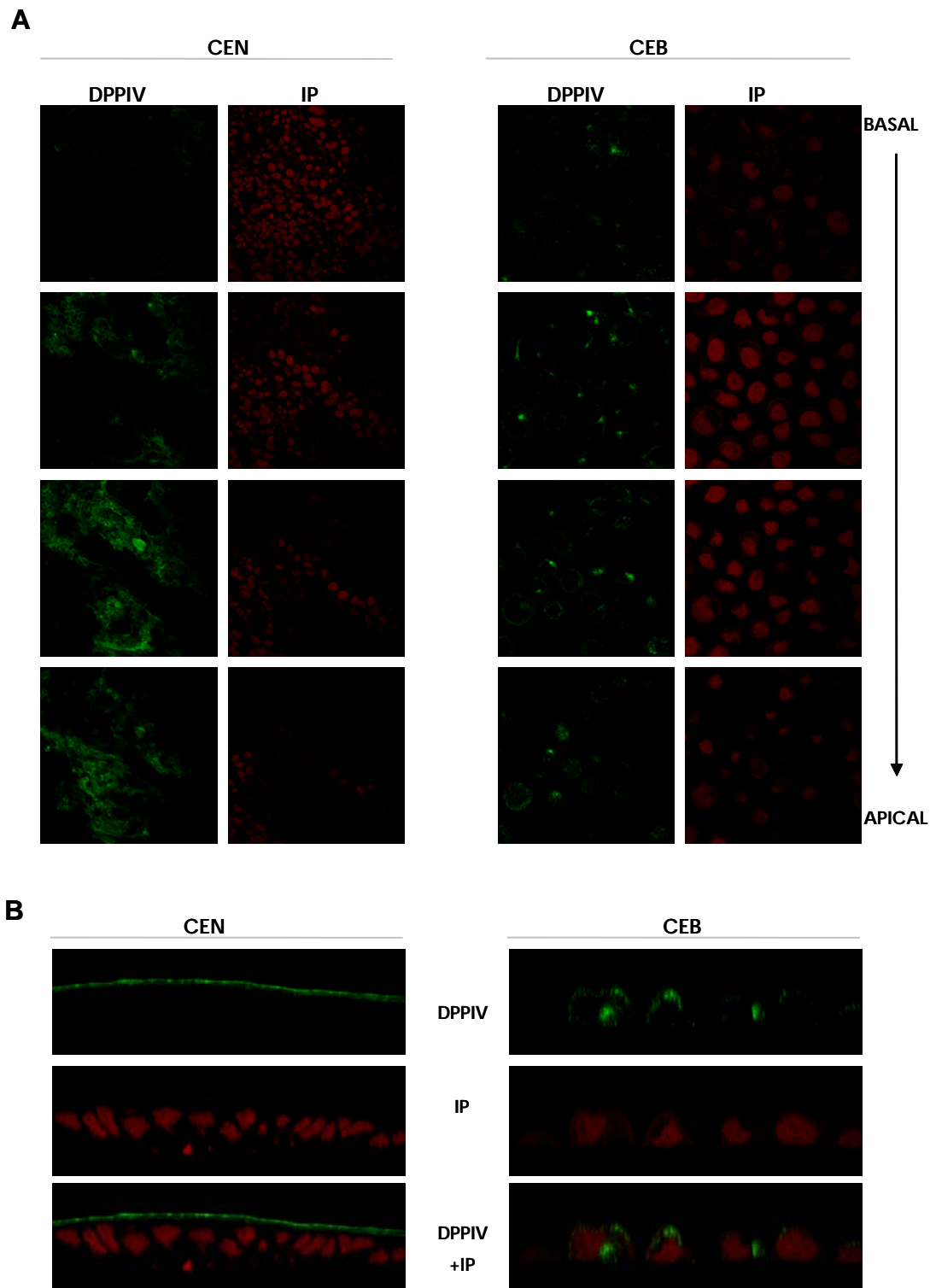


Figura R21: Localización subcelular de DPPIV en cultivos CEN y CEB, analizada por microscopía confocal. A: cortes horizontales seriados a lo largo de todo el eje basal-apical, donde se distingue la localización apical de DPPIV en cultivos CEN, a diferencia de los cultivos CEB, donde observamos marcaje en todos los planos del eje. B: Cortes verticales en ambas condiciones, que muestran también las diferencias en la localización de este marcador. En verde, tinción específica contra DPPIV. En rojo contrastados los núcleos con yoduro de propidio. Objetivo 63X.

A los 9 días de cultivo en condiciones CEN, los tres marcadores presentan el patrón de localización esperado: MUC1 y DPPIV son proteínas específicas de membrana apical y MUC5AC se encuentra acumulado en las vesículas del citoplasma apical. En cambio, este patrón está completamente alterado en ausencia de contactos de adhesión. Primero, no todas las células presentan marcaje con los anticuerpos anti-MUC1 y anti-MUC5AC sugiriendo que la expresión basal observada por *western blot* tiene lugar sólo en algunas células; por el contrario, la inmunoreactividad contra DPPIV se encuentra en todas las células. Segundo, la localización subcelular de estas proteínas está alterada, de tal manera que MUC1 se observa difusa por el citoplasma, DPPIV se acumula en un compartimento subcelular que no hemos definido (figura R21, ver discusión) y MUC5AC se localiza en un punteado grueso (probablemente las vesículas de moco) repartido por todo el citoplasma celular. Estos resultados sugieren que la ausencia de epitelialización impide el tráfico normal de proteínas de membrana y proteínas secretadas, las cuales serían dirigidas a la membrana apical en condiciones normales.

1.4- EN LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN CELULAR COMO PARÁMETRO DE DESDIFERENCIACIÓN HACIA UN FENOTIPO MÁS INVASIVO

Los resultados obtenidos hasta el momento nos mostraban que la depleción del calcio extracelular silenciaba la activación del programa de diferenciación *in vitro* de las HT-29 M6 durante el crecimiento hacia confluencia. Quisimos estudiar si la falta de diferenciación que presentan estas células en condiciones de cultivo CEB se correspondía con un incremento de la capacidad invasiva de las células, tomando como parámetro la migración celular, de forma similar a lo que ocurre en un porcentaje alto de tumores y líneas celulares epiteliales durante la transición epitelio-mesénquima (ver Introducción).

RESULTADOS

La ausencia de contactos de adhesión mediados por calcio no afecta la arquitectura del citoesqueleto de actina en las HT-29 M6

En primer lugar, analizamos los efectos de inhibir la epitelialización por depleción de calcio extracelular sobre la arquitectura del citoesqueleto de actina en las HT-29 M6. Para ello, detectamos el citoesqueleto de actina mediante faloidina conjugada a un fluorocromo sobre cultivos CEB de HT-29 M6, a los cuales se les añadió 2 mM de cloruro cálcico para restituir los contactos de adhesión, tomándose muestras a diferentes horas. Como se puede

apreciar en la figura R22, en ausencia de contactos de adhesión se mantiene la distribución sub-membranal de la actina característica de estas células epiteliales, y no se observa la formación de fibras de estrés característica de células mesenquimales o células epiteliales que han sufrido una transición epitelio-mesénquima.

Este resultado nos está sugiriendo que el programa de diferenciación dependiente de calcio, y en particular los contactos de adhesión por sí mismos, son prescindibles para el mantenimiento de la organización del citoesqueleto de actina presente en las células epiteliales.

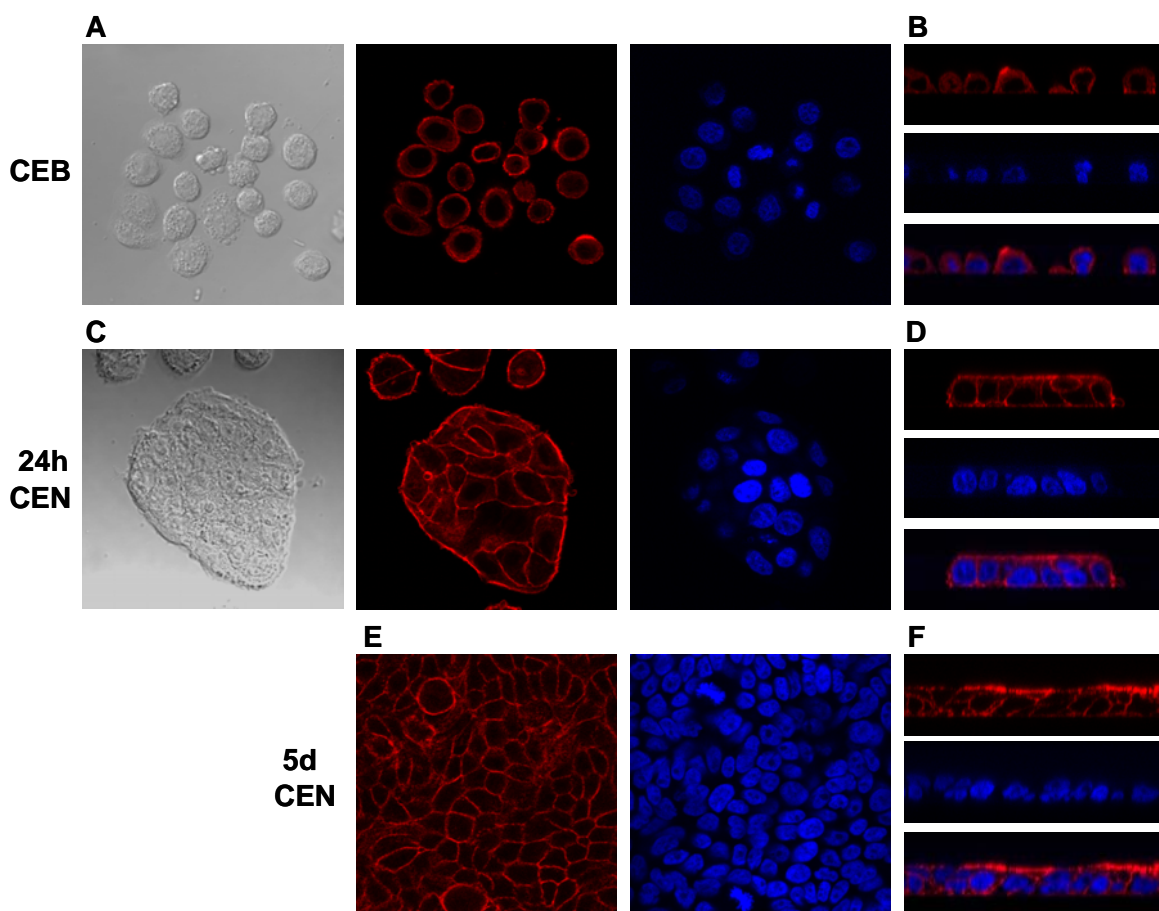


Figura R22: Localización cortical de la actina en células HT-29 M6, analizada mediante microscopía confocal. A, B: En condiciones CEB (cortes horizontales y verticales respectivamente). C, D: A las 24 horas de reañadido 2 mM de cloruro cálcico al medio de cultivo (cortes horizontales y verticales respectivamente). E, F: A los 5 días de reañadido 2 mM de cloruro cálcico al medio de cultivo (células confluentes) (cortes horizontales y verticales respectivamente). La detección de la actina se realizó mediante faloidina conjugada a un fluorocromo. En azul, los núcleos están contrastados con TOPRO. Objetivo 63x.

La inhibición de la diferenciación in vitro, debido a la depleción del calcio extracelular, no conduce a un fenotipo más invasivo, medido como cambios en la movilidad celular

Trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio por el grupo de García de Herreros mostraban que la incubación con 100 nM de PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) en células HT-29 M6 inducía *scattering* celular, pérdida de contactos de adhesión y disociación de la E-cadherina con el citoesqueleto de actina (Fabr  M, et al., 1993; Llosas MD, et al., 1996). El ester de forbol PMA se utiliza frecuentemente para activar la proteína quinasa C (PKC), que comprende una familia de isoenzimas implicadas en la transducción de señales implicadas en procesos como secreción, control del ciclo celular, diferenciación, proliferación, tumorogénesis, metástasis y apoptosis (revisado de Hofmann, 2004).

Puesto que una de las consecuencias del cultivo de las células HT-29 M6 en condiciones limitantes de calcio extracelular es la pérdida de los contactos celulares así como una deslocalización de la E-cadherina en el citoplasma celular, nuestra intención era determinar si en estas condiciones de cultivo las células quedaban liberadas del efecto supresor de la movilidad celular mediado por E-cadherina (ver Introducción). Para ello, realizamos heridas artificiales en monocapas de células HT-29 M6 confluyentes cultivadas en condiciones CEB, a las cuales se les reañadió o no 2 mM de CaCl₂ inmediatamente después de realizadas las heridas. Una vez hechas, se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 horas siguientes para evaluar la capacidad de las células en estas condiciones para migrar, medida como la reducción de la distancia entre los límites de las heridas respecto al día inicial. En paralelo, las células fueron tratadas con 100 nM de PMA.

Los cultivos HT-29 M6 CEN no migran prácticamente en respuesta a la realización de heridas artificiales, tal y como se muestra en la figura R23A, C, y en presencia de PMA se induce un fenotipo de *scattering* caracterizado por la emisión de filopodios, cerrándose prácticamente las heridas a las 72 horas (figura R23A, D). Curiosamente, en condiciones de no adherencia intercelular, las células no fueron capaces de migrar con los días de realizadas las heridas, y al tratar las células con PMA, estas se aplanan, emitiendo "seudo-filopodios", pero no son capaces de migrar (figura R23D). Esta reorganización morfológica que sufren las células en presencia de PMA justificaría la ligera reducción de la distancia entre los límites de las heridas observada a las 24 horas de realizadas las heridas (figura R23B, C). En ningún caso fuimos capaces de observar cambios apreciables en el citoesqueleto de actina (datos no mostrados).

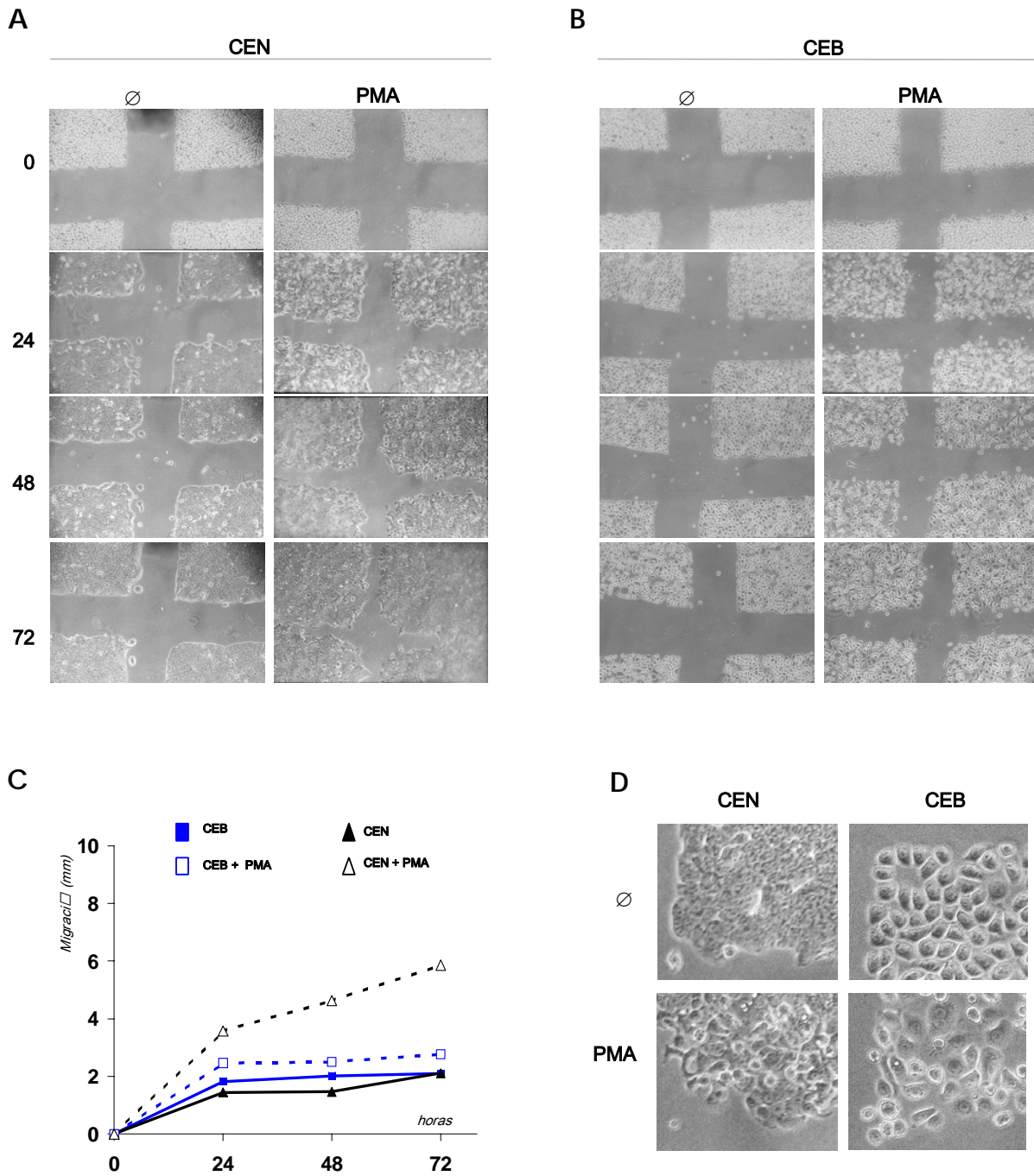


Figura R23: Capacidad de migración celular en respuesta a heridas en células HT-29 M6 cultivadas en condiciones CEN y CEB. Heridas artificiales de aproximadamente 6 mm de diámetro fueron realizadas con un peine esteril; el seguimiento se realizó mediante microscopía de contraste de fases durante las 72 horas posteriores. A) Los cultivos fueron mantenidos en condiciones CEB posterior a la realización de las heridas y una de las placas fue tratada en paralelo con 100 nM de PMA. B) Inmediatamente después de hechas las heridas, se añadió 2 mM de cloruro cálcico al medio de cultivo para inducir la formación de contactos celulares mediados por calcio. En paralelo, una de las placas fue tratada con 100 nM de PMA. C) Representación gráfica del experimento. La capacidad de migración celular fue medida como la distancia entre los límites de las heridas respecto al día inicial. D) Detalles ampliados del fenotipo de las células en cada condición experimental.

Para asegurarnos de que al realizar las heridas no estábamos dañando la superficie del plástico tratado para los cultivos celulares, de tal manera que esto pudiese estar interfiriendo en la adhesión y migración celular, a las heridas realizadas en las monocapas de cultivos CEB confluentes se les añadió 2×10^5 células/cm² en suspensión. A las 24 y 48 horas posteriores, las nuevas células sembradas habían sido capaces de adherirse completamente al plástico, descartando, pues, un impedimento en la adhesión al sustrato (figura R24).

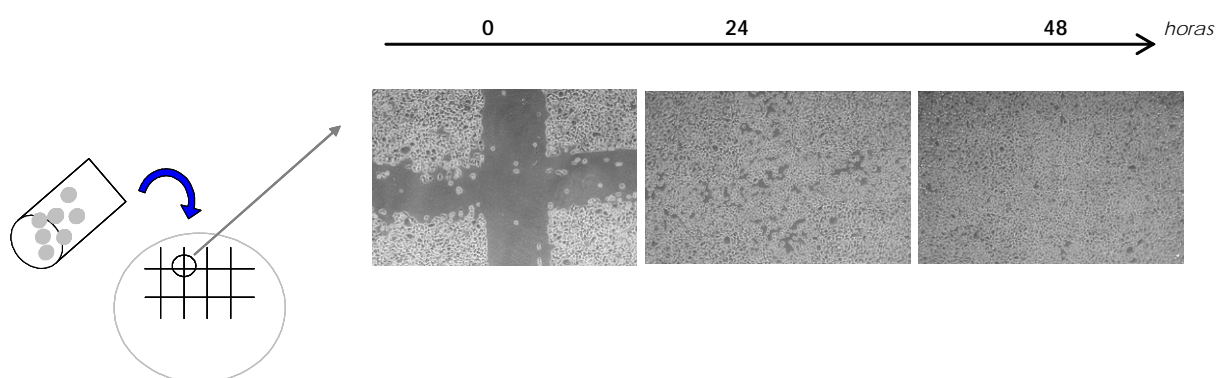


Figura R24: Evaluación de la afectación de la adhesión al sustrato en respuesta a heridas en cultivos CEB confluentes. A la izquierda, representación esquematizada de cómo se realizó el experimento. A la derecha, fotos realizadas con el microscopio de contraste de fases a diferentes tiempos posterior a la realización de las heridas. El tiempo 0 muestra el aspecto de las células antes de la resiembra celular.

Los datos obtenidos nos indican que la simple pérdida de contactos de adhesión no es suficiente para inducir migración celular en las HT-29 M6. Este resultado puede interpretarse de dos maneras: por una parte, que presumiblemente existen vías supresoras de la movilidad celular que serían independientes del programa de diferenciación *in vitro* inducido por calcio extracelular, ó, por otra parte, que se requiere de un gradiente intracelular de calcio mínimo (suprimido en condiciones CEB) que es necesario para el proceso de migración celular.

2.- ESTUDIAR SI EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN IN VITRO ES REVERSIBLE Y SU RELACIÓN CON EL ESTADO DE DIFERENCIACIÓN

A diferencia de lo que ocurre en el tejido adulto normal, donde el proceso de diferenciación culmina con la muerte celular, las células HT-29 M6 pueden mantenerse vivas durante meses en cultivos postconfluentes diferenciados, lo que nos sugiere que el programa de diferenciación *in vitro* que está teniendo lugar en estas células es incompleto. Una de las posibles causas pudiera ser una salida anormal del ciclo celular, que éste fuera suficiente para sostener la diferenciación *in vitro*, pero que no condujera al estado de quiescencia irreversible o de apoptosis característico de células intestinales diferenciadas terminalmente. Por otro lado, sabemos que células inhibidas por contacto pueden resembrarse a baja densidad, induciéndose una re-entrada en el ciclo celular. Por tanto, en este bloque de experimentos estudiaremos si el proceso de diferenciación *in vitro* es reversible, considerando como parámetros la salida del ciclo celular y la expresión génica de marcadores de diferenciación.

RESULTADOS

2.1. Al resembrar a baja densidad cultivos postconfluentes de HT-29 M6, hay una re-entrada en el ciclo celular asociada al silenciamiento transcripcional del programa de expresión génica.

Se tomaron muestras de cultivos postconfluentes diferenciados resembrados a baja densidad, para analizar tanto por citometría de flujo, *northern blot* y *western blot*, diferentes marcadores indicativos tanto de proliferación como de diferenciación celular.

Como se observa en la figura R25B, el análisis por citometría de flujo del patrón de contenido de DNA de cultivos postconfluentes resembrados a baja densidad muestra que en las primeras 12 horas el porcentaje de células en fase S era muy bajo (< 10%) y entre las 12 y 18 horas se observó un notable incremento hasta un pico a las 24 horas. Estos datos son indicativos de que las células vuelven a entrar y progresar en el ciclo celular, de manera sincrónica, cuando cultivos diferenciados son resembrados a baja densidad. Esta capacidad de re-entrar nuevamente en el ciclo celular, vino aparejada de una inhibición de los niveles de mRNA de MUC1, como marcador de diferenciación y de una inducción de los niveles de ciclina D1, como marcador de progresión a través de la fase G1 (figura R25C).

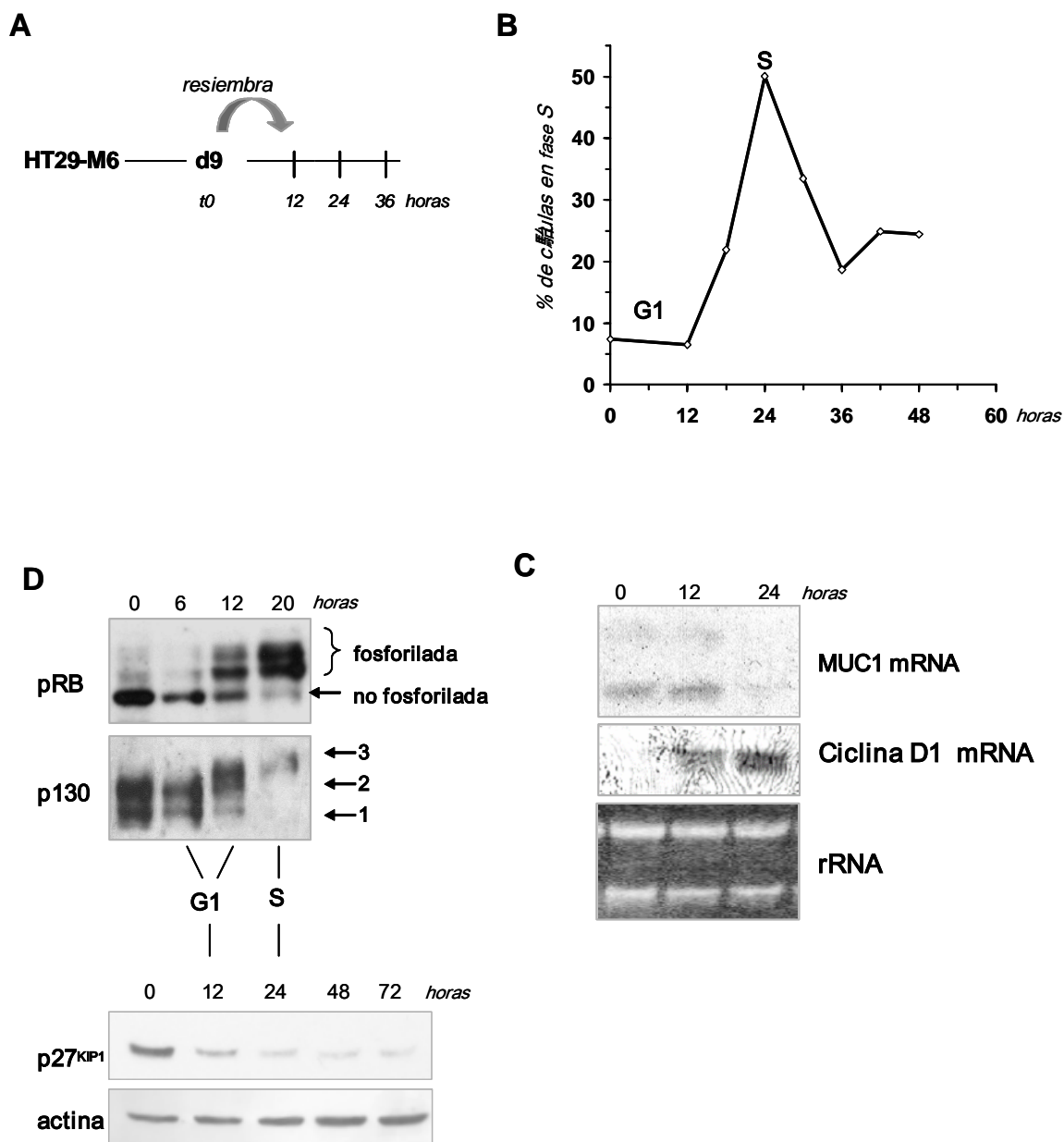


Figura R25: Re-entrada en el ciclo celular con las horas de reiniciadas las células. A: esquema de cómo se realizó este bloque de experimentos. Las células fueron cultivadas durante 9 días, tripsinizadas y resembradas en placas nuevas a una densidad de 5×10^4 células/cm². B: Porcentaje de células en fase S en las horas siguientes a la resiembra, analizando el contenido de DNA por citometría de flujo. C: niveles de mRNA, analizados por northern blot, de MUC1 y ciclina D1 con las horas de reiniciadas las células, utilizados como marcadores de diferenciación y proliferación celular respectivamente. D: Niveles totales de proteína de pRB, p130 y p27^{KIP1} a diferentes tiempos de reiniciación.

