

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

**Zeb1, un gen implicat en la repressió transcripcional de l'E-cadherina durant la Transició Epiteli-Mesènquima.
Caracterització del mecanisme de regulació de la seva expressió.**

Memòria presentada per :

Sandra Guaita Esteruelas

per a optar al grau de doctor
pel departament de Ciències Experimentals i de la Salut,
Universitat Pompeu Fabra
Barcelona, 2005

Tesi doctoral realitzada en la Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular
del Institut Municipal d'Investigació Mèdica

Antonio García de Herreros,
Director de la tesi

Sandra Guaita Esteruelas,
Doctoranda

Dipòsit legal: B.45225-2005
ISBN: 84-689-4415-7

Al yayo.

A la meva petita família, l'Agus i la Taca.

A la meva GRAN família.

El que es important és no deixar de fer-se preguntes.

Albert Einstein.

AGRAÏMENTS

Molta gent diu que les experiències que pateixes durant tota la vida et marquen d'una manera o una altra. Jo penso que això és ben cert. De fet, fa uns 16 anys més o menys, jo no tenia cap mena d'idea del que volia ser quan fos "gran", però hi ha moments que marquen la teva vida i et fan prendre decisions, suposo que ha vegades acertades i a vegades no, però al cap i a la fi són decisions. Jo ara que he arribat fins aquí, sé que la decisió que vaig prendre va ser l'acertada. Ningú ha dit que aquest hagi de ser un camí fàcil, però si que ha estat un camí ple d'experiències positives que m'han fet créixer molt, sobretot com a persona. Per tot això i primer de res, vull agrair profundament al "**yayo**" el fet d'haver començat la meva aventura científica, ja que, si bé és cert que el fet de que ja no hi sigui ha estat molt dur, també és cert que si no fos per aquest motiu potser jo no estaria aquí. Així que "yayo" moltíssimes gràcies per estar sempre tan a prop encara que et trobes tan lluny, se del ben cert que sense el teu record no hagués arribat fins aquí.

Es evident que el fet de que siguis una persona, més o menys "amb cara i ulls" es sobretot degut a la teva família, per això si sóc com sóc, els hi dec a ells. Per això vull agrair a la **mama** i al **papa** el que em permetessin estudiar el que volia, que sempre hagin confiat en mi i que se'ls hi ompli la boca d'orgull quan parlen de la meva feina a la gent que coneixen, si bé us he de dir que no és tan difícil ni tant de ficció com us penseu. Moltíssimes gràcies també a la meva germana, la **Marta**, perquè a més d'una gran germana també és una gran amiga, ser que sempre puc contar amb tu i per a mi això és molt important. També vull agrair-li al meu cunyat, el **Josep**, el fet d'aguantar a la meva germana de tant en tant i el que m'hagi demostrat que sota d'una aparença de "tio xungo" hi ha un gran cor.

Gràcies a la resta de la meva família, a la **yaya** perquè és un exemple de força i alegria constant, en qualsevol moment, siguin aquests fàcils o difícils. Als **avis**, perquè sempre han estat molt contents del que faig i perquè han confiat molt en mi. A la **padrina** i el **tiet Enric**, perquè m'encanten com a parella, perquè són absolutament divertits i perquè gràcies a ells sempre hi ha moments per riure. El **Xavi** m'ha demostrat que la gent canvia, i que et pots tornar-te una de les persones més

treballadores que conec. A la **Núria** moltes gràcies pels mils de viatges a Barcelona, perquè ara que ja no vens les coses no són el mateix, sense tu és molt avorrit! A la **tieta Montse**, perquè ha estat com la meva germana gran i una gran amiga, perquè sempre té temps per dedicar-nos i perquè gràcies a ella puc desconnectar dels "agobius" cada cap de setmana. Gràcies al **padrí** i a la **Nuri**, perquè encara que no ens veiem massa sé que sempre estan aquí i sé que sempre puc contar amb ells i al **Xavier** perquè s'està fent tot un homenet i em sento molt orgullosa d'ell, a veure si et fas un gran professional del futbol i pots mantenir a tota la família!

També vull donar les gràcies a la meva altre família, la política. Gràcies per haver-me acceptat com una més i fer-me sentir com a casa meva. Gràcies als meus **sogres** pel seu interès cap a la meva feina i per ajudar-nos en qualsevol moment. Gràcies a l'**abueta** pel temps dedicat a fer-nos cosetes i pels massatges espontanis a l'esquena. Moltíssimes gràcies a les meves cunyades, **Chari** i **Lourdes**, perquè sou les meves amigues i pel viatge que vam fer a Holanda i pels molts que espero que fem! I Gràcies també al **Carles**, pel seu sentit del humor, per estar al meu costat quan hem de "discutir" d'algun tema amb l'Agustín i sobretot pels seus "bailoteos" quan estem de festa....

Està clar que la vida sense amics no té cap mena de sentit. Per això vull donar les gràcies a L'**Eva** i la **Blanca**, perquè durant tots aquests anys heu estat al meu costat. Gràcies perquè dissabte rere dissabte em sento més a prop de vosaltres i gràcies per haver confiat sempre en mi de manera incondicional. Gràcies al **Jose**, a l'**Ainhoa**, al **Fran** i al **Patricia**. A ells per aguantar de tant en tant a l'Agus, que això sempre s'agraeix, i a elles per la seva simpatia i per les festetes de que em gaudit. Gràcies perquè dia a dia m'heu fet sentir més part del vostre grup i perquè avui en dia ja sóc una més de vosaltres. Gràcies a la **Marta** i a la **Yolanda**, perquè encara que estem separades per centenar de quilometres sempre m'heu demostrat que puc contar amb vosaltres i que dins del vostre cor i tinc un lloc important. Quan vaig començar a estudiar biologia, vaig conèixer una colla de bandarres, als que els hi he d'agrair no tan sols l'haver acabat la carrera, sinó que a més aquella època fos un període de la meva vida inoblidable. **Lluís**, gràcies perquè des del primer dia vas ser un gran amic, sempre he

pogut contar amb tu i sempre has estat disposat a fer-me un llom amb patates i intentar enverinar-me. **Sus**, gràcies per aguantar al Lluiset, que tots sabem que això no déu haver estat feina fàcil, no?. **Dani**, a tu et vull agrair principalment els últims anys de la carrera, a on, mà a mà, vam sortir endavant. A més també et vull agrair que sempre m'hagis intentat entendre i m'hagis donat sempre un cop de mà. **Neus**, gràcies per haver salvat al Dani en un moment en que ho necessitava i per la teva gran simpatia. **Albert**, moltes gràcies per la teva ajuda en tot moment i per no haver-te oblidat mai, però mai del meu aniversari!!!!. **Aurora**, gràcies pels teus constants somriures, i per haver fet, si cap, a l'Albert una mica millor. **Natàlia**, gràcies per la teva simpatia esbojarrada, per sempre dedicar-me una carícia quan ens trobem. A la **Raquel**, gràcies per interessar-te sempre per com em va la vida i per sempre estar disposada a ajudar. A la **Txell**, gràcies per la seva alegria i per la seva gran tendresa. A la **Sònia**, gràcies per ser diferent i per aportar un aire fresc al grup. I a l'**Eva**, el **Roger**, la **Sandra** i el **Jaume** per totes les hores meravelloses que vam passar al bar de biologia.

També vull agrair a la gent de Reus el que em permetessin fer pràctiques a l'hospital, perquè vaig poder comprovar que sense diners també existeix la ciència, encara que és molt difícil no!!!! Gràcies al **Josep Maria** i al **Jordi** per permetrem entrar dins aquest món i per demostrar-me que per molt que passin els anys sempre estan aquí. Gràcies a les nenes, la **Natàlia** i la **Lydia**, per haver-me aguantat en els meus inicis i gràcies al **Toni** per haver-me ensenyat amb profunda paciència. Gràcies al **Jorge** per haver-me donat l'oportunitat de continuar amb ells. Gràcies també a la gent del **Clínic** que van "suportar" la meva presència durant un any, sobretot a la **Francisca Rivera** per haver-me permès formar part del seu grup.

I bé, ara solament quedeu els que heu fet possible que això arribes a la seva fi. Vull agrair profundament a l'**Antonio** que em donés l'oportunitat de treballar amb els seu grup, espero haver assolit les seves expectatives. Ell de llarg ha passat les meves. Gràcies per haver-me ensenyat tant a nivell científic, però sobretot, gràcies per haver-me ensenyat tant a nivell personal. Sé que serà molt difícil tornar a trobar un cap com tu.

Bé **Isa** a tu que t'he de dir... Des del primer dia que ens van trobar al despatx de l'Antonio amb cara d'espantades fins avui en dia han passat moltíssimes coses. Dia a dia he pogut comptar amb tu per qualsevol cosa. Has estat una gran companya de laboratori, amb tu la ciència m'ha semblat divertida i apassionant, però a més, has estat una gran amiga. A partir d'ara les nostres carreres científiques es separen, però espero que la nostra amistat no ho faci. Desitjo que tinguis molta sort, és més, sé que la tindràs. A la **Bàrbara** li vull donar especialment les gràcies perquè sempre està disposada a ajudar i vull deixar aquí escrit i perquè ho sàpiga tothom que : Bàrbara, t'estimo! I si que et fem cas!!!! A la **Cris**, gràcies per ser com ets, perquè quan et miro a tu em veig a mi, i t'he de dir, que ets genial! Segueix igual, perquè encara que siguem unes histèriques i unes paranoiques, del que estic segura és que també som fantàstiques! A l'**Ariadna** li vull donar especialment les gràcies perquè gràcies a ella se que un altre món és possible. Per demostrar-me que en pot ser de valenta una dóna, i per demostrar-me que podem lluitar contra el sistema!

Al **Jose** i al **Susana**, perquè m'han ensenyat que treballar de manera neta i ordenada és possible! Però sobretot gràcies pels bons moments que em passat junts, per ensenyar-me una manera diferent de veure la vida. A tu Jose, gràcies per demostrar-me tant de "carinyu" en tot moment. I a tu Susana per demostrar-me que la vida, si somrius, sempre és molt millor.

A la **Susana Aguilar**, gràcies per ser una gran amiga, per tots els moments que vam passar al laboratori i perquè encara que la distància entre Londres i Barcelona és molt gran sempre et sento molt a prop. Gràcies també per ajudar-me amb tot el tema del post-doc (moltes gràcies també a l'**Hector!!!**).

Clara Mayo, moltes gràcies per ser tan despistada i per tenir la capacitat per canviar de tema tan ràpid, gràcies a això hem rigut moltíssim al laboratori. I gràcies també per descobrir-me "diferents" maneres de controlar la natalitat!. Al **Fran** i al **Miki**, gràcies per haver fet tantes coses esbojarrades i tantes tonteries solament perquè les nenes estiguéssim contentes i se'ns fes el dia més agradable. A la **Maria José**, mil gràcies per tot el temps que vam passar juntes al laboratori, fent experiments colze amb colze. Gràcies per la teva tendresa i perquè sempre tenies una paraula d'ànims en els mals moments.

Al **Jepi**, moltíssimes gràcies per haver estat el meu mentor en els començaments, gràcies per la teva paciència i per haver-me ensenyat que 300 pous en paral·lel es poden transfectar. Al **David**, gràcies per ensenyar-me que l'home sense dinar pot sobreviure, però sobretot, gràcies per aquelles converses que teníem al laboratori, perquè encara no he trobat a ningú que estigués al teu nivell. Al club súper3 (**Sandra, Anna i Natàlia**) li vull donar les gràcies perquè m'han fet veure que es pot arribar amb dignitat, o no, a la trentena. Gràcies pels bons moments d'aquests últims mesos. També vull anomenar a la "canalla". Moltes gràcies a la **Montse** per preocupar-se sempre per com estic, i per les demostracions d'afecte constants. A la **Maria** gràcies per tots els moments divertits que ens ha fet passar i sobretot per donar una mica d'emoció a la vida del laboratori! A la **Judit G** i la **Sonia**, moltes gràcies primerament per fer la proteïna de fusió, que jo millor que ningú comprenc que és un rotllo. A la Judit, gràcies per haver-me demostrat que treballar en un laboratori i ser una "fashion girl" és possible. A la Sonia, gràcies pels massatges a l'esquena en els moments que més ho necessitava i per haver estat en tan sols uns mesos una més del grup.

A la **Clara Francí**, gràcies pels moments fantàstics de "despiste" de les reunions de grup, gràcies a tu hem passat uns dels millors moments al lab. A la **Belen** i al **Manolo**, gràcies per haver-se incorporat al grup, perquè això farà factible que la nostra feina continuï endavant. Als nens (**Maurici, Ramon, Andrea, Oriol i Manel**) gràcies pels bons moments, per les converses a cultius i per haver sobreviscut en aquest laboratori ple de dones! Gràcies a la **Montse García** perquè a part de ser una secretaria excepcional, sempre es pot comptar amb ella per a qualsevol cosa. I al **Marc**, gràcies per la teva arribada, perquè aquests últims mesos sense tu no se que hagués fet! A la **Laia**, la **Coral**, l'**Ester**, el **Dani**, l'**Elena L**, l'**Elena O**, la **Melissa**, l'**Ibane**, la **Raquel**, la **Sandra**, la **Judit**, la **Jessica** i la **Laura**, gràcies perquè tots vosaltres sempre m'heu dedicat moments molt especials, sempre heu tingut una paraula de suport o sempre heu fet comentaris per fer-me somriure, per tot això moltes gràcies.

Al **Paco**, el **Gabriel**, la **Carme**, el **Xavi**, la **Pilar**, l'**Anoushka** i el **Roque**, gràcies perquè al seminaris sempre heu tingut comentaris constructius i perquè gràcies a vosaltres ens han sorgit preguntes molt interessants. Als

del costat de la Pompeu (**Txell, Annie, Luisa, Verónica...**) gràcies perquè encara que esteu una mica a lluny, sempre es pot comptar amb vosaltres per qualsevol cosa. I a tots aquells que ja no hi sou, però que vau marcar d'alguna manera la meva estada a l'IMIM (**Mercè Monfart, Edu, Elena, Arrate, Mercè Martin, Fausto, Santi, Maria del Mont...**) i molta altre gent que de ben segur que em deixo, però que no ho he fet amb cap mala intenció.

I finalment, però no per això menys important, la meva petita família, la persona que dia a dia m'ha estat acompanyant durant tots aquests anys, l'**Agus**, i la gosseta que encara que no entén res de ciència em mira amb una devoció absoluta, la **Taca**. Gràcies als dos per fer que la meva vida sigui plenament feliç. Agus, a tu un milió de gràcies perquè sempre, però absolutament sempre, has estat al meu costat, per sempre creure en el que faig, per creure't els meus resultats abans de que me'ls cregui jo, per explicar en les entrevistes de feina, la meva feina en lloc de la teva i en definitiva, pel teu suport incondicional, gràcies.

ABREVIATURES

AREB6: Atp1a1 Regulatory Element Binding factor 6.

bHLH: basic Helix-Loop-Helix.

Caixes E: Ephrussi box-like motif.

CtBP: C-terminal Binding Protein.

cDNA: DNA codificant.

DNA: Àcid Desoxirribonucleic.

EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay.

ERK : Extracellular-Regulated Kinase.

GSK-3 β : Glycogen Synthase Kinase-3 β .

ILK: Integrin-Linked Kinase.

IP: Immunoprecipitació.

LEF-1: Lymphoid Enhancer binding Factor 1.

LY294002: 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one hydrochloride.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase.

MEK: Mitogen activated protein kinase kinase.

mRNA: RNA missatger.

MUC-1: Mucin 1.

NF κ B: Nuclear Factor Kappa B.

PD98509: 2-amino-3-methoxyflavone.

PI3K: Phosphoinositide-3 Kinase.

PK-C α : Protein Kinase C α .

RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends.

RNA: Àcid Ribonucleic.

RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction.

SB203580: 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridil)1H-imidazole.

SIP1 : Smad Interacting Protein 1.

TEM: Transició Epiteli-Mesènquima.

TME: Transició Mesènquima-Epiteli.

WB: Western Blot.

Zfh-1: Zinc-finger homeodomain-1.

ÍNDIX
INTRODUCCIÓ

| | |
|--|----|
| 1. La transició Epiteli-Mesènquima (TEM). | 1 |
| 1.1 Vies de senyalització implicades en TEM. | 1 |
| 1.2 E-cadherina i Transició Epiteli-Mesènquima. Gastrulació i Càncer. | 2 |
| 1.3 Alteració de l'E-cadherina en processos tumorals. | 5 |
| 1.4 Gens implicats en la repressió de l'E-cadherina. | 6 |
| 2. El repressor transcripcional Snail. | 8 |
| 2.1 Estructura de la proteïna. | 8 |
| 2.2 Snail i regulació a la baixa de l'E-cadherina. | 10 |
| 3. Factors transcripcionals de la família <i>zfh</i> : Zeb1 i Zeb2. | 12 |
| 3.1 Estructura de la proteïna. | 13 |
| 3.2 Mecanisme de regulació transcripcional per <i>Zfh</i> . | 15 |
| 3.3 Expressió i processos en els que es troben implicats els factors de transcripció de la família de <i>zfh</i> . | 16 |

| | |
|-------------------|----|
| OBJECTIUS. | 18 |
|-------------------|----|

CAPÍTOL I: Mecanisme de repressió transcripcional per Snail.

| | |
|--|----|
| ▪ Antecedents. | 19 |
| ▪ Els clons estables per Snail de les cèl·lules MDCK i HT-29 M6 pateixen un canvi de fenotip d'epitelial a fibroblastoide. | 19 |
| ▪ Els clons que expressen Snail pateixen una regulació a la baixa de l'E-cadherina i varis gens epitelials. | 21 |

- El mutant de Snail 1-138, que no té domini d'unió al DNA, és capaç de reprimir el promotor de l'E-cadherina. 26
- Snail reprimeix el gen de l'E-cadherina de manera dependent d'Histones deacetilases (HDAC) i el de VDR de manera independent d'HDAC. 27
- Snail reprimeix la transcripció de l'E-cadherina de manera parcialment dependent de CtBP. 29
- CtBP no està implicat en la repressió transcripcional de MUC1 que es dona per Snail, però sí en la del promotor de VDR. 32
- CtIP potencia l'efecte repressor de Snail sobre el promotor d'E-cadherina. 35
- CtIP potencia l'efecte repressor de Snail sobre el promotor VDR. 36
- CtIP interacciona amb la sonda de l'E-cadherina solament en presència de Snail. 37
- CtIP estabilitza la proteïna Snail. 38
- Snail i Zeb1 reprimeixen el promotor d'E-cadherina de manera additiva. 39
- CtBP contribueix en part a la repressió transcripcional de l'E-cadherina que es dona per part de Zeb1, però no en la repressió transcripcional del promotor de MUC1. 42
- Snail i Zeb1 no interaccionen *in vivo*. 43

CAPTÍTOL II: Regulació de l'expressió de Zeb1 en la TEM.

- Snail i Zeb1 es coexpressen en línies cel·lulars tumorals. 45
- Snail promou la inducció de Zeb1 en els transfectants de Snail. 45

| | |
|--|----|
| ▪ Els clons transfectants per Snail indueixen també la proteïna de Zeb1. | 47 |
| ▪ Caracterització del promotor de Zeb1. L'inici de transcripció de Zeb1 es troba a 19 pb d'ATG (inici de traducció). | 48 |
| ▪ Els promotors de Zeb1 tenen més activitat en les cèl·lules mesenquimals que en les cèl·lules epitelials. | 49 |
| ▪ El promotor mínim de Zeb1 es sensible a les senyals que indueixen Zeb1 en cèl·lules epitelials. | 52 |
| ▪ La inducció del promotor de Zeb1 és sensible a PD98059, un inhibidor de MEK1/2. | 55 |
| ▪ VP-16 TCF-4 indueix el promotor (-1010/+26) de Zeb1 però no el (-150/+26). | 57 |
| ▪ L'expressió ectòpica d'E-cadherina disminueix els nivells de mRNA de Zeb1. | 58 |
| ▪ VP-16 REL activa el promotor (-1010/+26) i també el mRNA de Zeb1. | 59 |
| ▪ Snail i Twist activen la transcripció de Zeb1 de manera sinèrgica. | 60 |
| DISCUSSIÓ | 65 |
| CONCLUSIONS | 77 |
| MATERIALS I MÈTODES | 78 |
| BIBLIOGRAFIA | 87 |

INTRODUCCIÓ

1.La transició Epiteli-Mesènquima (TEM).

La Transició Epiteli-Mesènquima (TEM) és un procés en el qual les capes de cèl·lules epitelials perden la seva polaritat, els contactes cèl·lula a cèl·lula i pateixen un remodelament dramàtic del citoesquelet. (Thiery JP 2002). Juntament amb la pèrdua d'adhesió de les cèl·lules epitelials i dels components del citoesquelet, les cèl·lules que pateixen una TEM comencen a expressar components mesenquimals i manifesten un fenotip migratori. La TEM s'ha vist com un pas clau en l'embriogènesi del metazous i també en la reparació del teixit adult (Thiery JP 2002). Recentment s'ha proposat que la TEM podria estar també implicada en càncer (revisat en Thiery JP 2002) (fig.1.1).

Els carcinomes que mostren diversitat de fenotips i potencial maligne, perden moltes dels seves característiques epitelials durant la progressió (Thiery JP 2002). S'ha vist que l'epiteli normal alineat amb la membrana basal pot proliferar localment donant lloc a un adenoma. Posteriorment, altres transformacions per canvis epigenètics o alteracions genètiques donaran lloc al carcinoma *in situ*, encara perfilat per la membrana basal intacte. Noves alteracions poden induir disseminació local de les cèl·lules del carcinoma, possibilitada per la TEM i llavors la membrana basal comença a ser fragmentada. Les cèl·lules poden envair dins de vasos limfàtics o sanguinis, seguit d'un transport passiu a òrgans distant. En llocs secundaris, les cèl·lules de carcinoma solitàries poden extravasar i es pot produir llavors una transició mesènquima epiteli (Thiery JP 2002).

1.1 Vies de senyalització implicades en TEM.

Els models cel·lulars la TEM necessiten de senyals externes, ja sigui factors de creixements, citoquines o bé senyals de la matriu extracel·lular, que acostumen a arribar mitjançant dels seus receptors. Són molts els factors de creixement que s'han vist implicats en TEM (FGFs o EGF) de totes maneres, i un tret en comú, és que tots ells transdueixen la senyal a partir de receptor tyrosina Kinasa (TKR) i la posterior activació de la via de Ras-MAPK (Rommel and Hafen 1998). Aquesta inducció pot ser augmentada si s'activen varies vies alhora, aquest és el cas de TGF- β i Ras (Janda et al 2002). Totes aquestes transduccions de senyal acaben confluint en

l'activació d'ERK2 i la senyalització via PI3K/AKT (Grande et al 2002; Krasilnikov 2000).

A més de les senyals que provenen de factors de creixement, la cèl·lula també pot rebre senyals de l'exterior mitjançant la matriu extracel·lular. Una de les proteïnes més importants implicades en aquesta comunicació entre la matriu i la cèl·lula és la ILK (Integrin-Linked Kinase). Aquesta kinasa transmet la seva senyal a nucli activant AKT (Tan et al 2001) o per TKR (Porter and Villancourt 1998).

Moltes d'aquestes vies conflueixen en l'activació de factors de transcripció que són realment molt importants en la TEM que es produeix durant el desenvolupament, tal és el cas de Dorsal/NFKB. (Ozes et al 1999). Dorsal, a la seva vegada, és l'encarregat de l'activació en l'embrió de *Drosophila* de Twist i Snail, dos gens claus de la TEM que es produeix en la gastrulació (Leptin M 1999). El paper d'aquests factors es comentarà en detall més endavant.

1.2 E-cadherina i Transició Epiteli-Mesènquima. Gastrulació i Càncer.

Els teixits epitelials es caracteritzen per propietats estructurals úniques, les més importants de les quals són l'associació estreta de les cèl·lules individuals mitjançant varis tipus d'unions i la distribució polaritzada dels components del citoplasma i de la superfície cel·lular (Behrens et al 1991). Les principals conseqüències funcionals són que les cèl·lules epitelials són freqüentment menys mòbils que les d'origen mesenquimal i formen barreres de permeabilitat selectiva (Rodríguez-Boulan et al 1989). En la cèl·lula epitelial una de les principals proteïnes implicades en aquestes unions cèl·lula a cèl·lula és L'E-cadherina, proteïna transmembrana implicada en la formació de les unions adherents. (fig. I.1).

La pèrdua de l'expressió de l'E-cadherina és essencial per a la Transició Epiteli-Mesènquima (TEM), per això es considera l'E-cadherina un dels gens implicats en el manteniment del fenotip epitelial (fig. RI.2). La pèrdua d'E-cadherina durant la TEM s'ha vist en la formació de l'endoderm parietal (Damjanov et al 1986; Veltmaat et al 2000) i en la gastrulació de *Drosophila*, pollastre i ratolí (Tepass et al 1996; Edelman et al 1983; Burdsal et al 1993). A més, *in vitro*, hi ha correlació entre la pèrdua de la

producció de l'E-cadherina i la pèrdua del fenotip epitelial (Behrens et al 1989).

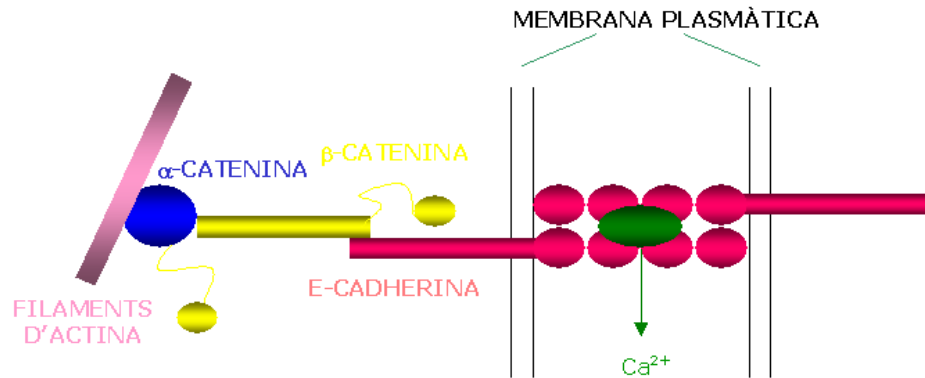


Figura 1.1: Composició de les Unions Adherents. L'E-cadherina forma interaccions homotípiques amb una altre molècula de la cèl·lula veïna; aquestes interaccions no es produeixen entre monòmers, sinó entre dímers de l'E-cadherina i són estrictament dependents de Calci. A més, perquè aquesta proteïna sigui funcional és necessari que la seva cua intracel·lular s'associï amb el citoesquelet d'actina, associació que ve mitjançada per les catenines α i β (Kemler et al 1993). La β -catenina s'associa amb aquestes dues proteïnes i permeten així la connexió de l'E-cadherina amb el citoesquelet.

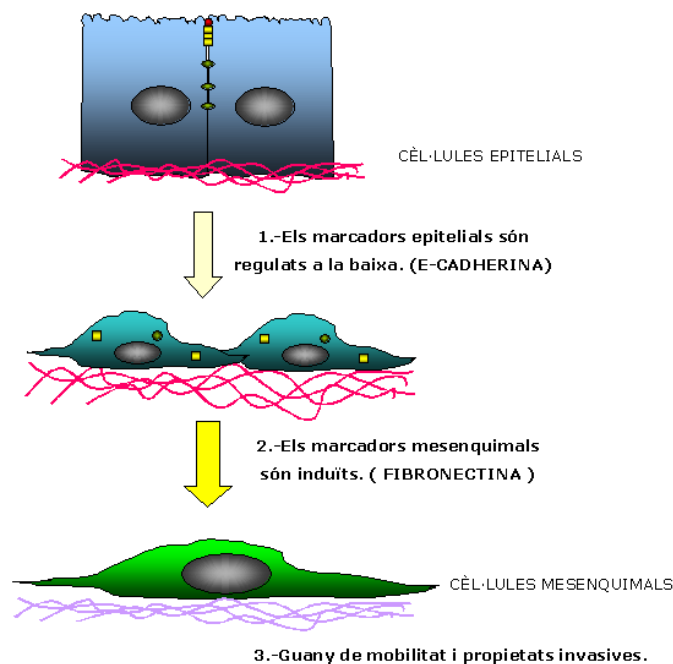


Figura 1.2: Transició Epiteli-Mesènquima (TEM). En la TEM la regulació a la baixa de l'E-cadherina, ve acompanyada per la pèrdua de característiques epitelials i l'adquisició de propietats mesènquimals. Un cop la cèl·lula està separada de les seves veïnes, ja podrà migrar i envair. (Adaptat de Thiery JP 2002).

La pèrdua de característiques epitelials dels tumors s'assembla a la que succeeix en certs processos embrionaris, en els quals les cèl·lules epitelials adopten característiques mesenquimals (transició epiteli-mesènquima o TEM). Aquestes TEM també es poden donar quan un tumor epitelial adopta característiques invasives (últimes etapes del tumor) i conjuntament amb això es produeix una baixada de l'E-cadherina i adquisició de capacitat migratòria (fig. 1.3).

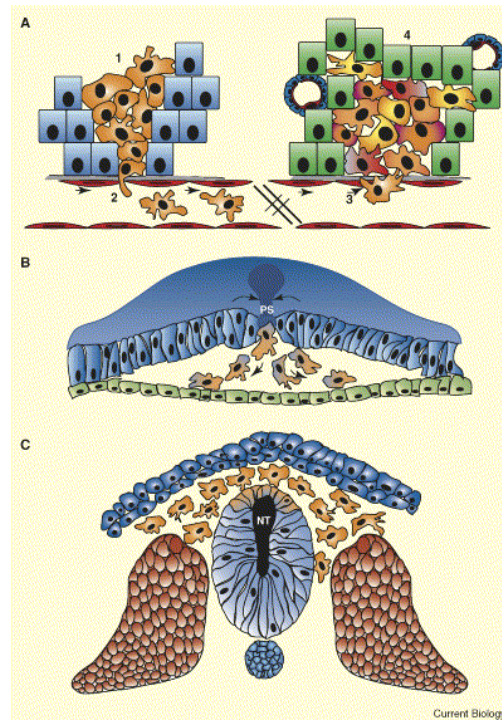


Figura 1.3: Transició epiteli-mesènquima és un pas crucial tan en la progressió tumoral com en el desenvolupament normal. (a) Els quatre passos principals de la metàstasi. Es necessita que les cèl·lules pateixin una TEM com a primer pas per la metàstasi, la invasió (1). Les cèl·lules del tumor invasiu poden entrar dins de la circulació sistèmica (2) abans d'extravasar (3) i establir tumors secundaris en un nou ambient hoste (4). (B) Una secció transversal a través del embrió gastrulant de pollet. Durant la gastrulació, les cèl·lules de l'epiblast (cèl·lules blaves) pateixen una TEM i migren cap a i per la lamina primitiva (PS). (C) Una secció transversal a través de l'estadi de nèurula d'un embrió de vertebrat. Seguint el tancament del tub neural (NT), les cèl·lules de la cresta neural multipotents pateixen TEM, delaminen de l'aspecte dorsal del tub neural i migren extensivament per l'embrió abans de donar lloc a diversos grups de derivats que inclueixen la majoria del sistema nerviós perifèric, melanòcits i la majoria de l'esquelet cranio-facial (Vernon et al 2004).

En molts casos, la regulació a la baixa de l'E-cadherina durant la progressió a carcinoma succeeix per canvis epigenètics, com per exemple,

repressió transcripcional i hipermetilació del promotor (encara que aquest és un procés secundari) . Solament algunes vegades, el gen de l'E-cadherina es troba mutat, portant això a l'absència o l'expressió d'una proteïna no funcional. (Berx et al 1995; Risinger et al 1994; Yoshiura et al 1995; Hennig et al 1995; Hennig et al 1996; Hajra et al 1999; Rodrigo et al 1999 i Tamura et al 2000).

1.3 Alteració de l'E-cadherina en processos tumorals.

Durant els processos de progressió dels tumors epitelials, s'observa una disminució de l'E-cadherina que es dona en paral·lel amb la pèrdua de característiques epitelials per les cèl·lules tumorals (Behrens et al 1989, Freixen et al 1991 i Schipper et al 1991). Aquesta regulació a la baixa de l'E-cadherina succeeix a nivell transcripcional (Schipper et al 1991 i Dorudi et al 1993), veient-se una disminució del seu nivell de mRNA (Brabant et al 1993). S'ha determinat que la pèrdua de E-cadherina es un bon marcador de invasivitat (Perl et al 1998). A la inversa, la transfecció del cDNA de l'E-cadherina preveu la capacitat de envair de línies cel·lulars tumorals desdiferenciades (Frixen et al 1991). Per totes aquestes dades es considera l'E-cadherina com el major determinant per l'establiment i manteniment del fenotip epitelial normal i podria actuar com un supressor de la invasió en carcinomes (Behrens et al 1991).

Per tal de descobrir quins podien ser els possibles mecanismes transcripcionals que regulaven l'expressió de l'E-cadherina, alguns grups van clonar el seu promotor, tant l'humà (Bussemakers et al 1994), com el de ratolí (Behrens et al 1991, Ringwald et al 1991). Un fragment d'aquest promotor 250 pb, presenta la mateixa especificitat de expressió que el gen sencer. En aquest promotor proximal s'han pogut identificar tres seqüències anomenades "E-boxes", amb la seqüència 5'-CACCTG (directa o reversa). S'ha proposat que un repressor, present en línies tumorals metastàsiques i en fibroblasts (Henning et al 1996), però no en cèl·lules epitelials, s'uniria específicament a aquestes seqüències; així quan aquestes estan mutades s'observa un increment en l'activitat transcripcional mitjançada per aquest promotor en cèl·lules que normalment no expressen E-cadherina (Henning et al 1996). Per aquesta raó, s'ha determinat que

aquestes caixes estan involucrades en el silenciament de l'expressió de l'E-cadherina en línies tumorals metastàsiques i en fibroblasts.

1.4 Gens implicats en la repressió de l'E-cadherina durant el desenvolupament embrionari.

La gastrulació s'ha de considerar com la suma de processos que porten a l'establiment inicial de les capes embrionàries. (Leptin, 1999). Durant la gastrulació s'ha observat que les cèl·lules poden migrar i que molecularment pateixen una disminució en els nivells d'E-cadherina (Danjanov et al 1986). I en el cas concret de les cèl·lules que formaran el mesoderm, es veu una clara transició epiteli-mesènquima.

L'expressió de certs gens durant el procés de gastrulació està estretament regulat. El sistema maternal del patró de l'embrió resulta en diferències regionals en l'expressió de factors de transcripció. Al llarg de l'eix Dorso-Ventral (D-V), la proteïna materna Dorsal està distribuïda en un gradient en el nucli del blastoderm i assoleix el seu punt més alt en els nuclis més ventrals. Dorsal activa l'expressió de dos factors de transcripció, Twist i Snail, en el lloc de les cèl·lules ventrals que inclouen el primordi del mesoderm. (Leptin, 1999).

Snail en gastrulació sembla que delimita el que és mesoderm de la resta de fulles embrionàries. S'ha vist que els mutants per Snail no modulen a la baixa l'E-cadherina en les cèl·lules que han de migrar (Oda et al 1998).

S'ha vist que Snail és una proteïna important per:

- 1) Invaginació de les cèl·lules de l'embrió en *Drosophila* (Ip et al 1994) .
- 2) Especificació del disc imaginal i neurogènesis en *Drosophila* (Ip et al 1994, Fuse et al 1996) .
- 3) En vertebrats, formació de la cresta neural i de les cèl·lules premigratòries i migratòries de la cresta (Nieto et al 1992, Seffon et al 1998).

Un altre membre d'aquesta família implicat en processos de TEM en vertebrats és Slug (Nieto et al 1994). Encara que tan Snail com Slug són produïdes en totes les espècies de vertebrats, el Snail de ratolí ha adquirit les funcions del Slug d'amfibis i aus (Linker et al 2000; Manzanares et al

2001), així Slug és produït en la gàstrula de pollet i en la cresta neural de *Xenopus* i pollet, mentre que Snail és produït en la làmina primitiva de ratolí i en els progenitors de la cresta neural (Cano et al 2000). Experiments utilitzant tan mutants l'antisense com dominants negatius han mostrat que Slug és necessari per la TEM que porta a la formació del mesoderm en pollet (Carl et al 1999, LaBonne et al 2000, Nieto MA 2001). Slug sembla tenir un paper dual en l'ontogènia de la cresta neural, contribuint tan a la seva inducció com a la TEM. Slug podria regular a la baixa l'E-cadherina en la gàstrula de pollet i Snail ho faria en la de ratolí. La inactivació de Snail en els embrions de ratolí resulta en una parada del desenvolupament a l'estadi de gàstrula (Carver et al 2001). Algunes cèl·lules del mesoderm del ratolí són formades, però aquestes cèl·lules romanen en "clusters" de cèl·lules productores d'E-cadherina, en contrast en els embrions de ratolins "wild-type" (wt) o dels heterozigots, les cèl·lules que formaran el mesoderm són negatives per l'E-cadherina.

Twist és una proteïna HLH que actua com a activador transcripcional de gens de mesoderm. En els mutants per Twist varis marcadors de diferenciació de mesoderm no s'expressen (Leptin 1991). Pel contrari, la principal funció de Snail és la repressió de gens en el mesoderm que estan destinats a ser actius i estar restringits en l'ectoderm, com per exemple E-cadherina. En els embrions mutants per Snail els dominis d'expressió d'aquests gens envaeixen la regió del mesoderm (Kosman et al 1991; Leptin, 1991). L'absència d'algun d'aquest gens en l'embrió, resulta en defectes greus de gastrulació, que es poden detectar en els primer estadis de canvis de forma cel·lular. (Leptin et al 1990; Sweeton et al 1991).

Però la formació del solc ventral és solament el primer pas en la gastrulació. El mesoderm invaginat ha de patir llavors una TEM, les cèl·lules es divideixen i migren fora de l'ectoderm subjacent. El primer pas, la TEM, no és molt coneguda, però podria haver-hi un canvi entre l'E-cadherina i la N-cadherina (Oda et al 1998). L'E-cadherina és suplementada maternament i la seva expressió és també activada en l'embrió tan aviat com comença la transcripció zigòtica. (Oda et al 1994). De qualsevol manera, l'E-cadherina és reprimida en el mesoderm per Snail i de manera simultània, Twist activa l'expressió de la N-cadherina. El fet de que el canvi entre E-cadherina i N-

cadherina sigui regulat per Snail i Twist suggereix que això podria ser important per la morfogènesi del mesoderm (Leptin 1999).

En *Drosophila* s'ha vist que Twist i Snail augmenten l'expressió de Zfh-1 (Zinc finger homeodomain 1 protein). Un gen implicat en el desenvolupament de mesoderm i sistema nerviós (Lai et al 1991,1993). Es pensa que una vegada l'expressió de Snail disminueix en l'embrió, la proteïna encarregada del manteniment de l'E-cadherina baixa és zfh-1 (Lai et al 1993).

Hi ha altres proteïnes que es pensen tenen un paper clau en la repressió transcripcional de l'E-cadherina. Es va descriure una proteïna anomenada CtBP caracteritzada inicialment per unir la regió C-terminal de la proteïna E1A d'adenovirus. Al 1998 Nibu et al i Poortinga et al van descriure que dCtBP funcionava com un co-repressors transcripcional durant el desenvolupament de *Drosophila*. En *Drosophila* els repressors transcripcionals han estat agrupats en dos tipus segons el seu mecanisme de repressió: repressors de curt rang (treballen en distàncies inferiors a 100 pb) i repressors de llarg rang (funcionen en distàncies per sobre de 1000 pb). Els repressors de curt rang (per exemple Snail) poden realitzar el seu efecte antagonitzant l'activitat del complex activador-coactivador o inhibint l'activitat del complex transcripcional al "core " del promotor. Es va identificar per estudis d'interacció que el dCtBP s'unia a Snail (Nibu et al 1998; Poortinga et al 1998). Els embrions que han perdut dCtBP, la repressió de gens diana endògens del repressor Snail es perdia, suggerint que dCtBP juga un paper directe en l'activitat repressora d'aquest factor de transcripció (Nibu et al 1998; Poortinga et al 1998). A més, altres putatius repressors de l'E-cadherina com zfh-1 també poden interaccionar amb dCtBP i podria realitzar el seu efecte repressor de manera parcial o total dependent de CtBP (Postigo et al 2000).

2. El repressor transcripcional Snail.

2.1 Estructura de la proteïna.

Snail forma part d'una família de factors de transcripció que es comporten com a repressors transcripcionals. Entre els membres de la família es poden destacar Snail, Slug, Escargot, entre d'altres. Snail és un

factor de transcripció que va ser caracteritzat en *Drosophila* per estar implicat en gastrulació. Té una estructura molt característica (fig. 1.4).

La proteïna té dues regions ben definides: el domini d'unió al DNA a C-terminal (aminoàcids 152-264) i el domini regulador de N-terminal (aminoàcids 1-151). La part C-terminal de la proteïna conté quatre dits de zenc de la subclasse C2H2 (Domínguez et al 2003). Aquest domini és conservat en altres homòlegs de la família tan en vertebrats com en invertebrats (Manzanares et al 2001; Nieto MA 2002) i tenen alta afinitat per els oligonucleòtids que contenen la seqüència 5'-CACCTG (Mauhin et al 1993). S'ha de notar que l'últim dit de zenc de la proteïna Snail no conté el consens CXXC_H Φ R/QS/TH, la qual està present en els altres tres dits de zenc, i que les dues histidines estan separades per tan sols una lisina. El domini N-terminal difereix molt més entre els varis homòlegs de la família Snail. En mamífers, una seqüència petita en l'amino-terminal, anomenada caixa SNAG, és essencial per a la repressió (Batlle et al 2000). L'alineament de les seqüències de Snail corresponents a la part N-terminal dels homòlegs coneguts, mostra que, excloent la caixa SNAG, la regió més conservada correspon al subdomini localitzat entre els residus 82-151 en la seqüència del Snail de ratolí. Aquest subdomini conté una seqüència d'export nuclear (NES). La fosforilació d'una seqüència rica en serines adjacents fa aquesta NES accessible al transportador CRM1 i facilitava la translocació de la proteïna del nucli. Conseqüentment, la fosforilació de Snail disminueix la seva activitat repressora de l'E-cadherina (Domínguez et al 2003).

Dins de la regió rica en serines, recentment han estat descrits dos sub-dominis: un motiu d'export nuclear i un segon motiu de destrucció, ambdós dominis són fosforilats per GSK-3 β . La fosforilació del primer motiu es dona a dins de nucli i fa que la proteïna es mogui cap a citoplasma, i el segon motiu és fosforilat un cop està Snail a fora i marca la proteïna per a la destrucció per al proteasoma (Zhou et al 2004).

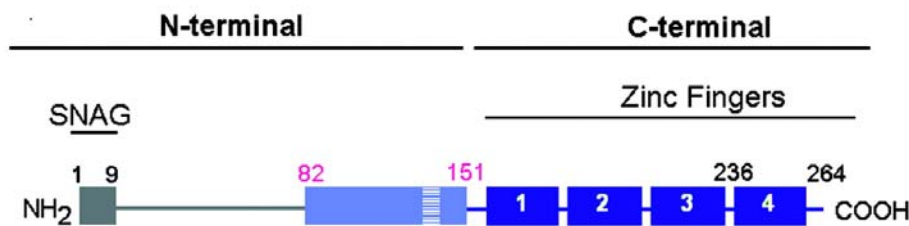


Figura 1.4: Estructura de la proteïna Snail. Es divideix bàsicament en dos dominis. L' amino terminal on hi trobem el domini SNAG, que és un domini repressor. I el carboxi terminal, on s'hi pot veure una estructura específica anomenada Dits de Zinc. Aquests serveixen a la proteïna per anellar-se al DNA, reconeixent una seqüència específica 5'-CACCTG-3' (Maohin et al 1993, Nakayana et al 1998). A més, recentment, s'ha descrit un subdomini ric en serines en la meitat amino terminal de la proteïna. L'estat de fosforilació d'aquest domini controla l'activitat de Snail d'acord amb la seva localització subcel·lular (dins o fora del nucli) (Domínguez et al 2003).

La major part dels membres de la família actuen com a repressors transcripcionals (Gray et al 1996, Nakayana et al 1998). Una de les característiques importants i un tret diferencial entre la proteïna de *Drosophila* i la de vertebrats, és que dmSnail interacciona amb una proteïna anomenada CtBP per un motiu Pro-X-Asp-Leu-Ser-X-Lys/Arg que es troba en el domini N-terminal de Snail. Aquest domini d'unió de Snail a CtBP s'ha perdut en els vertebrats.

2.2 Snail i regulació a la baixa de l'E-cadherina.

Com s'ha vist anteriorment, Snail és un factor de transcripció que funciona com un repressor transcripcional, està implicat en transició epiteli-mesènquima des d'invertebrats fins a vertebrats. S'ha demostrat que la seva funció la realitza mitjançant la seva unió a unes seqüències que es troben en alguns promotors, les Caixes E (E-Box). Com s'ha dit, Snail s'uneix a unes caixes molt característiques que són les E2 Box, les quals tenen una seqüència 5'-CACCTG-3', de forma directa o inversa.