Esta re-entrada en el ciclo celular implica, además, una disminución significativa de los niveles de p27^{KIP1}, consistente con el rol que juega este inhibidor de CDKs en la diferenciación asociada a salida del ciclo celular (St. Croix B, et al, 1998; Sgambato A, et al, 2000), así como la hiperfosforilación en G1 de proteínas pockets pRB y p130 (figura R25D) como sustratos de CDK-ciclinas (Vidal A, 2000). Por tanto, la resiembra a baja densidad de cultivos diferenciados induce una re-entrada en el ciclo celular desde el estado quiescente G0.

Para determinar si el programa de activación transcripcional de los marcadores de diferenciación estaba siendo afectado por la re-entrada en el ciclo celular, analizamos la actividad de los promotores mencionados en el apartado 1.3, después de la resiembra a baja densidad de cultivos diferenciados. Para ello, se transfectaron cultivos CEB HT-29 M6 postconfluentes con los promotores de MUC1, MUC5AC y DPPIV siguiendo el protocolo de transfección descrito en materiales y metodología. A los 9 días de transfectadas las células (cultivos CEN), se tripsinizaron de forma controlada para la obtención de suspensiones unicelulares y se sembraron en placas nuevas a baja densidad, recogiendo muestras a las 12 y 24 horas posteriores, como se indica en el esquema R26.

La disminución de los niveles de mRNA de MUC1 se correspondió con una notable disminución de la actividad de su promotor a las 12 horas de reiniciadas las células, tal y como se muestra en la figura R26. Un comportamiento similar presentó el promotor de DPPIV. En cambio, al analizar el promotor de MUC5AC vimos que los valores de actividad luciferasa se mantenían invariables al reiniciar las células, incluso a tiempos más tardíos (superiores a 48h, datos no mostrados). Teniendo en cuenta que la actividad de este promotor se induce con los días de cultivo CEN (ver figura R14), el hecho de que no exista un efecto inhibitorio sobre su actividad en respuesta a re-entrada en ciclo celular nos sugiere que MUC5AC está siendo regulado de manera diferente a MUC1 y DPPIV durante la reiniciación del ciclo.

En el apartado 1.3 mostramos que la baja actividad de estos promotores génicos en condiciones CEB, era reversible por tratamiento con el inhibidor de deacetilasas de histonas TSA. Para comprobar si el mismo mecanismo de silenciamiento transcripcional está teniendo lugar durante la resiembra a baja densidad celular, realizamos los experimentos de resiembra en presencia de TSA. Como se muestra en la figura R26, la presencia de TSA no indujo una desrepresión de la actividad de los promotores génicos de MUC1 ni DPPIV, ni tampoco tuvo ningún efecto inductor sobre la actividad invariable del promotor de MUC5AC.

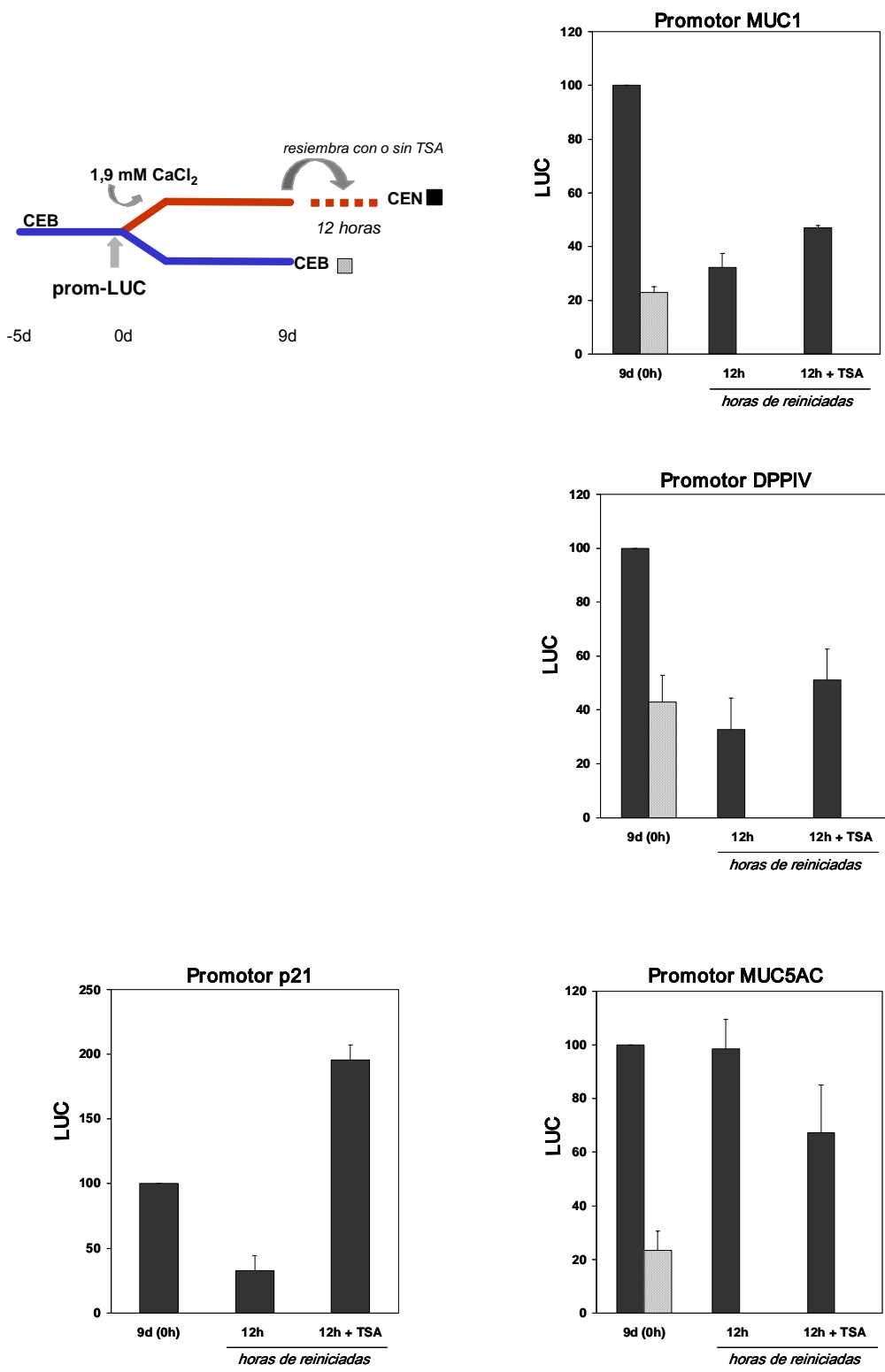


Figura R26: Actividad de los promotores de diferenciación MUC1, MUC5AC y DPPIV al reiniciar las células y efecto del TSA . A la izquierda y arriba, representación esquematizada de cómo se realizó el experimento. En los gráficos, en negro, células mantenidas en condiciones CEN; en rayado, células mantenidas en condiciones CEB. El valor de luciferasa (LUC) representa valores relativos de la actividad de cada promotor génico referido a los 9 días de transfectadas las células en condiciones CEN.

Para controlar la acción del TSA durante el protocolo de reiniciación, transfectamos en paralelo con el promotor de p21^{CIP1}, cuya actividad se encuentra fuertemente reprimida en estas células, y que es desreprimible por TSA (ver apartado 2.2). Al resembrar, pues, el promotor de p21 en presencia de TSA observamos una significativa desrepresión de su actividad transcripcional. Por tanto, estos resultados sugieren que los mecanismos de silenciamiento transcripcional sobre el programa de diferenciación que operan en condiciones CEB o por resiembra a baja densidad son diferentes.

En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que el proceso de diferenciación *in vitro* de las HT-29 M6 es un proceso reversible caracterizado por una capacidad celular de re-entrar y progresar nuevamente en el ciclo celular, aparejado a una inducción de la expresión de genes implicados en la proliferación celular y de un silenciamiento de algunos marcadores de diferenciación.

2.2. p21^{CIP1} NO ES INDUCIDO DURANTE LA DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE HT-29 M6

Es conocido que p21^{CIP1} se encuentra expresado específicamente en el compartimento terminalmente diferenciado del epitelio intestinal (EL Deiry WS, et al., 1995; van de Wetering M, et al., 2002). Resultados obtenidos mediante transfecciones transitorias nos mostraron que la actividad del promotor de p21^{CIP1} era muy baja durante el cultivo hacia confluencia, aunque en ocasiones se inducía ligeramente a los 9 días de transfectadas las células (figura R27A). En cambio, este promotor era sobre-inducido varias veces al ser tratadas las células con butirato sódico o con TSA, sugiriendo que este promotor se encuentra reprimido en HT-29 M6 mediante un mecanismo dependiente de deacetilasas de histona (figura R27A).

Al analizar por western blot los niveles totales de proteína, vimos que la represión transcripcional observada se traducía en la falta de inducción de la proteína de p21^{CIP1} durante el crecimiento de las células a post-confluencia, observándose una expresión basal poco relevante, si se compara con la inducción en respuesta a butirato sódico, compuesto que también actúa desreprimiendo genes silenciados por actividades de acetilasas de histonas (figura R27B).

Estos datos, unidos a los resultados obtenidos al resembrar a baja densidad cultivos confluentes de HT-29 M6 nos sugerían que la falta de inducción de p21^{CIP1} durante la diferenciación *in vitro* podría ser uno de los defectos en la salida del ciclo celular que no permiten la transición a un estado de diferenciación terminal.

La restitución de APC salvaje en HT-29 M6 induce la desrepresión del promotor de p21^{CIP1}

Por otra parte, APC desempeña un papel esencial en el control de la diferenciación celular del epitelio intestinal y se conoce que está mutado en la mayoría de tumores colorrectales esporádicos, así como en las HT-29 M6 (Polankis P, et al., 1999). Su sobreexpresión en varios modelos celulares, incluyendo las líneas celulares de cáncer colorrectal, inhibe la proliferación celular, por lo que la carencia funcional de APC podría explicar, al menos en parte, la falta de diferenciación terminal en HT-29 M6 (Heinen CD, et al., 2002). Nos pareció interesante, pues, valorar los posibles efectos de la restitución funcional de APC sobre el ciclo celular en estas células y, específicamente, si tenía algún efecto sobre la actividad del promotor de p21^{CIP1}.

En primer lugar, transfectamos APC, en paralelo al vector de expresión vacío, en cultivos HT-29 M6 preconfluentes y los sometimos a tratamiento con G418 durante varios días para seleccionar las células que habían incorporado el vector de expresión conteniendo el gen de resistencia a neomicina. El resultado fue una inhibición significativa de la clonogenicidad después de la transfección en los cultivos transfectados con APC respecto a los transfectados con el vector vacío (figura R28). En paralelo, se realizó el mismo experimento en cultivos de células HCT116, las cuales conservan APC salvaje, no observándose efectos a causa de la transfección indicando que la sobre-expresión de APC no provoca toxicidad. Este resultado confirma que la restitución funcional de APC en HT-29 M6 (cuyo APC endógeno está mutado) produce una inhibición del crecimiento celular.

Para evaluar la posibilidad que la falta de APC fuera responsable de la no inducción de p21^{CIP1}, realizamos experimentos de cotransfección utilizando la construcción luciferasa-reporter conteniendo el promotor de p21^{CIP1} sobre cultivos HT-29 M6 y el vector de expresión de APC salvaje.

De manera interesante, la cotransfección con un vector de expresión conteniendo APC salvaje condujo también a una desrepresión del promotor de p21 hasta valores comparables a los conseguidos por tratamientos con TSA o butirato sódico, a los 9 días de transfectadas las células (figura R27A).

Estos resultados constituyen una evidencia que relaciona los mecanismos de control del ciclo celular en HT-29 M6 (expresión de p21^{CIP1}) con las alteraciones oncogénicas más frecuentes en cáncer colorrectal (mutación de APC) y por tanto, constituyen un modelo muy interesante para estudiar las vías de regulación implicadas en este proceso.

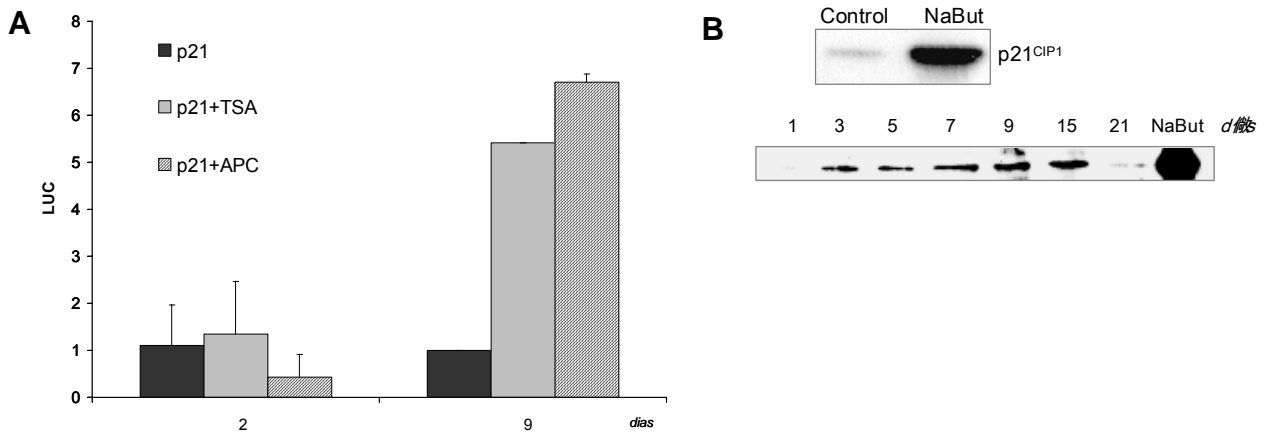


Figura R27: Expresión de p21^{CIP1} durante la diferenciación *in vitro*. A) Desrepresión del promotor de p21^{CIP1} al restituir APC *wt*. Células HT-29 M6 fueron cotransfectadas con el promotor de p21^{CIP1} y con el vector conteniendo el cDNA de APC *wt* o el vector CMV vacío (control). Las muestras cotransfectadas con el vector CMV fueron incubadas con 5µM de TSA 24 horas previo a la recogida de muestras. El valor de luciferasa (LUC) representa valores relativos de la actividad del promotor referido al control cotransfectado con CMV (no tratado con TSA). B) 10 µg de extracto proteico fueron analizados por western blot con anticuerpos contra p21^{CIP1}, en muestras procedentes de diferentes días de cultivo CEN.

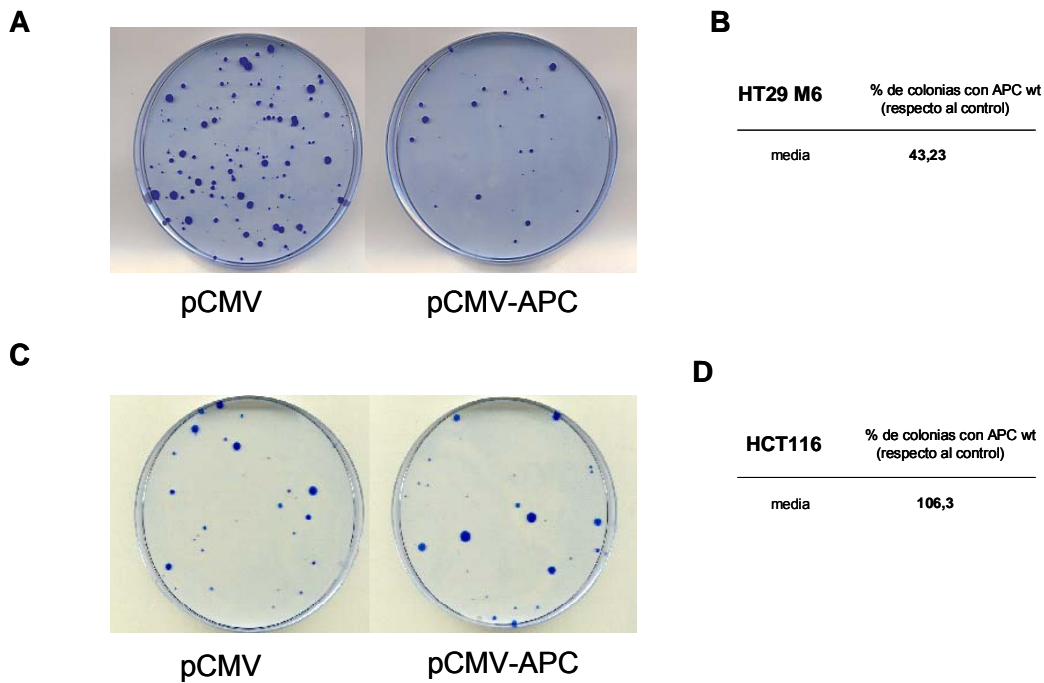


Figura R28: Ensayo de formación de colonias. Cultivos preconfluentes HT-29 M6 (A, B) y HCT-116 (C, D) fueron transfectedos con APC o con el vector de expresión vacío y sometidos a tratamiento con neomicina (G418) durante 15-30 días y posteriormente fueron fijadas con PBS+PFA 0,5% y teñidas con Comassie Blue.

3.- ESTUDIAR LA POSIBLE IMPLICACIÓN DE MOLÉCULAS CONTROLADORAS DEL CICLO CELULAR EN LA REGULACIÓN DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN DURANTE LA DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE LAS HT-29 M6.

Tanto la salida del ciclo celular como la inducción de la expresión de marcadores de diferenciación están regulados por el programa dependiente de calcio extracelular. Sin embargo, no sabemos si ambos procesos ocurren de manera paralela o si, por el contrario, la salida del ciclo desempeña un papel inductor de la expresión génica (ver esquema R29A). Esta pregunta tiene su razón en la implicación que ciertas moléculas de control del ciclo celular tienen sobre el proceso de diferenciación celular en otros modelos (Hauser PJ, et al., 1997; Skapek SX, et al., 1995; 1996).

Por tanto, el siguiente bloque de experimentos que nos planteamos consistieron en manipular moléculas de control del ciclo celular durante la diferenciación *in vitro* y determinar si existía un efecto sobre la expresión génica de los marcadores estudiados, para lo cual utilizamos como estrategia la sobreexpresión, de manera ectópica, de ciclina D1 y p27^{KIP1}.

RESULTADOS

Patrones de expresión de ciclina D1 y p27^{KIP1} durante la diferenciación *in vitro*

Ambas proteínas tienen un comportamiento diferencial durante el proceso de diferenciación *in vitro* en nuestro modelo celular. Por una parte, se sabe que ciclina D1 está involucrada en la transición G1/S (Resnitzky D, et al, 1994; Resnitzky D y Reed SI, 1995). Hemos comprobado que las HT-29 M6 presentan unos niveles de esta proteína muy bajos durante la diferenciación y que sólo es inducida durante la re-entrada en el ciclo celular de manera paralela al silenciamiento transcripcional de promotores génicos, siendo la falta de expresión independiente de contactos de adhesión (figura R29B).

En el caso del inhibidor de CDKs p27^{KIP1}, se describió como un factor inducido por la formación de contactos homotípicos de E-cadherina (St. Croix B, et al., 1998) y nosotros hemos comprobado que presenta un patrón de expresión parecido al de los marcadores de diferenciación en HT-29 M6, siendo su inducción uno de los posibles mecanismos de salida del ciclo celular durante la diferenciación *in vitro* (figura R29C).

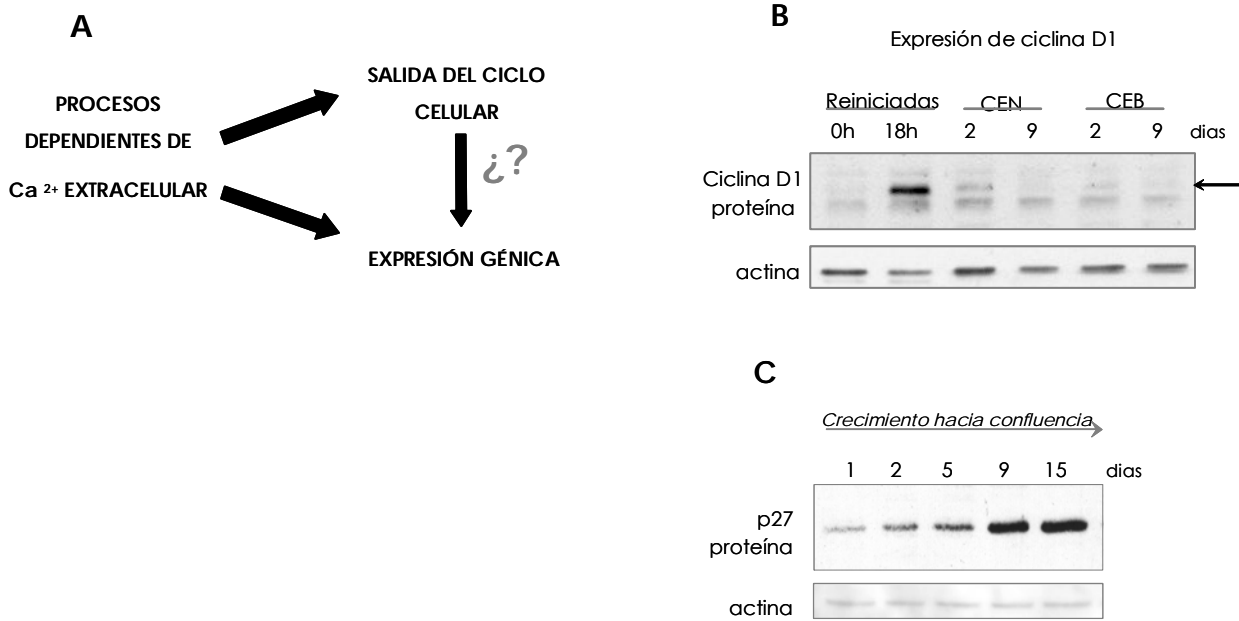


Figura R29: A: Posible coordinación de ambos procesos (salida del ciclo celular y expresión génica) durante la diferenciación *in vitro* de las células HT-29 M6. B: Niveles de expresión de la proteína ciclina D1 durante el crecimiento de las HT-29 M6: western blot de extractos totales de proteína provenientes de cultivos CEN y CEB a los 2 y 9 días de siembra, así como al inducir re-entrada en el ciclo por resiembra de cultivos diferenciados de 9 días (0h) hasta la entrada en fase S (18h). C: Niveles de la proteína p27^{KIP1} durante el crecimiento hacia confluencia en condiciones CEN.

Así pues, realizamos cotransfecciones transitorias de los vectores de expresión conteniendo los cDNAs humanos de ciclina D1 (ver materiales y métodos) y p27^{KIP1}, con los promotores reporters de MUC1, MUC5AC y DPPIV, siguiendo el mismo protocolo de transfección utilizado hasta ahora (descrito en apartado 1.3). De forma paralela, también generamos el cDNA de p27^{KIP1}, al cual llamamos p27-3M, que codifica para una proteína mutada en el residuo treonina-198, el cual corresponde a un sitio de fosforilación descrito recientemente como crítico para la localización citoplasmática de este inhibidor, por lo cual la proteína generada está constitutivamente en el núcleo (Fujita N, et al., 2002). Puesto que uno de los mecanismos de control de la actividad de p27^{KIP1} es precisamente la localización subcelular de esta proteína, pensamos que el mutante generado nos podría aportar información interesante respecto al posible papel de esta molécula en la regulación de la expresión génica en nuestro modelo celular.

La sobre-expresión de ciclina D1 y p27^{KIP1} modifica la actividad de los promotores de MUC1, MUC5AC y DPPIV

Los resultados de las transfecciones se muestran en la figura R30 y R31 respectivamente y están referidas a los 9 días posteriores a la transfección en muestras suplementadas o no con 2 mM de cloruro cálcico.