L'any 2000 el nostre grup va demostrar que Snail regula la expressió de l'E-cadherina a la baixa. Les cèl·lules que estaven transfectades de manera estable amb Snail experimentaven una transició de fenotip epitelial a fibroblastoide (TEM). Es va demostrar que el factor de transcripció Snail,

expressat en fibroblasts o algunes cèl·lules tumorals epitelials, reprimeix l'expressió del promotor proximal de l'E-cadherina i s'uneix directament a las caixes E2 que hi ha en el promotor d'E-cadherina proximal (-178/+92) (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). En cultius cel·lulars hi havia una clara inversió de l'expressió de l'E-cadherina vs Snail, és a dir, aquelles cèl·lules que tenien E-cadherina no tenien Snail i al revés (això es produïa en la majoria dels casos, però hi ha algunes excepcions) Aquesta relació inversa també es veia en els clons estables per Snail de les cèl·lules MDCK i HT-29 M6 (fig. 1.5). Altres grups com Cano et al 2000 i altres, van obtenir els mateixos resultats ens altres línies tumorals.

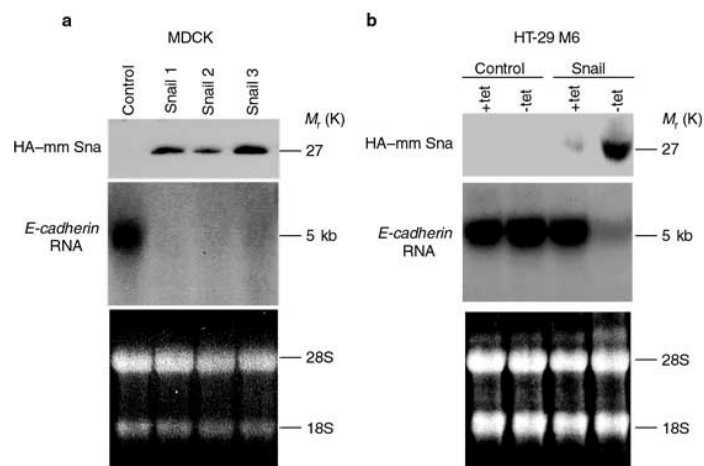


Figura 1.5: L'expressió exògena de mmSnail regula a la baixa els nivells de mRNA de l'E-cadherina. a, les MDCK eren transfectades amb el pcDNA3 que contenia el cDNA de mmSnail marcat amb un epítot d'haemaglutinina (HA) (Sna 1, 2, 3) o amb el plàsmid buit (Control). Es van aïllar clons individuals després de la selecció i es va analitzar d'expressió del tag HA per western blot (panell superior). Els nivells de mRNA de l'E-cadherina en aquests clons va ser determinada per northern blot (panell del mig). b, l'expressió del mmSnail induïble en les HT-29 M6 transfectades per Snail va ser aconseguïda utilitzant el sistema de repressió de la tetraciclina retirant la tetraciclina del medi de cultiu. L'anàlisi de northern blot dels nivells d'expressió dels mRNA de l'E-cadherina (panell del mig) correlacionaven inversament amb la inducció de l'expressió de mmSnail-HA (panell superior). La visualització del RNA ribosomal 18S i 28S era utilitzat com a control de càrrega pels northern blots (panells inferiors en a i b). (Batlle et al 2000.)

3. Factors transcripcionals de la família *zfh*: Zeb1 i Zeb2.

Les proteïnes Zeb són membres d'una gran família de proteïnes de dits de Zenc conegudes com a *zfh*, les quals van ser identificades per primera vegada en *Drosophila* (Fortini et al 1991; Lai et al 1991). Els gens codificants de les proteïnes de Zeb1/ δ EF1 i Zeb2/SIP1 (Zfhx1a i Zfhx1b, respectivament) semblen haver evolucionat des d'un sol gen de *Drosophila* anomenat *zfh-1* (Fortini et al 1991; Lai et al 1991, Postigo et al 1999). Postigo et al 2000, van descriure els dos tipus diferents de la proteïna en humans: Zeb1 i Zeb2 (fig. 1.6). Zeb1 i Zeb2 reconeixen les mateixes seqüències diana, tot i que s'ha vist que regulen alguns gens diferents. El tret més diferencial de Zeb2 respecte la resta de membres de la família és la seva capacitat per unir-se a les proteïnes Smad, implicades en la via del TGF- β (Verschueren et al 1999). Recentment però, Postigo et al 2003 ha demostrat que tan Zeb1 com Zeb2 tenen capacitat per unir-se a les proteïnes Smad. De totes maneres, les funcions de les dues proteïnes en aquestes condicions, són totalment oposades. Mentre que Zeb1 podria facilitar l'activació de la via de TGF- β , Zeb2 podria facilitar la repressió de la mateixa.

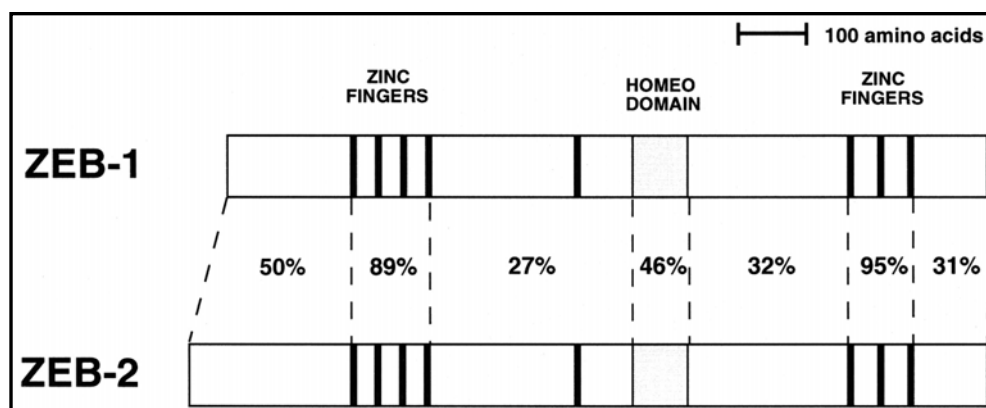


Figura I.6: Comparació de l'homologia de les proteïnes Zeb1/Zeb2. Esquema de les estructures de Zeb1/Zeb2 que mostren els percentatges de semblança a nivell de proteïna.

La família de factors de transcripció *Zfh* es troben des de *Drosophila* fins a mamífers (Taula I.1) (Sekido et al 1994, Genetta i Kadesch 1996). Segons la espècie a la que pertanyen se'ls hi ha assignat diferents noms; *Zfh-1*: *Drosophila* (Fortini et al 1991), δ EF1: Pollastre (Funahashi et al 1993), Nil-2-a: Seqüència parcial humana (Williams et al 1991), AREB6: Humà, extensió de l'anterior (Watanabe et al 1993), Zeb: Humà (Genetta et al 1994), BZP: Hamster (Franklin et al 1994), δ EF1: Homòleg de ratolí (Sekido et al 1996), MEB1: ratolí (Genetta i Kadesch 1996), Zfh_{ep}: Rata (Cabanilla i Darling 1996).

En *Drosophila* s'ha vist que Twist i Snail augmenten l'expressió de *Zfh-1* (Zinc finger homeodomain 1 protein). Els estudis de mutagènesi han evidenciat que el 80% dels mutants de *zfh-1* en *Drosophila* són letals, els que no moren, tenen errors en el destí cel·lular i posicionament, per exemple un mal posicionament de l'intestí mig possiblement perquè per la seva formació necessita de la interacció entre mesoderm i endoderm (Immerglück et al 1990, Reuter et al 1990). Es creu que aquest fenotip i no un de més greu és perquè hi ha solapament de funció entre altres proteïnes i *Zfh-1*.

| Region(s) | Amino acids | | % |
|--------------------------|-------------|--------------|----|
| | ZEB | <i>zfh-1</i> | |
| N-terminal region | 1-168 | 1-252 | 8 |
| N-terminal zinc fingers | 169-294 | 253-415 | 50 |
| Central repressor domain | 295-902 | 416-972 | 12 |
| Homeodomain | 590-637 | 714-762 | 30 |
| C-terminal zinc fingers | 903-987 | 973-1056 | 80 |
| C-terminal region | 988-1124 | NA | NA |

Taula I.1: Comparació de Seqüències de *Zfh-1* i *Zeb1*. Obtinguda de Postigo et al 1999.

3.1 Estructura de la proteïna

Tots els membres de la família es caracteritzen per varis dominis bastant ben conservats: dos grups de dits de Zinc del tipus Krüppel C₂H₂, distribuïts a la part N (NTZF, 168-294) i C (CTZF, 903-988) terminal de la proteïna i un homeodomain (HD, 590-637) al mig. Solament els dits de Zinc semblen involucrats en la unió al DNA (Remacle et al 1999). De totes maneres el nombre i distribució d'aquests dominis pot variar d'un membre de la família a un altre. (Fortini et al 1991, Morinaga et al 1991, Lai et al 1991 i Funahashi et al 1993 i Ikeda et al 1995)(Figura I.7).

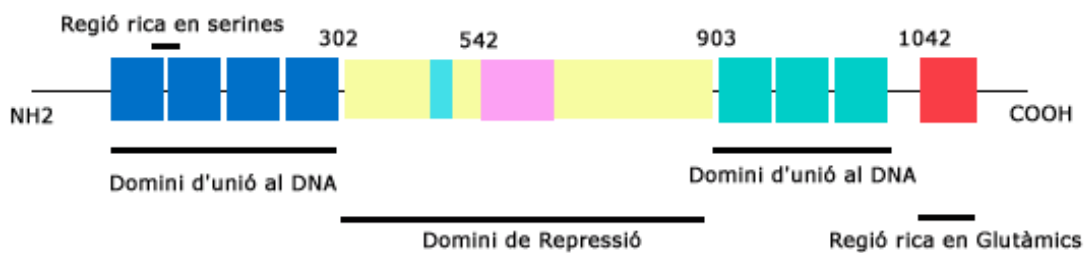


Figura I.7: Esquema de l'estructura proteica de Zeb1. La proteïna es caracteritza per tenir dos dominis ben definits de dits de Zinc a NT i CT i al mig un Homeodomain (HD). S'ha caracteritzat un domini repressor al centre de la proteïna i un putatiu domini activador en una regió rica en glutàmics en la cua més CT. Adaptat de Postigo et al 1999.

S'ha vist que hi ha gran semblança entre els NTZF 3-4 i els CTZF 2-3 (Funahashi et al 1993, Sekido et al 1994 i Postigo et al 1997). Això feia pensar que s'unirien a seqüències molt semblants del DNA o fins i tot a la mateixa. S'ha vist que CTZF s'uneixen amb més afinitat al DNA que NTZF. Segons aquests autors es necessita de la unió dels dos grups de dits de zinc pel correcte funcionament de la proteïna, però això no és comunament acceptat; per exemple es pensa que CTZF per si sol pot unir el DNA amb la mateixa afinitat que la proteïna sencera (Funahashi et al 1993).

NTZF i CTZF s'uneixen al DNA que posseeix una seqüència característica: 5'-CACCT, anomenada E2-Box. A més, aquesta unió sembla ser molt més gran si després de la caixa E2 hi ha una G, quedant la caixa de la següent manera: CACCTG. Com s'ha dit, aquesta caixa és un lloc d'unió per Snail i també pels activadors transcripcionals bHLH (Funahashi et al 1993, Ruezinsky et al 1991, Simon et al 1993, Batlle et al 2000).

Ha estat descrit per molt grups que l'HD no s'uneix al DNA (Ikeda et al 1995) i s'ha suggerit, que podria formar heterodímers amb altres proteïnes (Funahashi et al 1993 i Sekido et al 1997). Altres grups han descrit que l'HD s'uneix als NTZF i que això funcionaria com un mecanisme de regulació per a la proteïna (Ikeda et al 1995).

En els últims aminoàcids de la proteïna hi ha una regió àcida rica en glutàmics, entre 989-1123 (Watanabe et al 1993 i Gennetta et al 1995). Aquests dominis àcids són comuns en activadors transcripcionals (Mitchell i Tjian 1989, Seipel et al 1992), és a dir, que funcionen com elements efectors positius de transcripció (Gill i Phashne et al 1987 i Hope et al 1988).

3.2 Mecanisme de regulació transcripcional per *Zfh*.

La regulació de molts gens es dona per competència directe d'activadors amb els repressors pel mateix lloc d'unió a DNA. Es creu que *Zfh* funcionen en la majoria de casos com a repressors transcripcionals, que poden actuar de varies maneres diferents: per repressió per unió en el mateix lloc que els activadors, per exemple ZEB/E47 (Sekido et al 1994). Per repressió per interferència amb seqüències veïnes (Kamachi et al 1993).

S'han descrit molts gens reprimits per Zeb1: per exemple es pot unir a varis enhancers i reprimir-los, tal és el cas de l'enhancer DC5 del gen de la δ 1-cristalina i l'enhancer K de les Immunoglobulines (Funahashi et al 1993; Sekido et al 1994). En el primer cas ho fa mitjançant competició amb un activador que s'uneix en el mateix lloc (Kamachi i Kondoh 1993), i en el segon cas es desconeix. D'altre banda també s'han vist altres gens regulats negativament per zeb1, per exemple es pot unir a la seqüència NRE-A (de l'anglès: Negative Regulator Element) i reprimir l'expressió de IL-2 (Williams et al 1991; Becker et al 1995; Ronald H.Schwartz 1997). Zeb1 també s'ha vist implicat en la repressió de GATA-3 (Grégorie et al 1999), Col2a1 (Murray et al 2000), Pro- α 1 col·lagen (Terraz et al 2001), p73 (Fontamaggi et al 2001). Brachyury, aquesta proteïna controla el desenvolupament de la notocorda (Herrmann et al 1990) unint-se a una seqüència TTTCA CACCT AGGTG TGAAA (Kispert et al 1993). Zeb1 s'uneix a aquesta seqüència en CACCT i això està implicat en canvis temporals en el desenvolupament de la notocorda (Yamada et al 1991). De fet un altre

membre de la família, ZEB2, s'ha vist implicat en regulació de Brachyury en *Xenopus* (Lerchner et al 2000 i Papin et al 2002).

Molts grups han descrit un domini de repressió activa dins de la mateixa proteïna que funciona silenciament dels activadors que es troben units en els llocs veïns. Sekido i col·laboradors al 1997 van descriure en Zeb1 de ratolí un lloc de repressió activa davant de NTZF, pel contrari, Postigo i col·laboradors també en el 1997 utilitzant l'homòleg humà, van descriure també un domini de repressió activa però entre NTZF i l'HD, en l'HD hi ha el domini repressor. Per tant es pensa que Zeb1 pot tenir dos mecanismes de repressió, una, aquesta repressió activa en la qual hi participa una part de la proteïna directament (Sekido et al 1997 i Postigo et al 1997), i per altre banda, un mecanisme de repressió mitjançant co-repressors. El fet de que es doni un mecanisme no vol dir que l'altre sigui exclouent. Els co-repressors que s'han descrit implicats en el mecanisme repressor de Zeb són varis: NC2, un cofactor àmpliament descrit per segrestar la maquinària transcripcional basal (Ikeda et al 1998); TIP60, un cofactor que conjuntament amb Zeb1 inhibeix l'activitat del promotor/*enhancer* de CD4 (Hlubek et al 2001) i CtBP: co-repressor caracteritzat per donar lloc a mecanismes de repressió de curt rang i pel reclutament de deacetilases de histones (Postigo et al 1999 i Grootclaes et al 2000). Furusawa et al 1999, va descriure que els dos membres de la família, CtBP1 i CtBP2, s'unien a Zeb1 i actuaven com els seus co-repressors.

Com s'ha dit anteriorment els factors de transcripció que pertanyen a la família de *zfh* es comporten principalment com a repressors transcripcionals, però en els últims anys Zeb1 també ha estat caracteritzat com un possible activador en diferents circumstàncies. Així per exemple s'ha vist implicat en l'activació de certs gens, com el promotor del Receptor de Vitamina D3 (Lazarova et al 2001), l'ovoalbumina, de manera dependent d'estrogens (Chamberlain et al 1999).

3.3 Expressió i Processos en els que es troben implicats els factors de transcripció de la família de *zfh*.

Els factors de transcripció de *Zhf* participen en processos cel·lulars com, la miogènesis, en la qual Zeb es comporta com un inhibidor de la diferenciació muscular, competint pels mateixos llocs d'unió que els factors

de transcripció positius MRF i Mef2 (Postigo et al 1997); així com també en el desenvolupament de cèl·lules hematopoietiques, on competeix amb els activadors transcripcionals c-Myb i Ets, que sineritzen per superar la repressió mitjançada per Zeb (Genetta et al 1994 i Postigo et al 1997). També està implicat en la diferenciació de cèl·lules T, mitjançant la inhibició del promotor de l'interleuquina 2 (Williams et al 1991, Becker et al 1995 i Ronald H.Schwartz 1997).

Els diferents membres de la família s'expressen en teixits molt semblants. En *Drosophila*: està implicat en la destinació de destí cel·lular del mesoderm, així com també en el desenvolupament de sistema nerviós (SN) (Lai et al 1991, 1993). En ratolí i pollet, Zeb1 s'expressa en els primordis del mesoderm i està implicat en l'origen del neuroectoderm (Funahashi et al 1993 i Takagi et al 1998). Funahashi i col·laboradors van descriure al 1993 que Zeb1 s'expressa en la postgastrulació del embrió (en els diferents llinatges del mesoderm) primerament en notocorda i després, en somites i en nefrotom (Yamada i col·laboradors al 1991 van obtenir els mateixos resultats). Finalment, Zeb1 s'expressa en sistema nerviós i retina. En humans Zeb1 es troba activament expressat en múscul esquelètic (Watanabe et al 1993) així com també en el cor. Trobem un nivell d'expressió moderat en el cervell, el pulmó i la placenta. I molt baix en fetge, ronyó i pàncreas.

És interessant remarcar que l'expressió mesodèrmica de Zfh-1 en *Drosophila* és depenent de Snail i Twist (Lai et al 1991). En el cas de *Drosophila*, Snail i Twist s'expressen abans que Zfh-1 i sembla probable que en vertebrats hi hagi la mateixa jerarquia.

Els mutants per l'expressió de zfh-1 (Lai et al 1993) tenen diferents graus d'errors locals en el destí cel·lular i el posicionament. Zfh-1 no és necessari per la segregació inicial del mesoderm o dels derivats del mesoderm. La gran majoria dels mutants per zfh-1 (80%) són letals embrionaris, això però no és el que succeeix en ratolins. Hi ha dos KO del gen en ratolí, un ratolí mutant que li falta la regió C-terminal de la proteïna (Delta C727) s'observen problemes greus en el desenvolupament de cèl·lules T (Higashi et al 1997); així com també un ratolí KO o null: en el que els viables tenen problemes greus en l'esquelet i també en cèl·lules T

(Takagi et al 1998). Es pensa que el fenotip tan sever en *Drosophila* es deu a que tan sols hi ha un gen, mentre que en mamífers s'hi troben dos gens que venen d'un mateix ancestre comú. Es creu que la falta d'un fenotip més greu en els ratolins KO es deu al solapament de funcions d'altres factors, com Snail (Higashi et al 1997) o Zeb2 (Postigo et al 2000).

OBJECTIUS

- 1) Caracteritzar amb detall el mecanisme de repressió transcripcional de Snail sobre diferents marcadors epitelials: E-cadherina, MUC1 i VDR.
Possible participació de Zeb1
- 2) Estudiar les vies que controlen l'expressió de Zeb1 en cèl·lules tumorals.

CAPÍTOL I: MECANISME DE REPRESSIÓ TRANSCRIPCIONAL PER SNAIL.**Antecedents.**

Una de les proteïnes que s'havia vist regulada a la baixa en la TEM que es dona tan en gastrulació com en el procés tumoral és l'E-cadherina. (Vleminckx et al 1991; Perl et al 1998; Shiozaki et al 1996). Hi havia evidències molt clares de que la regulació a la baixa de l'E-cadherina es produïa a nivell transcripcional i requereix de les caixes E presents en el seu promotor (Henning et al 1996; Ji et al 1997; Giroldi et al 1997). Van veure que la seqüència de les caixes E (5' CACCTG) coincidia perfectament amb el lloc d'unió d'un factor de transcripció anomenat Snail. (Mauhin et al 1993; Nakayama et al 1998).

En aquest moment ens vam plantejar d'estudiar quin era el mecanisme pel qual Snail podia reprimir el gen de l'E-cadherina i si hi utilitzava el mateix mecanisme de repressió per a altres gens epitelials.

Els clons estables per Snail de les cèl·lules MDCK i HT-29 M6 pateixen un canvi de fenotip d'epitelial a fibroblastoide.

Es va voler estudiar la relació inversa entre Snail i expressió d'E-cadherina. Per aquest motiu es van fer clons estables de Snail en línies cel·lulars epitelials, en concret es van utilitzar les MDCK (Madin-Darby canine Kidney) i les HT-29 M6 (cèl·lules humanes de colon). Aquests dos tipus cel·lulars no formaven colònies compactes i tenen un fenotip molt més estirat. Els clons HT-29 M6 van ser transfectats amb el sistema "Tet off", és a dir, el fenotip epitelial era recuperat que s'afegia al medi doxiciclina (dox), un anàleg de la tetraciclina. En aquests dos tipus cel·lulars es va poder observar una morfologia fibroblastoide (fig. R1.1).

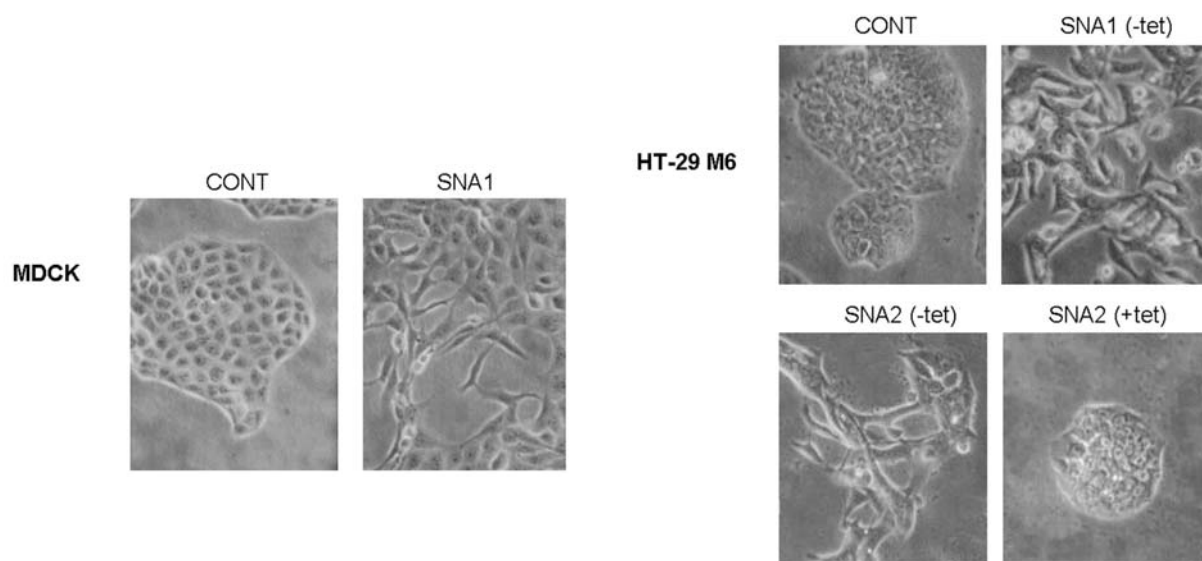


Figura RI.1. Morfologia de les MDCK i HT-29 M6 transfectades amb Snail. Les fotografies eren agafades a 200 augments (MDCK) o 350 augments (HT-29 M6). Quan s'indica (+tet), les HT-29 M6 eren crescudes en presència de doxiciclina (2 µg/ml). CONT, control.

Es van fer seccions laterals dels clons de les HT-29 M6 i es va observar que la sobre-expressió de Snail prevenia la formació de columnes compactes de monocapes de tipus epitelials que són característiques d'aquest tipus cel·lular i es reduïa el gruix de la capa de 12-16 a 4-6 µm. (fig. RI.2, esquerra).

Els clons Sna1 de les HT-29 M6, així com els altres clons que expressaven Snail, mostraven un fenotip més fibroblastoide amb les cèl·lules disposades, de manera ocasional, unes sobre de les altres. No es veien contactes cel·lulars en aquests transfectants en contrast amb els clons control, a on es podien observar unions estretes, unions adherents i desmosomes (fig. RI.2 dreta). A més els clons control tenien altres trets epitelials ben definits, com són els microvilli o les vesícules de moc.

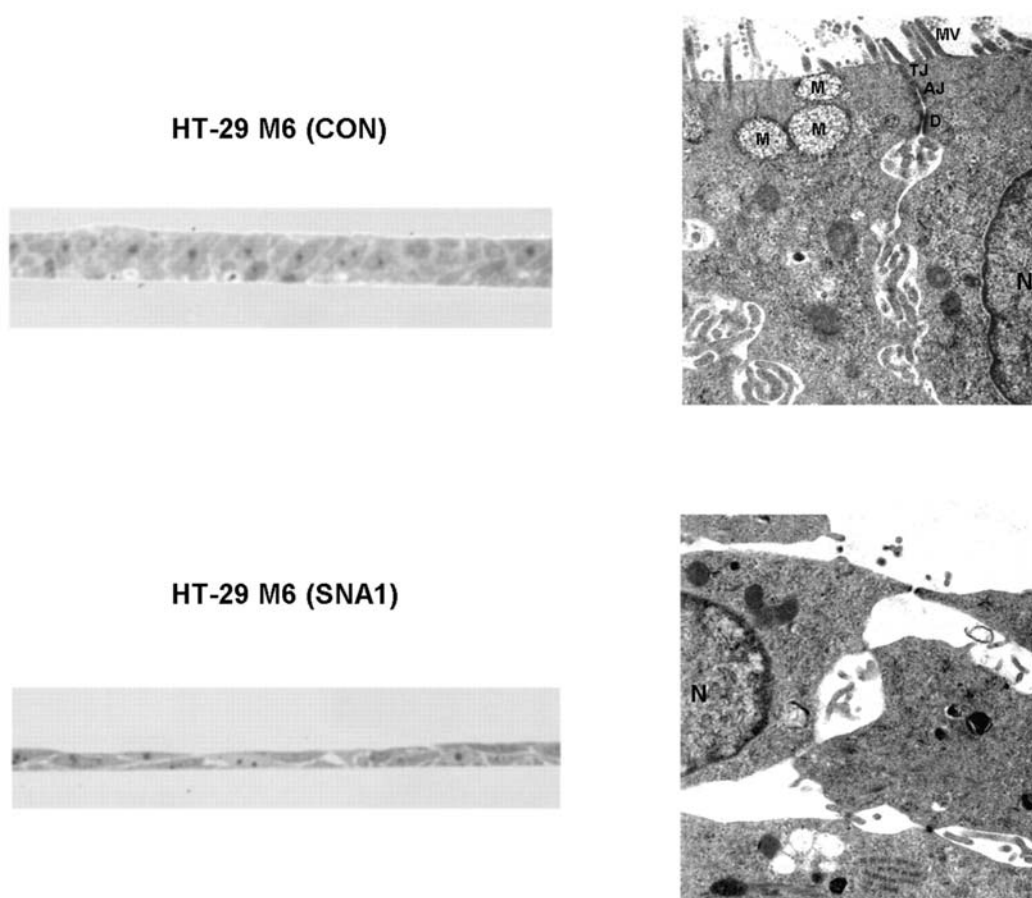


Figura RI.2. Seccions semi-fines i microscopia electrònica de les cèl·lules HT-29 M6 transfectades amb Snail. Els clons d'HT-29 M6 control i Snail, eren crescudes fins a confluència. Es mostren seccions semi-fines (panell de l'esquerra) i ultra-fines visualitzades amb microscopi electrònic (panell de la dreta). M, vesícules de moc; MV, microvilli; TJ, unions estretes; AJ, unions adherents; D, desmosomes; N, nucli; Con, control.

A més els clons que expressaven Snail s'enganxaven millor al plàstic i s'estiraven més ràpidament sobre matrius de colagen o laminina (dades no mostrades).

Els clons que expressen Snail pateixen una regulació a la baixa de l'E-cadherina i varis gens epitelials.

També es va determinar si aquests canvis en el fenotip venien acompanyats per alteracions en l'expressió de diferents gens epitelials. Utilitzant anàlisi de RT-PCR semi-quantitativa es va veure que els nivells de

RNA de varis gens epitelials, a més de l'E-cadherina, eren disminuïts en els clons que expressaven Snail. (fig. RI.3).

RNA de varis gens epitelials, a més de l'E-cadherina, eren disminuïts en els clons que expressaven Snail. (fig. RI.3). L'expressió de MUC1 i

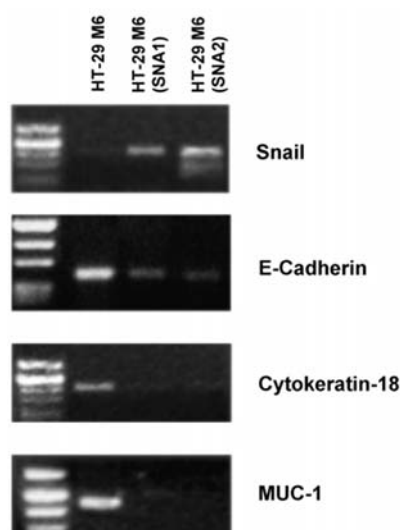


Figura RI.3. Els clons tranfectants per Snail mostren una regulació a la baixa de gens epitelials. El RNA era obtingut de cèl·lules HT-29 M6 control o transfectades amb Snail (Sna1/Sna2) pel procediments estàndards. Les amplificacions dels RNAs per RT-PCR "One-Step" eren realitzades amb 500 ng de RNA total, i els productes eren separats en gels d'agarosa de 1.5% i 2%. La seqüències dels oligonucleòtids es van descriure en els materials i mètodes, i les mides dels fragments amplificats corresponien als esperats. El primer carril correspon a marcador de DNA de baix pes molecular (MBI, Fermentas): 908, 659-656,521,4.03,283,257 i 226)

Es va voler caracteritzar amb més profunditat quins eren els mecanismes pels quals Snail exercia la repressió sobre determinats gens epitelials, i amb aquest fi es van clonar diferents promotors. El primer amb el que es va començar a treballar va ser el promotor d'E-cadherina. En el nostre grup es va clonar un promotor proximal de l'E-cadherina que contenia tres caixes E i que consistia en el fragment -178/+92 (fig. RI.4).

Es va veure que aquest promotor era reprimat pel factor de transcripció Snail i que aquesta repressió era dosi dependent (fig. RI.4). Per últim es va poder demostrar que la repressió exercida per Snail sobre el promotor d'E-cadherina era dependent de les caixes E del promotor, ja que si

mutàvem les caixes, Snail perdia la seva capacitat de reprimir) (Batlle et al 2000).

Es va voler llavors caracteritzar altres gens epitelials i el mecanisme de repressió de Snail sobre aquests gens. Com es veu en la figura RI.3, l'expressió de MUC1 i Citoqueratina 18, els quals contenen seqüències de unió per Snail en els seu promotors, era disminuïda en els clons transfectants per Snail. Es va començar a estudiar la repressió transcripcional de MUC1.

MUC1 és un marcador de varis teixits epitelials incloent l'epiteli colònic. La seqüència del seu promotor conté repeticions en tàndem de la seqüència consens per la unió de Snail al DNA situada a -84 bp de l'inici de transcripció (Kovarik et al 1993). Així doncs, com l'E-cadherina, aquest gen podria ser diana directe de Snail.

Els Northern Blots van corroborar que els nivells de RNA de MUC1 eren significativament més baixos en els clons d'HT-29 M6 que expressen Snail que en els controls (fig. RI.5a).

Llavors es va analitzar si la disminució dels nivells de RNA de MUC1 induïda per Snail era conseqüència d'una repressió de l'activitat del promotor. Un fragment del gen de MUC1 de 800 pb, corresponents a la seqüència que conté el -756/+49 respecte l'inici de transcripció (Kovarik et al 1993), era clonat i insertat en el plàsmid pGL3 per sobre del gen reporter de la luciferasa. Aquest promotor ha estat descrit per ser actiu en línies cel·lulars epitelials que expressen MUC1 (Kovarik et al 1993). L'activitat transcripcional de MUC1 era més baixa en els clons estables per Snail que en els controls o en les cèl·lules parentals (fig. RI.5b). La repressió induïda per Snail del promotor de MUC1 era reproduïda quan Snail era transfectat de manera transitòria en HT-29 M6 parentals o altres cèl·lules epitelials que expressaven MUC1. En tots els casos, Snail reprimia l'activitat del promotor de manera dosi-depenent per sobre del 80% (fig. RI.5c). Aquesta repressió no era observada amb el mutant de Snail P2A (Pro→Ala) (resultats no mostrats).

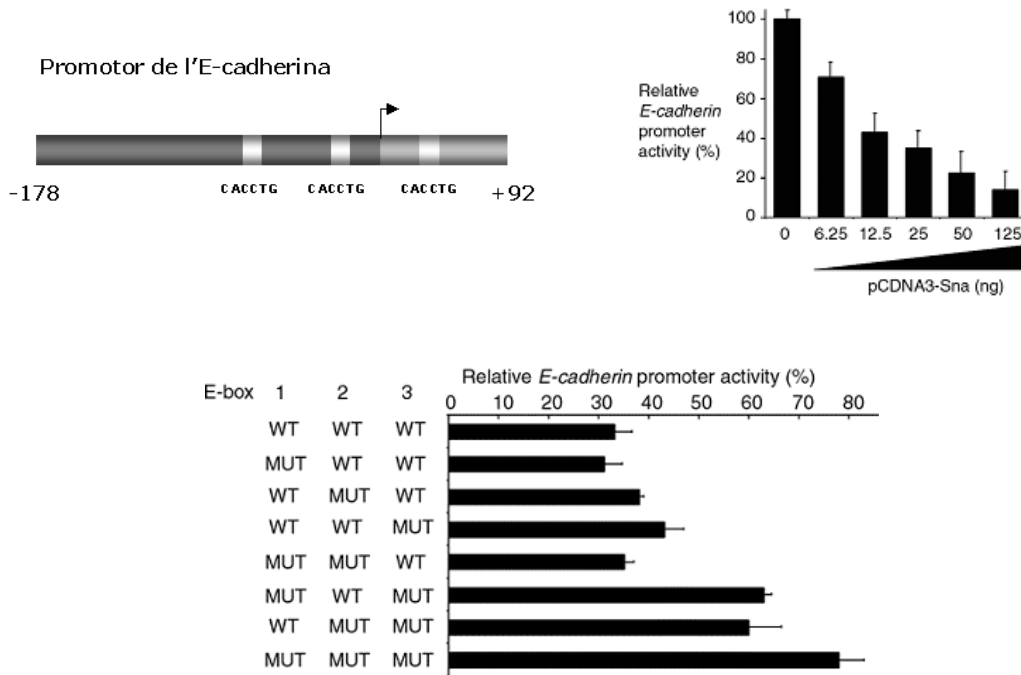


Figura RI.4. Snail de ratolí bloqueja l'activitat del fragment -178/+92 del promotor de l'E-cadherina humana de manera dependent de les caixes E. Esquema del promotor de l'E-cadherina. En el promotor proximal es troben tres caixes E, una de les quals està situada després de l'inici de transcripció. Les cèl·lules HT-29 M6 eren transfectades amb 25 ng del vector pGL3 que contenia el gen de la Luc sota el control del fragment -178/+92 del promotor de l'E-cadherina humana (pGL3-Ecad -178/+92) més 5 ng del vector reporter control (pRLtk). Els nivells d'activitat Luc eren normalitzats en tots els casos per l'activitat Rluc, les transfeccions eren suplementades amb la quantitat indicada de mmSna pcDNA3 (pcDNA3-Sna). Panell inferior, el pGL3-Ecad -178/+92 (wt) o el mateix plàsmid contenint mutacions en les diferents caixes E era co-transfectat en les cèl·lules HT-29 M6 juntament amb pRLtk i o el pcDNA3-Sna o el vector pcDNA3 buit (50ng). Les dades són expressades com a activitat Luc en presència del Sna exogen com a percentatge de l'activitat del mateix reporter en transfeccions suplementades amb vector control. L'activitat Luc era expressada com a percentatge de l'activitat trobada en cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard (Batlle et al 2000).

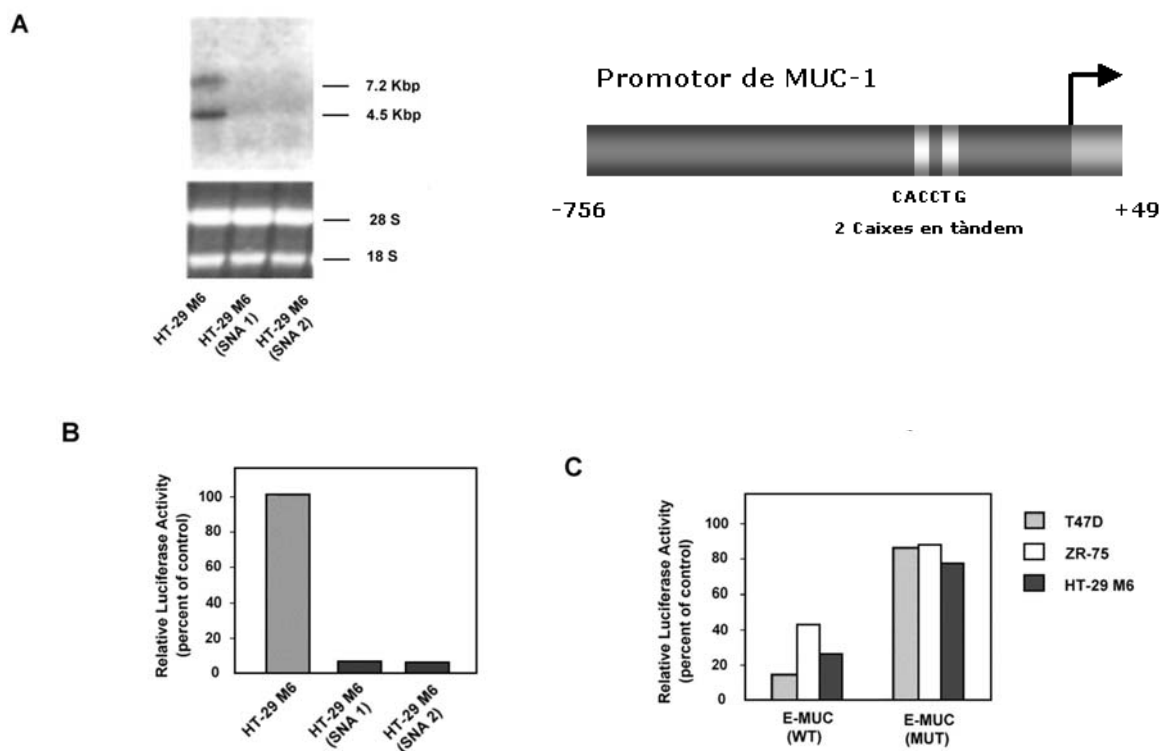


Figura RI.5. Snail reprimeix l'expressió del gen de MUC1. a, S'obtenia RNA de cèl·lules HT-29 M6 control o Sna1, Sna2 i era analitzat per Northern Blot utilitzant una sonda de cDNA de MUC1 marcada radioactivament. Tinció del RNA 18S i 28S amb bromur d'etidi era fotografiat abans del bloqueig i utilitzat com a control de càrrega. Les dues bandes detectades amb aquest anàlisi corresponen als dos al·lels de MUC1 en aquestes línies cel·lulars (Kovarik et al 1993). El promotor es caracteritza per tenir dues caixes E prop de l'inici de transcripció, en les quals pot interaccionar el factor de transcripció Snail. A més aquest promotor és molt actiu en cèl·lules epitelials que expressen MUC1. B, els assaigs reporters de les cèl·lules HT-29 M6 control, Sna1 i Sna2 eren realitzats com es descriu utilitzant 400 ng de pGL3 o pGL3-Promotor de MUC1 i 25 ng de pRTK-Luc per normalitzar l'eficiència de transfecció. C, les línies cel·lulars eren transfectades amb 250-500 ng de pGL3-Promotor de MUC1 (wild-type o amb les caixes E mutades) en presència de 25 ng de pcDNA3-Sna o pcDNA3 com a control, i l'activitat luciferasa era determinada com abans. Els valors eren normalitzats utilitzant l'activitat de la luciferasa de la Renilla (pRTK-Luc, 15-30 ng). Els resultats representen el percentatge de la màxima repressió *versus* els valors de pcDNA3 control. Els resultats corresponen a un experiment representatiu de tres experiments realitzats per duplicat o triplicat. WT, wild-type.

El mutant de Snail 1-138, que no té domini d'unió al DNA, és capaç de reprimir el promotor de l'E-cadherina.

Així doncs s'havia vist que Snail era capaç de reprimir varis gens epitelials i es va pensar que això podia ser un tret important per a la transició epiteli-mesènquima que s'observava en els clons estables per Snail. Per aquest motiu es va decidir estudiar amb més profunditat el mecanisme de repressió transcripcional de Snail.

Es sabia que en la part N-terminal de la proteïna hi ha la seqüència de export nuclear i que la localització de la proteïna venia regulada per la fosforilació d'una seqüència rica en Ser (Domínguez et al 2003). Es va comprovar que la localització de la proteïna era important per la seva capacitat repressora, ja que el fragment N-terminal de la proteïna que pot mantenir-se dins de nucli, ja que no té la seqüència d'export, era capaç de reprimir (fig.RI.6). Es va pensar que el fragment N-terminal de Snail (1-138) era capaç d'interaccionar amb una proteïna que li permetia unir-se al DNA. En condicions en que tenim la proteïna Snail wt, aquesta exerciria el seu mecanisme repressor mitjançant interacció directa amb les caixes E i per interacció amb un altre repressor que s'uniria també a les caixes E veïnes.

Es va aconseguir un altre mutant per Snail en el laboratori (1-82) i va ser curiós observar que aquest mutant no era capaç de reprimir el promotor de l'E-cadherina, mentre si que ho feia el mutant 1-138 (fig. RI.6). Així doncs, es va pensar que entre els aminoàcids 82-138 podria interaccionar alguna proteïna que podia facilitar el mecanisme repressor de Snail, sobretot en aquells casos en que Snail per si sol no pot interaccionar amb les caixes E, per exemple els mutants que no tenen els dits de zinc.

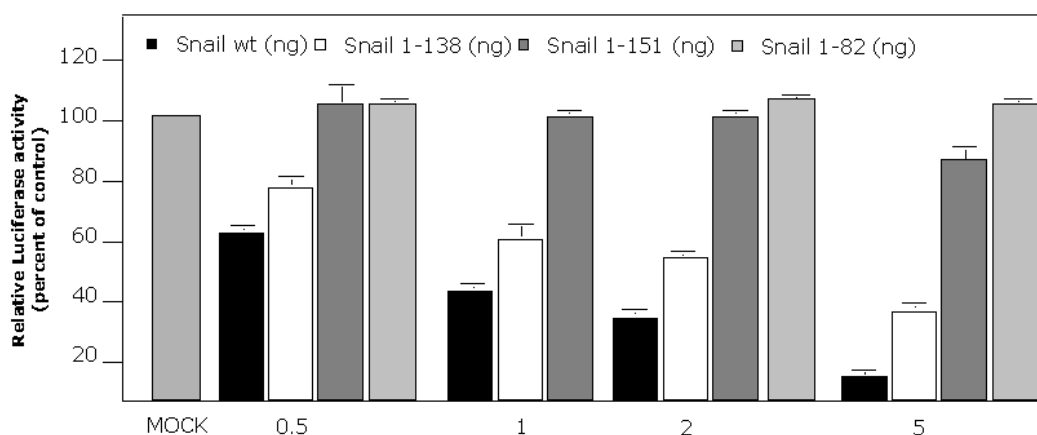
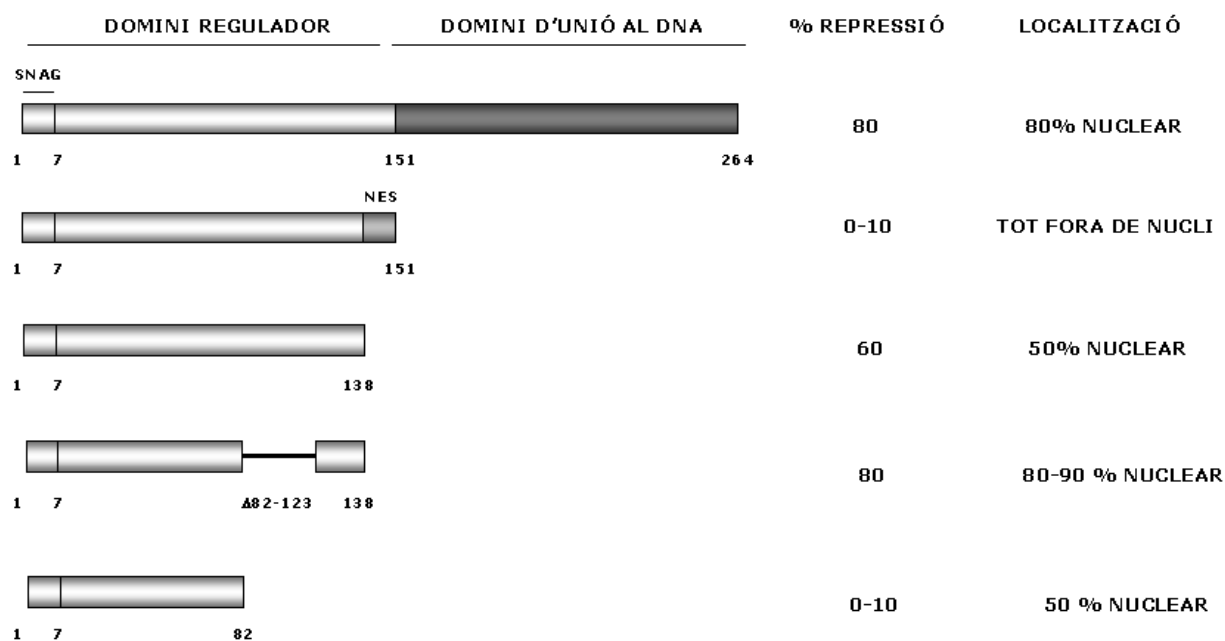


Figura RI.6. Acció dels mutants de Snail sobre el promotor de l'E-cadherina.