Al sobre-expresar ciclina D1 en cultivos CEN observamos una disminución muy significativa de la actividad de los promotores de MUC1, MUC5AC y DPPIV, hasta valores similares a los obtenidos en cultivos CEB cotransfectados con vector control (figura R30). Este efecto inhibitorio también tuvo lugar en condiciones CEB, pero las diferencias son menos aparentes debido a la baja actividad que presentan los promotores en estas condiciones de cultivo. Puesto que anteriormente habíamos visto que la baja actividad de los promotores génicos en ausencia de contactos de adhesión era atribuible, al menos en parte, a mecanismos de represión mediados por deacetilasas de histonas (ver apartado 1.3), quisimos ver si esta reducción de la actividad de los promotores de diferenciación mediada por ciclina D1 podía ser suprimida por tratamiento con TSA. Observamos que la TSA es incapaz de revertir el efecto de ciclina D1 sobre los promotores en condiciones CEN, pero sí que es capaz de hacerlo en condiciones CEB al cotransfectar con el vector control (figura R30).

Estos resultados nos están sugiriendo que el mecanismo por el cual ciclina D1 está modulando la expresión génica durante la diferenciación *in vitro* es independiente de deacetilasas de histonas y del programa de diferenciación inducido por calcio; en todo caso, se trata de un mecanismo distinguible de la represión sensible a TSA en condiciones CEB. Esta conclusión es compatible con el hecho de que ciclina D1 sólo se induce por resiembra a baja densidad, condición en la que el silenciamiento génico es insensible a TSA (ver figura R26). Finalmente, la existencia de dos mecanismos de represión transcripcional en dependencia de las condiciones de re-entrada en ciclo (resiembra y expresión de ciclina D1, cultivo CEB y p27^{KIP1} presumiblemente inactivo) sugiere que el mero hecho de inducir una re-entrada en ciclo celular por parte de ciclina D1 (no lo hemos analizado en este trabajo) no es suficiente por sí mismo para explicar su efecto sobre la transcripción.

Por otra parte, la sobre-expresión de los cDNAs correspondientes a p27^{KIP1} salvaje y p27^{KIP1}-3M es capaz de revertir, al menos casi totalmente en los casos de MUC1 y MUC5AC, los niveles basales de actividad luciferasa observados en cultivos CEB, hasta niveles comparables a los obtenidos en cultivos CEN (figura R31).

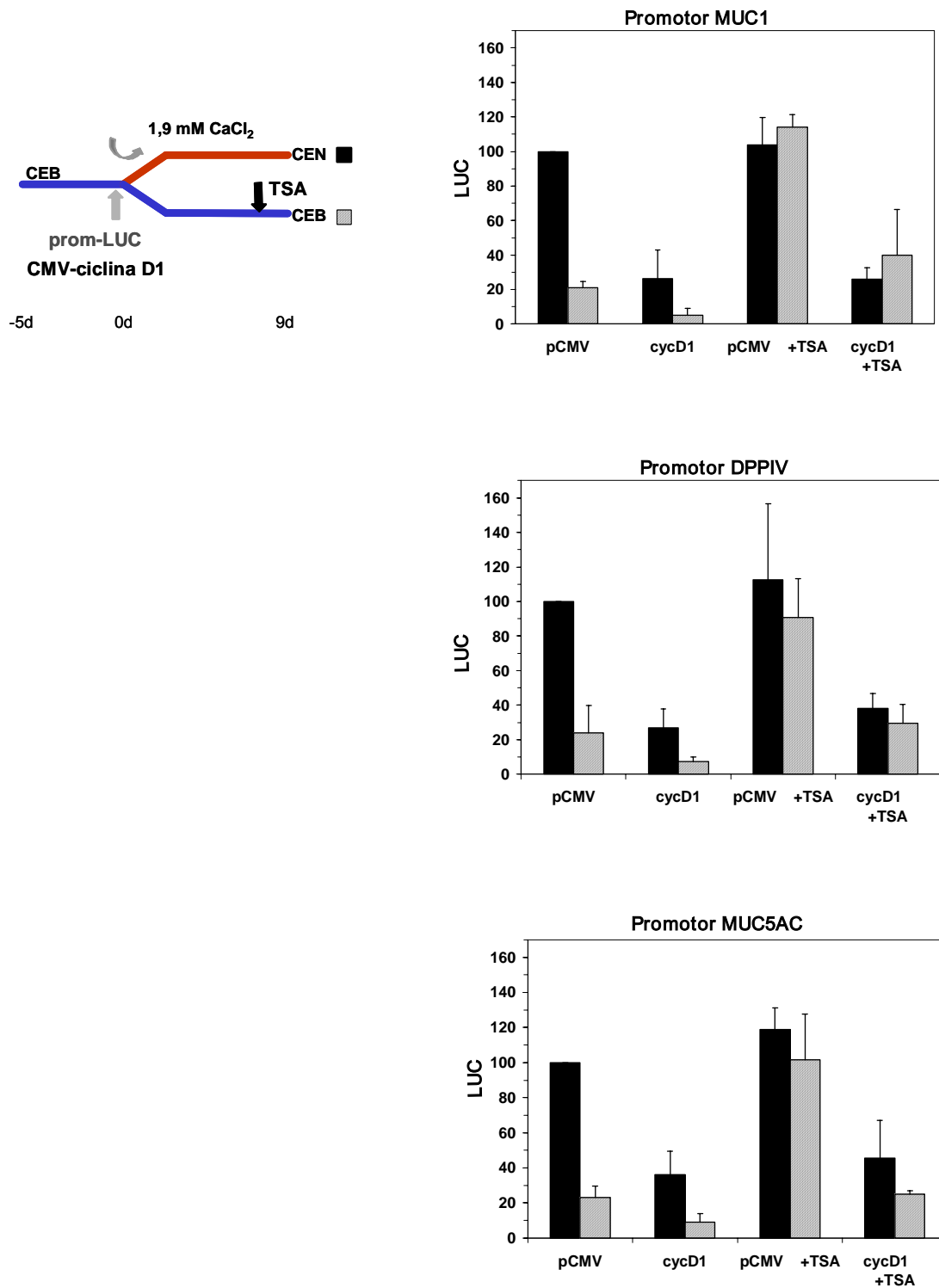


Figura R30: Efectos de la sobreexpresión ectópica de ciclina D1 a los 9 días de cotransfectadas células HT-29 M6 en condiciones CEB (rayado) o CEN (negro). A la izquierda, esquema de cómo se realizó el experimento. Una vez cotransfectadas con el cDNA de ciclina D1, 24 horas antes de la recogida de muestras se trataron las células con 5 μ M de TSA. El valor de luciferasa (LUC) representa valores relativos de la actividad de los promotores génicos referido al control CEN cotransfectado con CMV.

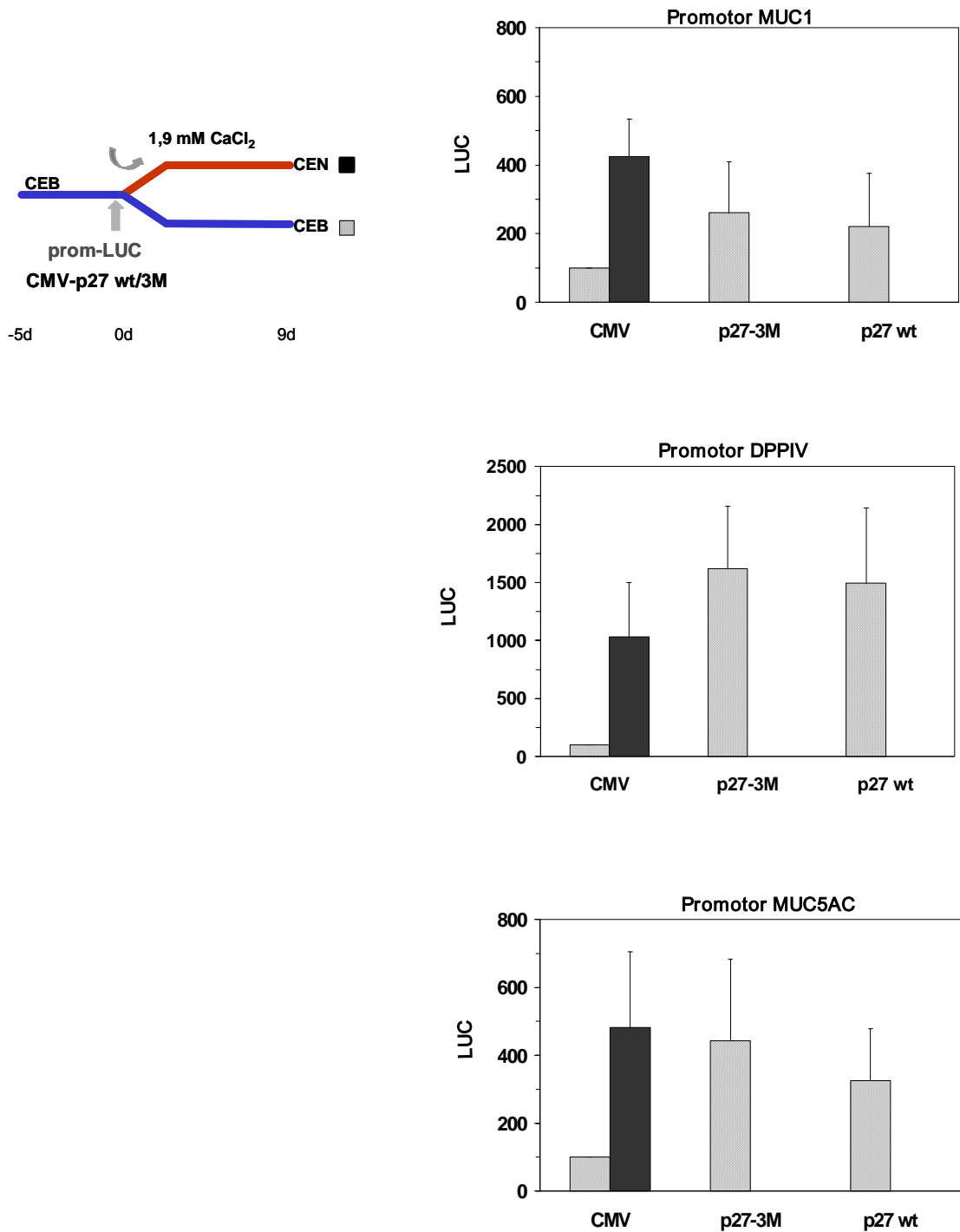


Figura R31: Efectos de la sobreexpresión ectópica de p27^{KIP1} (wt y mutado) a los 9 días de cotransfectadas células HT-29 M6 en condiciones CEB (rayado) o CEN (negro). A la izquierda, esquema de cómo se realizó el experimento. El valor de luciferasa (LUC) representa valores relativos de la actividad de los promotores génicos referido al control CEN cotransfectado con CMV.

Así pues, p27^{KIP1} tiene la capacidad de inducir la transcripción génica en ausencia de diferenciación dependiente de calcio extracelular, sugiriendo que p27^{KIP1} podría ser un mediador importante del proceso de diferenciación *in vitro* en estas células. La ausencia de diferencias significativas entre el efecto de p27^{KIP1} salvaje y el de p27^{KIP1}-3M sugiere que su sobre-expresión es suficiente para modular la transcripción, aunque no descarta que la localización subcelular pueda participar en la regulación de la proteína endógena dependiendo de condiciones CEN o CEB (ver discusión).

De forma general, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la relación existente entre la salida del ciclo celular y la expresión génica durante la diferenciación *in vitro* de estas células, y nos aportan evidencias experimentales de la implicación de estas moléculas reguladoras del ciclo celular en la regulación de la transcripción de genes asociados al fenotipo diferenciado en las HT-29 M6.

La activación de programas de diferenciación celular es un proceso inducido y/o modulado por diversos tipos de señales extracelulares, las cuales normalmente implican una salida del ciclo celular. En el caso de las células epiteliales, incluyendo células del epitelio colónico, se sabe que una de las señales de parada de la proliferación celular durante la diferenciación es el establecimiento de contactos y uniones intercelulares. Estas uniones intercelulares son imprescindibles para la diferenciación epitelial (o epitelialización), ya que posibilitan la integridad estructural del epitelio (o de monocapas impermeables de células diferenciadas en cultivo) y la polarización de los dominios membranales apical y basolateral. Tal como ha sido estudiado en nuestra Unidad durante los últimos años, la desestabilización de tales uniones en células tumorales está asociada a la desdiferenciación celular y la adquisición de mayor capacidad invasiva (Battle E, et al., 2000; Guaita S, et al., 2002).

En este trabajo hemos estudiado el proceso de diferenciación *in vitro* que ocurre de manera espontánea en las células HT-29 M6 durante el crecimiento hacia confluencia. Nuestra hipótesis de trabajo ha considerado que la manipulación de la adhesión intercelular dependiente de calcio extracelular podría ayudarnos a discernir diferentes partes del programa de diferenciación *in vitro*, en particular como están coordinados los procesos de epitelialización, salida del ciclo celular y expresión génica asociada al fenotipo diferenciado.

Los resultados que presentamos en este trabajo aportan evidencias sólidas acerca del papel del calcio extracelular como modulador no sólo de la epitelialización, sino también del ciclo celular y de la expresión génica durante la diferenciación *in vitro*. Aunque puede existir más de un mecanismo por el que el calcio extracelular sea responsable de los efectos observados, los resultados obtenidos son consistentes con el requerimiento de contactos de adhesión para la diferenciación epitelial.

Además, los resultados sugieren que reguladores del ciclo celular, concretamente ciclina D1 y p27, desempeñan un papel determinante en el control del programa de expresión génica durante la diferenciación. Este resultado es muy relevante ya que: (1) su función parece tener lugar de manera general sobre el programa de expresión génica, y (2) al estar estas proteínas implicadas en la progresión tumoral, su mecanismo de acción emerge como una diana para manipular el fenotipo de diferenciación celular y con ello la tumorigenicidad.

Por otro lado, hemos descubierto que parte del proceso de diferenciación *in vitro* es independiente de la formación de contactos de adhesión y de la epitelialización, concretamente niveles basales de expresión génica asociada a diferenciación y la producción de vesículas de moco. Asimismo, en condiciones de no adherencia celular, las células no adquieren capacidad invasiva, lo cual nos está indicando que la

desdiferenciación celular observada en tumores y la adquisición de capacidad invasiva podría tener lugar por vías separadas. En cualquier caso, estos resultados sugieren que la pérdida de contactos de adhesión no es de por sí suficiente para una desdiferenciación celular completa ni para la adquisición de propiedades invasivas, a pesar de ser una de las características de la transición epitelio-mesénquima en tumores.

Finalmente, hemos obtenido evidencias preliminares acerca de la existencia de una vía de regulación de APC sobre p21^{CIP1} cuya inactivación podría estar relacionada con la reversibilidad del programa de diferenciación *in vitro* y con su incapacidad para llevar a término un programa de diferenciación terminal.

En la figura D1 mostramos un esquema que integra los principales resultados obtenidos en este trabajo, siguiendo a continuación la discusión de aquellos aspectos de mayor interés.

1. El programa de diferenciación *in vitro* dependiente de calcio extracelular

Para diseccionar diferentes aspectos del proceso de diferenciación *in vitro* hemos usado la depleción parcial del calcio presente en el medio de cultivo, una metodología comúnmente utilizada para suprimir los contactos de adhesión intercelular (originalmente empleada por Hennings H, et al, 1980a y 1980b). De esta forma, los contactos de adhesión célula-célula y otros procesos dependientes de adhesión celular pueden ser inducidos, de manera sincrónica, al re-establecer la concentración extracelular normal de calcio. Esta estrategia nos ha permitido suprimir parte del proceso de diferenciación *in vitro*, incluida la polarización en dominios membranales, la salida del ciclo celular hacia G0 y la inducción transcripcional de marcadores de diferenciación. La depleción del calcio extracelular es parcial (entre 20 y 100 μ M según mediciones realizadas de manera rutinaria en los diversos lotes de tratamiento del suero fetal usado en el medio de cultivo; ver Materiales y Métodos), de tal manera que se mantiene un gradiente de concentración entre el exterior y el interior celular que hemos estimado en un mínimo de 200:1. Sin embargo, no podemos descartar que otras vías celulares además de los contactos de adhesión - por ejemplo vías en las que el calcio actúa como regulador intracelular (Berridge MJ, et al., 2003) - puedan verse afectadas en estas condiciones experimentales y sean responsables de parte del programa de diferenciación.

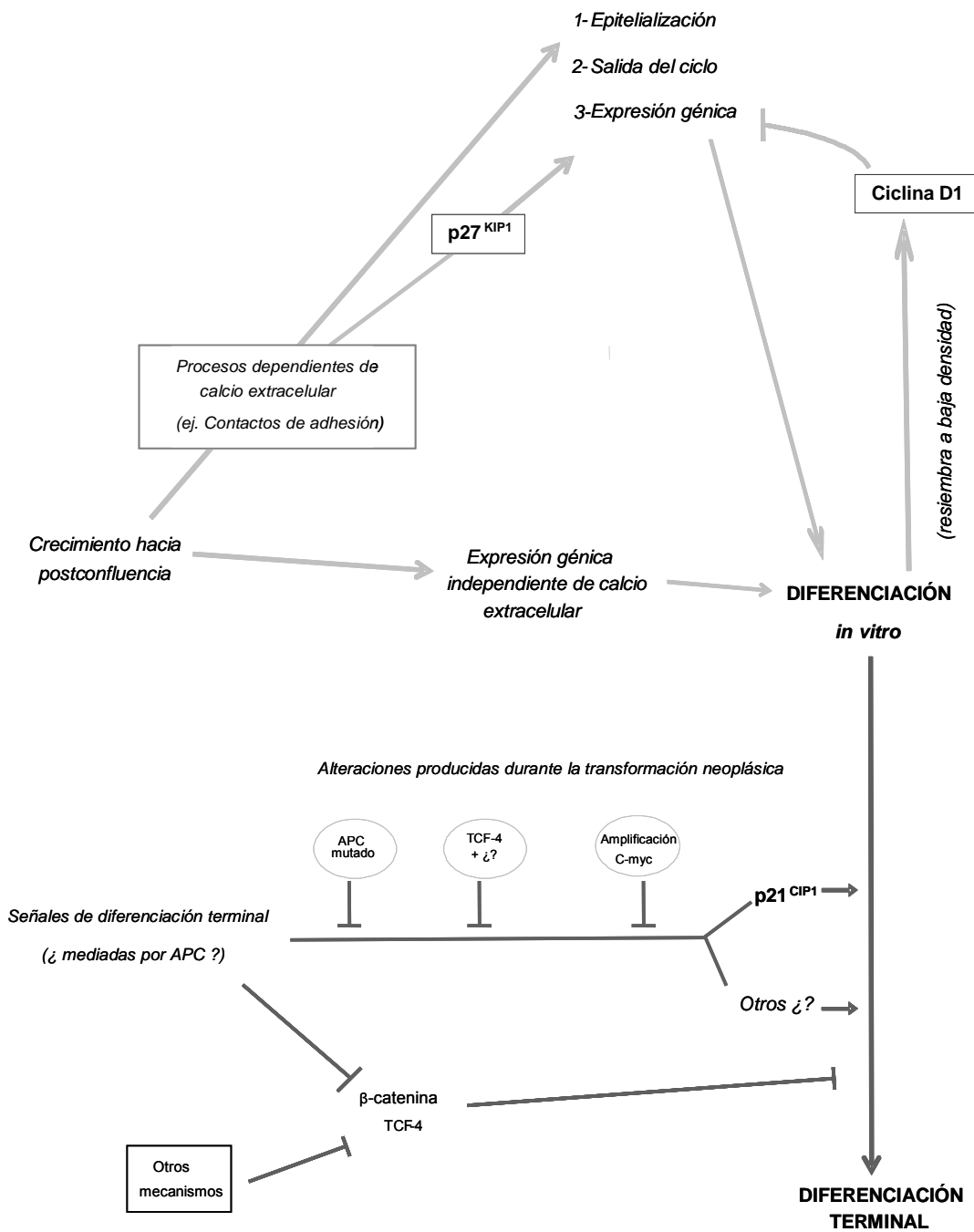


Figura D1: Control del proceso de diferenciación *in vitro* de las HT-29 M6 durante el crecimiento hacia postconfluencia, a partir de los resultados obtenidos en este trabajo.

Aparte de su utilidad experimental, el calcio es un agente con propiedades preventivas demostradas en cáncer de colon que puede actuar a través de múltiples vías de regulación, incluyendo las de diferenciación celular (revisado en Lamprecht SA y Lipkin M, 2003). En este sentido, varios trabajos han mostrado la influencia de la concentración extracelular de calcio en la citodiferenciación de diferentes tipos de células epiteliales en cultivo. Uno de los modelos celulares más estudiados es el de queratinocitos humanos, donde es conocido que el gradiente de calcio es un factor crítico en el proceso de diferenciación (Hennings H, et al., 1983). En un estudio publicado recientemente, se muestran evidencias del papel del calcio extracelular como regulador de la diferenciación *in vitro* de células de queratinocitos HaCaT a través de la modulación de los niveles de expresión de IGFBP-3 (IGF binding protein-3) así como de la inducción de profilagrina, un marcador de diferenciación terminal en este tipo celular (Edmondson S, et al., 2001). De forma similar, estudios realizados en cultivos primarios de células epiteliales de glándulas salivares humanas mostraron que cambios en la concentración extracelular de calcio de 0,2 mM a 1 mM inducen la formación de contactos célula-célula (mayoritariamente desmosomas) así como la diferenciación morfológica de las células acinares, con la consecuente inducción de la expresión de α -amilasa, uno de los marcadores distintivos de estas células glandulares (Hiraki A, et al., 2002). La implicación del calcio en la diferenciación epitelial intestinal se ha evidenciado también en estudios realizados en líneas derivadas de tumores colorrectales, donde concentraciones extracelulares de calcio de 1mM aproximadamente pueden promover la diferenciación *in vitro* de células Caco-2, por ejemplo (Hulla W, et al., 1995; Kallay E, et al., 1997). Más allá de estos datos, los mecanismos por los cuales el calcio extracelular está mediando estos efectos es una de las cuestiones todavía sin respuesta.

Durante los últimos años, además, se han obtenido evidencias acerca de la existencia de moléculas de membrana sensibles a cambios en la concentración extracelular de calcio, llevando a la identificación del CaSR (*calcium sensing receptor*) que puede modular vías de regulación intracelulares (Hofer AM y Brown EM, 2003). Desafortunadamente, existen muy pocos datos sobre la implicación de tales "receptores de calcio" en la diferenciación epitelial. En particular, se sabe que estos receptores pueden modular la secreción en células gástricas (Caroppo R, et al., 2004). Además, el CaSR se detecta en el compartimento terminalmente diferenciado del epitelio intestinal y colónico y su expresión se encuentra disminuida en tumores de colon diferenciados y casi ausente en tumores indiferenciados, lo cual se correlaciona con su capacidad para regular positivamente la expresión de E-cadherina e inhibir la actividad transcripcional de β -catenina-TCF (Chakrabarty S, et al., 2003). Sin embargo, nuestros cultivos CEB no muestran cambios significativos ni en la

expresión de E-cadherina ni en la actividad β -catenina-TCF (ver más adelante), lo cual sugiere que los efectos de la depleción parcial del calcio no tienen lugar a través del CaSR.

¿Podrían ser los contactos adherentes y la E-cadherina los mediadores moleculares de la activación del programa de diferenciación *in vitro* dependiente de calcio extracelular?

Nuestros resultados nos muestran que una de las consecuencias del cultivo en condiciones de bajo calcio extracelular (CEB) es la inhibición de la adhesión y la polarización celular: se suprime la formación del complejo de uniones intercelulares (contactos adherentes, uniones estrechas y desmosomas), también el establecimiento de dominios membranales apical y basolateral característicos del epitelio polarizado, y E-cadherina y β -catenina se detectan dispersas en el citoplasma celular. Los contactos de adhesión requieren de la unión homofílica dependiente de calcio de moléculas de E-cadherina entre células vecinas. El hecho de que la E-cadherina sea la principal molécula de adhesión en HT-29 M6 y de que sea una de las dianas durante procesos de dediferenciación en HT-29 M6 apunta a que sea también el mediador, al menos en parte, de la dependencia de calcio extracelular por parte de la diferenciación *in vitro*.

Para determinar el grado de implicación de los contactos mediados por E-cadherina en la activación del programa de diferenciación *in vitro* sería interesante comprobar si inactivando la E-cadherina se reproducen los mismos efectos que con el cultivo en condiciones CEB. Nosotros realizamos construcciones de E-cadherina donde delecionamos el dominio extracelular o intracelular de la proteína para que actuaran como dominantes negativos de la proteína endógena, pero no conseguimos aislar poblaciones que expresaran el cDNA exógeno. Métodos alternativos para contestar esta cuestión podrían consistir en usar anticuerpos anti-E-cadherina que inhiben el contacto homofílico célula-célula.

Los posibles mecanismos por los que E-cadherina podría estar mediando la diferenciación *in vitro* son múltiples. En primer lugar, E-cadherina secuestra β -catenina en el compartimento de uniones laterales asociadas al citoesqueleto de actina con lo que impide su actividad transcripcional como co-activador de TCF-4 (Nelson & Nusse, 2004). En concordancia, detectamos β -catenina exclusivamente en la zona de contactos laterales en células HT-29 M6 diferenciadas y la depleción parcial de calcio implica su deslocalización al citoplasma (ver figura R3). Sin embargo, esta deslocalización no se traduce en una acumulación nuclear de β -catenina ni en un incremento de la actividad transcripcional del elemento de DNA TOP de respuesta a TCF-4 (datos no mostrados) con lo que concluimos que la

desdiferenciación provocada por el cultivo CEB no es debido a la activación de la vía β -catenina-TCF-4.