Estructura proteica dels diferents mutants de Snail, la seva localització sub-cel·lular i la seva capacitat de repressió a 5 ng. Es van transfectar de forma transitòria cèl·lules RWP1 amb 250 ng de pGL3-promotor de l'E-cadherina i Snail (0.5-10 ng). Tots els valors obtinguts es van normalitzar utilitzant l'activitat *luciferasa* de la *Renilla* (pRTK-Luc 30 ng). Els resultats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, realitzats per triplicats. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

Snail reprimeix el gen de l'E-cadherina de manera dependent d'Histones deacetilases (HDAC) i el de VDR de manera independent d'HDAC.

Es sabia que la repressió transcripcional jugava un paper central en la regulació dels patrons d'expressió de gens durant el desenvolupament i la diferenciació. La repressió de gens específics és important per controlar

varis processos cel·lulars com són la proliferació o l'oncogènesis. Els repressors transcripcionals duen a terme els seus efectes pel reclutament de varis co-repressors.

Es va estudiar si el mecanisme de repressió de Snail sobre el promotor de l'E-cadherina, depenia d'HDAC (fig. RI.7, superior). Es va afegir a les cèl·lules Trichostatina A (TSA), un inhibidor de les HDAC. Els estudis transcripcionals portats a cap en presència de l'inhibidor (TSA) van revelar que es el mecanisme de repressió de Snail sobre aquests promotor venia mediat en gran mesura per HDAC.

Prèviament havia estat descrit que el promotor de VDR (un altre marcador epitelial) era reprimat per Snail (Pàlmer et al 2001). Així doncs, ens vam proposar estudiar que passava amb el mecanisme de repressió transcripcional per Snail d'aquest promotor (fig. RI.7 inferior).

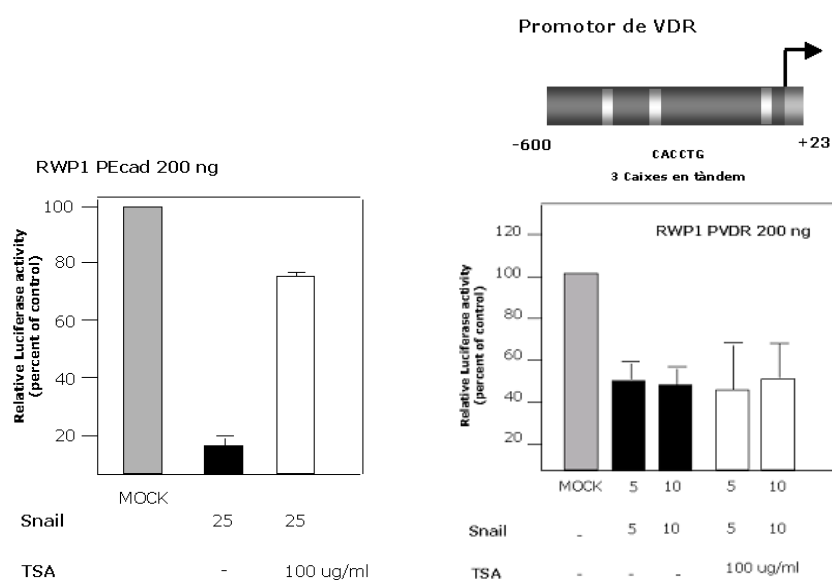


Figura RI.7. TSA reverteix la repressió del promotor d'E-cadherina per Snail, però no la del promotor de VDR. Les cèl·lules RWP1 eren transfectades amb 200 ng de promotor de l'E-cadherina (panell esquerre) o PVDR (panell dret) i concentracions creixents de Snail (5-25 ng). Després s'afegia 100 µg/ml de TSA o en el control el mateix volum de DMSO. Tots els valors obtinguts es van normalitzar utilitzant l'activitat *luciferasa* de la *Renilla* (pRSV40-Luc, 5 ng). Els resultats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, realitzats per triplicats. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

De qualsevol manera, el mecanisme de repressió dependent d'HDAC no es dona en un altre promotor epitelial, promotor de VDR. Es pensa que

el mecanisme de repressió sobre els diferents gens epitelials, pot ser dependent o independent d'HDAC.

Snail reprimeix la transcripció de l'E-cadherina de manera parcialment dependent de CtBP.

Es va voler estudiar llavors en profunditat quins podien ser els co-repressors transcripcional que estiguessin ajudant a Snail en el seu mecanisme de repressió.

S'havia vist que el Snail de *Drosophila* exercia el seu mecanisme de repressió unint-se a una proteïna anomenada CtBP (Nibu et al 1998). També es va demostrar que aquesta unió es donava en el fragment N-terminal de la proteïna (Hemavathy et al 2004).

Alguns grups van demostrar que CtBP forma un gran complex multi-protèic que funcionaria reprimint la transcripció de certs gens, per exemple el gen de l'E-cadherina (Shi et al 2003). A més també es va veure que la interacció de CtBP amb E1A activava alguns gens epitelials, com és el cas de l'E-cadherina (Grootclaes et al 2000).

Prenent aquests experiments com la base del nostre treball ens vam plantejar estudiar amb detall si la repressió de Snail sobre el promotor de l'E-cadherina era dependent de CtBP. Per tal de poder dur a terme els nostres experiments, es van utilitzar algunes aproximacions experimentals que ja havien estat usades per altres grups (fig. RI.8, panell superior).

Basant-se amb aquesta premissa, es van agafar cèl·lules SW480 de còlon humanes de les que es sabien que presentaven alts nivells de Snail i baixa expressió de l'E-cadherina i es va observar que succeïa en aquestes cèl·lules al afegir pcDNA3-E1A (fig. RI.8, panell inferior esquerre). En aquelles cèl·lules en les que s'havia afegit E1A es va veure un clar augment de l'expressió del promotor de manera dosi-dependent. Es van obtenir resultats semblants en altres línies cel·lulars en les que l'expressió de Snail era alta i la d'E-cadherina era baixa (SW620, Mia Paca-2 i NIH3T3, les dues primeres eren de còlon humanes i les NIH3T3, eren fibroblasts de ratolí).

Es va comprovar si els resultats obtinguts a nivell d'activitat del promotor també eren obtinguts a nivell de proteïna (fig. RI.8 panell dret) i es va observar que ambdós tipus cel·lulars presenten un augment dels nivells de la E-cadherina total en resposta a E1A.

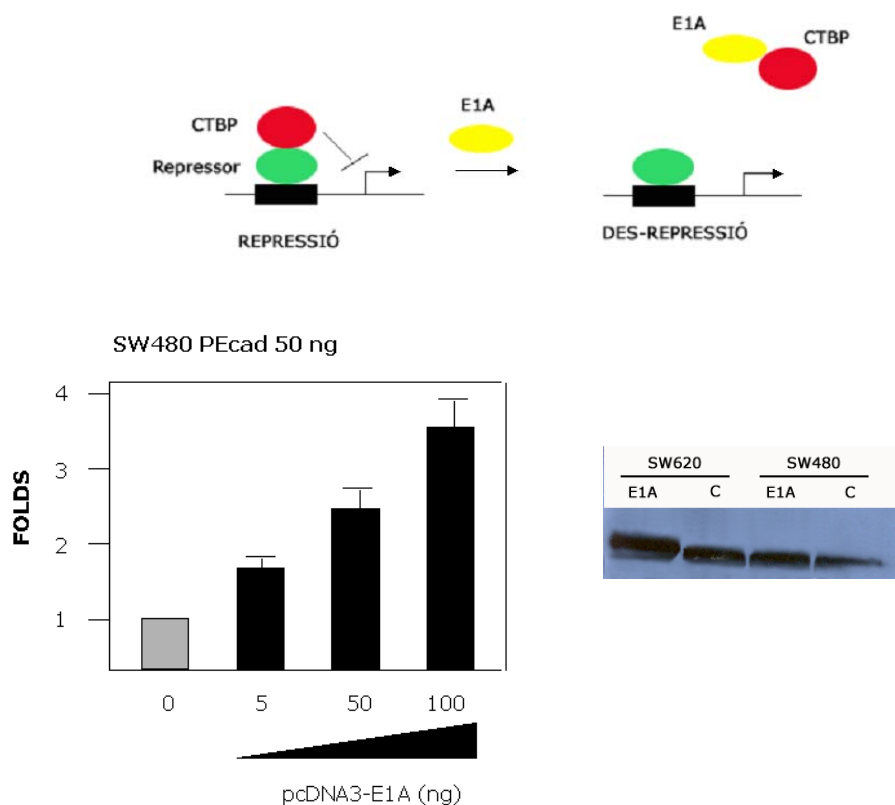


Figura RI.8. E1A augmenta l'activitat del promotor d'E-cadherina en SW480. (esquema superior adaptat de Chinnadurai G. 2002) Panell superior, si el promotor de l'E-cadherina està regulat per CTBP, un cop s'afegeix E1A a les cèl·lules, aquest segrestarà CTBP i des-reprimirà el promotor. Panell inferior esquerre, les cèl·lules SW480 eren transfectades amb 50 ng de promotor de l'E-cadherina i concentracions creixents d'E1A-pcDNA3. Tots els valors obtinguts es van normalitzar utilitzant l'activitat *luciferasa* de la *Renilla* (pRSV40-Luc, 5 ng). Els resultats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, realitzats per triplicats. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard. Panell inferior dret, les cèl·lules SW480 i SW620 eren transfectades amb 3 µg d'E1A, a les 48h de la transfecció, es lissaven les cèl·lules amb RIPA i es realitzava wb contra E-cadherina.

Es va voler estudiar que era el que passava en les cèl·lules epitelials que expressaven alts nivells d'E-cadherina i baixos de Snail (fig. RI.9). El que es va veure era que Snail per si sol reprimia el promotor d'E-cadherina (barres de color negre) i E1A per si sol tan sols activava lleugerament el promotor (barres de color blanc), ara bé, quan s'afegien les dues proteïnes (Snail + E1A) el que succeïa és que la capacitat repressora de Snail es veia revertida, gairebé totalment, quan la concentració de Snail era baixa (barres gris fosc), o parcialment, quan aquesta concentració era més alta

(barres gris clar). Els mateixos resultats eren obtinguts en RWP1 (cèl·lules humanes de pàncreas).

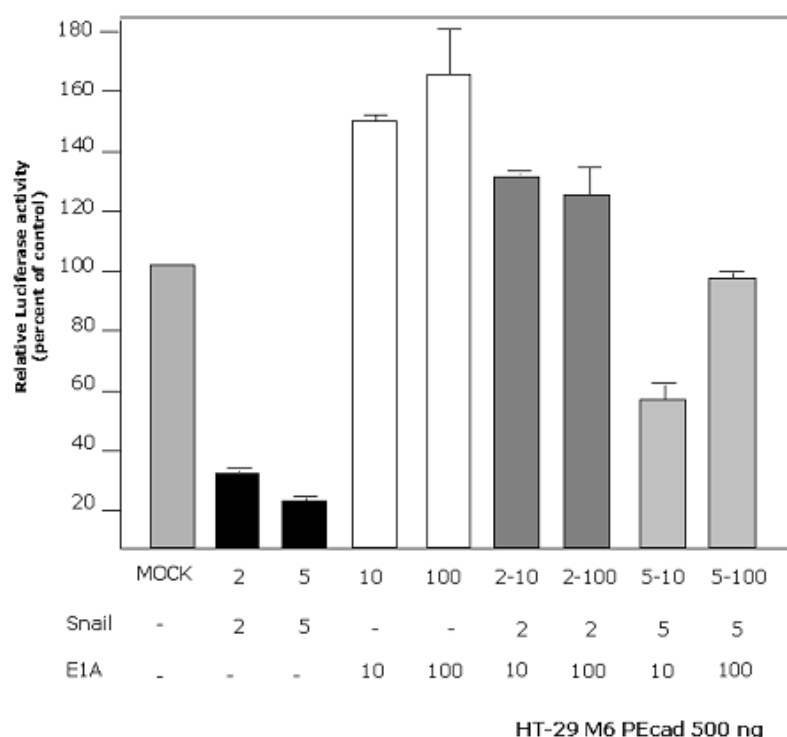


Figura RI.9. E1A es capaç de revertir parcialment l'acció repressora de Snail en HT-29 M6. Les cèl·lules HT-29 M6 eren transfectades amb 500 ng de promotor de l'E-cadherina i concentracions creixents tan de Snail com d'E1A-pcDNA3, o ambdós. Tots els valors obtinguts es van normalitzar utilitzant l'activitat *luciferasa* de la *Renilla* (pRTK-Luc, 30 ng). Els resultats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, realitzats per triplicats. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

Aquests resultats reforçaren l'idea de que CtBP estava implicat parcialment en el mecanisme de repressió transcripcional del promotor de l'E-cadherina per Snail que tenia lloc en les cèl·lules que es tenien en el laboratori. Quan es va clonar el cDNA de CTBP humà, es va veure una gran homologia entre CtBP i les *NAD-dependent 2-hydroxy acid dehydrogenases* (Schaeper et al 1995). Aquesta homologia incloïa un putatiu residu His catalític al lloc actiu i un motiu d'unió a NAD (GXGXXG). Encara que no s'ha vist una alta activitat catalítica de CTBP, si que s'ha pogut comprovar que CtBP es pot unir a NAD (Chinnadurai G. 2002; Zhang et al 2002).

Es va veure que quan en la cèl·lula augmentava la concentració de NADH en el nucli, CtBP era capaç de reprimir els seus gens diana de manera més eficient. Es van transfectar les cèl·lules amb Snail i es va estudiar que

succeïa amb la repressió del promotor de l'E-cadherina quan afegiem al medi NADH. (fig. RI.10)

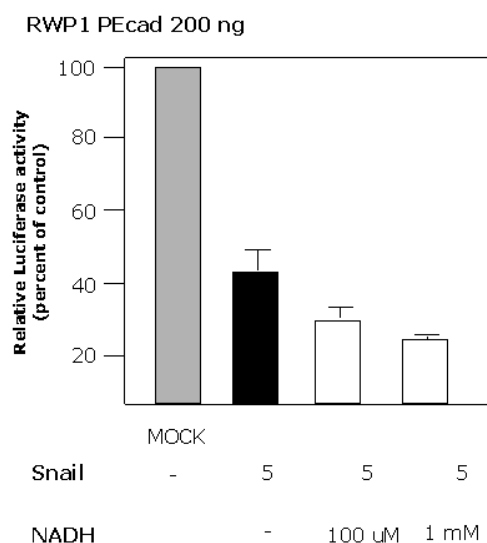


Figura RI.10. NADH augmenta la capacitat repressora de Snail sobre el promotor de l'E-cadherina. Les cèl·lules RWP1 eren transfectades amb 200 ng de promotor de l'E-cadherina i 5 ng de Snail. Després s'afegia 100 μM-1mM de NADH o en el control el mateix volum d'etanol. Tots els valors obtinguts es van normalitzar utilitzant l'activitat *luciferasa* de la *Renilla* (pRSV40-Luc, 5 ng). Els resultats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, realitzats per duplicats. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

CtBP no està implicat en la repressió transcripcional de MUC1 que es dona per Snail, però sí en la del promotor de VDR.

Es va estudiar que passava amb la repressió transcripcional mitjançada per Snail sobre altres promotors. Es va estudiar dos promotors epitelials descrits anteriorment com a promotors regulats negativament per Snail, el promotor de MUC1 i el de VDR. Es va veure que aquest mecanisme de repressió dependent de CtBP que es donava en el promotor de l'E-cadherina també es donava en el promotor de VDR de manera encara més eficient, però no es donava per exemple en el promotor de MUC1 (fig. RI.11), un altre promotor epitelial.

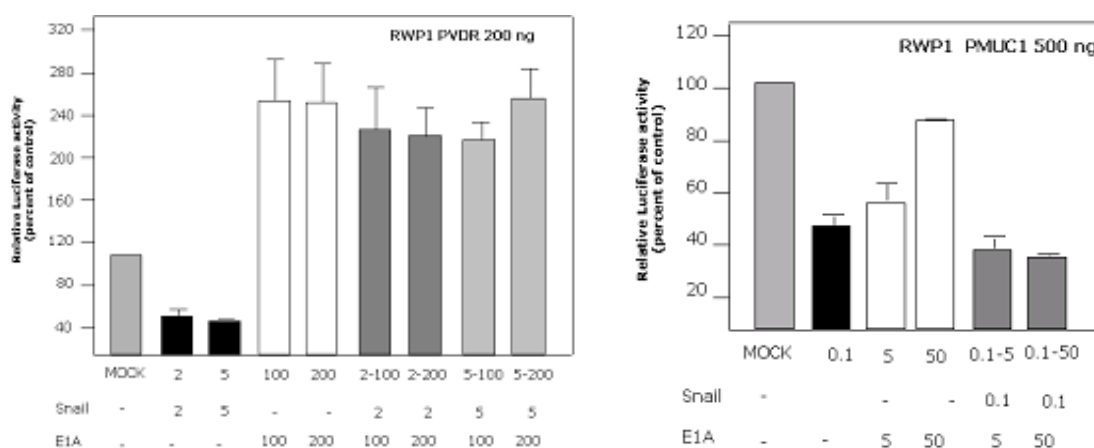


Figura RI.11. E1A no era capaç de revertir l'acció repressora de Snail sobre el promotor de MUC1 però sí que ho feia sobre el promotor de VDR en RWP1. Les cèl·lules RWP1 eren transfectades amb (500-200 ng) de promotor de MUC1 o de VDR i concentracions creixents de Snail o concentracions creixents d'E1A-pcDNA3, o ambdós. Tots els valors obtinguts es van normalitzar utilitzant l'activitat *luciferasa* de la *Renilla* (pRTK-Luc, 20 ng). Els resultats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, realitzats per triplicats. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

Totes aquestes dades apuntaven al fet de que CtBP estava implicat en la repressió de l'E-cadherina en les nostres línies cel·lulars tumorals, sobretot en aquelles més mesenquimals. El que es va voler estudiar era si Snail podia estar interaccionant amb CtBP. S'ha de recordar que la proteïna Snail en mamífers ha perdut el domini d'interacció amb CtBP (PXDLS), però es va pensar que potser les proteïnes podien estar interaccionant per algun altre domini. Es van fer tan assaigs de pulldown com immunoprecipitacions i en les condicions en les que es van fer els experiments no es va veure interacció (fig. RI.12)

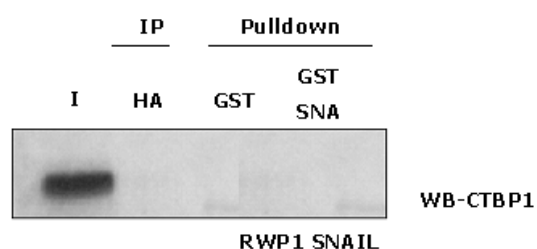


Figura RI.12. CtBP i Snail no interaccionen de manera directe. Les cèl·lules RWP1 eren transfectades amb 3 µg de Snail. Després de 48h es lisaven les cèl·lules amb tampó i es feien els diferents assaigs com s'explica els materials i mètodes. I, Input; IP, immunoprecipitació; HA, haemaglutinina.

Quan es va veure que no hi havia interacció directe es va pensar que potser Snail estava interaccionant amb CtBP de manera indirecte, és a dir, hi podia haver una proteïna pont entre Snail i CtBP. Com s'havien construït aquests mutants de Snail en el laboratori que encara que no podien unir-se al DNA, eren capaços de reprimir (fig. RI.6). Es va voler saber si aquests mutants també eren susceptibles al tractament amb E1A (fig. RI.13). En cèl·lules RWP1 es va poder observar que la repressió mitjançada pels mutants de Snail, es veia revertida en part per E1A. Aquests resultats es van obtenir tan en cèl·lules RWP1 com en MDCK.

Per tots aquests resultats es va pensar que l'acció repressora de Snail sobre el promotor d'E-cadherina venia mitjançada en part per CtBP, però que aquesta acció no era per una interacció directe entre Snail i CtBP, com es veu en els experiments de pulldown, sinó que es podria donar mitjançant l'acció d'una proteïna pont entre Snail i CtBP, que realitzaria la seva funció repressora de manera dependent de CtBP i que permetria als mutants de Snail interaccionar amb el DNA.

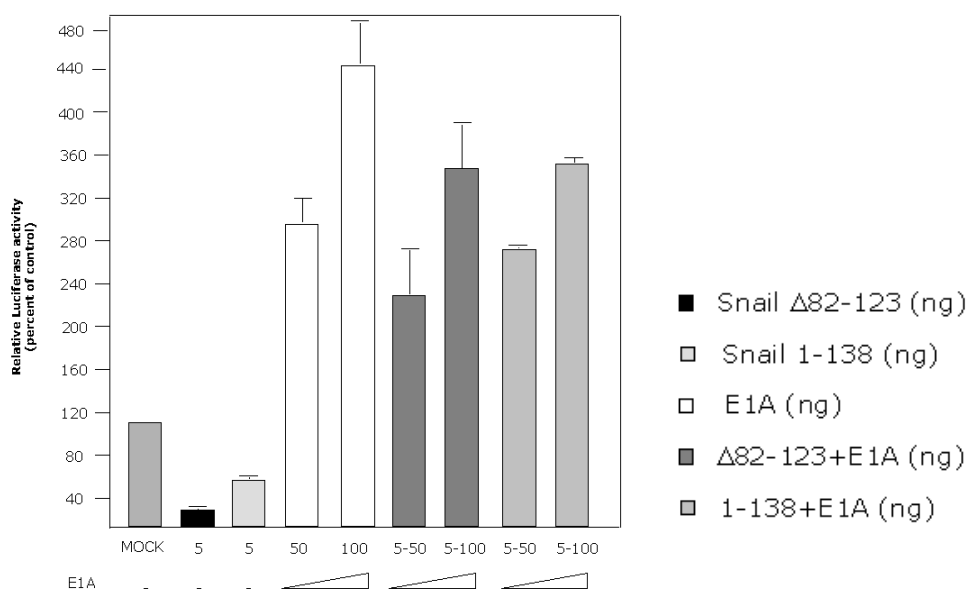


Figura RI.13. E1A es capaç de revertir parcialment l'acció repressora dels mutants de Snail en RWP1. Les cèl·lules RWP1 eren transfectades amb 250 ng de promotor de l'E-cadherina i 5 ng dels mutants de Snail o concentracions creixents d'E1A-pcDNA3, o ambdós. Tots els valors obtinguts es van normalitzar utilitzant l'activitat *luciferasa* de la *Renilla* (pRTK-Luc, 20 ng). Els resultats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, realitzats per triplicats. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

CtIP potencia l'efecte repressor de Snail sobre el promotor d'E-cadherina.

Va ser en aquest moment quan es va plantejar la possibilitat de que CtIP (CtBP Interaction Protein) participés en la repressió transcripcional de l'E-cadherina mitjançada per Snail. Es va transfectar les cèl·lules epitelials amb Snail i CtIP i es va mirar quin efecte tenien les dues proteïnes sobre l'activitat d'aquest promotor (fig. RI.14).

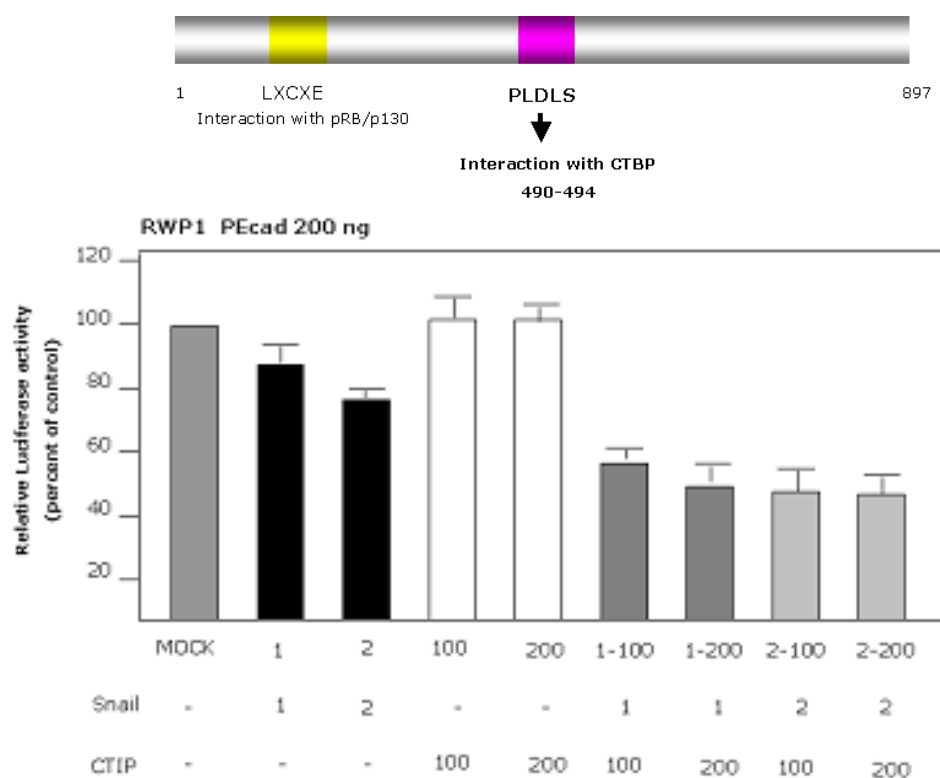


Figura RI.14. CtIP potencia l'efecte repressor de Snail sobre el promotor d'E-cadherina en RWP1. Panell superior esquema de la proteïna CtIP; en la proteïna es destaquen dos dominis importants, un d'interacció amb CtBP (PLDLS) i l'altre d'interacció a pRB (LXCXE). Panell inferior; les cèl·lules RWP1 eren co-transfectades amb 200 ng de promotor de E-cadherina i concentracions creixents de Snail (1-2 ng; barres negres), CtIP (100-200; barres blanques) o ambdós (barres gris fosc, 1 ng de Snail; barres gris clar, 2 ng Snail). Tots els valors obtinguts es van normalitzar utilitzant l'activitat *luciferasa* de la *Renilla* (pRSV-Luc, 2.5 ng). Els resultats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, realitzats per triplicats. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

Es va observar que CtIP potenciava la repressió de l'E-cadherina per Snail. Seguidament es va estudiar el possible paper que podrien tenir les proteïnes que interaccionen amb CtIP en aquesta repressió.

Es van utilitzar dues proteïnes mutants de CtIP, una que no podia interaccionar amb CtBP (Δ PLDLS) i l'altre que no podia interaccionar amb Rb (Δ LXCXE) (fig. RI.15).

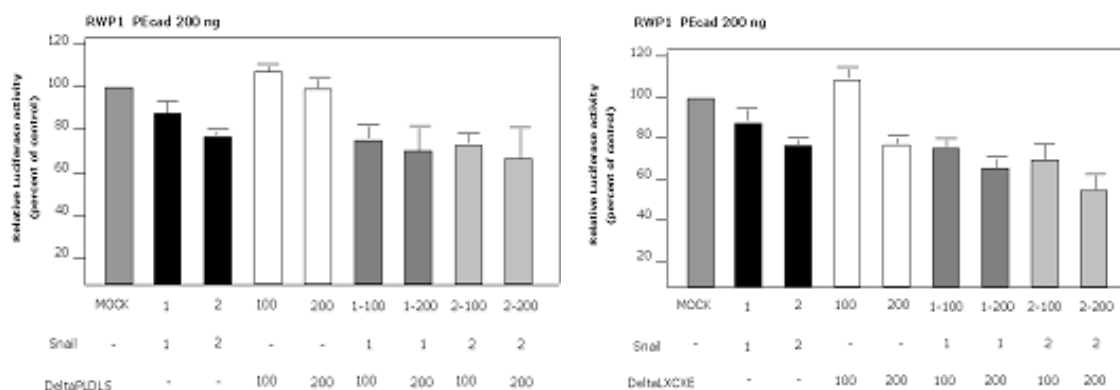


Figura RI.15. CtIP Δ PLDLS no potencia l'efecte repressor de Snail sobre el promotor d'E-cadherina en RWP1, però sí que ho fa el mutant Δ LXCXE. Les cèl·lules RWP1 eren co-transfectades amb 200 ng de promotor de E-cadherina i concentracions creixents de Snail (1-2 ng, barres negres) i/o CtIP Δ PLDLS (100-200, barres blanques) (panell esquerre), CtIP Δ LXCXE (100-200, barres blanques) (panell dret) o ambdós (barres gris fosc, 1 ng de Snail; i gris clar, 2 ng de Snail). Tots els valors obtinguts es van normalitzar utilitzant l'activitat *luciferasa* de la *Renilla* (pRSV-Luc, 2.5 ng). Els resultats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, realitzats per triplicats. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

El que es va poder observar va ser que encara que el mutant que no uneix Rb (Δ LXCXE) es comporta de manera bastant semblant a la proteïna wt quan l'afegim amb Snail, el mutant que no pot unir CtBP (Δ PLDLS) no té un efecte potenciador amb Snail tan evident. De totes maneres la diferència entre l'efecte repressor sinèrgic entre la proteïna wt i Snail; i la Δ PLDLS i Snail no era molt gran. Fins un 35% més de repressió al afegir CtIP wt a Snail i 15% més de repressió al afegir la Δ PLDLS a Snail. Així doncs es va pensar que CtBP podia tenir un cert paper en aquesta repressió però també es va creure que hi podia haver un mecanisme CtBP-independent.

CtIP potencia l'efecte repressor de Snail sobre el promotor VDR.

Es va voler estudiar si algun altre promotor epitelial era susceptible de ser regulat pel sistema Snail/CtIP. Ens vam centrar en el promotor de VDR (fig.RI.16). El que es va poder observar era que , de la mateixa

manera com passa en el promotor de l'E-cadherina, CtIP potenciava l'efecte repressor de Snail sobre el promotor de VDR.

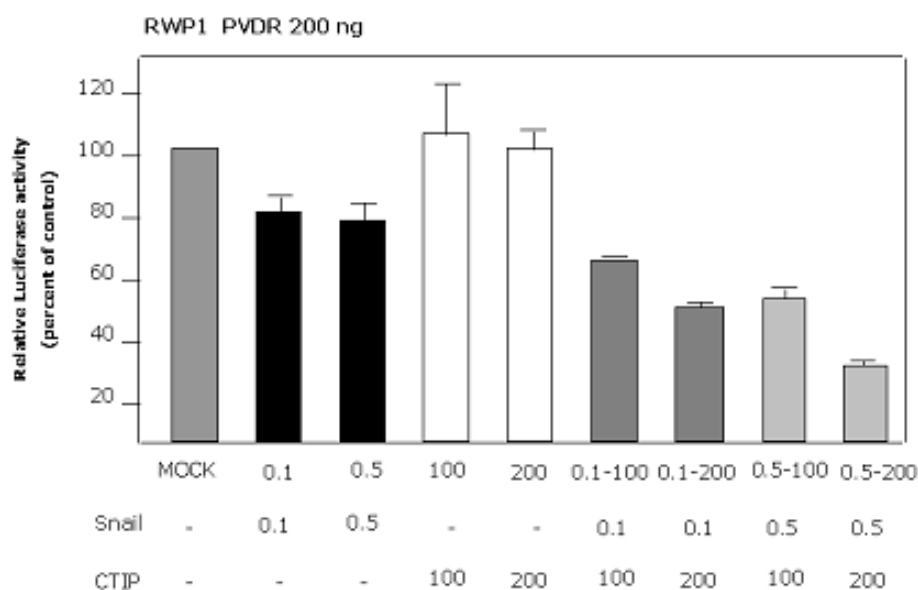


Figura RI.16. CtIP potencia l'efecte repressor de Snail sobre el promotor de VDR en RWP1. Les cèl·lules RWP1 eren co-transfectades amb 200 ng de promotor de VDR i concentracions creixents de Snail (0.1-0.5 ng, barres negres), CtIP (100-200, barres blanques) o ambdós (barres gris fosc, 0.1 ng Snail; barres gris clar, 0.5 ng de Snail). Tots els valors obtinguts es van normalitzar utilitzant l'activitat *luciferasa* de la *Renilla* (pRSV-Luc, 2.5 ng). Els resultats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, realitzats per triplicats. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

CtIP interacciona amb la sonda de l'E-cadherina solament en presència de Snail.

Es va voler estudiar que succeïa a nivell d'unió dels factors de transcripció al promotor. Per això vàrem utilitzar els assaigs "BOPA" (Biotinilated Oligonucleotide Precipitation Assay), per estudiar si les dues proteïnes podien interaccionar a la vegada amb el promotor de l'E-cadherina o si la unió d'una d'elles afavoria la unió de l'altre (fig.RI.17). El que es va poder observar va ser que CtIP solament s'unia a la sonda de l'E-cadherina en presència de Snail, però que en canvi no ho feien cap dels dos en la sonda inespecífica (SP1). Per aquest motiu es va pensar que Snail era necessari perquè CtIP arribés al promotor d'E-cadherina i pogués fer el seu efecte co-repressor. De totes maneres, i com es pot veure en la figura

RI.23, no es va veure interacció de CtBP en el complex, al menys en aquestes condicions.

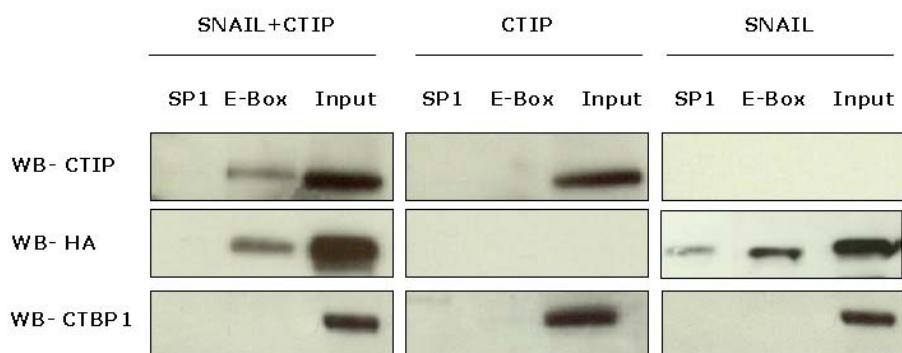


Figura RI.17. CtIP solament s'uneix a la sonda d'E-cadherina en presència de Snail.

Les cèl·lules RWP1 eren transfectades amb Snail (3 µg), CtIP (3 µg) o ambdós. A les 48h es lissaven les cèl·lules amb RIPA i es feia l'assaig BOPA com s'explica a materials i mètodes. Seguidament es feia una wb contra cada proteïna.

CtIP estabilitza la proteïna Snail.

Recentment s'ha descrit que la proteïna Snail podria ser molt inestable i susceptible de degradació pel proteasoma després d'haver estat fosforilada per GSK-3β (Zhou et al 2004). Es va pensar que potser el que succeïa en les nostres cèl·lules era que CtIP estava retenint Snail al nucli i l'estava protegint en front a una ràpida degradació i que això afavoriria una millor repressió de Snail quan hi ha CtIP. Per això es va fer un assaig afegint cicloheximida (droga que inhibeix la traducció) a les cèl·lules i es va observar que passava en quan a la desaparició de la proteïna Snail (fig.RI.18). El que es va observar va ser que en presència de CtIP Snail era degradat molt lentament, això va fer pensar que CtIP podia estabilitzar la proteïna i que això podia ser degut a que les dues estiguessin enganxades a les caixes E, al menys del promotor de l'E-cadherina (fig.RI.17). Es possible que aquest efecte sigui degut a una major unió de Snail al DNA en presència de CtIP.

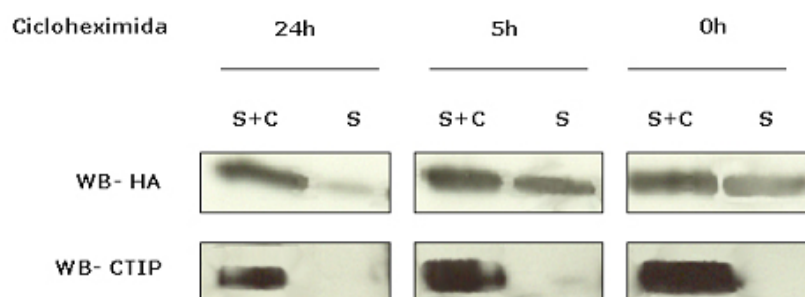


Figura RI.18. CtIP estabilitza Snail en cèl·lules RWP1. Les cèl·lules RWP1 eren transfectades amb Snail (3 µg), CtIP (3 µg) o ambdós. A les 48h s'afegia Cicloheximida (25 µg/µl) i es lisaven les cèl·lules amb RIPA als diferents temps indicats a la figura. Seguidament es feia una wb contra cada proteïna.

Snail i Zeb1 reprimeixen el promotor d'E-cadherina de manera additiva.

Es va voler estudiar el possible paper d'altres factors de transcripció en el mecanisme de repressió transcripcional de Snail. Com s'ha dit anteriorment, s'havia trobat que Snail no era capaç d'interaccionar directament amb CtBP, però per altra banda s'havia vist que la repressió del promotor de l'E-cadherina venia mitjançada en part per CtBP. Així doncs, es va començar a fer un cribatge de factors de transcripció que poguessin unir CtBP i alhora que reconeguessin seqüències 5'-CACCTG. Es va estudiar en un primer moment el repressió transcripcional per factors de la família de *zfh* (Zeb1 i Zeb2) (fig. RI.19 a i b).

Es va veure que Zeb1 era capaç de reprimir el promotor de l'E-cadherina de manera dosi-depenent, fins un 80% de repressió, encara que per obtenir la màxima capacitat repressora necessitàvem molta més quantitat de Zeb1 que de Snail. Pel contrari, en les nostres condicions, Zeb2 reprimia bastant malament el promotor d'E-cadherina, amb un màxim de repressió del 40%.

De la mateixa manera també es va poder observar que Zeb1 reprimia un altre promotor epitelial, el promotor de MUC1 de manera dosi-depenent i que de nou, Zeb1 necessitava més quantitat de proteïna per aconseguir el mateix nivell de repressió (fig. RI.19c).

En aquest moment es va plantejar quin seria el paper repressor dels dos factors de transcripció alhora, i el que es va observar va ser que Snail i Zeb1 reprimien el promotor de l'E-cadherina de manera additiva (fig. RI.19a).

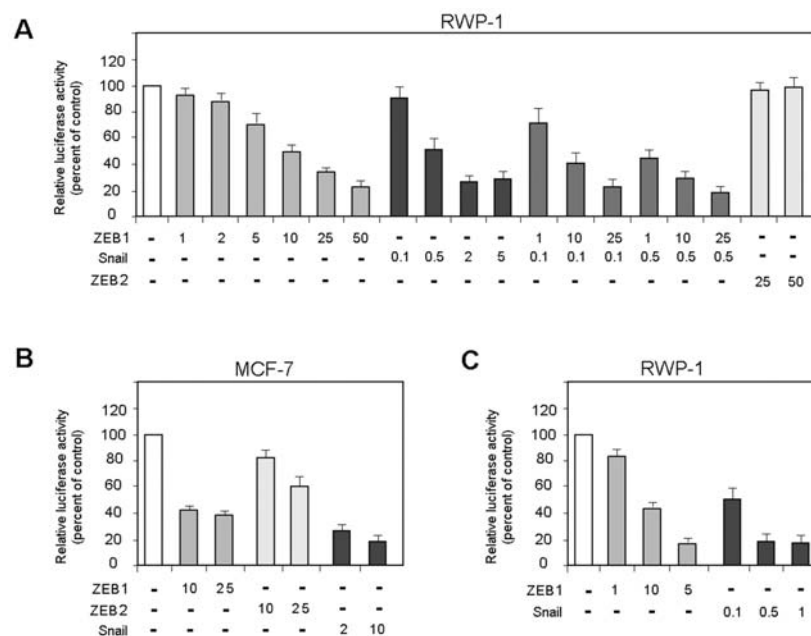


Figura RI.19. Snail i Zeb1 reprimeixen el promotor d'E-cadherina de manera additiva en RWP1. Les cèl·lules RWP1 eren co-transfectades amb 250 ng de promotor de E-cadherina (a i b) o promotor de MUC1 (c) i concentracions creixents de Snail (0.1-5 ng), Zeb1 (1-50 ng) i Zeb2 (10-50 ng). Tots els valors obtinguts es van normalitzar utilitzant l'activitat *luciferasa* de la *Renilla* (pRSV-Luc, 5 ng). Els resultats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, realitzats per triplicats. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

Es va voler estudiar si aquest efecte de repressió additiva que es veia entre Zeb1 i Snail també el podíem observar entre Zeb2 i Snail. Per això es van utilitzar cèl·lules MCF-7 (cèl·lules de mama humanes), doncs són les cèl·lules on el nostre grup havia vist una repressió més efectiva de Zeb2 sobre el promotor d'E-cadherina (fig. RI.19b).

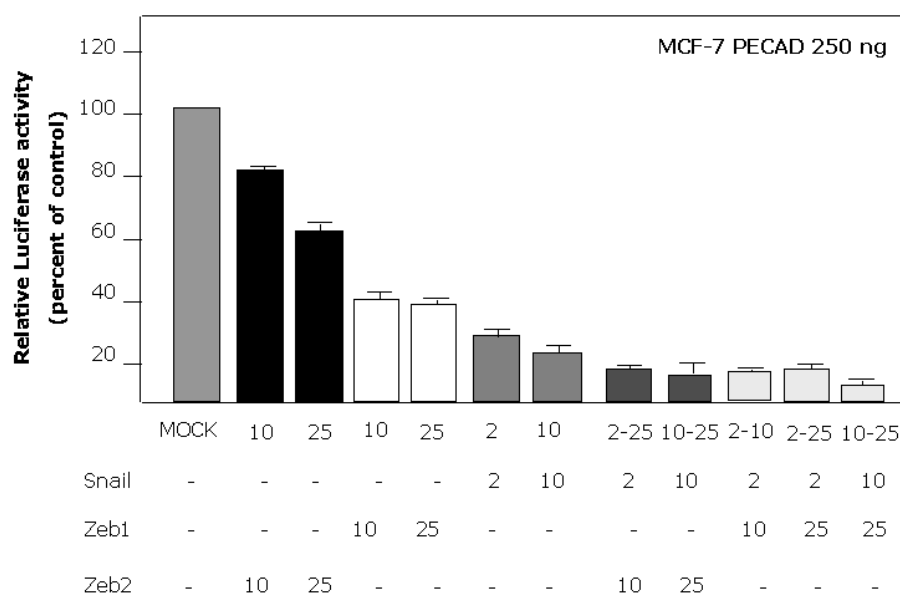


Figura RI.20. Snail i Zeb2 també reprimeixen el promotor d'E-cadherina de manera additiva en MCF-7. Les cèl·lules MCF-7 eren co-transfectades amb 250 ng de promotor de E-cadherina i concentracions creixents de Snail (2-10 ng), Zeb1 i Zeb2 (10-25 ng). Tots els valors obtinguts es van normalitzar utilitzant l'activitat *luciferasa* de la *Renilla* (pRSV-Luc, 5 ng). Els resultats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, realitzats per triplicats. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

Tal i com s'havia observat en el cas de Snail i Zeb1, també es va veure que Snail i Zeb2 reprimeixen el promotor de l'E-cadherina de manera additiva (fig.RI.20).