Un posible segundo mecanismo podría inferirse de la interacción funcional entre E-cadherina y receptores de membrana, como por ejemplo el receptor de EGF. El resultado de esta interacción parece depender del tipo celular. Gutkind y colaboradores mostraron en queratinocitos transformados HaCat que la E-cadherina, a través del establecimiento de los contactos adherentes dependientes de calcio extracelular, está implicada en la transducción de señales al interior celular reclutando el receptor de EGF y activando la vía MAPK (Pece S, et al., 1999; 2000). En cambio, en células MDCK y células epiteliales de mama, los contactos mediados por E-cadherina impiden la activación del receptor de EGF en respuesta al ligando (Takahashi K & Suzuki K, 1996; Qian X, et al., 2004). Estudios recientes realizados en células Caco-2 han mostrado, también, que el empaquetamiento de la E-cadherina en los contactos adherentes conduce a la inhibición de MEK/ERK de manera dependiente de la vía PI3K/Akt (Laprise P, et al., 2004). Es de destacar que el grado de diferenciación en sublíneas HT-29 con fenotipo mucosecretor es determinante en el tipo de señalización mediado por EGFR, proliferación en células menos diferenciadas o inhibición del crecimiento en células más diferenciadas (Huang F, et al., 1995; Sauma S, et al., 1995). Por tanto, la acción moduladora de E-cadherina sobre la señalización de EGFR puede ser un mecanismo importante durante el proceso de diferenciación dependiente de calcio.

En relación a la posible asociación entre E-cadherina/EGFR y la diferenciación celular, cabe destacar también que las vías de señalización intracelular mediadas por MAPK y PI3K están sobre-activadas en tumores de colon (Hoshino R, et al., 1999; Khaleghpour K, et al., 2004), y que la fosforilación de PI3K sobre componentes de esta vía (AKT, FKHR y p70S6K) está directamente correlacionada con la tumorigenicidad de diferentes líneas celulares de adenocarcinoma de colon (Khaleghpour K, et al., 2004). Además, la inhibición *in vitro* de la vía PI3K (mediante inhibición química o sobre-expresión del gen supresor tumoral PTEN) contribuye de manera significativa a la diferenciación enterocítica de células HT-29 y Caco2 (Wang Q, et al., 2001), lo cual nos indica que esta vía de señalización juega un papel importante en la diferenciación celular intestinal. En este mismo sentido, St. Croix y colaboradores mostraron que la supresión de contactos adherentes mediante anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular de E-cadherina impide la inducción de p27^{KIP1}, y que los niveles de p27^{KIP1} en estas condiciones se restituyen por tratamiento con un inhibidor químico de PI3K (St. Croix B, et al., 1998). Sabemos que la fosforilación de p27^{KIP1} por PI3K/AKT impide su transporte al núcleo facilitando así su degradación en el citoplasma (Liang J, et al., 2002; Shin I, et al., 2002; Viglietto G, et al., 2002) y el factor de transcripción FKHR, sustrato regulado negativamente por PI3K/AKT, activa la transcripción de p27^{KIP1} (Dijkers PF, et al.,

2000; Nakamura N, et al., 2000). Nosotros sugerimos que la capacidad de p27^{KIP1} endógena para actuar sobre la transcripción es activada por calcio extracelular (efecto posiblemente mediado por E-cadherina). Por tanto, nuestros resultados concuerdan con los datos mencionados, y proponemos que un posible mecanismo de señalización por E-cadherina durante la diferenciación *in vitro* podría consistir en una inhibición de las vías MAPK y PI3K por la formación de contactos adherentes, la consecuente inducción/activación de p27^{KIP1}, y la acción de este último sobre la salida del ciclo celular y sobre la activación transcripcional de marcadores de diferenciación por p27^{KIP1} (la acción particular de p27^{KIP1} sobre la diferenciación *in vitro* se discute más adelante). Es plausible también que otras vías de señalización en paralelo interaccionen con la vía propuesta.

Por otro lado, la incapacidad de epitelialización que observamos en condiciones limitantes de calcio implica no sólo la pérdida de los contactos adherentes sino también de desmosomas y de uniones estrechas. En este sentido, podemos considerar dos posibilidades:

- 1) La funcionalidad de la E-cadherina y los contactos adherentes son imprescindibles para la formación y estabilización de otras uniones intercelulares.
- 2) La depleción de calcio extracelular está afectando también la formación de desmosomas y/o uniones estrechas de manera directa.

Es conocida la importancia de las uniones adherentes mediadas por E-cadherina como señales iniciadoras en el establecimiento de la polaridad celular y en la posterior estabilidad de otras uniones célula-célula del tipo desmosomas y uniones estrechas (Grindstaff K, et al., 1998; Suzyki A, et al., 2001). Jacquier-Sarlin y colaboradores han mostrado recientemente que, en las células HT-29, la madurez y funcionalidad de las uniones adherentes (dada por la interacción cooperativa entre E-cadherina y p120^{ctn}) es esencial para la polarización y diferenciación celular, aportando nuevas evidencias de la relevancia de p120^{ctn} como regulador positivo de la función de la E-cadherina durante la diferenciación epitelial (Gout S, et al., 2004). Por otra parte, existen evidencias en la literatura acerca de la importancia del calcio extracelular en la estabilidad de las uniones estrechas (Ma TY, et al., 2000) así como de su implicación directa en la formación de los desmosomas (Chitaev NA & Troyanovsky SM, 1997). Por tanto, podría ser que la limitación de calcio en los cultivos CEB esté afectando de forma directa la formación de los desmosomas. Sobre este respecto, por trabajos realizados en nuestro laboratorio, sabemos que a pesar de que las células HT-29 parentales expresen E-cadherina no forman contactos adherentes funcionales (Skoudy A, et al., 1996; Gout S., et al., 2004), aunque sí forman otras uniones celulares del tipo desmosomas (Mercé Martín, tesis doctoral 2001). Estos desmosomas parecen ser responsables de mantener la

cohesión intercelular en la multicapa HT-29 postconfluyente. Esto sugiere que la formación de desmosomas puede ocurrir en independencia de la formación de contactos de adhesión en este tipo celular. Además, el cultivo de HT-29 en condiciones CEB conduce a un fenotipo de células aisladas semejante al observado en HT-29 M6 (datos no mostrados) que, ante la incapacidad para formar contactos de adhesión, sería compatible con que los desmosomas mediaran la adhesividad intercelular de una manera dependiente de calcio.

No obstante, el hecho de que las HT-29 presenten un fenotipo indiferenciado durante el crecimiento hacia confluencia indica que los desmosomas no constituyen una señal suficiente para la activación del programa de diferenciación *in vitro* en su conjunto.

El calcio extracelular y su implicación en la epitelialización y la activación del programa de expresión génica durante la diferenciación in vitro de las HT-29 M6

El estudio detallado de los cambios morfológicos que tienen lugar en cultivos HT-29 M6 durante el crecimiento a postconfluencia nos permitió diferenciar dos estadios principales del proceso de diferenciación: (1) un estadio temprano, que tiene lugar durante los primeros 7-9 días aproximadamente de cultivo donde la multicapa celular formada presenta una capa apical de células con características diferenciadas, y (2) un estadio tardío, que se extiende hasta las 2-3 semanas de cultivo, en el que se observa la formación de una monocapa de células polarizadas más compactada.

El proceso de epitelialización de los cultivos HT-29 M6 tiene pues ya lugar durante los primeros días de la etapa temprana mencionada y es suprimido en condiciones limitantes de calcio. Respecto a la expresión génica, nuestros resultados nos muestran que la expresión de genes codificantes para MUC1, MUC5AC y DPPIV, los cuales son característicos de la diferenciación en el modelo celular HT-29 M6 (Lesuffleur T, et al., 1993; Howell S, et al., 1992) tiene lugar mediante la activación transcripcional de sus promotores durante también el estadio temprano de la diferenciación *in vitro*. Esta activación del programa de expresión génica es dependiente de calcio extracelular. Por tanto, nuestro estudio sobre la expresión génica durante la diferenciación se ha centrado en este estadio temprano.

Para estudiar qué posibles mecanismos están mediando el programa de expresión génica, hemos utilizado diversas aproximaciones. En cultivos CEB, la inducción de la actividad de estos promotores está suprimida por un mecanismo sensible a TSA, inhibidor de deacetilasas de histona (ver figura R16). Existe pues un mecanismo represor de la expresión génica – el cual requiere de actividad de acetilasa de histona – que mantiene estos genes silenciados en ausencia de epitelialización.

A su vez, el tratamiento con TSA no tiene efectos sobre la actividad de los promotores génicos estudiados cuando éstos son inactivados después de re-siembra a baja densidad (con la excepción de MUC5AC, cuyo promotor todavía conserva una actividad elevada en estas condiciones; ver figura R26), ni a los 3 días de cultivo en condiciones CEN, es decir, cuando aún no ha tenido lugar la activación génica (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la inducción espontánea del programa de expresión génica en condiciones CEN estándar implica mecanismos adicionales al de superar la represión mediada por deacetilasas de histona. Sobre este respecto, cabe destacar que el TSA tampoco tiene efectos sobre la transcripción si es administrado a los 3 días de la transfección en cultivos CEB (datos no mostrados). Una posible explicación de estos resultados es que, durante el cultivo en postconfluencia, las células adquieren una competencia para la activación del programa de expresión génica de manera independiente del calcio extracelular. Una vez competentes, la presencia de calcio (y la activación de vías de señalización dependientes, como por ejemplo los contactos de adhesión) posibilita la activación transcripcional, pero su ausencia (condiciones CEB) induce el mecanismo de represión transcripcional sensible a TSA.

Esta última hipótesis encaja con la capacidad de p27^{KIP1} para inducir por sí solo la actividad transcripcional en condiciones CEB, solamente a los 9 días de la transfección pero no a los 3 días. Tal como se discute en el apartado correspondiente (apartado 2) la acción de p27^{KIP1} es dependiente de la funcionalidad de los contactos mediados por E-cadherina (St. Croix B, et al., 1998) y por tanto es candidato a ser el mediador de la activación transcripcional en células en estado competente: (1) por inducción endógena en condiciones CEN, y (2) por sobre-expresión ectópica en condiciones CEB.

Finalmente, es de destacar que los inhibidores de deacetilasas de histonas han mostrado propiedades anticarcinogénicas en diversos tipos de tumores, y actualmente varios de ellos se encuentran en fase de ensayos clínicos (revisado en Villar-Garea A & Esteller M, 2004). Sus posibles mecanismos de acción son múltiples, y no necesariamente restringidos a la transcripción génica, e incluyen efectos sobre la proliferación y diferenciación celulares y la apoptosis (revisado en Johnstone RW & Licht JD, 2003; Marks PA, et al., 2004). Nuestros resultados aportan pues un modelo de estudio donde el mecanismo de acción de inhibidores como el TSA sobre la expresión génica asociada a la diferenciación celular puede ser estudiada en detalle.

No hemos profundizado nuestro estudio para identificar los factores de transcripción implicados en la activación del programa de expresión génica. Sin embargo, los fragmentos

de DNA genómico utilizados como promotores de la transcripción en nuestros experimentos han sido descritos previamente como suficientes para sostener la transcripción en células epiteliales. En el caso de MUC1, elementos de unión al factor Sp1 (Kovarick A, et al., 1993 y 1996) y a factores de la familia STAT (Gaemers IC, et al., 2001) en la región génica 5'-UTR están implicados en su sobre-expresión en células de carcinoma de mama. El factor Sp1 también está implicado en la activación del promotor de MUC5AC murino en respuesta a TGF- β (Jonckheere N, et al., 2004) y del promotor humano en respuesta a EGF en células de carcinoma de pulmón (Perrais M, et al., 2002). Asimismo, el factor de transcripción CREB a través del elemento de respuesta a AMPc en el promotor de MUC5AC es el mediador de su activación transcripcional en respuesta a interleuquina-1 β y a TNF- α en células de cáncer pulmonar también (Song K.S., et al., 2003). La regulación transcripcional de estos genes en células de cáncer de colon ha sido poco estudiada, aunque trabajos recientes de nuestro laboratorio han mostrado que el factor de transcripción Snail, inductor de transición epitelio-mesénquima en HT-29 M6, inhibe la expresión de MUC1 durante la desdiferenciación a través de dos elementos E situados en su promotor (Guaita S, et al., 2002). Respecto a DPPIV, HNF-1 α es necesario para su expresión en células Caco-2 (Erickson RH, et al., 1999) tal como ocurre con otras hidrolasas del borde en cepillo de células intestinales (ver Introducción). Aunque su promotor también contiene múltiples cajas GC consensus con el sitio de unión de factores de la familia de Sp1, su regulación por este factor no ha sido descrita hasta el momento.

Es interesante pues considerar el posible mecanismo por el que los 3 marcadores de diferenciación se encuentran regulados de manera coordinada durante la diferenciación *in vitro*. Más aún, el mecanismo por el que se suprime su inducción en ausencia de contactos de adhesión (condiciones CEB). Factores de transcripción como Sp1 podrían ser responsables de la regulación común de algunos de los genes marcadores de diferenciación. Sp1 es un buen candidato ya que puede interactuar con multitud de factores de transcripción o actuar como co-factor para regular positiva o negativamente gran cantidad de genes dentro de una misma red de regulación transcripcional (revisado en Black AR, et al., 2001). Asimismo, Sp1 puede interactuar con HDAC-1 y participar en la represión de genes como el de p21^{CIP1} (Sowa Y, et al., 1997) y el del receptor de TGF- β (Zhao S, et al., 2003), ambos genes implicados en la diferenciación celular en cáncer intestinal (van de Wetering M, et al., 2002; Deng X, et al., 1999; Engle SJ, et al., 1999). Finalmente, Sp1 es el factor de transcripción responsable de la expresión de MBP inducida por p27^{KIP1} durante la diferenciación *in vitro* de oligodendrocitos CG4 (Wei Q, et al., 2003), dato que relaciona directamente esta hipótesis con el papel de p27^{KIP1} como activador de la expresión génica en nuestro modelo. Por tanto, estudiar la implicación de factores de transcripción como Sp1 en nuestro modelo de diferenciación *in vitro* – en especial, su posible implicación en la

represión transcripcional en condiciones CEB – es una de las líneas de investigación posibles que continúen este proyecto.

Una parte del proceso de diferenciación in vitro, sin embargo, es independiente de calcio extracelular

Los resultados mostrados en este trabajo nos indican que parte de la activación del programa de diferenciación *in vitro* está teniendo lugar por mecanismos no dependientes de la señalización mediada por calcio. En estas condiciones, las células se mantienen ciclando, y hay una actividad transcripcional basal que posiblemente a través de mecanismos postranscripcionales compensadores, daría lugar a la expresión basal de los diferentes marcadores, especialmente del tipo mucinas, observados durante el cultivo CEB. Esta síntesis basal de mucinas es coherente con el hecho de que la síntesis de vesículas de moco no se ve afectada por la depleción parcial del calcio extracelular. Sin embargo, la maquinaria de secreción sí parece encontrarse afectada de forma importante en estos cultivos. Esto lo hemos evidenciado a través de las imágenes de microscopía electrónica a días postconfluyentes, en los que se observa una gran acumulación de las vesículas de moco en el citoplasma celular acompañado de la ausencia de figuras de exocitosis (típicas del fenotipo mucosecretor de estas células) en cultivos CEB. El hecho de que el tratamiento agudo (30 minutos) en condiciones CEB no impida la secreción basal de moco en poblaciones HT-29 mucosecretoras (Hanna-Bou C, et al., 1994), unido a la deslocalización observada en los marcadores de diferenciación, sugiere que la acumulación de vesículas citoplasmáticas no es debida a un efecto directo del calcio sino a un defecto en el tráfico de membranas

Por otro lado, esta parte de la diferenciación *in vitro* no dependiente de calcio extracelular parece que está teniendo lugar solo en algunas células. A favor de esto tenemos los datos de inmunofluorescencia, donde observamos que en cultivos CEB, no todas las células presentan marcaje con los anticuerpos anti-MUC1 y anti-MUC5AC. En estos casos, además, tanto MUC1 como MUC5AC se encuentran deslocalizados en el citoplasma celular. En el caso concreto de MUC5AC, esta mucina se localiza en un punteado grueso repartido por todo el citoplasma celular, que se corresponde probablemente con las vesículas de moco, y que es coherente con lo observado a través de microscopía electrónica. Puesto que esta mucina es el principal componente del moco secretado en estas células, su inmunoreactividad restringida solamente a algunas células en cultivos CEB, comparado con la gran acumulación de vesículas de moco, sugiere que en ausencia de epitelialización podría activarse la síntesis de mucinas adicionales.

or otra parte, el hecho de que la inmunoreactividad contra DPPIV fuese positiva en el 100% de las células cultivadas en condiciones CEB, unido al hecho de que observamos una ligera expresión de los niveles de mRNA de este marcador en células HT-29 parentales indiferenciadas nos podría sugerir que la expresión de este marcador no es específica del programa de diferenciación que tiene lugar en las células HT-29 M6. Sin embargo, los defectos en el tráfico de proteínas hacia la membrana producidos por la ausencia de polarización se ven reflejados también en la acumulación de DPPIV en un compartimento subcelular no definido (figura D2).

Desconocemos que vías podrían estar regulando esta parte del fenotipo diferenciado que es independiente de calcio extracelular. Una posibilidad es que en HT-29 M6 existiera, por defecto, un programa endógeno de diferenciación que ponemos en evidencia mediante el cultivo CEB, y que durante el proceso de epitelialización fuera potenciado, por ejemplo, por la formación de contactos de adhesión o por otras vías dependientes de calcio. Alternativamente, podrían existir dos vías paralelas de diferenciación: una dependiente y otra independiente de calcio, esta última quizás bajo control de otras señales extracelulares.

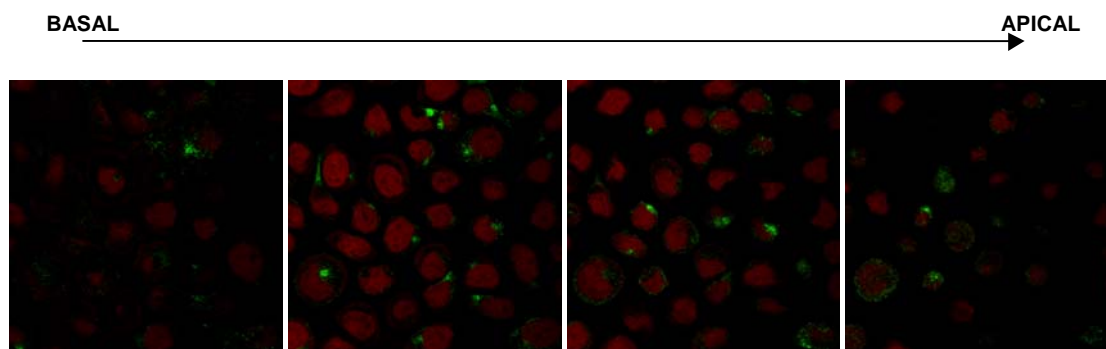


Figura D2: Cortes seriados a lo largo del eje basal-apical de inmunofluorescencias de células HT-29 M6, teñidas contra DPPIV y analizadas por microscopía confocal. Las muestras fueron analizadas a los 9 días de cultivos CEB, donde puede observarse la acumulación subcelular de DPPIV en compartimentos subcelulares en ausencia de polarización celular. Objetivo 63X.

El calcio extracelular está mediando la inhibición por contacto y la salida del ciclo celular en las HT-29 M6

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la línea tumoral HT-29 M6 mantiene conservados, al menos en parte, los mecanismos de salida del ciclo celular durante la

diferenciación *in vitro* en respuesta a la inhibición por contacto, de manera similar a lo que ocurre en células epiteliales intestinales normales. La dependencia de calcio extracelular de este fenómeno y de la formación de contactos de adhesión célula-célula sugiere que éstos podrían participar como señal de salida del ciclo celular.

Varios trabajos han mostrado el papel de la E-cadherina como supresor del crecimiento celular (Takahashi K and Suzuki K, et al 1996; Kandikonda S, et al, 1996, Stockinger A, et al., 2001). Por ejemplo, St. Croix y colaboradores, en estudios realizados en células tumorales de mama y colon, confirmaron el papel de la E-cadherina como supresor de la proliferación celular en respuesta a inhibición por contacto. El mecanismo por el cual E-cadherina estaría suprimiendo la proliferación celular consiste en la inhibición de la actividad mitogénica de vías como la de EGFR, las cuales regulan los niveles de expresión de p27^{KIP1} en la célula (St Croix B, et al., 1998). Otros trabajos, sin embargo, plantean que los efectos de la E-cadherina como supresor del crecimiento en células epiteliales y fibroblastoides de ratón así como en células tumorales de colon SW480 viene dado por su capacidad de regular negativamente la actividad transcripcional del complejo β -catenina/LEF1 de manera independiente de adhesión celular (Stockinger A, et al., 2001; Gottardi CJ, et al., 2001).

En HT-29 M6, la salida del ciclo celular está caracterizada por la hipofosforilación de pRB y la acumulación de formas fosforiladas 1 y 2 de p130 con el crecimiento hacia confluencia, lo cual concuerda con el patrón de fosforilación de las proteínas pockets característico de células diferenciadas (Garriga J, et al., 1998; Graña X, et al., 1998). También existe una inducción significativa de los niveles de expresión de p27^{KIP1} con los días de cultivo, de forma similar a lo descrito en la literatura (St Croix B, et al., 1998).

Clevers y colaboradores sugieren que APC induce diferenciación celular activando, al menos en parte, la transcripción de p21^{CIP1} a través de la vía de β -catenina/TCF-4. La actividad incrementada de β -catenina/TCF-4 en células tumorales derivadas de cáncer colorrectal mantiene el gen de p21^{CIP1} silenciado y consecuentemente inhibe la salida del ciclo celular (Van de Wetering M, et al, 2002; ver introducción). Se ha descrito con posterioridad un mecanismo similar para p27^{KIP1} pero se desconoce si también ocurre en el intestino (revisado de Gartel AL, 2003) (ver introducción). Nuestros resultados indican por el contrario que p21^{CIP1} no se induce durante la diferenciación de HT-29 M6. Sobre este respecto, nosotros hemos visto que en las células HT-29 M6 la β -catenina se encuentra mayoritariamente asociada a la E-cadherina en la zona de las uniones adherentes, y la actividad transcripcional del complejo β -catenina/TCF-4 es muy baja, según trabajos previos realizados en nuestra Unidad de Investigación (Baulida J, et al, 1999; resultados nuestros

preliminares). El hecho de que en ausencia de contactos mediados por calcio no se reduzca un incremento de la actividad transcripcional de este complejo (resultados preliminares no mostrados), a pesar del incremento en la tasa de proliferación celular, y de que la β -catenina se encuentre dispersa por el citoplasma celular, nos sugiere que en estas células la vía β -catenina-TCF-4 está inactivada de manera independiente del estado proliferativo.

Consistente con esta hipótesis, hemos visto afectada la expresión de genes dianas de la actividad β -catenina/TCF-4 durante el crecimiento hacia confluencia. Este es el caso de ciclina D1, cuyos niveles de expresión son muy bajos y prácticamente sostenidos durante el cultivo a postconfluencia, no encontrándose un aumento de los niveles de expresión de esta proteína en condiciones proliferantes (cultivos CEB). Quizás por este mismo motivo también, $p21^{CIP1}$ no se induce durante el crecimiento hacia post-confluencia en HT-29 M6, aunque sabemos que el gen de $p21^{CIP1}$ es funcionalmente activo ya que puede inducirse por tratamiento con butirato sódico o por sobre-expresión de APC. No obstante, tal como se discute más adelante, disponemos de evidencias que indican que APC regula positivamente la expresión de $p21^{CIP1}$ y de que la pérdida de función de APC en HT-29 M6 es la responsable del silenciamiento del gen de $p21^{CIP1}$.

Estudios realizados por Hannon y colaboradores en ratones mostraron que la delección de $p21^{CIP1}$ no tiene consecuencias detectables en la migración celular a lo largo de las criptas intestinales, aunque fibroblastos embrionarios de ratones $p21^{-/-}$ tienen afectada la capacidad de bloqueo del ciclo en G1 en respuesta a daño en el DNA (Brugarolas J, et al., 1995). La falta de efectos en el intestino observada en estos ratones puede ser explicada por la redundancia de los mecanismos de control del ciclo celular, pudiendo estar compensadas las funciones de $p21^{CIP1}$, al menos en parte, por otros miembros de la familia de inhibidores CIP/KIP como $p27^{KIP1}$ o $p57^{KIP2}$. En concordancia, parece que $p27^{KIP1}$, y no $p21^{CIP1}$, es quien participa en la salida del ciclo celular durante la diferenciación *in vitro*.

Por otra parte, cabe notar que los mecanismos de salida del ciclo celular en cáncer de colon varían según la línea celular. Así pues, por ejemplo, existen trabajos que muestran que la salida del ciclo celular que precede a la diferenciación en células Caco-2 (las cuales también contienen APC mutado) está asociada con la inducción de $p21^{CIP1}$ (Evers BM, et al., 1996; Gartel AL, et al., 1996).

2. Papel de p27^{KIP1} en el control de la diferenciación de las HT-29 M6

En cultivos postconfluentes deprivados de calcio extracelular, los promotores génicos de MUC1, MUC5AC y DPPIV están silenciados por mecanismos represores mediados por deacetilasas de histonas y el re-establecimiento de los niveles extracelulares de calcio conduce a la desrepresión de la actividad de dichos promotores génicos. La implicación de p27^{KIP1} en la regulación de la expresión génica durante la diferenciación *in vitro* de las HT-29 M6 se hizo evidente en los cultivos CEB, donde la sobre-expresión de este inhibidor de CDK fue suficiente para inducir la actividad de los promotores génicos implicados en diferenciación.