Es va estudiar si les mutacions en les caixes E del promotor de l'E-cadherina afectarien el mecanisme de repressió de Zeb1 (fig. RI.21). Es va observar que, com passava amb Snail, Zeb1 reprimeix la transcripció de manera dependent de les caixes E, ja que quan el promotor tenia les tres caixes mutades Zeb1 ja no podia reprimir. A més, es va poder observar que la caixa 3 era la més important pel mecanisme de repressió de Zeb1, seguida per la caixa 2. Mentre que la mutació de la caixa 1 afecta molt poc la repressió mitjançant Zeb1.

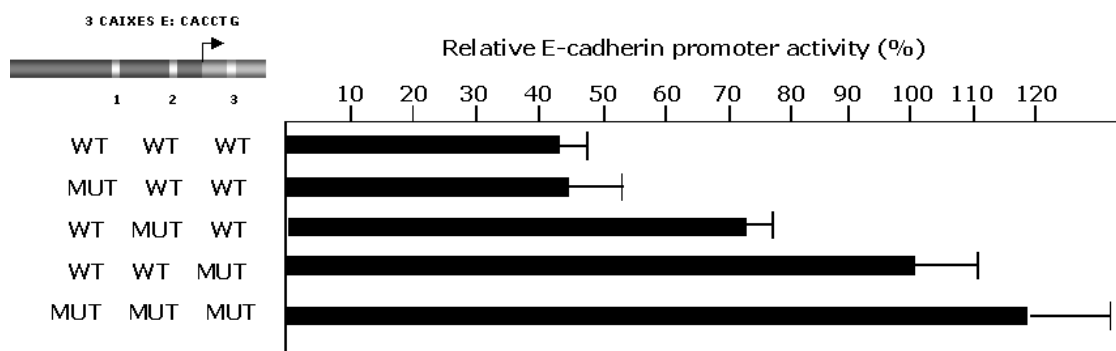


Figura RI.21. La mutació de les caixes E afecta la repressió del promotor de l'E-cadherina per Zeb1. El pGL3-Ecad -178/+92 (wt) o el mateix plàsmid contenint mutacions en les diferents caixes E era co-transfectat en les cèl·lules MDCK juntament amb pRLtk i el pcDNA3-Zeb1 o el vector pcDNA3 buit (25 ng). Les dades són expressades com a activitat Luc en presència del Sna exogen com a percentatge de l'activitat del mateix reporter en transfeccions suplementades amb vector control. Els resultats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, realitzats per triplicats. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

CTBP contribueix en part a la repressió transcripcional de l'E-cadherina que es dona per part de Zeb1, però no en la repressió transcripcional del promotor de MUC1.

S'havia descrit que Zeb1 podia utilitzar com a co-repressor a la proteïna CTBP (Postigo et al 1999). Es va voler estudiar si en el cas de la repressió transcripcional sobre el promotor de l'E-cadherina el que succeïa era això mateix. Basant-nos en la mateixa teoria anteriorment descrita d'E1A, es van realitzar els mateixos assaigs fets prèviament amb Snail i promotor d'E-cadherina, però ara el repressor transcripcional va ser Zeb1 (fig. RI.22)

Es va veure que E1A era capaç de revertir completament la repressió de Zeb1 a baixes concentracions del factor de transcripció, però pel contrari la reversió era més difícil si s'hi afegia gran quantitat de Zeb1.

Es va estudiar que passava amb la repressió transcripcional mitjançant Zeb1 sobre el promotor de MUC1. Es va veure que aquest mecanisme de repressió depenent de CTBP que es donava en el promotor de l'E-cadherina no es donava en el cas del promotor de MUC1 (fig. RI.22,

panell dret), un altre promotor epitelial. Això mateix era el que succeïa amb Snail.

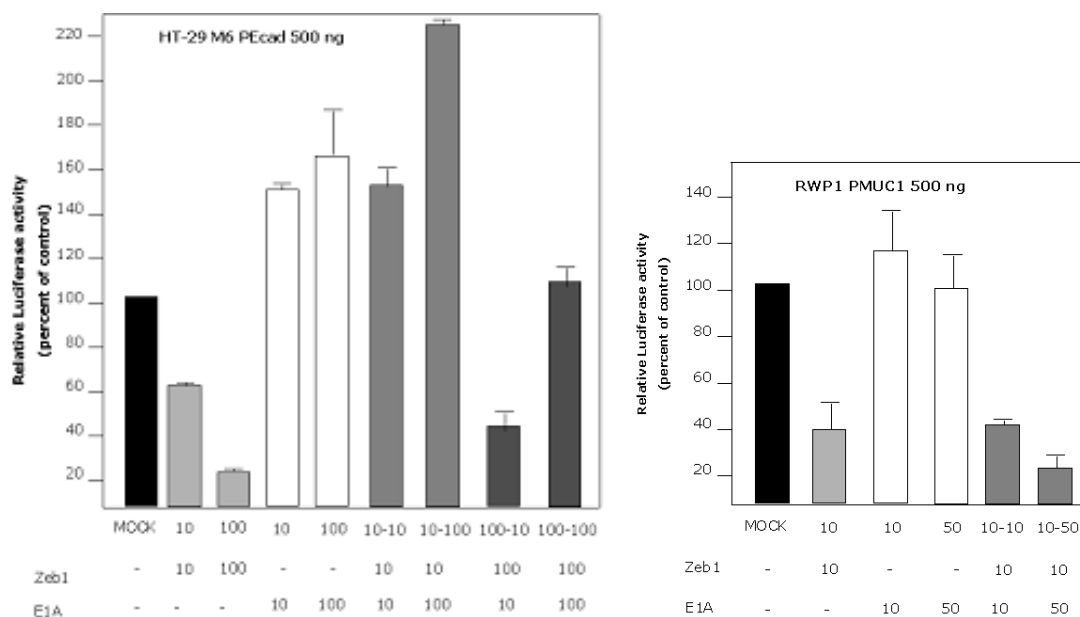


Figura RI.22. E1A es capaç de revertir parcialment l'acció repressora de Zeb1 sobre el promotor de l'E-cadherina, però no sobre el promotor de MUC1. Les cèl·lules HT-29 M6, a la dreta i les RWP1 a l'esquerra, eren transfectades amb 500 ng de promotor de l'E-cadherina o promotor de MUC1 i concentracions creixents tan de Zeb1 com d'E1A-pcDNA3, o ambdós. Tots els valors obtinguts es van normalitzar utilitzant l'activitat *luciferasa* de la *Renilla* (pRTK-Luc, 30 ng). Els resultats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, realitzats per triplicats. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

Snail i Zeb1 no interaccionen *in vivo*.

Es va pensar en aquest moment que la repressió additiva que es veia al afegir els dos repressors sobre el promotor de l'E-cadherina, podia ser degut a que les dues proteïnes podien interaccionar. Es van realitzar experiments de pulldown i d'immunoprecipitació, i el que es va poder observar era que els dits de Zinc del domini N-terminal, podien interaccionar amb el domini N-terminal de Snail (fig. RI.23). No obstant, l'associació no va poder ser detectada *in vivo* mitjançant assaig de Co-Immunoprecipitació, tot i que ho vàrem intentar repetidament.

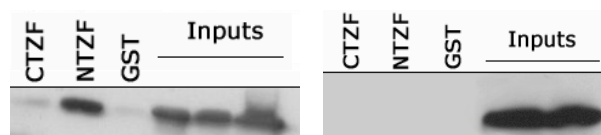


Figura RI.23. Snail i Zeb1 interaccionen *in vitro* pel fragment N-terminal de les dues proteïnes. Les cèl·lules RWP1 eren transfectades amb 3 μg de Snail-wt (panell de l'esquerra) o CT-Snail (panell de la dreta). Després de 48h es lisaven les cèl·lules amb tampó i es feien els diferents assaigs com s'explica els materials i mètodes. I, Input; Wb HA.

CAPÍTOL II: REGULACIÓ DE L'EXPRESSION DE ZEB1 EN LA TEM.

Snail i Zeb1 es coexpressen en línies cel·lulars tumorals.

Com s'ha dit abans, Zeb1 és un repressor transcripcional capaç, com Snail, de reprimir l'activitat del promotor de l'E-cadherina. Primerament, l'expressió de Snail i Zeb1 va ser analitzada en una col·lecció de línies cel·lulars epitelials. Degut als baixos nivells de RNA dels factors de transcripció presents en la preparació de RNA total, es va utilitzar RT-PCR per detectar Snail i Zeb1. Es va veure una clara correlació positiva entre l'expressió de Snail i l'expressió de Zeb1 (fig. RII.1). Aquesta correlació positiva no es veia en cap cas amb Zeb2 (un altre membre de la família de factors de transcripció *zfh*).

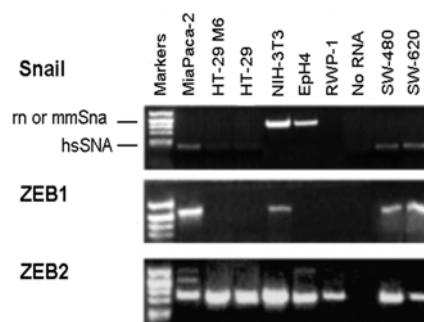


Figura RII.1. Expressió de Snail i Zeb1 en línies cel·lulars epitelials. L'expressió de l'E-cadherina era analitzat per western blot utilitzant lisats en SDS del conjunt de cèl·lules indicades (panell superior). L'expressió del RNA del Snail humà, de ratolí, i de rata; Zeb1 i Zeb2 era analitzada per RT-PCR com es descriu als materials i mètodes (panell inferior). Els oligonucleòtids utilitzats per l'amplificació dels Zebs reconeixen la forma humana, de rata i murina; els usats per Snail de ratolí (mmSna) també reconeixen el cDNA de rata (rn).

Snail promou la inducció de Zeb1 en els transfectants de Snail.

La participació de Snail en l'activació de Zeb1 va ser evidenciada pels resultats en els transfectants per Snail. Els clons de les MDCK transfectades amb Snail també mostraven nivells augmentats del RNA de Zeb1 (fig. RII.2 panell superior esquerre). Aquest mecanisme semblava que no era exclusiu dels clons de les MDCK, ja que els clons d'Ht-29 M6 que expressen Snail tenen els nivells de Zeb1 augmentats (fig. RII.2 panell superior dret). Un estudi més detallat va ser realitzat en aquests clons treient profit de la

regulació de l'expressió d'aquest gen per l'anàleg de la tetraciclina: doxiciclina (dox). La transcripció del RNA de Zeb1 va ser detectada solament després de que l'expressió del RNA de Snail fos induïda treient la dox del medi (fig. RII.2, panell inferior). L'expressió de Snail era detectada 4 dies després de treure la dox del medi, precedint lleugerament l'expressió de Zeb1, el qual necessitava 8 dies. Per tant, l'expressió de Snail es suficient per marcar l'augment del RNA de Zeb1. Per altra banda, quan l'expressió de Snail era apagada afegint dox, el RNA de Zeb1 no desapareixia immediatament, així com ho feia Snail, però disminuïa gradualment. L'estabilitat de l'expressió del RNA de Zeb1 en absència de Snail suggereix que Zeb1 podria possiblement prolongar la repressió de gens epitelials iniciada per Snail.

L'homòleg de Zeb1, Zeb2, també descrit com a un repressor de l'E-cadherina (Comijn et al 2001), de qualsevol manera, no respon a l'activació per Snail en cap dels nostres experiments, i la seva expressió no correlaciona amb la de Snail en les línies cel·lulars epitelials testades; Zeb2 era detectat en totes les línies cel·lulars analitzades (fig. RII.1 i 2, panell superior esquerre).

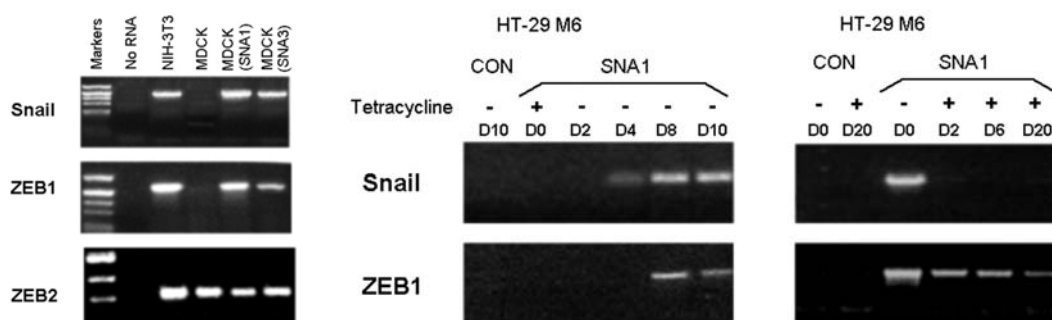


Figura RII.2. Snail promou l'expressió de Zeb1 en els transfectants per Snail tan en les MDCK com en les HT-29 M6 regulats per tetraciclina. Panell superior esquerra; anàlisi de RT-PCR dels RNAs per Snail, Zeb1 i Zeb2 en els clons de MDCK que expressen de manera estable Snail. El RNA de Zeb1 i Zeb2 caní era amplificat utilitzant els primers obtinguts de les seqüències dels Zeb1 humans. Panell superior dreta, El RNA era obtingut de cèl·lules HT-29 M6 control o transfectades amb Snail (Sna1/Sna2) pel procediments estàndards. Panell inferior, expressió de Zeb1 després de la inducció de Snail. El clon Sna1 de les HT-29 M6 era cultivat amb DMEM més FCS (10%) en presència de doxiciclina (2 μ /ml) durant 30 dies. La inducció de Snail era aconseguida quan es treia la doxiciclina del medi els dies indicats (D). Les cèl·lules control eren crescudes en absència de doxiciclina. Panell de la dreta, expressió de Zeb1 després de la repressió de Snail. Les cèl·lules HT-29 M6 Sna1 eren crescudes en absència de doxiciclina; l'expressió d'aquest gen era reprimida afegint dox al medi de creixement els dies indicats. Els nivells de RNA de Snail i Zeb1 eren analitzats per RT-PCR. D0 correspon al dia quan la dox era afegida (panell de la dreta) o retirada (panell de l'esquerra). CON, control. Les amplificacions dels RNAs per RT-PCR "One-Step" eren realitzades amb 500 ng de RNA total, i els productes eren separats en gels d'agarosa de 1.5% i 2%. La seqüències dels oligonucleòtids es van descriure en els materials i mètodes, i les mides dels fragments amplificats corresponien als esperats. El primer carril correspon a marcador de DNA de baix pes molecular (MBI, Fermentas): 908, 659-656,521,4.03,283,257 i 226).

Els clons transfectants per Snail indueixen també la proteïna de Zeb1.

Es va voler estudiar si la correlació positiva que es donava a nivell de RNA entre Zeb1 i Snail, també es donava a nivell de proteïna. Amb aquest objectiu es van fer assaigs de immunofluorescència amb anticòsols contra Zeb1 en clons estables per Snail de les cèl·lules MDCK i HT-29 M6 (fig.RII.3). Un clar augment de Zeb1 era detectat en el nucli dels clons que expressen Snail de les HT-29 M6 i de les MDCK.

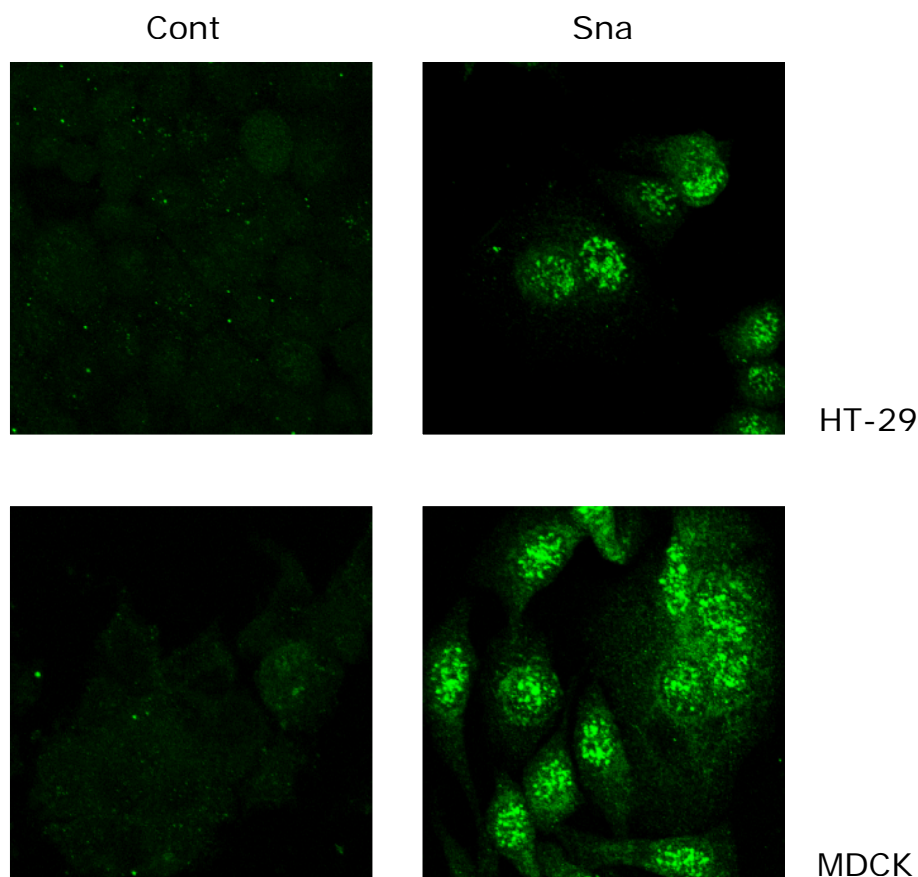


Figura RII.3. Snail promou l'expressió de la proteïna de Zeb1 en els transfectants per Snail. Es van realitzar immunofluoresències de Zeb1 en les cèl·lules que expressaven de manera estable Snail (MDCK i HT-29 M6), en el panell de la dreta. A l'esquerra, immunofluoresència de Zeb1 en les cèl·lules control.

Caracterització del promotor de Zeb1. L'inici de transcripció de Zeb1 es troba a 19 pb d'ATG (inici de traducció).

Per determinar quins factors regulen directament l'expressió de Zeb1, es va amplificar i aïllar un fragment de 1036 pb corresponents a la regió per sobre de l'inici de traducció. Quan es va analitzar la seqüència i es va poder observar que el promotor de Zeb1 no té TATA. L'inici de transcripció va ser determinat utilitzant l'amplificació de cDNAs de 5' (RACE) i el RNA aïllat de les cèl·lules i Mia-Paca-2, dues línies cel·lulars amb alts nivells de RNA de Zeb1 (fig. RII.4, es van obtenir els mateixos resultats en les cèl·lules SW620). Es van obtenir dos fragments, un amb l'oligonuclèotid low (U12170; 1707-1688) d'uns 1000 pb i l'altre amb l'oligo +7 (U12170) de

menys de 100pb. La seqüenciació d'aquests fragments va demostrar que el 5'-CTAAAT-3' eren les últimes bases de cDNA que eren amplificades, pel que l'inici de transcripció va ser identificat en una Adenosina (en vermell a la figura) localitzada a -19 pb respecte d'ATG (inici de traducció).

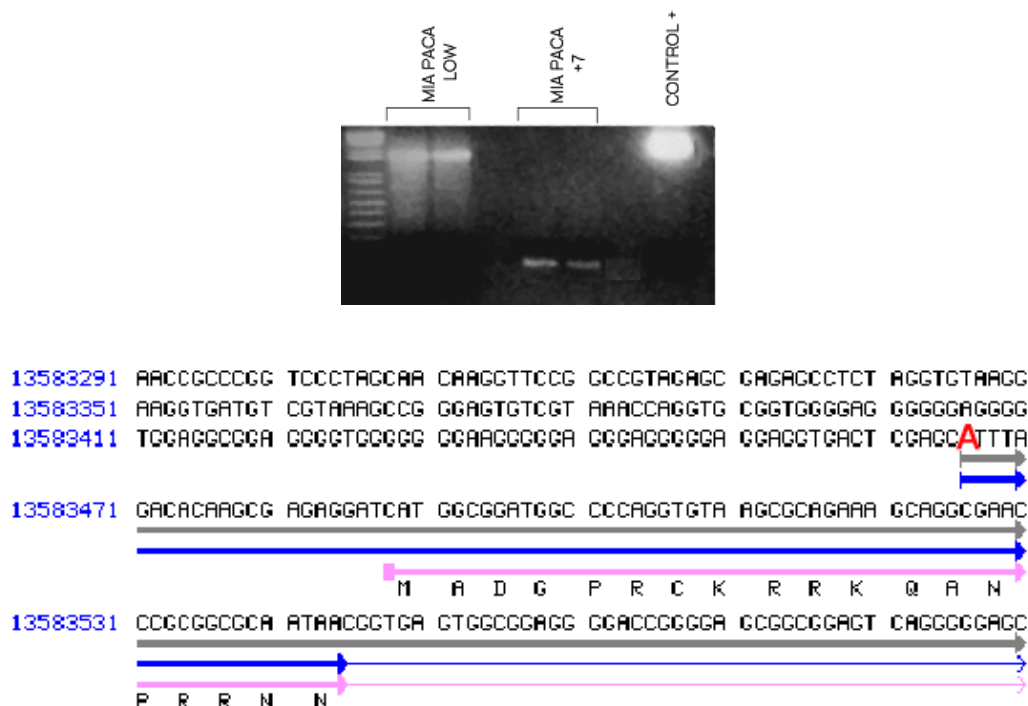


Figura RII.4. Determinació de l'inici de transcripció del promotor de Zeb1. Dos fragments del DNA humà situats a 5'-upstream de la seqüència codificant per Zeb1 va ser amplificat com es descriu a materials i mètodes. L'inici de transcripció va ser determinat utilitzant el RACE i 1µg de RNA de les cèl·lules Mia-Paca-2; els fragments amplificats van ser analitzats en gels d'agarosa i les bandes visualitzades amb Bromur d'etidi. Seguint les instruccions de la casa comercial, RNA de placenta humana i un oligonucleòtid corresponent al receptor de la transferrina van ser utilitzats com a control positiu. El primer carril correspon al marcador de pes molecular. Les dues bandes que es mostren van ser obtingudes utilitzant dos primers diferents dins del gen de Zeb1. Les bandes obtingudes van ser aïllades i seqüenciades. El nucleòtid a on s'inicia la transcripció va ser marcat en vermell.

Els promotors de Zeb1 tenen més activitat en les cèl·lules mesenquimals que en les cèl·lules epitelials.