Varios estudios sugieren un posible papel de p27^{KIP1} como gen supresor tumoral con valor pronóstico en diversos tipos tumorales (revisado de Lloyd RV, et al., 1999), habiendo sido descrito en carcinomas colorrectales bajos niveles de esta proteína y/o cambios en su localización subcelular asociados con una mayor agresividad y menor supervivencia de los pacientes (Liu DF, et al., 1999; Palmqvist R, et al., 1999; Sgambato A, et al., 1999; Hirano K y Minamoto T, 2000; Zhang H Y Sun XF, 2001; Hoos A, et al., 2002; Li J-Q, et al., 2002). La implicación de p27^{KIP1} en la progresión del tumor se ha evidenciado también en estudios realizados en ratones: Kemp y colaboradores demostraron que aunque la pérdida homocigótica del gen de p27^{KIP1} no conduce a la formación espontánea de tumores intestinales, sí incrementa la frecuencia de adenocarcinomas en el intestino delgado y colon en respuesta a agentes carcinógenos y en animales Min/+ (Philipp-Staheli J, et al., 2002). Por otro lado, Augenlicht y colaboradores describen que el *knockout* de p27^{KIP1} en otra cepa de ratones es suficiente para la inducción de adenomas en colon y duodeno, cuyo número y tamaño se ven a su vez aumentados por una dieta de estilo occidental (Yang W, et al., 2003). Es de destacar que p27^{KIP1} muestra haploinsuficiencia en su función supresora tumoral, tal como mostró la frecuencia incrementada de tumores de diversos orígenes, incluyendo el intestino, en ratones heterocigóticos p27^{KIP1}/- irradiados o tratados con etilnitrosourea (Fero ML, et al., 1996).

Teniendo como base nuestros resultados, nosotros proponemos que p27^{KIP1} desempeña un papel importante en la regulación de la diferenciación celular en tumores colorrectales activando la transcripción de genes implicados en el fenotipo diferenciado. De esta manera, la pérdida de p27^{KIP1} podría facilitar la desdiferenciación de las células cancerosas y la progresión tumoral. Consistente con esta hipótesis, la expresión de algunos marcadores de diferenciación en células de cáncer de colon Caco-2, las cuales se diferencian *in vitro* hacia un fenotipo enterocítico, se ve disminuída por la expresión estable de construcciones antisentido del cDNA de p27^{KIP1}, y su sobre-expresión activa el promotor de la sucrosa

isomaltasa (Deschénes C, et al., 2001). Previamente, se había demostrado que la expresión de otro marcador enterocítico, DPPIV, podía ser inducida por p27^{KIP1} en células epiteliales intestinales (Quaroni A, et al., 2000). Los resultados de la presente tesis extienden esta función de p27^{KIP1} a genes del fenotipo mucosecretor y tumoral, tales como son MUC1 y MUC5AC.

A partir de estos datos sería interesante dilucidar si p27^{KIP1} está actuando directamente sobre la transcripción génica de marcadores de diferenciación o si a través de su papel mediador de la salida del ciclo celular permite la activación de otras vías reguladoras de la diferenciación celular. Sobre este tema, es interesante mencionar que la pérdida de expresión de p27^{KIP1} en tumores colorrectales no se correlaciona con un incremento de la proliferación celular (Palmqvist R, et al., 1999), sugiriendo que su papel en el ciclo celular y en la progresión tumoral tiene lugar por mecanismos distintos. Consistentemente, estudios realizados en otros modelos celulares muestran la implicación de p27^{KIP1} en la diferenciación celular de manera independiente a sus efectos sobre el ciclo. Por ejemplo, Quaroni y colaboradores mostraron que la expresión forzada de p27^{KIP1} o de p21^{CIP1}, pero no de p16^{INK1}, promueve la diferenciación en células epiteliales intestinales no transformadas HIEC6, aunque cualquiera de ellos inhibe la proliferación celular (Quaroni A, et al., 2000); en estas células, además, existe una disociación temporal entre la inhibición del crecimiento y la expresión génica de marcadores de diferenciación (Tian J.Q. & Quaroni A., 1999).

No ha sido descrita hasta el momento una acción directa de p27^{KIP1} sobre promotores génicos. Sin embargo, p27^{KIP1} puede regular algunos factores de transcripción. Miskimins y colaboradores, recientemente, propusieron un mecanismo no descrito hasta el momento por el cual p27^{KIP1} estaría induciendo la transcripción génica durante la diferenciación celular. Utilizando como modelo de estudio la diferenciación de oligodendrocitos en el sistema nervioso central, mostraron que la sobre-expresión de p27^{KIP1} conlleva el incremento de los niveles de expresión del factor de transcripción Sp1 (por disminución de su degradación), y mediaría directamente la activación transcripcional del promotor MBP (Wei Q, et al., 2003). Por otro lado, la forma fosforilada en Ser10 de p27^{KIP1} tiene una estabilidad incrementada y promueve la exportación nuclear de JAB1, co-activador de c-JUN, con lo que se inhibe la actividad transcripcional mediada por c-JUN (Chopra S, et al., 2002). Por tanto, en nuestro modelo p27^{KIP1} podría regular algún factor de transcripción implicado en la diferenciación *in vitro*.

Tal como se ha apuntado antes, los promotores génicos de MUC1 y MUC5AC presentan varias secuencias consenso CG en las regiones 5' UTR. Estas secuencias pueden interactuar con el factor de transcripción Sp1 y están implicadas en la regulación transcripcional de estos genes (Kovarik A, et al., 1996; Morris JR, et al., 2001; Perrais M, et al.,

2002; Jonckheere N, et al., 2004; ver introducción). Es pues plausible que un mecanismo similar al descrito por Miskimins y colaboradores podría estar teniendo lugar durante la diferenciación *in vitro* de HT-29 M6 y nos ayudaría a explicar, al menos en parte, la des-represión de la expresión génica al sobre-expresar p27^{KIP1} en cultivos CEB.

La acción de p27^{KIP1} sobre la diferenciación celular no está restringida al modelo intestinal. Hauser y colaboradores mostraron la implicación de p27^{KIP1} en la diferenciación *in vitro* de queratinocitos murinos (Hauser PJ, et al., 1997) y, más recientemente, estudios realizados en *Xenopus* muestran que la delección de p27^{XIC1} (homólogo funcional y estructural de la familia de inhibidores CIP/KIP humana) impide la diferenciación de neuronas primarias así como la diferenciación muscular *in vivo*, mientras que la sobre-expresión de este inhibidor promueve los procesos de neurogénesis y miogénesis de manera independiente a la capacidad de regular el ciclo celular (Vernon AE, et al., 2003a y b). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos proponen vías por las cuales p27^{KIP1} pudiera estar mediando la activación de la transcripción de genes implicados en diferenciación celular.

Por último, los niveles totales de expresión de p27^{KIP1} durante el crecimiento hacia post-confluencia en cultivos CEB y CEN nos reveló, curiosamente, que el patrón de inducción de esta proteína es similar en ambas condiciones experimentales (resultados preliminares no mostrados). Este resultado contrasta con la supresión de la expresión de p27^{KIP1} en HT-29 observada previamente al inhibir la formación de contactos adherentes mediante anticuerpos anti-E-cadherina (St. Croix B, et al., 1998). Al tener un efecto la sobre-expresión de p27^{KIP1} en condiciones CEB, pero no en condiciones CEN, sin haber cambios aparentes en los niveles endógenos de proteína entre ambas condiciones, pensamos que p27^{KIP1} está siendo regulado a nivel post-traducciona, y que los efectos sobre la transcripción observados al sobre-expresar p27^{KIP1} sobrepasan esta regulación postraducciona.

Un mecanismo posible, aunque no el único, podría implicar una regulación de la exportación o importación nuclear de p27^{KIP1}. Estudios recientes han demostrado la importancia de la localización nuclear de p27^{KIP1} en la regulación de su actividad inhibidora del ciclo celular (revisado de Sgambato A, et al., 2000; ver introducción), y alteraciones en su localización subcelular ocurren en diferentes tipos de tumores (Viglietto G, et al., 2002). Recientemente, Viglietto y colaboradores demostraron que en líneas celulares derivadas de tumores de mama, p27^{KIP1} es fosforilada en el residuo T198 de manera dependiente de PI3K/Akt contribuyendo así a la translocación citoplasmática observada en tumores (Motti ML, et al., 2004). Por tanto, estudiar este tipo de cambios en la modificación postraducciona de p27^{KIP1} ayudaría a entender su regulación dependiente del programa de diferenciación.

3. Posible existencia de una vía de regulación de APC sobre p21^{WAF1} cuya inactivación es responsable de la reversibilidad del programa de diferenciación *in vitro* de HT-29 M6.

La salida del ciclo celular durante la diferenciación *in vitro* de HT-29 M6 no es indicativa de diferenciación terminal, pues no conduce a un estado de quiescencia irreversible. La acumulación en G0/G1 que tiene lugar durante la diferenciación *in vitro* es reversible al reiniciar cultivos postconfluentes a baja densidad, lo cual conduce a una re-entrada sincrónica en el ciclo celular asociada a la inducción de ciclina D1, la hiperfosforilación de pRB y p130 así como la rápida disminución de la expresión de p27^{KIP1} hacia el final de la fase G1, de forma concomitante con el silenciamiento transcripcional de algunos marcadores de diferenciación. Puesto que p21^{CIP1} es un inhibidor del ciclo celular diferencialmente expresado en los compartimentos proliferantes y no proliferantes del intestino y colon (Gartel AL, et al., 1996), su falta de inducción durante la diferenciación *in vitro* podría ser, por tanto, uno de los defectos que no permiten la transición a un estado de diferenciación terminal.

Nuestros resultados nos muestran que al restituir APC salvaje en células HT-29 M6, las cuales presentan este oncogén mutado, tiene lugar una desrepresión importante del promotor de p21^{CIP1} no descrita hasta el momento en la literatura, constituyendo una evidencia que relaciona los mecanismos de control del ciclo celular en HT-29 M6 con las alteraciones oncogénicas más frecuentes en cáncer colorrectal. Por tanto, este hallazgo constituye un modelo interesante para estudiar las vías de regulación implicadas en la transformación neoplásica.

En paralelo a la realización de estos experimentos, Clevers y colaboradores (Van de Wetering M, et al., 2002) describieron que la vía de regulación transcripcional mediada por β -catenina/TCF-4 reprime la expresión de p21^{CIP1} indirectamente a través de c-MYC. De este modo, el gen de p21^{CIP1} se adscribe como miembro del programa de diferenciación epitelial reprimido por la vía de Wnt, y que posiblemente APC induciría la expresión de p21^{CIP1} mediante la inducción de la degradación de β -catenina. Sin embargo, la actividad TOP en respuesta a la actividad de β -catenina/TCF-4 es muy baja en diferentes condiciones de proliferación celular (ver más arriba), por lo que nuestros resultados sugieren que APC regula la expresión de p21^{CIP1} mediante una vía diferente. En concordancia con esta hipótesis, Heinen CD, et al. (2002) mostraron que la sobre-expresión de APC en células de cáncer de colon HCT116 induce un bloqueo en la fase G1 del ciclo celular; debido a que las células HCT116 poseen una forma mutada no fosforilable de β -catenina que la hace insensible a la regulación por APC, debe de existir una vía alternativa a la de β -catenina/TCF-4 por la que APC regula el ciclo celular.

La cotransfección con una forma estabilizada de β -catenina – semejante a la presente en células HCT116 – no revierte el efecto inductor de APC sobre el promotor de p21^{CIP1} en HT-29 M6, lo cual nos confirma nuestra hipótesis de trabajo. Sin embargo, y de forma interesante, la cotransfección con un dominante negativo de TCF4 es capaz de inducir actividad del promotor de p21^{CIP1} hasta niveles semejantes a los conseguidos con la expresión de APC salvaje, sugiriendo que TCF4 unido a algún elemento regulador negativo podría estar actuando como represor transcripcional en HT-29 M6, pero desconocemos si APC inhibe TCF4 en HT-29 M6 de manera independiente de β -catenina, para así inducir la expresión de p21^{CIP1}.

Finalmente, la desrepresión del promotor de p21^{CIP1} mediada por APC o por el dominante negativo de TCF4 se suprime parcialmente al deletar ciertos fragmentos del promotor de p21^{CIP1} que no incluyen el elemento MIZ-1 mediante el que c-MYC reprime la transcripción (figura D3) (Macías S, Ampurdanés C, Mayol X; resultados no publicados).

Estos datos, en conjunto, sugieren una regulación compleja del gen de p21^{CIP1} en células HT-29 M6 y sugieren que existe una vía de regulación del ciclo celular por APC independiente de β -catenina/TCF-4, de tal manera que su estudio más detallado podría aportar información importante sobre los mecanismos de supresión de la diferenciación terminal durante la transformación neoplásica en el colon.

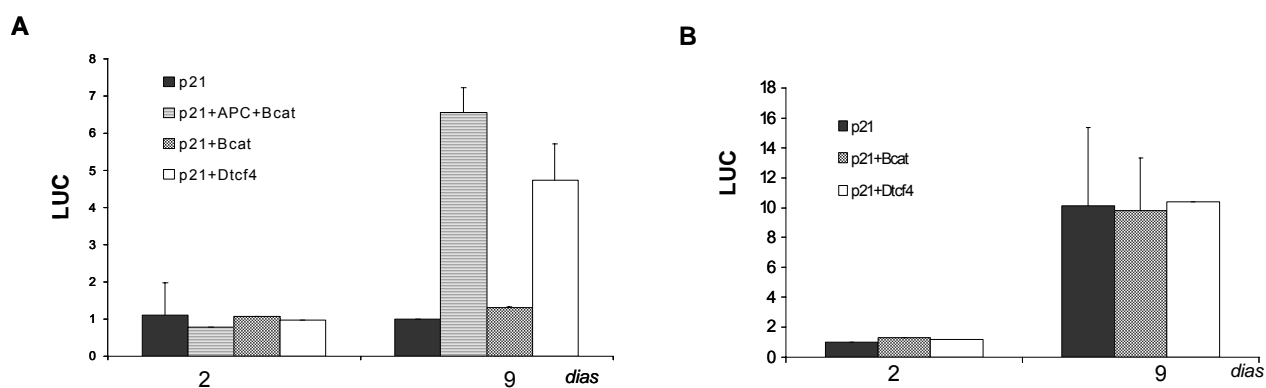


Figura D3: Regulación de p21^{CIP1}. Células HT-29 M6 (A) y HCT-116 (B) fueron cotransfectadas con el promotor de p21, APC wt, β -catenina estabilizada y/o Δ TCF4. El valor de luciferasa (LUC) representa valores relativos de la actividad del promotor referido al control cotransfectado con el vector vacío (cedido por Sara Macías).

En paralelo también a la hipótesis de trabajo planteada a partir de los resultados obtenidos, recientemente fue descrito que las HT-29 presentan una amplificación constitutiva del gen

de c-myc (Corzo C, et al., 2003). Puesto que c-myc es capaz de reprimir la expresión de p21^{CIP1} mediante la interacción con MIZ-1 (Wu S, et al., 2003), la amplificación de c-MYC podría contribuir a la represión constitutiva de p21^{CIP1} observada durante la diferenciación *in vitro*.

Por último, vale la pena destacar otra línea de investigación de nuestro grupo, en la que mostramos que la expresión de E2F-1, factor de transcripción implicado en la progresión del ciclo celular y en la apoptosis (Trimarchi JM, et al., 2002), está fuertemente reprimida en HT-29 M6, de manera independiente del ciclo celular (datos no mostrados). Al igual que en otras líneas celulares de cáncer colorrectal (Elliott MJ, et al., 2001), la sobre-expresión de E2F-1 en HT-29 M6 induce apoptosis, lo cual confirma que E2F-1 no desempeña un papel en el ciclo celular de estas células. Puesto que está descrito que E2F1 es un activador transcripcional de p21^{CIP1} (Gartel AL, et al., 1998; Hiyama H, et al., 1998), y nosotros reproducimos este efecto en HT-29 M6 (datos no mostrados), su falta de expresión en esta línea celular podría estar también contribuyendo al silenciamiento transcripcional de p21^{CIP1}. En cualquier caso, la función de E2F-1 en el epitelio intestinal es todavía incierta.

4. Papel de ciclina D1 en el control de la diferenciación *in vitro* de las HT-29 M6.

Como hemos discutido anteriormente, el programa de diferenciación *in vitro* de las HT-29 M6 no es terminal, pudiéndose inducir re-entrada en el ciclo celular y silenciamiento de la expresión génica por resiembra a baja densidad de los cultivos post-confluentes. Además de las vías discutidas en el apartado anterior, este proceso podría también estar siendo mediado, al menos en parte, por ciclina D1, cuyos niveles de expresión son muy bajos y prácticamente invariables durante el crecimiento hacia post-confluencia, induciéndose puntualmente su expresión durante las primeras horas de re-iniciación de cultivos diferenciados.

Es conocido que ciclina D1 juega un papel importante durante la transformación neoplásica, habiendo sido descrita una expresión aberrante en numerosos tipos de tumores humanos (Hosokawa & Arnold, 1998), incluyendo su sobre-expresión en adenocarcinomas y pólipos adenomatosos en colon (Bartkova J, et al., 1994; Arber N, et al., 1997). En este sentido, la deficiencia de ciclina D1 inhibe el crecimiento de células tumorales de colon SW480 en ratones *nude* (Arber N, et al., 1997) y reduce el número de pólipos intestinales en ratones APC^{min} (Hulit J, et al., 2004). Puesto que el gen que codifica para ciclina D1 no está amplificado en tumores de colon humano, pero la proteína está sobre-expresada, se piensa que señales oncogénicas inducen y/o modulan su abundancia en tumores. Entre las señales responsables de la sobre-expresión de ciclina D1 en tumores colorrectales se encuentra la

vía de Wnt ya que β -catenina/TCF-4 activa su transcripción a nivel del promotor génico (Tetsu O y McCormick F, 1999). Este no parece ser el caso de las células HT-29 M6, donde no se detecta una actividad significativa en comparación con otras líneas celulares donde sí es relevante.

Nuestros resultados muestran que la sobre-expresión ectópica de ciclina D1 suprime la activación de los promotores génicos de marcadores de diferenciación, de forma similar a lo que ocurre al reiniciar cultivos diferenciados respecto la transcripción de MUC1 y DPPIV. No obstante, el hecho de que el promotor del gen de MUC5AC sea inhibido por ciclina D1 pero se mantenga activo después de resiembra a baja densidad sugiere que la sobre-expresión de ciclina D1 no reproduce enteramente el proceso endógeno de reversión de la diferenciación. De forma interesante, ambos procesos de silenciamiento transcripcional (inducido por resiembra a baja densidad o por sobre-expresión de ciclina D1) son insensibles a TSA, indicando que los mecanismos que están regulando la expresión génica en estas condiciones son independientes del mecanismo de represión que ocurre en condiciones CEB. En definitiva, ciclina D1 parece actuar de manera no relacionada con el programa de diferenciación dependiente de calcio, de tal manera que el modelo de re-iniciación del ciclo celular en HT-29 M6, inicialmente caracterizado en este trabajo, podría resultar muy útil para identificar su mecanismo de acción en la carcinogénesis colorrectal.

El mecanismo por el que ciclina D1 modula el programa de diferenciación de HT-29 M6 no es, en principio, claro. Es conocido desde hace años que la expresión de ciclina D1 constituye un impedimento para la diferenciación celular. Así pues, ciclina D1 impide la diferenciación muscular mediante la inactivación del factor de transcripción miogénico MyoD (Skapek SX, et al., 1995 y 1996), probablemente inhibiendo señales de salida del ciclo celular durante la diferenciación. Recientemente, se ha mostrado que la sobre-expresión de ciclina D1 encontrada en tumores de diverso origen tiene como consecuencia la inhibición de un programa genético dependiente del factor de transcripción C/EBP β (Lamb J, et al., 2003); de manera interesante, entre los genes así regulados se encuentra MUC1. Es de destacar que miembros de la familia de factores C/EBP se expresan de manera diferencial durante el desarrollo del colon (Boudreau BS, et al., 1995), que C/EBP α podría desempeñar un papel importante en la regulación de la expresión génica durante la diferenciación celular en el eje de la cripta colónica (Cohn SM, et al., 1992; Chandrasekaran C & Gordon, 1993), y que C/EBP β y C/EBP δ se encuentran sobre-expresados en tumores colorrectales invasivos (Rask K, et al., 2000). Por tanto, miembros de la familia C/EBP son candidatos a mediar los efectos de ciclina D1 sobre la expresión génica en nuestro modelo de diferenciación celular.

Varios estudios, además, han descrito la capacidad de ciclina D1 para modular la transcripción de manera independiente de su función reguladora de CDK-4 durante el ciclo celular (revisado en Bernards R, 1999) y a través de la asociación con diversos factores de transcripción, incluyendo el receptor de estrógenos (Neuman E, et al., 1997; Zwijzen RML, et al., 1997 y 1998), v-Myb y el factor relacionado con Myb DMP1 (Ganter B, et al., 1998; Inoue K & Sherr C, 1998), el receptor de andrógenos (Reutens AT, et al., 2001), STAT3 (Bienvenu F, et al., 2001), y receptores de hormonas tiroideas (Lin H-M, et al., 2002). Sería pues interesante dilucidar (por ejemplo, mediante el uso del mutante ciclina D1 incapaz de asociarse a CDK-4) si en células HT-29 M6 ciclina D1 está actuando de forma directa sobre los promotores génicos o si la inhibición de la expresión génica es consecuencia de una re-entrada en el ciclo celular inducida por la sobre-expresión de ciclina D1.

Es de interés destacar que, recientemente, se ha mostrado que la ciclina D1 es capaz de asociarse al factor de transcripción del tipo b-HLH Beta2/NeuroD e inhibir su actividad transcripcional sobre el gen de la secretina (Ratineau C, et al., 2002). Tal como se describió en el capítulo de Introducción, Beta2/NeuroD es un factor necesario para el desarrollo de las células enteroendocrinas (Naya FJ, et al., 1997), tanto a nivel de definición del linaje activando la transcripción del gen de la secretina (Mutoh H, et al., 1997) como de salida del ciclo celular activando la transcripción del gen de p21^{CIP1} (Mutoh H, et al., 1998). Por otro lado, el *knockout* de ciclina D1 en ratones APC^{min}, además de reducir el número de tumores, induce diferenciación de las células colónicas hacia el fenotipo mucosecretor, y su sobre-expresión en células 293 reprime la actividad del promotor de MUC2 (Hulit J, 2004), indicando que ciclina D1 también actúa como regulador negativo de la diferenciación de células mucosecretoras semejante a lo que ocurre en nuestro modelo. Por tanto, ciclina D1 podría estar restringiendo la diferenciación de células progenitoras inmaduras a través de la inhibición de factores de transcripción, como Beta2/NeuroD en el linaje enteroendocrino u otros en el linaje mucosecretor, para prevenir la salida del ciclo celular y el programa de expresión génica asociado a la diferenciación.

Nuestros resultados, por otro lado, extienden esta idea a las células tumorales donde, además de activar la proliferación celular (Arber N, et al., 1997), ciclina D1 actúa sobre la expresión de genes marcadores de diferenciación. Su sobre-expresión en células tumorales (o su expresión facilitada, como durante la re-iniciación de HT-29 M6) podría estar contribuyendo a la transformación celular frenando la transición hacia un fenotipo terminalmente diferenciado.

5. Las HT-29 M6, modelo de células derivadas de CCR donde la desdiferenciación celular y la adquisición de capacidad invasiva podría estar teniendo lugar por vías diferentes.

Las células tumorales colorrectales, con frecuencia, mantienen conservadas vías de diferenciación que preservan el fenotipo epitelial, pero tienen defectos que impiden que se complete el programa de diferenciación celular. Durante la progresión tumoral, la pérdida de características diferenciadas, como por ejemplo la formación de contactos de adhesión intercelular, se ha visto asociada con la adquisición de mayor invasividad y metástasis (Guilford P, et al., 1998; Christofori G y Semb H, 1999). Esta transformación morfológica es frecuentemente referida como transición epitelio-mesénquima (EMT).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, aunque preliminares, muestran que en las HT-29 M6, la pérdida de características diferenciadas no es suficiente para inducir la movilidad celular, como parámetro inicial para valorar una posible EMT. Además, en estas condiciones las células no solo son incapaces de migrar sino que además no observamos una reorganización del citoesqueleto de actina, como ocurre durante la transición epitelio-mesénquima (Liu Y, 2004). Este resultado es consistente con la no activación del complejo transcripcional β -catenina-TCF en HT-29 M6 por cultivo CEB. Estos resultados, podrían ser explicados a partir de dos razonamientos:

- 1) Existen vías supresoras de la movilidad celular, que quizás participan en el mantenimiento del citoesqueleto epitelial de actina, independientes del programa de diferenciación *in vitro* mediado por calcio extracelular.
- 2) Existe un gradiente extracelular/intracelular de calcio mínimo por debajo del cual la maquinaria de migración celular no es funcional.

Existen evidencias experimentales a favor de ambas hipótesis. Por una parte, nuestros resultados guardan coherencia con observaciones descritas por otros investigadores que han descrito que la E-cadherina suprime la movilidad celular por un mecanismo distinto al de adhesión celular y que implica al dominio transmembrana de esta proteína (Chen H, et al., 1997). Puesto que en condiciones de cultivo CEB la E-cadherina se localiza en el citoplasma celular, no observando un silenciamiento transcripcional del gen en estas condiciones (datos no mostrados) tal y como se ha descrito que ocurre durante la transición epitelio-mesénquima (Batlle E, et al., 2000), una posibilidad podría ser que en ausencia de diferenciación dependiente de calcio extracelular, vías supresoras de la movilidad celular, que podrían estar implicando de forma directa o indirecta a la E-cadherina (independientemente de su localización en la membrana plasmática) continúan activas, y podrían estar regulando la capacidad de migración de las células.

Sin embargo, al tratar con PMA cultivos CEB, las células HT-29 M6 muestran una reorganización morfológica similar al fenotipo de "scattering" inducido por PMA en cultivos CEN, pero no son capaces de migrar. Puesto que el mecanismo por el cual el PMA induce el fenotipo de *scattering* celular en células HT-29 M6 es mediante la activación de la PKC- α (Fabr  M, et al., 1993; Llosas MD, et al., 1996) y es conocido que esta subfamilia de proteínas quinasas C convencionales requieren calcio para su activación, podríamos pensar que la depleción parcial del calcio en los cultivos CEB podría estar afectando la se nalizaci n mediada por PKC- α , cuya activación se ha descrito que es necesaria para la inducción de migración celular (Liao L, et al., 1993). Una forma de validar esta posibilidad sería analizar si la capacidad de activar PKC por PMA es distinta en cultivos CEN y en cultivos CEB.

Por otro lado, en estudios realizados en queratinocitos humanos donde analizaban el efecto del calcio en la migración de estas células, Fang y colaboradores demostraron que cambios en la concentración extracelular de calcio del orden de 3 μ M a 3,3 mM no afectan de manera significativa la capacidad de migración celular (Fang KS, et al., 1998). Sin embargo, la adición al medio de cultivo de un agente quelante en exceso (EGTA) s  es capaz de reducir considerablemente, y en algunos casos abolir, la movilidad de estas células en presencia de un campo eléctrico, lo que indica que la presencia de una mínima concentración de calcio extracelular (3 μ M) es necesaria para la migración de queratinocitos humanos. Cabe recordar que en nuestro modelo experimental, la concentración de calcio presente en los cultivos CEB es entre 20 y 100 μ M aproximadamente, una concentración superior a las utilizadas por Fang y colaboradores en este trabajo, lo cual indica que la disminución del gradiente provocado por el cultivo CEB no necesariamente debe de afectar a la movilidad celular.

A partir de los resultados, se obtienen las siguientes conclusiones:

1- Gran parte de la inducción del programa de diferenciación celular *in vitro* tiene lugar por vías de señalización dependientes de calcio extracelular, concretamente:

- a) La inhibición por contacto de la proliferación celular con la consecuente salida del ciclo celular.
- b) La inducción transcripcional de genes involucrados en el fenotipo diferenciado como son MUC1, MUC5AC y DPPIV.
- c) El establecimiento del fenotipo polarizado que presentan estas células durante el crecimiento hacia confluencia y que está caracterizado por la formación de monocapas de células impermeables con fenotipo epitelial.

2- Otra parte de la inducción del programa de diferenciación *in vitro*, sin embargo, está teniendo lugar por mecanismos no dependientes de calcio extracelular, en los cuales no se requiere del proceso de epitelialización ni de que las células salgan del ciclo celular. Concretamente:

- a) Unos niveles mínimos de síntesis, al menos en una fracción de las células, de MUC1 y MUC5AC.
- b) La síntesis de DPPIV, posiblemente regulada por mecanismos post-transcripcionales.
- c) La producción de vesículas citoplasmáticas de moco formadas por MUC5AC, y posiblemente, otras mucinas.

3- El proceso de diferenciación *in vitro* es reversible y conlleva al silenciamiento transcripcional de marcadores de diferenciación como MUC1 y DPPIV pero no de MUC5AC, asociado a la re-entrada en el ciclo celular.

4- Ciclina D1 se induce específicamente durante la reiniciación del ciclo celular y su sobre-expresión es suficiente para silenciar la expresión génica de marcadores de diferenciación a través de un mecanismo insensible a TSA, y pudiendo ser responsable del silenciamiento transcripcional observado en el proceso de reiniciación del ciclo.

5- El programa de expresión génica es silenciado, en condiciones de no diferenciación por falta de calcio, por mecanismos de represión sensibles a TSA.

6- p27^{KIP1} se induce espontáneamente durante la diferenciación *in vitro* y su sobre-expresión es capaz de desreprimir la transcripción de marcadores de diferenciación que se encuentra silenciada en condiciones CEB.

7- p21^{CIP1} no se induce durante la diferenciación, pudiendo ser inducida su expresión al sobre-expresar APC.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo celular

1.1 Células y condiciones de cultivo

HT-29 M6 es una línea tumoral humana derivada de adenocarcinoma de colon, con fenotipo mucosecretor, obtenida por selección con 10^{-7} M y 10^{-6} M de metotrexato, en tratamientos sucesivos, de la línea parental indiferenciada HT-29 (Lesuffleur T, et al., 1990) (ver detalles en la Introducción).

HCT-116 es una línea tumoral humana derivada de adenocarcinoma de colon obtenida de la ATCC.

Excepto en algunos casos, donde se especificará, las células HT-29 M6 fueron sembradas a una densidad de 2×10^5 células/cm² y mantenidas a 37°C, en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂ y 95% de aire. Durante la expansión de las células, estas fueron tripsinizadas cada 2-3 días y el rango en número de pasajes al que correspondieron los cultivos realizados fue de 18 a 30 respecto al pasaje en que fueron obtenidas (Lesuffleur T, et al, 1990).

El medio de cultivo estándar empleado fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) conteniendo 4.5 g/L de glucosa (Life Technologies, número de catálogo 10938), suplementado con 2 mM de glutamina, 56 U/ml de penicilina, 56 µg/ml de estreptomycin y 10% de FBS (GIBCO). Durante la realización de los experimentos de esta tesis, utilizamos dos lotes de FBS diferentes que fueron escogidos por su capacidad de reproducir las cinéticas de crecimiento y diferenciación sobre la línea celular HT-29 M6.

Para inhibir la formación de contactos dependientes de calcio, el medio de cultivo empleado fue DMEM sin calcio conteniendo 4.5 g/L de glucosa (Life Technologies, número de catálogo 21068), suplementado con 2 mM de glutamina, 56 U/ml de penicilina, 56 µg/ml de estreptomycin y 10% de FBS con bajo contenido en calcio (FBS CHELEX), éste último obtenido por tratamiento con una resina quelante de intercambio iónico (ver apartado siguiente).

1.2 Preparación del FBS con bajo contenido en calcio (FBS CHELEX)

El FBS utilizado en el medio de cultivo CEB fue parcialmente deplecionado en cationes divalentes mediante el tratamiento con una resina quelante de intercambio iónico CHELEX-

100 (Bio-Rad; Ref: 143-2832, *Biotechnology Grade Chelex 100 Resin, 100-200 mesh, sodium form*).

Se pesó la cantidad de resina que a utilizar, se embebió en NaAc/ 0.5 M /pH 6.3 (autoclavado o filtrado) y se introdujo en una columna de vidrio (que admita unos 4 volúmenes adicionales). Se añadió 500 mL de NaAc/ 0.5 M /pH 6.3, se lavó con 0.5-1L de H₂O miliQ (autoclavada o filtrada) y se pasó lentamente por la columna, gota a gota, 0.5-1L de FBS previamente inactivado (56°C, 30 minutos) y filtrado (0.2 µM). Inmediatamente después de pasar por la columna, se filtró en condiciones estériles, se alícuotó y se guardó congelado a -20°C.

Una vez acabada de utilizar la columna, ésta se lavó y se regeneró mediante desplazamiento de los cationes adsorbidos con HCl y conversión de la resina a su forma sódica con NaOH, según protocolos del fabricante, para poder ser reutilizada en otra ocasión.

Antes de la utilización de cada lote de FBS CHELEX, se realizaron mediciones de las concentraciones de calcio (en los servicios científico técnicos de la UB), que dieron en todos los casos valores entre 20-100 µM en la mezcla al 10% con medio DMEM sin calcio.

1.3 Contaje de células

Para determinar el número de células presente en una suspensión celular, se visualizaron y contaron las células presentes en un determinado volumen en una cámara de Neubauer. La adición de Trypan Blue (Sigma) a la suspensión celular permitió, a su vez, controlar la supervivencia e integridad de las células.

1.4 Congelación y almacenaje de las células

Para conservar durante largo tiempo las líneas celulares, entre 1-3 millones de células se resuspendieron en 900 µL de DMEM/ 10% FBS y fueron pasadas a un criotubo con 100 µL de DMSO (Sigma) a 0°C. Suavemente se homogenizó la mezcla y se congeló lentamente hasta -80°C en cajas de congelación especiales (conteniendo isopropanol), para ser almacenadas finalmente en tanques de nitrógeno líquido.

La descongelación de células desde los tanques de nitrógeno líquido se llevó a cabo sometiendo los criotubos a un baño de 37°C hasta la casi completa licuación de su

contenido, que rápidamente se diluyó 10-20 veces en DMEM/ 10% FBS para ser centrifugadas y resuspendidas en el medio de cultivo.

2. Plásmidos, clonajes y subclonajes

2.1 Construcciones de DNA

El constructo reporter con el fragmento -756 pb /+ 49 pb del promotor del gen de MUC1 humano, clonado en pGL3 (Guaita S, et al, 2002) fue cedido por J. Baulida.

El constructo reporter con el fragmento -4,0 kb /+ 68 pb del promotor del gen de MUC5AC humano, clonado en pGL3 (Li D, et al, 1998) fue cedido por F. Ulloa.

El promotor de DPPIV (fragmento de -307 a + 14) (Erickson RH, et al, 2000) fue amplificado mediante PCR (detalles en el apartado 2.2), y clonado en el vector pGL3 por las dianas de restricción Xho I y Sac I.

El constructo reporter con el fragmento de 2,4 kb del promotor de p21 humano, clonado en pGL3 (Prabhu S, et al, 1997) fue cedido por A. Rodolose.

El constructo reporter con el cDNA del gen de ciclina D1 humano, clonado en CMV, fue cedido por G. Gil.

El constructo reporter con el cDNA del gen de p27^{KIP1} humano, fue amplificado mediante PCR y clonado en el vector CMV por las dianas de restricción Xba I y BamH I.

El constructo reporter con el cDNA del gen de p27-3M humano, fue amplificado mediante PCR y clonado en el vector CMV por las dianas de restricción Xba I y BamH I.

2.2 Amplificación de fragmentos de DNA por PCR

Las amplificaciones por PCR del fragmento del promotor de DPPIV así como los fragmentos utilizados como sondas para northern blot se hicieron utilizando la *Pfx^R Platinum* polimerasa de Invitrogen, sistema que muestra una elevada fidelidad de los fragmentos a amplificar y que al estar asociado al sistema *Platinum* permite montar las reacciones a temperatura ambiente, sin que la polimerasa no sea activa hasta llegar a los 94°C del primer ciclo.

Las reacciones se hicieron en un termociclador 2400 Perkin-Elmer. Las mezclas de cada reacción contenían MgCl₂ 1.5mM, 0.4 μM de cada oligonucleótido, 0.3 mM de nucleótidos trifosfato y 1-2 unidades de polimerasa en 50 μl finales. En todos los casos se utilizó DNA genómico obtenido de células HT-29 M6 para la amplificación (1,5 μg por muestra).

Dependiendo del fragmento amplificado, los ciclos fueron variables, pero en general se realizaron programas de este tipo: 94°C 3' (desnaturalización inicial), 30-40 ciclos de 96°C/15'', 50-57°C/30'', 68°C/35-45'', y un periodo final de extensión de 2' a 68°C y 4°C finales, siendo montadas las reacciones de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del promotor de DPPIV tenían las secuencias: *tcagagctcggccgggatgccagtg* (sense) y *ccgctcgagcggcactcaccttcat* (antisense).

2.3 Digestión de DNA

Los fragmentos de DNA de interés contenidos en un vector y que debían ser subclonados se digirieron con nucleasas de restricción. Los enzimas y tampones fueron suministrados por Promega, Amersham y New England Biolabs.

La cantidad de DNA a digerir osciló entre 100 ng y 4 μg en un volumen de 20 a 100 μL. La cantidad de enzima, el tampón utilizado y la temperatura fueron en cada caso los especificados por el fabricante, en un tiempo de reacción de 2 a 3 horas.

2.4 Desfosforilación de vectores

La desfosforilación se realiza cuando se digiere el vector con un solo enzima de restricción, para evitar que el vector linealizado pueda recircularizar durante la ligación sin haber incluido el inserto deseado. A los 5 μg de vector digerido, se añadieron 0.1 unidades de fosfatasa alcalina de intestino de ternera diluída en su correspondiente buffer (Promega) y la mezcla se incubó por 30 min a 37°C. A continuación se aisló el DNA utilizando el kit GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit (Pharmacia), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.5 Ligación

Una vez abierto el vector y listo el producto a clonar, ambos se encuentran linealizados y con sus extremos compatibles para ser ligados.

Se mezcló una relación molar vector: inserto de 1:3 (poniendo generalmente unos 50-100 ng de vector) en un medio que contenía tampón de ligación (con 1 mM ATP) y 1-5 unidades de T4-DNA ligasa (Pharmacia) incubándose durante 20 h a 15°C.

2.6 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Esta técnica ha sido usada rutinariamente para visualizar el DNA obtenido en los distintos pasos del clonaje de todos los productos: tras las digestiones, aislamiento de DNA plasmídico de *E.coli*, etc. En la mayor parte de los casos se utilizó una concentración de agarosa del 1% en TAE (50 mM Tris, 1mM acetato, 2 mM EDTA, pH 8.5) añadiendo 0.5 µg/mL de bromuro de etidio para visualizar las bandas. El marcador de peso molecular utilizado fue DNA del fago λ digerido con Hind III.

Para visualizar las bandas, el gel se colocó sobre una fuente de luz UV. La emisión de luz se captó con una cámara fotográfica o de vídeo.

2.7 Transformación de bacterias

Se mezcló, en hielo, 100 µl de bacterias DH5-α competentes preparadas en el laboratorio siguiendo el protocolo de transformación por cloruro de calcio (recién preparadas o descongeladas lentamente a 4°C) con el producto de ligación (Sambrook, et al., 1989). A continuación, se dejó en hielo durante 30-45 min. Se propició un choque térmico poniendo las bacterias 90 segundos a 42°C, añadiéndose posteriormente 0.9 ml de medio LB (sin ampicilina) y se incubó 1h a 37°C para permitir que las bacterias transformadas iniciaran la fase esponencial de crecimiento. Se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min para descartar parte del volumen del sobrenadante. Unos 100 µl de bacterias se sembraron en placas de LB-agar-ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C hasta la aparición de colonias resistentes al antibiótico.

2.8 Secuenciación del DNA

La secuenciación de los diferentes constructos para la correspondiente comprobación fue hecha mediante PCR, utilizando el kit *BigDye v3.0* (Applied Biosystems) y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de la reacción, de hasta 700 pb, fueron analizados en un secuenciador de canales múltiples y resolución en gel y capilar (Applied Biosystems)

3. Transfecciones y ensayos reporter de actividad transcripcional

Los ensayos reporter se realizaron sobre células HT-29 M6 sembradas en placas de 24 pozos por duplicado, a una densidad de 2×10^5 células/cm², mantenidas en DMEM sin calcio suplementado con 10% FBS CHELEX durante 4 - 5 días aproximadamente (tiempo que tardan en llegar a confluencia), y transfectadas con 1 µg de DNA utilizando el sistema de liposomas LipofectAMINE PLUS (*Invitrogen*) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. A las 4-6 horas de transfectadas, se les retira el medio de transfección y se les añade medio fresco suplementado o no (CEN y CEB, respectivamente) con 2 mM de calcio. Se recogieron muestras a los días indicados en los Resultados, según el experimento.

Los promotores subclonados en pGL3 Basic dirigen la transcripción del gen de la luciferasa *Firefly*. La actividad luciferasa se considera medida proporcional a la actividad transcripcional y fue normalizada por cotransfección con 10 ng/pozo del plásmido que codifica para la luciferasa *Renilla Reniformis* bajo el promotor SV40. Ambas luciferasas fueron medidas en un luminómetro con el kit Dual Luciferase Reporter Assay System (*Invitrogen*) de acuerdo también con las especificaciones indicadas por el fabricante.

Para los ensayos de reiniciación, una vez transcurridos los 9 días de transfectadas las células, se tripsizaron y se resembraron a una densidad de 10^5 células/cm², recogiéndose muestras a las 12, 24 y 48 horas de reiniciadas las células o según se indique en el texto.

4. Ensayos de migración celular por heridas en cultivos confluentes

Células HT-29 M6 fueron cultivadas hasta confluencia en DMEM sin calcio suplementado con 10% FBS CHELEX. Las heridas fueron realizadas por rascado con peine (6-8 mm grosor). Una vez realizadas, las células se lavaron con PBS 1X y se cultivaron durante 48-72 horas a 37°C en condiciones de agitación orbital suave, y en el caso de cultivo CEN se suplementó el medio con 2 mM de cloruro cálcico inmediatamente después de hechas las heridas, tomándose fotos a las 0, 24, 48 y 72 horas posteriores.

5. Técnicas electroforéticas para el estudio de proteínas

5.1 Obtención de los extractos celulares

Para obtener los extractos de proteínas totales, las células se solubilizaron en PBS mediante rascado. Tras dos lavados con PBS las células se lisaron con 300-500 µl de tampón de lisis SDS (1%SDS, 1 mM Na₃VaO₄, 10 mM Tris HCl pH 7.4) y se hirvieron durante 5 minutos.

Seguidamente se sonicaron varias veces con un émbolo o jeringilla para favorecer la solubilización de las muestras. A continuación se determinó la concentración total de proteínas presentes mediante el método colorimétrico de Lowry (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se guardaron a -80°C .

5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para garantizar la separación óptima de MUC1 y MUC5AC, mucinas altamente glicosiladas, la electroforesis de proteína se realizó en minigeles de poliacrilamida al 3% sin *staking*, y en condiciones desnaturalizantes. Para la separación de p27^{KIP1}, p21^{WAF1}, y ciclina D1 la electroforesis de proteína se realizó en minigeles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes y con *staking*, mientras que la separación de pRB y p130 se hizo en minigeles de poliacrilamida al 6%. Las muestras proteicas fueron hervidas previamente en tampón Laemmli (Tris 10 mM, SDS 1%, beta-mercaptoetanol, 10% de glicerol y azul de bromofenol como colorante). Las muestras fueron resueltas mediante electroforesis en los geles mencionados en un tampón balanceado de Tris – Glicina.

5.3 Electrotransferencia de proteínas. Western Blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a un filtro de nitrocelulosa (0.45 μM Protan, Schleicher & Schuell) en una cámara de transferencia (BioRad) durante toda la noche a 4°C y 30 mA.

La inmunodetección de las proteínas transferidas a una membrana de nitrocelulosa se realizó siguiendo un protocolo de Western Blot usual: incubación de 1 hora en solución de bloqueo (Tampón Tris-HCl, Tween al 0,5% (TBS-t y leche en polvo al 5%). A continuación se incubó la membrana durante 1-2 horas con el anticuerpo primario específico a temperatura ambiente y en agitación suave. Después de 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente y en abundante solución TBS-t, se procedió a realizar la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) específico contra la especie originaria del primario, durante 45 – 60 minutos a temperatura ambiente. Después de nuevos lavados con solución TBS-t se reveló la reacción con un sustrato quimioluminiscente específico para la HRP (*Enhanced ChemiLuminescence, ECL, Amersham-Pharmacia*) durante 1 minuto, para después exponer a diferentes tiempos la membrana a películas autoradiográficas AGFA-Curix.

Una vez revelada, la membrana de nitrocelulosa se sumerge en solución de *stripping* (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7, 100 mM β -mercaptoetanol, 2% SDS) a 55°C durante 30-45 min en

agitación suave, para eliminar la señal. Tras varios lavados en abundante TBS-t, se comprobó cada vez la ausencia de señal incubando la nitrocelulosa con el anticuerpo secundario correspondiente y revelando nuevamente con ECL.

6. Anticuerpos utilizados

Los anticuerpos utilizados fueron los mismos para Western blot e Inmunofluorescencia, salvo en el caso de la detección de DPPIV, pues no contábamos con ninguno que funcionara correctamente en Western blot.

Anticuerpo	Antígeno	Dilución	Procedencia
M8 (1)*	MUC1	IF: 1/2 WB: 1/2	D. Swallow (University College of London)
LUMS-1 (2)*	MUC5AC	IF: 1/1000 WB: 1/1000	Dra. Carmen de Bolós (IMIM-UBCM)
DECMA-1 (1)*	E-cadherina	IF: 1/50	Transduction Laboratories
B-catenin (1)*	B-catenina	IF: 1/20	Transduction Laboratories
	DPPIV	IF: 1/1000	Dra. Carmen de Bolós (IMIM-UBCM)
Cyclin D1 (M20) (2)*	Ciclina D1	WB: 1/1000	Santa Cruz Biotechnology
p27 ^{KIP1} (1)*	p27 ^{KIP1}	WB: 1/1000	Transduction Laboratories
p21 ^{KIP1} (1)*	p21 ^{KIP1} (1)*	WB: 1/1000	Transduction Laboratories
pRB	pRB	WB: 1/1000	Santa Cruz Biotechnology
p130	p130	WB: 1/1000	Santa Cruz Biotechnology

* (1) monoclonal, de ratón

* (2) policlonal, de conejo

7. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Los estudios de inmunofluorescencia fueron realizados en cubreobjetos sobre células previamente fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente y lavadas 3 veces en PBS. Después de la fijación de las células, se hizo un bloqueo corto de 20 minutos con NH₄Cl 50 mM para eliminar los radicales generados por el PFA que pudieran dar lugar a uniones inespecíficas con los anticuerpos. Posteriormente, se

permeabilizaron las células con Tritón 0.2% en PBS durante 10 minutos. El siguiente paso realizado fue el bloqueo con TWEEN 0.5% en PBS 1%-BSA 2% durante 30 minutos. A continuación, los cubreobjetos se incubaron sobre una gota de la dilución pertinente del anticuerpo primario, en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces los cubreobjetos con TWEEN 0.5% en PBS 1%-BSA 0.5%, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con fluoresteína o rodamina según fuera necesario, durante 1 hora en cámara oscura. Para la contrateñición de los núcleos se incubaron las células con yoduro de propidio (durante 30 minutos disuelto en PBS a 5 µg/ml y en presencia de RNAsa A 100 U/ml). Finalmente, y después de lavados 3 veces con PBS, los cubreobjetos fueron montados en Mowiol (DABCO) y visualizados al microscopio.

Las imágenes de microscopía confocal fueron captadas por un sistema de Microscopía Confocal Invertida Leica TCS-SP2, y procesadas con el software asociado. Los canales de emisión y excitación con láser fueron colimados en cada caso para evitar señales cruzadas. En cada imagen se realizaron entre 4-8 cortes para generar después una proyección. La intensidad de coloreado de la señal fue retocada ocasionalmente mediante programas de procesamiento de imagen (PaintShopPro).

8. Marcaje del citoesqueleto de actina

Las células, sembradas sobre cubreobjetos y fijadas con PFA al 4%, se lavaron con PBS. A continuación se hizo un bloqueo corto de 20 minutos con NH₄Cl 50 mM para posteriormente permeabilizar con Tritón- 0.2% en PBS durante 10 minutos. El siguiente paso realizado fue el bloqueo con TWEEN 0.5% en PBS 1%-BSA 2% durante 30 minutos. Entonces las células se incubaron durante 10-15 minutos con faloidina marcada con rodamina diluída en TWEEN 0.5%, PBS 1%-BSA 0.5% (Molecular Probes). Para contrateñir los núcleos se incubaron las células con TOPRO (Molecular Probes) y en presencia de RNAsa A. Luego de lavar con PBS se montaron en Mowiol y se visualizan al microscopio.

9. Semifinos y microscopía electrónica

Las células en cultivo se lavaron con PBS 1x y se fijaron con 2.5% de glutaraldehído diluído en PBS 1x. Posteriormente fueron post-fijadas con OsO₄ al 2% durante 1h a temperatura ambiente y protegidas de la luz. A continuación se lavaron con H₂O destilada y se deshidrataron incubando las muestras en baños seriados de etanol: una vez en 30% de etanol, una vez en 50% de etanol, una vez en 70% de etanol, dos veces en 95% de etanol, y 5 veces en 100% de etanol (5 min por incubación). La deshidratación se completó con 3 incubaciones de 5 minutos seguidas de 2 incubaciones de 15 min con hidroxipropil

Metacrilato (HPMA) (MERCK). Posteriormente, las muestras fueron incluidas en una resina Epon (BioRad) incubándose a temperatura ambiente en Epon: HPMA (1:2) durante 15 min, Epon:HPMA (1:1) 15 min, Epon:HPMA (2:1) 30 min y Epon al 100% 3 veces durante 10 min cada vez. A continuación, las piezas fueron depositadas en moldes de goma y orientadas para ser incubadas adicionalmente durante 16-18 h a 37°C y 24 h a 60°C igualmente en Epon al 100%.

Las preparaciones semifinas fueron cortadas en secciones de 0.5 μm con un ultramicrotomo LKB, teñidas con azul de toluidina y observadas por microscopía óptica de transmisión para seleccionar la zona de piramidado y posterior obtención de cortes ultrafinos.

Para microscopía electrónica, se obtuvieron secciones con el ultramicrotomo que fueron colocadas sobre una rejilla de cobre, teñidas con acetato de uranil (5% en etanol absoluto) y citrato de plomo. Las muestras fueron analizadas a 5000-45000 aumentos en un microscopio electrónico de transmisión Phillips a 75 kV.

10. Análisis de los niveles de RNA

10.1 Obtención del RNA total

La extracción de RNA se llevó a cabo por el método de extracción con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Chomczynski P, et al, 1987). Las células fueron lisadas con 4 ml de solución D (4 M tiocianato de guanidinio, 25 mM citrato de sodio pH 7, 0.5% sarcosyl, 0.1% beta-mercaptoetanol). A continuación se le añadió 0.4 ml de 2 M NaAc pH 4, mezclando bien por vortex. Seguidamente, se procedió a la extracción con fenol/cloroformo (4 ml : 0.8 ml), dejando reposar la mezcla en hielo por 15 min a 4°C. Se centrifugó a 8000 rpm durante 30 minutos (4°C) y el sobrenadante se recogió en un tubo limpio, al que se le añadió un volumen de isopropanol, centrifugándose nuevamente durante 30 minutos a 8000 rpm (4°C). Antes de esta última centrifugación se recomienda congelar a -20°C. Una vez centrifugado se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 0.4 mL de solución D, se le añadió un volumen de isopropanol y se centrifugó a 13000 rpm, lavando el pellet con etanol al 75%. Finalmente, el RNA obtenido se resuspendió en H₂O DEPC (el tratamiento con DEPC, dietilpircarbonato rompe los enlaces de los grupos aminos de las proteínas y se realiza para eliminar posibles contaminaciones con RNAsas).

10.2 Northern Blot

Muestras de RNA total se desnaturalizaron a 70°C durante 10 min en tampón MOPS (20 mM de MOPS, 5 mM de NaAc, 0.1 mM de EDTA) conteniendo 50% de formamida y 6.5% de paraformaldehído. Los RNAs se fraccionaron en un gel de agarosa al 1%, 6.5% de formaldehído y MOPS, y se transfirieron por capilaridad en tampón 10x SSC (3 M de NaCl, 0.3 M de citrato de sodio, pH 7) a una membrana de nylon (Hybond-N; Amersham). Los filtros se prehibridan y se hibridan a 68°C en la solución ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. Después, los filtros se lavaron a 55°C: dos lavados cada 15 min con 2x SSC/0.5% de SDS y un lavado de 30 min con 0.1x SSC/0.05% de SDS.

Las sondas utilizadas para la hibridación fueron obtenidas a partir de la digestión de vectores que contenían los cDNAs específicos para MUC1, MUC5AC, DPPIV y ciclina D1 con endonucleasas específicas en cada uno de los casos, obteniendo fragmentos de entre 300-400 pb, las cuales se marcaron con α -³²P [dCTP] (3000 Ci/mmol) (ICN) por "random priming" siguiendo las directrices del kit Rediprime (Amersham) y se purificaron por centrifugación mediante una columna MicroSpin S-400 HR (Pharmacia).

11. Citometría de flujo (FACS)

11.1 Determinación del contenido de DNA

Para el procesamiento de las muestras, partimos de células suspendidas en PBS que fueron fijadas añadiendo etanol a -20°C gota a gota en agitación suave pero constante hasta una concentración final de etanol del 70% (en estas condiciones se pueden mantener a 4°C durante varias semanas). En el momento de hacer el análisis las células se centrifugaron 3 minutos a 5000 rpm, se lavaron en PBS y centrifugaron para posteriormente resuspender en el tampón de tinción (50 µg/ml de yoduro de propidio, 10 µg/ml de RNAsa A en PBS) dejándolas durante 1 hora a temperatura ambiente antes del análisis.

11.2 Determinación de células en fase S (incorporación de 5BrdU)

Las células se incuban con 10 µM de BrdU (Sigma) en su propio medio de cultivo durante 1 hora a 37°C. Se tripsinizan, se cuentan y se fijan en etanol -20°C gota a gota en agitación suave pero constante. En el momento del análisis, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1x. Posteriormente se procedió a la desnaturalización del DNA por incubación con una solución desnaturalizante (PBS 1x, 0.5% BSA, 2M HCl). Seguidamente se lavaron nuevamente

las células con PBS 1x, 0.5% BSA, 0.5% Tween 20 (PBS-BSA-t) y se incubaron con el anticuerpo anti 5BrdU durante 1 hora a temperatura ambiente (anticuerpo monoclonal *Pharmingen*, diluído 1:2000 en PBS-BSA-t . Luego de dos tandas de lavado con PBS-BSA-t se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (FITC) y diluido en la misma solución que el anticuerpo primario. Para contrastar el DNA se les añadió 100 µl de 10x bromuro de etidio 500 µg/ml en citrato de sodio 38 mM.

Las muestras fueron analizadas por el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

12. Ensayo de formación de colonias

Las células HT-29 y HCT-116 fueron sembradas a una concentración de $1-2 \times 10^5$ células/cm² en placas de 57 cm². Se Transfectaron con 10 µg de los vectores APC-CMV o pCMV (vector vacío) y con 1 µg del plásmido TK-higromicina por placa utilizando el sistema de liposomas de LipofectaMINE PLUS (*Invitrogen*) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. Las células fueron crecidas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS y 250 µg/ml de higromicina (G418) y mantenidas en estas condiciones durante 15-30 días para facilitar la selección y el crecimiento de las colonias expresando el vector transfectado, las cuales fueron fijadas con PBS+ PFA 0,5% y teñidas con Comassie Blue.

A

Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Okada Y, Imai K. Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut* 1999;45: 252-8.

Allen A, Hutton DA, Pearson JP. The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 797-801.

Arber N, Doki Y, Han EK, Sgambato A, Zhou P, Kim NH, Delohery T, Klein MG, Holt PR, Weinstein IB. Antisense to cyclin D1 inhibits the growth and tumorigenicity of human colon cancer cells. *Cancer Res* 1997; 57: 1569-74.

Aslam F, Palumbo L, Augenlicht LH, Velcich A. The Sp family of transcription factors in the regulation of the human and mouse MUC2 gene promoters. *Cancer Res* 2001; 61: 570-6.

B

Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 683-90. Review.

Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 2002; 111: 251-263.

Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 84-9.

Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. The PRAD-1/cyclin D1 oncogene product accumulates aberrantly in a subset of colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1994; 58: 568-73.

Baulida J, Batlle E, Garcia De Herreros A. Adenomatous polyposis coli protein (APC)-independent regulation of beta-catenin/Tcf-4 mediated transcription in intestinal cells. *Biochem J* 1999; 344: 565-70.

Birmingham NA, Hassan BA, Wang VY, Fernandez M, Banfi S, Bellen HJ, Fritsch B, Zoghbi HY. Proprioceptor pathway development is dependent on Math1. *Neuron* 2001; 30: 411-22.

Bernards R. CDK-independent activities of D type cyclins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1424: M17-22.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 517-29.

Bienvenu F, Gascan H, Coqueret O. Cyclin D1 represses STAT3 activation through a Cdk4-independent mechanism. *J Biol Chem* 2001; 276: 16840-7. Epub 2001 Feb 20.

Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P, Freund JN, Clevers H, Jay P. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol* 2004; 166:37-47.

Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P, Freund JN, Clevers H, Jay P. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol* 2004; 166: 37-47.

Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and krÄppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 2001; 188: 143-60.

Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPiV. *Eur J Cell Biol* 2003; 82: 53-73.

Bou-Hanna C, Berthon B, Combettes L, Claret M, Laboisse CL. Role of calcium in carbachol- and neurotensin-induced mucin exocytosis in a human colonic goblet cell line and cross-talk with the cyclic AMP pathway. *Biochem J* 1994; 299:579-85.

Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 1999; 155: 1033-8.

Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10356-61.

Bright-Thomas RM, Agrawal A, Hargest R. Preclinical studies of gene transfer for the treatment of desmoid disease in familial adenomatous polyposis. *Br J Surg* 2002; 89:1563-9.

Brown RC, Davis TP. Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Stroke* 2002; 33: 1706-11.

Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 1995; 377: 552-7.

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

Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 77-99.

C

Cam H, Dynlacht BD. Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell* 2003; 3: 311-6.

Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 76-83.

Cao Y, Blohm D, Ghadimi BM, Stosiek P, Xing PX, Karsten U. Mucins (MUC1 and MUC3) of gastrointestinal and breast epithelia reveal different and heterogeneous tumor-associated aberrations in glycosylation. *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 1547-57.

Caroppo R, Gerbino A, Fistetto G, Colella M, Debellis L, Hofer AM, Curci S. Extracellular calcium acts as a "third messenger" to regulate enzyme and alkaline secretion. *J Cell Biol* 2004; 166: 111-9.

Castano E, Kleyner Y, Dynlacht BD. Dual cyclin-binding domains are required for p107 to function as a kinase inhibitor. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 5380-91.

Chakrabarty S, Radjendirane V, Appelman H, Varani J. Extracellular calcium and calcium sensing receptor function in human colon carcinomas: promotion of E-cadherin expression and suppression of beta-catenin/TCF activation. *Cancer Res* 2003; 63: 67-71.

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

Chandrasekaran C, Gordon JL. Cell lineage-specific and differentiation-dependent patterns of CCAAT/enhancer binding protein alpha expression in the gut epithelium of normal and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 8871-5.

Chang SK, Dohman AF, Basbaum CB, Ho SB, Tsuda T, Toribara NW, Gum JR, Kim YS. Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer. *Gastroenterology* 1994; 107: 28-36.

Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE, Kontgen F, Beck F. Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 1997; 386: 84-7.

Chen H, Paradies NE, Fedor-Chaiken M, Brackenbury R. E-cadherin mediates adhesion and suppresses cell motility via distinct mechanisms. *J Cell Sci* 1997; 110: 345-56.

Chitaev NA, Troyanovsky SM. Direct Ca²⁺-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1997; 138: 193-201.

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

Chopra S, Fernandez De Mattos S, Lam EW, Mann DJ. Jab1 co-activation of c-Jun is abrogated by the serine 10-phosphorylated form of p27Kip1. *J Biol Chem* 2002; 277: 32413-6. Epub 2002 Jul 15.

Clements WK, Kimelman D. Wnt signalling gets XEEKy. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 861-3.

Cohn SM, Simon TC, Roth KA, Birkenmeier EH, Gordon JL. Use of transgenic mice to map cis-acting elements in the intestinal fatty acid binding protein gene (Fabpi) that control its cell lineage-specific and regional patterns of expression along the duodenal-colonic and crypt-villus axes of the gut epithelium. *J Cell Biol* 1992; 119: 27-44.

Corzo C, Petzold M, Mayol X, Espinet B, Salido M, Serrano S, Real FX, Sole F. RxFISH karyotype and MYC amplification in the HT-29 colon adenocarcinoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 425-6.

Cowin P, Burke B. Cytoskeleton-membrane interactions. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 56-65.

Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 1999; 18: 2883-91.

D

Deng X, Bellis S, Yan Z, Friedman E. Differential responsiveness to autocrine and exogenous transforming growth factor (TGF) beta1 in cells with nonfunctional TGF-beta receptor type III. *Cell Growth Differ* 1999; 10: 11-8.

Deschenes C, Vezina A, Beaulieu JF, Rivard N. Role of p27(Kip1) in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* 2001; 120: 423-38.

Dijkers PF, Medema RH, Pals C, Banerji L, Thomas NS, Lam EW, Burgering BM, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9138-48.

Duval A, Hamelin R. Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers. *Ann Genet* 2002; 45: 71-5.

E

- Eastman Q, Grosschedl R. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 233-40.
- Edmondson SR, Werther GA, Wraight CJ. Calcium regulates the expression of insulin-like growth factor binding protein-3 by the human keratinocyte cell line HaCaT. *J Invest Dermatol* 2001; 116: 491-7.
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-25.
- el-Deiry WS, Tokino T, Waldman T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M, Hill DE, Healy E, Rees JL, Hamilton SR, et al. Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995; 55: 2910-9.
- Elliott MJ, Dong YB, Yang H, McMasters KM. E2F-1 up-regulates c-Myc and p14(ARF) and induces apoptosis in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3590-7.
- Engle SJ, Hoying JB, Boivin GP, Ormsby I, Gartside PS, Doetschman T. Transforming growth factor beta1 suppresses nonmetastatic colon cancer at an early stage of tumorigenesis. *Cancer Res* 1999; 59: 3379-86.
- Erickson RH, Gum JR, Lotterman CD, Hicks JW, Lai RS, Kim YS. Regulation of the gene for human dipeptidyl peptidase IV by hepatocyte nuclear factor 1 alpha. *Biochem J* 1999; 338: 91-7.
- Erickson RH, Lai RS, Lotterman CD, Kim YS. Identification of upstream stimulatory factor as an activator of the human dipeptidyl peptidase IV gene in Caco-2 cells. *Gene* 2000; 258: 77-84.
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983; 33: 389-96.
- Evers BM, Ko TC, Li J, Thompson EA. Cell cycle protein suppression and p21 induction in differentiating Caco-2 cells. *Am J Physiol* 1996; 271: G722-7.

F

- Fabre M, Garcia de Herreros A. Phorbol ester-induced scattering of HT-29 human intestinal cancer cells is associated with down-modulation of E-cadherin. *J Cell Sci* 1993; 106: 513-21.
- Fabre M, Martin M, Ulloa F, Real FX. In vitro analysis of the role of DCC in mucus-secreting intestinal differentiation. *Int J Cancer* 1999; 81: 799-807.
- Fang KS, Farboud B, Nuccitelli R, Isseroff RR. Migration of human keratinocytes in electric fields requires growth factors and extracellular calcium. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 751-6.
- Fang R, Olds LC, Santiago NA, Sibley E. GATA family transcription factors activate lactase gene promoter in intestinal Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G58-67.
- Fang R, Santiago NA, Olds LC, Sibley E. The homeodomain protein Cdx2 regulates lactase gene promoter activity during enterocyte differentiation. *Gastroenterology* 2000; 118: 115-27.
- Fearon ER. Defining the microsatellite instability phenotype in colorectal cancer through analysis of surrogate markers. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 79-81.
- Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, Kaushansky K, Roberts JM. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 1996; 85: 733-44.
- Fisher RP, Morgan DO. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 1994; 78: 713-24.
- Fodde R, Smits R. Disease model: familial adenomatous polyposis. *Trends Mol Med* 2001; 7: 369-73.
- Fogh J. Human tumor cells in vitro. *New York and London: Plenum Press* 1975; 115-59.
- Fujita N, Sato S, Tsuruo T. Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem* 2003; 278: 49254-60.
- Furuse M, Fujita K, Hiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998; 141: 1539-50.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993; 123: 1777-88.

G

- Gaemers IC, Vos HL, Volders HH, van der Valk SW, Hilkens J. A stat-responsive element in the promoter of the episialin/MUC1 gene is involved in its overexpression in carcinoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 6191-9. Ganter B, Fu S, Lipsick JS. D-type cyclins repress transcriptional activation by the v-Myb but not the c-Myb DNA-binding domain. *EMBO J* 1998; 17: 255-68.
- Gambus G, de Bolos C, Andreu D, Franci C, Egea G, Real FX. Detection of the MUC2 apomucin tandem repeat with a mouse monoclonal antibody. *Gastroenterology* 1993; 104: 93-102.
- Garriga J, Limon A, Mayol X, Rane SG, Albrecht JH, Reddy EP, Andres V, Grana X. Differential regulation of the retinoblastoma family of proteins during cell proliferation and differentiation. *Biochem J* 1998; 333: 645-54.
- Gartel AL, Goufman E, Tevosian SG, Shih H, Yee AS, Tyner AL. Activation and repression of p21(WAF1/CIP1) transcription by RB binding proteins. *Oncogene* 1998; 17: 3463-9.
- Gartel AL, Serfas MS, Gartel M, Goufman E, Wu GS, el-Deiry WS, Tyner AL. p21 (WAF1/CIP1) expression is induced in newly nondividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line. *Exp Cell Res* 1996; 227: 171-81.
- Gartel AL, Shchors K. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* 2003; 283: 17-21.
- Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 5: 1653: 1-24.
- Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 1998; 391: 357-62.
- Gomez S, del Mont Llosas M, Verdu J, Roura S, Lloreta J, Fabre M, Garcia de Herreros A. Independent regulation of adherens and tight junctions by tyrosine phosphorylation in Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1452: 121-32.
- Gooding JM, Yap KL, Ikura M. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays* 2004; 26: 497-511.
- Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 2001; 153: 1049-60.
- Gout S, Marie C, Laine M, Tavernier G, Block MR, Jacquier-Sarlin M. Early enterocytic differentiation of HT-29 cells: biochemical changes and strength increases of adherens junctions. *Exp Cell Res* 2004; 299: 498-510.
- Grana X, Garriga J, Mayol X. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* 1998; 17: 3365-83.
- Gratchev A, Siedow A, Bumke-Vogt C, Hummel M, Foss HD, Hanski ML, Kobalz U, Mann B, Lammert H, Mansmann U, Stein H, Riecken EO, Hanski C. Regulation of the intestinal mucin MUC2 gene expression in vivo: evidence for the role of promoter methylation. *Cancer Lett* 2001; 168: 71-80.
- Grindstaff KK, Yeaman C, Anandasabapathy N, Hsu SC, Rodriguez-Boulant E, Scheller RH, Nelson WJ. Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells. *Cell* 1998; 93: 731-40.
- Grife R, Swallow C, Bapat B and col. Molecular Biology of colorectal cancer. *Current problems in Cancer* 1998; 2: 1-68.
- Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Battlle E, Sancho E, Dedhar S, De Herreros AG, Baulida J. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem* 2002; 277: 39209-16.
- Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998; 392: 402-5.
- Guo RJ, Huang E, Ezaki T, Patel N, Sinclair K, Wu J, Klein P, Suh ER, Lynch JP. Cdx1 inhibits human colon cancer cell proliferation by reducing beta-catenin/T-cell factor transcriptional activity. *J Biol Chem* 2004; 279: 36865-75.

H

- Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371: 257-61.
- Hanski C, Riede E, Gratchev A, Foss HD, Bohm C, Klusmann E, Hummel M, Mann B, Buhr HJ, Stein H, Kim YS, Gum J, Riecken EO. MUC2 gene suppression in human colorectal carcinomas and their metastases: in vitro evidence of the modulatory role of DNA methylation. *Lab Invest* 1997; 77: 685-95.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-16.
- Hauser PJ, Agrawal D, Flanagan M, Pledger WJ. The role of p27kip1 in the in vitro differentiation of murine keratinocytes. *Cell Growth Differ* 1997; 8: 203-11.

- He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999; 99: 335-45.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281:1509-12.
- Heinen CD, Goss KH, Cornelius JR, Babcock GF, Knudsen ES, Kowalik T, Groden J. The APC tumor suppressor controls entry into S-phase through its ability to regulate the cyclin D/RB pathway. *Gastroenterology* 2002; 123: 751-63.
- Hengst L, Reed SI. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 1996; 27: 1861-4.
- Hennings H, Holbrook K, Steinert P, Yuspa S. Growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture: effects of extracellular calcium. *Curr Probl Dermatol* 1980; 10: 3-25 (b).
- Hennings H, Holbrook KA. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp Cell Res* 1983; 143: 127-42.
- Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 1980; 19: 245-54 (a).
- Hinchcliffe EH, Sluder G. Two for two: Cdk2 and its role in centrosome doubling. *Oncogene* 2002; 21: 6154-60.
- Hinnebusch BF, Siddique A, Henderson JW, Malo MS, Zhang W, Athaide CP, Abedrapo MA, Chen X, Yang VW, Hodin RA. Enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is a target gene of the gut-enriched Kruppel-like factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G23-30.
- Hirabayashi S, Tajima M, Yao I, Nishimura W, Mori H, Hata Y. JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1. *Mol Cell Biol* 2003 ; 23: 4267-82.
- Hiraki A, Shirasuna K, Ikari T, Shinohara M, Garrod DR. Calcium induces differentiation of primary human salivary acinar cells. *J Cell Physiol* 2002; 193: 55-63.
- Hirano K, Minamoto T. Altered expression of p53 and p27 proteins, alone or combined, as a predictor of metastatic potential in early invasive carcinoma of colon and rectum--a comparative clinicopathologic and molecular analysis. *Cancer Detect Prev* 2000; 24: 343-55.
- Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003; 94:575-81.
- Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998; 153: 333-9.
- Hiyama H, Iavarone A, Reeves SA. Regulation of the cdk inhibitor p21 gene during cell cycle progression is under the control of the transcription factor E2F. *Oncogene* 1998; 16: 1513-23.
- Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1993; 53: 641-51.
- Hofer AM, Brown EM. Extracellular calcium sensing and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 530-8.
- Hofmann J. Protein kinase C isozymes as potential targets for anticancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4:125-46.
- Hoos A, Nissan A, Stojadinovic A, Shia J, Hedvat CV, Leung DH, Paty PB, Klimstra D, Cordon-Cardo C, Wong WD. Tissue microarray molecular profiling of early, node-negative adenocarcinoma of the rectum: a comprehensive analysis. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3841-9.
- Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 1999; 18: 813-22.
- Hosokawa Y, Arnold A. Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 22: 66-71.
- Howell S, Kenny AJ, Turner AJ. A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29. *Biochem J* 1992; 284: 595-601.
- Huang F, Sauma S, Yan Z, Friedman E. Colon absorptive epithelial cells lose proliferative response to TGF alpha as they differentiate. *Exp Cell Res* 1995; 219: 8-14.
- Huang L, Ren J, Chen D, Li Y, Kharbanda S, Kufe D. MUC1 cytoplasmic domain coactivates Wnt target gene transcription and confers transformation. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: 702-6.
- Huelsken J, Birchmeier W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 547-53.
- Huen AC, Park JK, Godsel LM, Chen X, Bannon LJ, Amargo EV, Hudson TY, Mongiu AK, Leigh IM, Kelsell DP, Gumbiner BM, Green KJ. Intermediate filament-membrane attachments function synergistically with actin-dependent contacts to regulate intercellular adhesive strength. *J Cell Biol* 2002; 159: 1005-17.

Hulit J, Wang C, Li Z, Albanese C, Rao M, Di Vizio D, Shah S, Byers SW, Mahmood R, Augenlicht LH, Russell R, Pestell RG. Cyclin D1 genetic heterozygosity regulates colonic epithelial cell differentiation and tumor number in ApcMin mice. *Mol Cell Biol*. 2004; 24: 7598-611.

Hulla W, Kallay E, Krugluger W, Peterlik M, Cross HS. Growth control of human colon-adenocarcinoma-derived Caco-2 cells by vitamin-D compounds and extracellular calcium in vitro: relation to c-myc-oncogene and vitamin-D-receptor expression. *Int J Cancer* 1995; 62: 711-6.

Hurford RK Jr, Cobrinik D, Lee MH, Dyson N. pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes. *Genes Dev* 1997; 11: 1447-63.

I

Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat* 2003; 21: 271-6.

Inoue K, Sherr CJ. Gene expression and cell cycle arrest mediated by transcription factor DMP1 is antagonized by D-type cyclins through a cyclin-dependent-kinase-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 1590-600.

Iwata S, Morimoto C. CD26/dipeptidyl peptidase IV in context. The different roles of a multifunctional ectoenzyme in malignant transformation. *J Exp Med* 1999; 190: 301-6.

J

Jarrault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 1995; 377: 355-8.

Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2002; 123: 862-76.

Jenny M, Uhl C, Roche C, Duluc I, Guillemin V, Guillemot F, Jensen J, Kedinger M, Gradwohl G. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J* 2002; 21: 6338-47.

Jessup JM, Lavin PT, Andrews CW Jr, Loda M, Mercurio A, Minsky BD, Mies C, Cukor B, Bleday R, Steele G Jr. Sucrase-isomaltase is an independent prognostic marker for colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1995 ; 38: 1257-64.

Johnson DG, Schneider-Broussard R. Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front Biosci* 1998; 3: 447-8.

Johnstone RW, Licht JD. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell* 2003; 4: 13-8.

Jonckheere N, Van Der Sluis M, Velghe A, Buisine MP, Suttmuller M, Ducourouble MP, Pigny P, Buller HA, Aubert JP, Einerhand AW, Van Seuninghen I. Transcriptional activation of the murine Muc5ac mucin gene in epithelial cancer cells by TGF-beta/Smad4 signalling pathway is potentiated by Sp1. *Biochem J* 2004; 377: 797-808.

Jung A, Schrauder M, Oswald U, Knoll C, Sellberg P, Palmqvist R, Niedobitek G, Brabletz T, Kirchner T. The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. *Am J Pathol* 2001; 159: 1613-7.

K

Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, Spichtin H, Stoios D, Bundi M, Korcheva V, Mirlacher M, Loda M, Sauter G, Corless CL. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2004; 17: 1392-9.

Kandikonda S, Oda D, Niederman R, Sorokin BC. Cadherin-mediated adhesion is required for normal growth regulation of human gingival epithelial cells. *Cell Adhes Commun* 1996; 4: 13-24.

Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Lee CS, Labosky PA, Yang VW, Kaestner KH. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* 2002; 129: 2619-28.

Kallay E, Kifor O, Chattopadhyay N, Brown EM, Bischof MG, Peterlik M, Cross HS. Calcium-dependent c-myc proto-oncogene expression and proliferation of Caco-2 cells: a role for a luminal extracellular calcium-sensing receptor.

Khaleghpour K, Li Y, Banville D, Yu Z, Shen SH. Involvement of the PI 3-kinase signaling pathway in progression *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232: 80-3. of colon adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2004; 25: 241-8.

Kim TY, Kim WI, Smith RE, Kay ED. Role of p27(Kip1) in cAMP- and TGF-beta2-mediated antiproliferation in rabbit corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 3142-9.

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

Kljuic A, Bazzi H, Sundberg JP, Martinez-Mir A, O'Shaughnessy R, Mahoney MG, Levy M, Montagutelli X, Ahmad W, Aita VM, Gordon D, Uitto J, Whiting D, Ott J, Fischer S, Gilliam TC, Jahoda CA, Morris RJ, Panteleyev AA, Nguyen VT, Christiano AM. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell* 2003; 113: 249-60.

Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massague J. Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta. *Science* 1993; 260: 536-9.

Kohler K, Louvard D, Zahraoui A. Rab13 regulates PKA signaling during tight junction assembly. *J Cell Biol* 2004; 165: 175-80.

Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 1998; 19: 379-83.

Kovarik A, Lu PJ, Peat N, Morris J, Taylor-Papadimitriou J. Two GC boxes (Sp1 sites) are involved in regulation of the activity of the epithelium-specific MUC1 promoter. *J Biol Chem* 1996; 271: 18140-7.

Kovarik A, Peat N, Wilson D, Gendler SJ, Taylor-Papadimitriou J. Analysis of the tissue-specific promoter of the MUC1 gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 9917-26.

Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Norvell SM, Palka HL, Green KJ. Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int Rev Cytol* 1999; 185: 237-302.

Kubota K, Furuse M, Sasaki H, Sonoda N, Fujita K, Nagafuchi A, Tsukita S. Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr Biol* 1999; 9: 1035-8.

Kyoung-Mee K, Darryl S. Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts. *Oncogene* 2002; 21: 5441-49.

L

Lamb J, Ramaswamy S, Ford HL, Contreras B, Martinez RV, Kittrell FS, Zahnow CA, Patterson N, Golub TR, Ewen ME. A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer. *Cell* 2003; 114: 323-34.

Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 601-14.

Lamprecht SA, Lipkin M. Migrating colonic crypt epithelial cells: primary targets for transformation. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1777-80.

Lane DP: P53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.

Laprise P, Langlois MJ, Boucher MJ, Jobin C, Rivard N. Down-regulation of MEK/ERK signaling by E-cadherin-dependent PI3K/Akt pathway in differentiating intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* 2004;199: 32-9.

Lees JA, Saito M, Vidal M, Valentine M, Look T, Harlow E, Dyson N, Helin K. The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 7813-25.

Leow CC, Romero MS, Ross S, Polakis P, Gao WQ. Hath1, down-regulated in colon adenocarcinomas, inhibits proliferation and tumorigenesis of colon cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 6050-7.

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

Lesuffleur T, Kornowski A, Augeron C, Dussaulx E, Barbat A, Laboisse C, Zweibaum A. Increased growth adaptability to 5-fluorouracil and methotrexate of HT-29 sub-populations selected for their commitment to differentiation. *Int J Cancer* 1991; 49: 731-7.

Lesuffleur T, Kornowski A, Luccioni C, Muleris M, Barbat A, Beaumatin J, Dussaulx E, Dutrillaux B, Zweibaum A. Adaptation to 5-fluorouracil of the heterogeneous human colon tumor cell line HT-29 results in the selection of cells committed to differentiation. *Int J Cancer* 1991; 49: 721-30.

Lesuffleur T, Porchet N, Aubert JP, Swallow D, Gum JR, Kim YS, Real FX, Zweibaum A. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J Cell Sci* 1993; 106: 771-83.

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

Lesuffleur T, Violette S, Vasile-Pandrea I, Dussaulx E, Barbat A, Muleris M, Zweibaum A. Resistance to high concentrations of methotrexate and 5-fluorouracil of differentiated HT-29 colon-cancer cells is restricted to cells of enterocytic phenotype. *Int J Cancer* 1998; 76: 383-92.

Liao L, Jaken S. Effect of alpha-protein kinase C neutralizing antibodies and the pseudosubstrate peptide on phosphorylation, migration, and growth of REF52 cells. *Cell Growth Differ* 1993; 4: 309-16.

Li D, Gallup M, Fan N, Szymkowski DE, Basbaum CB. Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts. *J Biol Chem* 1998; 273: 6812-20.

Li JQ, Miki H, Wu F, Saoo K, Nishioka M, Ohmori M, Imaida K. Cyclin A correlates with carcinogenesis and metastasis, and p27(kip1) correlates with lymphatic invasion, in colorectal neoplasms. *Hum Pathol* 2002; 33: 1006-15.

Li XL, Eishi Y, Bai YQ, Sakai H, Akiyama Y, Tani M, Takizawa T, Koike M, Yuasa Y. Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma. *Int J Oncol* 2004; 24: 257-63.

- Li Y, Bharti A, Chen D, Gong J, Kufe D. Interaction of glycogen synthase kinase 3beta with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 7216-24.
- Li Y, Kuwahara H, Ren J, Wen G, Kufe D. The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3 beta and beta-catenin. *J Biol Chem* 2001; 276: 6061-4 (b).
- Li Y, Liu D, Chen D, Kharbanda S, Kufe D. Human DF3/MUC1 carcinoma-associated protein functions as an oncogene. *Oncogene* 2003; 22: 6107-10.
- Li Y, Ren J, Yu W, Li Q, Kuwahara H, Yin L, Carraway KL 3rd, Kufe D. The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin. *J Biol Chem* 2001; 276: 35239-42 (a).
- Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002; 8: 153-60.
- Lickert H, Domon C, Huls G, Wehrle C, Duluc I, Clevers H, Meyer BI, Freund JN, Kemler R. Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene Cdx1 in embryonic intestine. *Development* 2000; 127: 3805-13.
- Limburg PJ, Ahlquist DA, Gilbert JA, Harrington JJ, Klee GG, Roche PC. Immunodiscrimination of colorectal neoplasia using MUC1 antibodies: discrepant findings in tissue versus stool. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 494-9.
- Lin HM, Zhao L, Cheng SY. Cyclin D1 Is a Ligand-independent Co-repressor for Thyroid Hormone Receptors. *J Biol Chem* 2002; 277: 28733-41.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002; 108: 37-47.
- Liu DF, Ferguson K, Cooper GS, Grady WM, Willis J. p27 cell-cycle inhibitor is inversely correlated with lymph node metastases in right-sided colon cancer. *J Clin Lab Anal* 1999; 13: 291-5.
- Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1-12.
- Llosas MD, BATTLE E, Coll O, Skoudy A, Fabre M, Garcia de Herreros A. Evidence for a role of conventional protein kinase-C alpha in the control of homotypic contacts and cell scattering of HT-29 human intestinal cells. *Biochem J* 1996; 315: 1049-54.
- Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC, Scheithauer BW. p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 1999; 154: 313-23.
- Loeb LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3230-9.
- Logan N, Delavaine L, Graham A, Reilly C, Wilson J, Brummelkamp TR, Hijmans EM, Bernards R, La Thangue NB. E2F-7: a distinctive E2F family member with an unusual organization of DNA-binding domains. *Oncogene* 2004; 23: 5138-50.
- Lynch J, Suh ER, Silberg DG, Rulyak S, Blanchard N, Traber PG. The caudal-related homeodomain protein Cdx1 inhibits proliferation of intestinal epithelial cells by down-regulation of D-type cyclins. *J Biol Chem* 2000; 275: 4499-506.

M

- Ma TY, Tran D, Hoa N, Nguyen D, Merryfield M, Tarnawski A. Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: role of cytoskeletal involvement. *Micrasc Res Tech* 2000; 51: 156-68.
- Mallo GV, Rechreche H, Frigerio JM, Rocha D, Zweibaum A, Lacasa M, Jordan BR, Duseti NJ, Dagorn JC, Iovanna JL. Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer*. 1997 Feb 20; 74: 35-44.
- Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 1603-8.
- Mao W, Luis E, Ross S, Silva J, Tan C, Crowley C, Chui C, Franz G, Senter P, Koeppen H, Polakis P. EphB2 as a therapeutic antibody drug target for the treatment of colorectal cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 781-8.
- Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res* 2004; 91: 137-68.
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998; 142: 117-27.
- Marzesco AM, Dunia I, Pandjaitan R, Recouvreur M, Dauzonne D, Benedetti EL, Louvard D, Zahraoui A. The small GTPase Rab13 regulates assembly of functional tight junctions in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 1819-31.
- Mayol X, Garriga J, Grana X. Cell cycle-dependent phosphorylation of the retinoblastoma-related protein p130. *Oncogene* 1995; 11: 801-8.

Mayol X, Garriga J, Grana X. G1 cyclin/CDK-independent phosphorylation and accumulation of p130 during the transition from G1 to G0 lead to its association with E2F-4. *Oncogene* 1996; 13: 237-46.

McDonald ER 3rd, El-Deiry WS. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. *Int J Oncol* 2000; 16: 871-86.

Mercé Marín Peña. Caracterització de la funció del DCC (Deleted in Colorectal Cancer) en cèl·lules epitelials en relació als processos de diferenciació i adhesió cel·lular. Universidad de Barcelona, 2001.

Millard SS, Yan JS, Nguyen H, Pagano M, Kiyokawa H, Koff A. Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J Biol Chem* 1997; 272: 7093-8.

Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Hershko A, Pagano M. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 1999; 13: 1181-9.

Morris JR, Taylor-Papadimitriou J. The Sp1 transcription factor regulates cell type-specific transcription of MUC1. *DNA Cell Biol* 2001; 20: 133-9.

Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 1990; 247: 322-4.

Motti ML, De Marco C, Califano D, Fusco A, Viglietto G. Akt-dependent T198 phosphorylation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in breast cancer. *Cell Cycle* 2004; 3: 1074-80.

Muñoz A. *Cancer: genes y nuevas terapias*. Editorial Helice, 1997.

Mutoh H, Fung BP, Naya FJ, Tsai MJ, Nishitani J, Leiter AB. The basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/NeuroD is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3560-4.

Mutoh H, Naya FJ, Tsai MJ, Leiter AB. The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells. *Genes Dev* 1998; 12: 820-30.

N

Nakamura N, Ramaswamy S, Vazquez F, Signoretti S, Loda M, Sellers WR. Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 8969-82.

Navarro E, Espinosa L, Adell T, Torá M, Berrozpe G, Real FX. Expressed sequence tag (EST) phenotyping of TH-29 cells: cloning of ser/thr kinase EMK1, kinesin KIF3B, and of transcripts that include Alu repeated elements. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1450: 254-64.

Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai MJ. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 1997; 11: 2323-34.

Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004; 303: 1483-7.

Neufeld KL, Zhang F, Cullen BR, White RL. APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. *EMBO Rep* 2000; 1: 519-23.

Neuman E, Ladha MH, Lin N, Upton TM, Miller SJ, DiRenzo J, Pestell RG, Hinds PW, Dowdy SF, Brown M, Ewen ME. Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5338-47.

Ng AY, Waring P, Ristevski S, Wang C, Wilson T, Pritchard M, Hertzog P, Kola I. Inactivation of the transcription factor Elf3 in mice results in dysmorphogenesis and altered differentiation of intestinal epithelium. *Gastroenterology* 2002; 122:1455-66.

Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 21-32.

Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 1994; 211: 90-8.

O

Oliveira C, Bordin MC, Grehan N, Huntsman D, Suriano G, Machado JC, Kiviluoto T, Aaltonen L, Jackson CE, Seruca R, Caldas C. Screening E-cadherin in gastric cancer families reveals germline mutations only in hereditary diffuse gastric cancer kindred. *Hum Mutat* 2002; 19: 510-7.

Olsen J, Kokholm K, Troelsen JT, Laustsen L. An enhancer with cell-type dependent activity is located between the myeloid and epithelial aminopeptidase N (CD 13) promoters. *Biochem J* 1997; 322: 899-908.

Ookawa K, Kudo T, Aizawa S, Saito H, Tsuchida S. Transcriptional activation of the MUC2 gene by p53. *J Biol Chem* 2002; 277: 48270-5.

P

Palmqvist R, Stenling R, Oberg A, Landberg G. Prognostic significance of p27(Kip1) expression in colorectal cancer: a clinicopathological characterization. *J Pathol* 1999; 188: 18-23.

Pece S, Gutkind JS. Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem* 2000; 275: 41227-33.

Pece S, Chiariello M, Murga C, Gutkind JS. Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem* 1999; 274: 19347-51.

Peifer M, Pai LM, Casey M. Phosphorylation of the Drosophila adherens junction protein Armadillo: roles for wingless signal and zeste-white 3 kinase. *Dev Biol* 1994; 166: 543-56.

Peifer M. Colon construction. *Nature* 2002; 410: 274-5.

Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 2003; 112: 535-48.

Perrais M, Pigny P, Copin MC, Aubert JP, Van Seuning I. Induction of MUC2 and MUC5AC mucins by factors of the epidermal growth factor (EGF) family is mediated by EGF receptor/Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase cascade and Sp1. *J Biol Chem* 2002; 277: 32258-67.

Philipp-Staheli J, Kim KH, Payne SR, Gurley KE, Liggitt D, Longton G, Kemp CJ. Pathway-specific tumor suppression. Reduction of p27 accelerates gastrointestinal tumorigenesis in Apc mutant mice, but not in Smad3 mutant mice. *Cancer Cell* 2002; 1: 355-68.

Piedra J, Miravet S, Castano J, Palmer HG, Heisterkamp N, Garcia de Herreros A, Dunach M. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin interaction. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 2287-97.

Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 2003; 17:1709-13.

Polakis P, Hart M, Rubinfeld B. Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol* 1999; 470: 23-32.

Polakis P. The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9:15-21.

Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8: 9-22.

Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78: 59-66.

Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 916-32.

Prabhu S, Ignatova A, Park ST, Sun XH. Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5888-96.

Q

Qian X, Karpova T, Sheppard AM, McNally J, Lowy DR. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 2004; 23: 1739-84.

Qualtrough D, Hinoi T, Fearon E, Paraskeva C. Expression of CDX2 in normal and neoplastic human colon tissue and during differentiation of an in vitro model system. *Gut* 2002; 51: 184-90.

Quaroni A, Tian JQ, Seth P, Ap Rhys C. p27(Kip1) is an inducer of intestinal epithelial cell differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C1045-57.

R

Ratineau C, Petry MW, Mutoh H, Leiter AB. Cyclin D1 represses the basic helix-loop-helix transcription factor, BETA2/NeuroD. *J Biol Chem* 2002; 277: 8847-53.

Rask K, Thom M, Ponten F, Kraaz W, Sundfeldt K, Hedin L, Enerback S. Increased expression of the transcription factors CCAAT-enhancer binding protein-beta (C/EBbeta) and C/EBzeta (CHOP) correlate with invasiveness of human colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000; 86: 337-43.

Real FX, Xu M, Vila MR, de Bolos C. Intestinal brush-border-associated enzymes: co-ordinated expression in colorectal cancer. *Int J Cancer* 1992; 51: 173-81.

Reed SI. Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 855-64.

Ren J, Li Y, Kufe D. Protein kinase C delta regulates function of the DF3/MUC1 carcinoma antigen in beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 2002; 277: 17616-22.

Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 1994; 14:1669-79.

- Resnitzky D, Reed SI. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 3463-9.
- Reutens AT, Fu M, Wang C, Albanese C, McPhaul MJ, Sun Z, Balk SP, Janne OA, Palvimo JJ, Pestell RG. Cyclin D1 binds the androgen receptor and regulates hormone-dependent signaling in a p300/CBP-associated factor (P/CAF)-dependent manner. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 797-811.
- Rockman SP, Currie SA, Ciavarella M, Vincan E, Dow C, Thomas RJ, Phillips WA. Id2 is a target of the beta-catenin/T cell factor pathway in colon carcinoma. *J Biol Chem* 2001; 276: 45113-9.
- Roura S, Dominguez D. Inducible expression of p120Cas1B isoform corroborates the role for p120-catenin as a positive regulator of E-cadherin function in intestinal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 435-41.
- Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1999; 274: 36734-40.
- S**
- Sancho E, Battle E, Clevers H. Live and let die in the intestinal epithelium. *Cell Biology* 2003; 15:763-70.
- Sander GR, Powell BC. Expression of notch receptors and ligands in the adult gut. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 509-16.
- Sauma S, Huang F, Winawer S, Friedman E. Colon goblet cells lose proliferative response to TGF alpha as they differentiate. *Int J Cancer* 1995; 61: 848-53.
- Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C1213-28.
- Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein IB. Multiple functions of p27(Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol* 2000; 183: 18-27.
- Sgambato A, Ratto C, Faraglia B, Merico M, Ardito R, Schinzari G, Romano G, Cittadini AR. Reduced expression and altered subcellular localization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in human colon cancer. *Mol Carcinog* 1999; 26: 172-9.
- Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501-12.
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672-7.
- Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994; 79: 551-5.
- Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 2002; 8: 1145-52.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5522-7.
- Silberg DG, Furth EE, Taylor JK, Schuck T, Chiou T, Traber PG. CDX1 protein expression in normal, metaplastic, and neoplastic human alimentary tract epithelium. *Gastroenterology* 1997; 113: 478-86.
- Siliciano JD, Goodenough DA. Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Cell Biol* 1988; 107: 2389-99.
- Skapek SX, Rhee J, Kim PS, Novitch BG, Lassar AB. Cyclin-mediated inhibition of muscle gene expression via a mechanism that is independent of pRB hyperphosphorylation. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 7043-53.
- Skapek SX, Rhee J, Spicer DB, Lassar AB. Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. *Science* 1995; 267: 1022-4.
- Skoudy A, Llosas MD, Garcia de Herreros A. Intestinal HT-29 cells with dysfunction of E-cadherin show increased pp60src activity and tyrosine phosphorylation of p120-catenin. *Biochem J* 1996; 317: 279-84.
- Smith DR, Myint T, Goh HS. Over-expression of the c-myc proto-oncogene in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1993; 68: 407-13.
- Smorodinsky N, Weiss M, Hartmann ML, Baruch A, Harness E, Yaakovovitz M, Keydar I, Wreschner DH. Detection of a secreted MUC1/SEC protein by MUC1 isoform specific monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228: 115-21.
- Song KS, Lee WJ, Chung KC, Koo JS, Yang EJ, Choi JY, Yoon JH. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 23243-50.
- Sowa Y, Orita T, Minamikawa S, Nakano K, Mizuno T, Nomura H, Sakai T. Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 142-50.
- Spicer AP, Rowse GJ, Lidner TK, Gendler SJ. Delayed mammary tumor progression in Muc-1 null mice. *J Biol Chem* 1995; 270: 30093-101.

Spodsberg N, Troelsen JT, Carlsson P, Enerback S, Sjöström H, Noren O. Transcriptional regulation of pig lactase-phlorizin hydrolase: involvement of HNF-1 and FREACs. *Gastroenterology* 1999; 116: 842-54.

St Croix B, Sheehan C, Rak JW, Florenes VA, Slingerland JM, Kerbel RS. E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J Cell Biol* 1998; 142: 557-71.

Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H, Foisner R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J Cell Biol* 2001; 154: 1185-96.

Subramanian V, Meyer B, Evans GS. The murine Cdx1 gene product localises to the proliferative compartment in the developing and regenerating intestinal epithelium. *Differentiation* 1998; 64:11-8.

Suh E, Chen L, Taylor J, Traber PG. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 7340-51.

Suh E, Traber PG. An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 619-25.

Suriano G, Oliveira C, Ferreira P, Machado JC, Bordin MC, De Wever O, Bruyneel EA, Moguilevsky N, Grehan N, Porter TR, Richards FM, Hruban RH, Roviello F, Huntsman D, Mareel M, Carneiro F, Caldas C, Seruca R. Identification of CDH1 germline missense mutations associated with functional inactivation of the E-cadherin protein in young gastric cancer probands. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 575-82.

Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T, Manabe N, Mizuno K, Shimizu M, Akimoto K, Izumi Y, Ohnishi T, Ohno S. Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J Cell Biol* 2001; 152: 1183-96.

Syed SE, Trinnaman B, Martin S, Major S, Hutchinson J, Magee AI. Molecular interactions between desmosomal cadherins. *Biochem J* 2002; 362: 317-27.

Sylvester PA, Myerscough N, Warren BF, Carlstedt I, Corfield AP, Durdey P, Thomas MG. Differential expression of the chromosome 11 mucin genes in colorectal cancer. *J Pathol* 2001; 195: 327-35.

T

Takahashi K, Suzuki K. Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Exp Cell Res* 1996; 226:214-22.

Takahashi M, Fujita M, Furukawa Y, Hamamoto R, Shimokawa T, Miwa N, Ogawa M, Nakamura Y. Isolation of a novel human gene, APCDD1, as a direct target of the beta-Catenin/T-cell factor 4 complex with probable involvement in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 2002; 62:5651-6.

Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Peifer M. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 91-100.

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

Thomas PQ, Rathjen PD. HES-1, a novel homeobox gene expressed by murine embryonic stem cells, identifies a new class of homeobox genes. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 5840.

Tian JQ, Quaroni A. Dissociation between growth arrest and differentiation in Caco-2 subclone expressing high levels of sucrase. *Am J Physiol* 1999; 276: G1094-104.

Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78: 67-74.

Trimarchi JM, Fairchild B, Verona R, Moberg K, Andon N, Lees JA. E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 2850-5.

Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 11-20.

Tsukamoto T, Inada K, Tanaka H, Mizoshita T, Mihara M, Ushijima T, Yamamura Y, Nakamura S, Tatematsu M. Down-regulation of a gastric transcription factor, Sox2, and ectopic expression of intestinal homeobox genes, Cdx1 and Cdx2: inverse correlation during progression from gastric/intestinal-mixed to complete intestinal metaplasia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 135-45.

Tung J, Markowitz AJ, Silberg DG, Traber PG. Developmental expression of Sl is regulated in transgenic mice by an evolutionarily conserved promoter. *Am J Physiol* 1997; 273: G83-92.

U

Umeda K, Matsui T, Nakayama M, Furuse K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 44785-94.

V

Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, Van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, Van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H. The β -Catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002; 111: 241-250.

Vasioukhin V, Bowers E, Bauer C, Degenstein L, Fuchs E. Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 1076-85.

Velcich A, Yang W, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht L. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 2002; 295: 1726-9.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; 36: 131-49.

Vernon AE, Devine C, Philpott A. The cdk inhibitor p27Xic1 is required for differentiation of primary neurones in *Xenopus*. *Development* 2003; 130: 85-92 (b).

Vernon AE, Philpott A. A single cdk inhibitor, p27Xic1, functions beyond cell cycle regulation to promote muscle differentiation in *Xenopus*. *Development* 2003; 130: 71-83 (a).

Vidal A, Koff A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 2000; 247: 1-15.

Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tsihchlis P, Bellacosa A, Fusco A, Santoro M. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 2002; 8: 1136-44 (a).

Viglietto G, Motti ML, Fusco A. Understanding p27(kip1) deregulation in cancer: down-regulation or mislocalization. *Cell Cycle* 2002; 1: 394-400 (b).

Villar-Garea A, Esteller M. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer* 2004; 112: 171-8.

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

Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y et al Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 207-11.

W

Wang Q, Wang X, Hernandez A, Kim S, Evers BM. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to HT29 and Caco-2 intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* 2001; 120: 1381-92.

Wei Q, Miskimins WK, Miskimins R. The Sp1 family of transcription factors is involved in p27(Kip1)-mediated activation of myelin basic protein gene expression. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 4035-45.

Wheater PR, Zurbitt HG, Daniels VG. Editorial JIMS, Barcelona, 1987.

Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H, Pals ST. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 1999; 154: 515-23.

Williams SJ, McGuckin MA, Gotley DC, Eyre HJ, Sutherland GR, Antalis TM. Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. *Cancer Res* 1999; 59: 4083-9.

Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL, Matrisian LM. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:1402-7.

Wilson M, Koopman P. Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 441-6.

Wolgemuth DJ, Lele KM, Jobanputra V, Salazar G. The A-type cyclins and the meiotic cell cycle in mammalian male germ cells. *Int J Androl* 2004; 27: 192-9.

Wong NA, Pignatelli M. Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* 2002; 160: 389-401.

Woo MS, Sanchez I, Dynlacht BD. p130 and p107 use a conserved domain to inhibit cellular cyclin-dependent kinase activity. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 3566-79.

Wright NA. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 117-43.

Wu GD, Chen L, Forslund K, Traber PG. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha (HNF-1 alpha) and HNF-1 beta regulate transcription via two elements in an intestine-specific promoter. *J Biol Chem* 1994; 269: 17080-5.

Wu S, Cefinkaya C, Munoz-Alonso MJ, von der Lehr N, Bahram F, Beuger V, Eilers M, Leon J, Larsson LG. Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene* 2003 ; 22: 351-60.

X

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701-4.

Y

Yamamoto H, Bai YQ, Yuasa Y. Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300: 813-8.

Yamamoto M, Bharti A, Li Y, Kufe D. Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *J Biol Chem* 1997; 272: 12492-4.

Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, Zoghbi HY. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 2001; 294: 2155-8.

Yang W, Bancroft L, Nicholas C, Lozonchi I, Augenlicht LH. Targeted inactivation of p27kip1 is sufficient for large and small intestinal tumorigenesis in the mouse, which can be augmented by a Western-style high-risk diet. *Cancer Res* 2003; 63: 4990-6.

Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7416-9.

Z

Zahraoui A. [Tight junctions, a platform regulating cell proliferation and polarity] *Med Sci (Paris)* 2004; 20: 580-5.

Zhang H, Sun XF. Loss of p27 expression predicts poor prognosis in patients with Dukes' B stage or proximal colorectal cancer. *Int J Oncol* 2001; 19: 49-52.

Zhang H, Xiong Y, Beach D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* 1993; 4:897-906.

Zhang Y, Lin SC. Molecular characterization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 promoter. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1353: 307-17.

Zhao S, Venkatasubbarao K, Li S, Freeman JW. Requirement of a specific Sp1 site for histone deacetylase-mediated repression of transforming growth factor beta Type II receptor expression in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 2624-30.

Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, Babbin BA, Lamb NE, Yang VW. Identification of Kruppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene* 2004; 23: 395-402.

Zhu L, Harlow E, Dynlacht BD. p107 uses a p21CIP1-related domain to bind cyclin/cdk2 and regulate interactions with E2F. *Genes Dev* 1995; 9: 1740-52.

Zrihan-Licht S, Baruch A, Elroy-Stein O, Keydar I, Wreschner DH. Tyrosine phosphorylation of the MUC1 breast cancer membrane proteins. Cytokine receptor-like molecules. *FEBS Lett* 1994; 356: 130-6.

Zweibaum A, Triadou N, Kedinger M, Augeron C, Robine-Leon S, Pinto M, Rousset M, Haffen K. Sucrase-isomaltase: a marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon. *Int J Cancer* 1983; 32: 407-12.

Zwijsen RM, Buckle RS, Hijmans EM, Loomans CJ, Bernards R. Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. *Genes Dev* 1998; 12: 3488-98.

Zwijsen RM, Wientjens E, Klomp maker R, van der Smán J, Bernards R, Michalides RJ. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 1997; 88: 405-15.