Per estudiar l'activitat del promotor, es van preparar fragments a partir del promotor de -1010/+26. Els fragments obtinguts van ser els següent: -718/+26, -341/+26, -150/+26, -74/+26 i -10/+26 (fig. RII.5). Es van analitzar les activitats dels promotors en varies línies mesenquimals caracteritzades per tenir un alt nivell de mRNA de Zeb1 (SW620, SW480 i

Mai Paca-2). L'eliminació progressiva de les seqüències 5' "upstream" no afectava de manera molt substancial l'activitat del promotor, excepte quan s'eliminava el fragment de -150 fins a -74 en que l'activitat del promotor disminuïa molt i la caiguda era superior si s'eliminava el fragment de -74 a -10. D'acord amb els resultats mostrats els promotors que presenten el fragment de -1010 fins a -150 són els que presenten més alta activitat. Així doncs, la seqüència de -150/+26 va ser denominat com a promotor mínim de Zeb1.

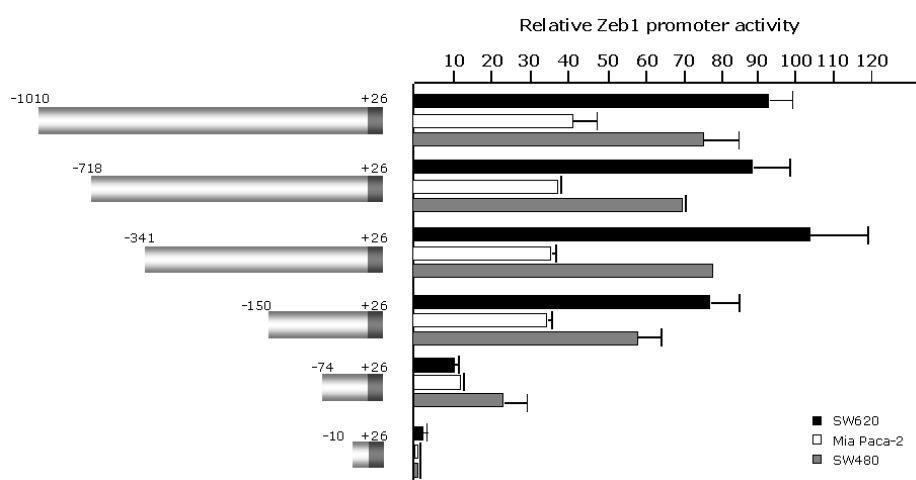


Figura RII.5. Determinació del promotor mínim de Zeb1. Es van fer delecions progressives del promotor llarg de Zeb1 (-1010/+26) o bé per PCR, en el cas del P-718/+26, P-341/+26 i P-74/+26; o bé per digestió, en el cas de P-150/+26 i P-10/+26; com s'indica a materials i mètodes i van ser insertats en el pàsmid del pGL3. Les activitats de les diferents construccions va ser analitzades en tres línies cel·lulars; SW620, SW480 i Mia Paca-2. Es van transfectar 100 ng de cada construcció Els valors eren normalitzats utilitzant l'activitat de la luciferasa de la Renilla (pRSV-Luc, 5 ng). L'activitat Luc era expressada com a folds d'estimulació respecte pGL3 buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

L'activitat del promotor de Zeb1 llarg (-1010/+26) era més alta en cèl·lules mesenquimals (SW620) que en línies cel·lulars epitelials (HT-29 M6 o IEC-18) (fig. RII.6). Aquesta diferent activitat també era observada en el promotor mínim (-150/+26).

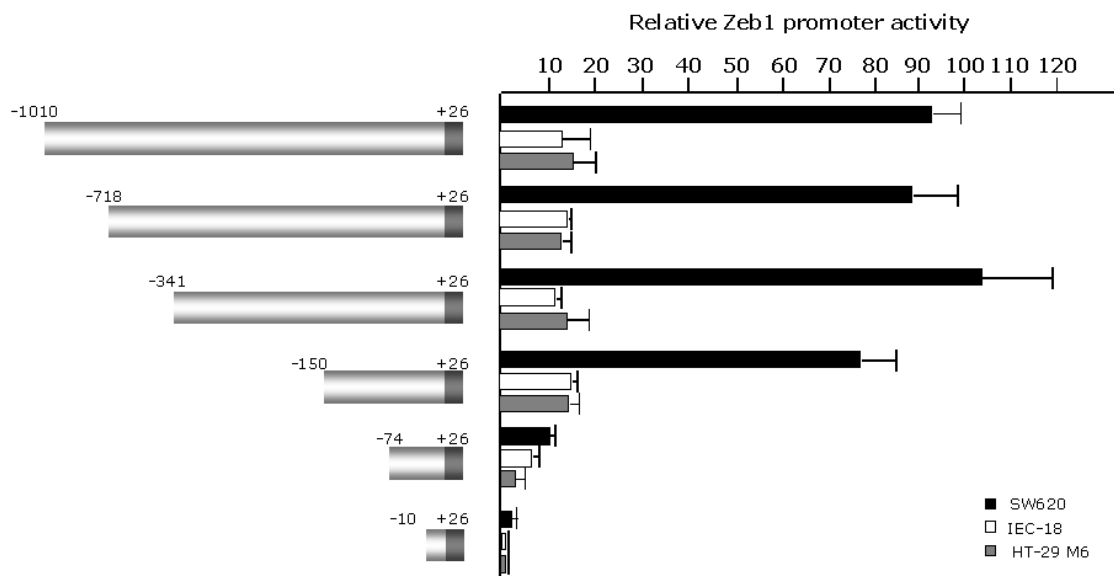


Figura RII.6. L'activitat dels promotors actius de Zeb1 era més alta en cèl·lules mesenquimals que en cèl·lules epitelials. Les activitats de les diferents construccions de les diferents construccions van ser analitzades en tres línies cel·lulars; SW620 (mesenquimal) i les IEC-18 i HT-29 M6 (ambdues epitelials). Es van transfectar 100 ng de cada construcció Els valors eren normalitzats utilitzant l'activitat de la luciferasa de la Renilla (pRSV-Luc, 5 ng). L'activitat Luc era expressada com a folds d'estimulació respecte pGL3 buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

Es va voler mirar que succeïa amb els diferents promotors i la resposta a Snail. I per això es van utilitzar els clons de les SW480 que expressen de manera estable Snail (fig. RII.7). En els clons que expressaven Snail, l'activitat dels diferents fragments dels promotors de Zeb1 era més alta que en les cèl·lules control. Aquests resultats ja havien estat obtinguts a nivell de RNA (fig. RII.2; veure també fig. RII.14)

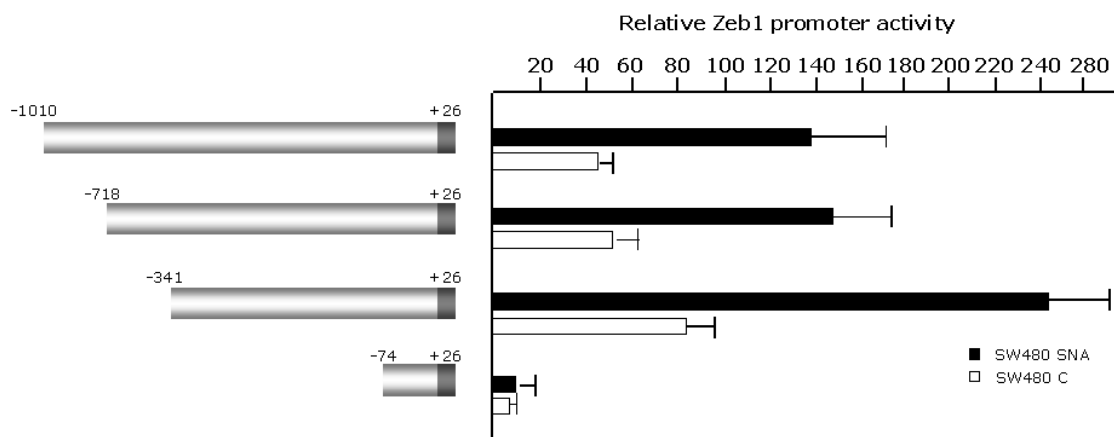


Figura RII.7. Snail activa el promotor de Zeb1. Les activitats dels diferents promotors va ser analitzades en les cèl·lules SW480 C i els clons transfectats de manera estable amb Snail. Es van transfectar 100 ng de cada construcció Els valors eren normalitzats utilitzant l'activitat de la luciferasa de la Renilla (pRSV-Luc, 5 ng). L'activitat Luc era expressada com a folds d'estimulació respecte pGL3 buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard

El promotor mínim de Zeb1 es sensible a les senyals que indueixen Zeb1 en cèl·lules epitelials.

Per tal d'estudiar els factors precisos que regulen l'expressió de Zeb1, es va aïllar i caracteritzar el promotor humà de Zeb1 i es va demostrar que aquest promotor respon a senyals que indueixen la TEM, entre els quals es troba Snail. Per aquest fi, es van utilitzar varis sistemes cel·lulars on es pot induir la TEM. Les cèl·lules anteriorment descrites que expressen de manera estable i/o induïble Snail (MDCK i HT-29 M6). Les IEC-18 que sobre-expressen l'ILK (Novak et al 1998) o l'oncogen Ha-Ras (Coso et al 1995) i les cèl·lules HT-29 M6 que expressen una forma activada de cPK-C α (Batlle et al 1998). Totes aquestes cèl·lules mostren baixos nivells d'E-cadherina i alts nivells de Snail (fig. RII.8). Es van analitzar els nivells de RNA corresponents a Zeb1.

L'augment de Zeb1 era detectat en els tres sistemes cel·lulars (ILK, Ha-Ras i cPKC- α (+)) per RT-PCR semi-quantitativa. No es van observar canvis pel que fa a Zeb2.

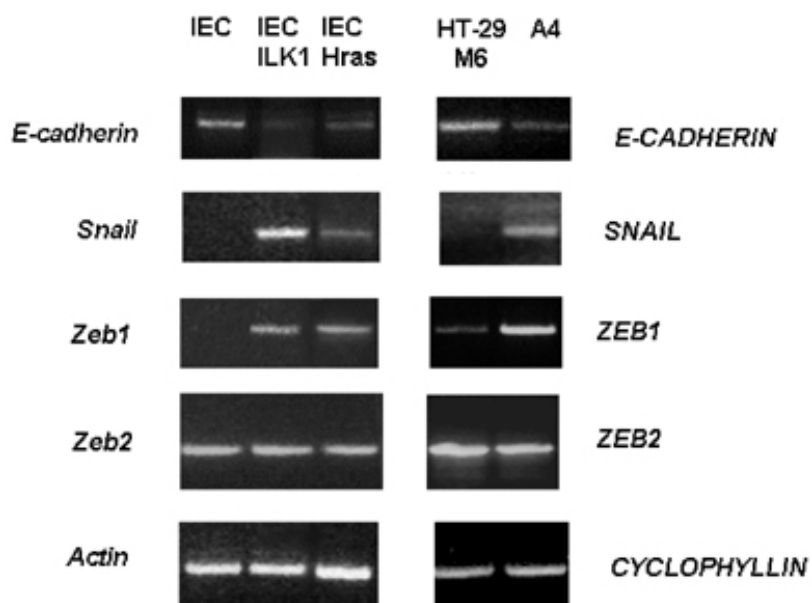


Figura RII.8. L'expressió d'Ha-Ras, ILK-1 i cPKC- α en les IEC-18 i les HT-29 M6 augmenten els nivells de mRNA de Zeb1. RNA va ser aïllat de les línies cel·lulars indicades i els nivells de mRNA van ser determinats per RT-PCR semi-quantitativa com es descriu a materials i mètodes. La ciclofilina i l'actina eren utilitzades com a controls en cèl·lules humanes i de rata, respectivament (Barberà et al 2004).

Seguidament es va estudiar les activitats dels diferents promotors de Zeb1 en aquests sistemes cel·lulars (fig. RII.9). Encara que el promotor de -74/+26 tenia una activitat basal en línies epitelials molt baixa, encara era capaç de respondre a estímuls que provenien d'ILK o cPKC- α , indicant que encara hi pot haver un element de resposta a TEM en aquest promotor, però tot i així, l'activitat d'aquest promotor dista molt de l'activitat del promotor mínim (-150/+26), així doncs, es considera que gran part de la resposta a les senyals per a l'activació de Zeb1 durant la TEM es troben entre el -150 i el -74 .

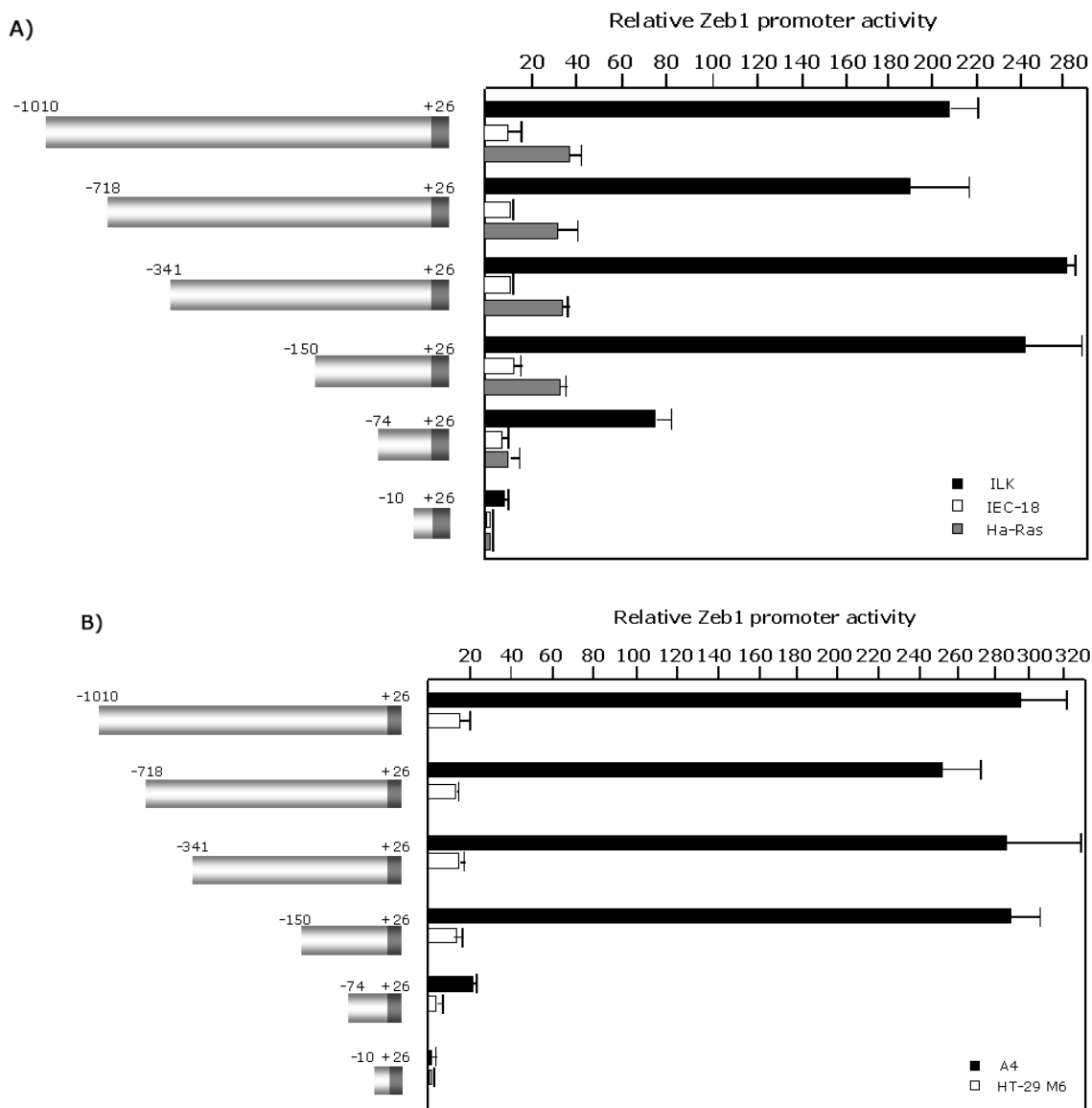


Figura RII.9. El promotor mínim de Zeb1 és sensible a les senyals que activen Zeb1 en les cèl·lules epitelials. Les activitats de les diferents promotors va ser analitzades en a: les línies cel·lulars IEC-18 i els clons estables ILK i Ha-Ras; i b: HT-29 M6 i el clon estable A4. Es van transfectar 100 ng de cada construcció Els valors eren normalitzats utilitzant l'activitat de la luciferasa de la Renilla (pRSV-Luc, 5 ng). L'activitat Luc era expressada com a folds d'estimulació respecte pGL3 buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard

La inducció del promotor de Zeb1 és sensible a PD98059, un inhibidor de MEK1/2.

L'activació de les vies de la Kinasa ERK2 i de la fosfatidilinositol-3 Kinasa (PI3K)/AKT s'han mostrat implicades en la TEM induïda per TGF- β i altres estímuls (Ellenrieder et al 2001; Grande et al 2002; Janda et al 2002; Bates i Mercurio 2003; Grille et al 2003; Peinado et al 2003). Es va mirar la rellevància d'aquestes dues vies en les nostres condicions experimentals. No es va veure efecte negatiu de la LY294002, un inhibidor de la PI3K àmpliament utilitzat (ni a nivell de promotor, ni a nivell de mRNA) en totes les línies utilitzades i amb una ampla gamma de concentracions. Pel contrari, es van observar un efecte activador sobre el promotor al afegir la droga, més aviat el contrari. Pel contrari l'inhibidor de MEK1/2 (PD98059) afectava de manera significativa l'activitat del promotor de Zeb1 a la dosis normalment usada (50 μ M) (fig. RII.10, panell superior). Aquesta disminució de l'activitat del promotor també es va poder observar a nivell de mRNA realitzant RT-PCR d'aquestes línies cel·lulars (fig. RII.10, panell inferior), així com també de línies mesenquimals com les SW620 (fig. RII.11).

El SB203580, un inhibidor de la p38 Kinasa, a concentracions per sobre de 10 μ M no modificava l'activitat del promotor, indicant que la via d'ERK, i no la de p38, afecta selectivament la transcripció de Zeb1 (fig. RII.10 dreta).

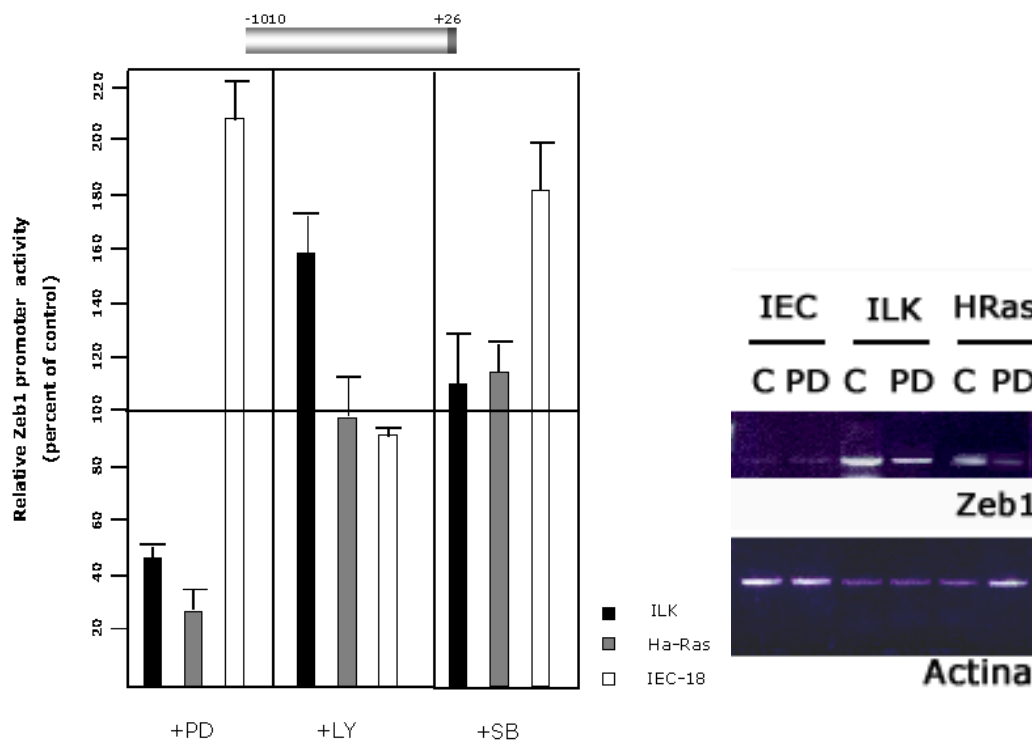


Figura RII.10. L'activitat del promotor de Zeb1 és dependent de l'activitat de la via d'ERK. Panell superior, les cèl·lules eren incubades amb PD98059 (+PD; 50 μ M) o bé LY294002 (+LY; 30 μ M) o bé amb SB203580 (SB; 10 μ M) o el vehicle (DMSO) durant 24h. Es van transfectar 100 ng de cada construcció Els valors eren normalitzats utilitzant l'activitat de la luciferasa de la Renilla (pRSV-Luc, 5 ng). L'activitat Luc era expressada com a % d'activitat del promotor respecte al control amb DMSO. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard. Panell inferior; es va realitzar RT-PCR de Zeb1 i actina (com a control) com es descriu a materials i mètodes, amb els RNAs obtinguts després de 24h de tractament amb les concentracions anteriorment descrites de PD.

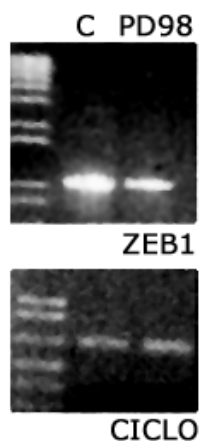


Figura RII.11. L'expressió de Zeb1 és dependent de l'activitat de la via d'ERK. Es va realitzar RT-PCR com es descriu a materials i mètodes, amb els RNAs de les cèl·lules SW620 obtinguts després de 24h de tractament amb les concentracions anteriorment descrites de PD.

En aquest moment es va voler caracteritzar quins podien ser els factors que estaven per sota d'aquestes vies i que eren els responsables de l'activació de Zeb1. Es va utilitzar un programa informàtic anomenat Tess que dóna llocs hipotètics d'unió per a factors de transcripció (fig. RII.12).

Es van realitzar una sèrie d'experiments amb factors de transcripció que tenien lloc d'unió putatiu en els promotors de Zeb1. Vàrem detectar un lloc putatiu per a TCF-4, que estaven a uns 160 pb de l'inici de transcripció, un lloc d'unió putatiu per NFκB, que es trobava entre el promotor de (-341/+26) i el (-718/+26) i per últim en caixes E presents en el promotor, llocs putatius d'unió pel factor de transcripció bHLH Twist o per Snail, per exemple.

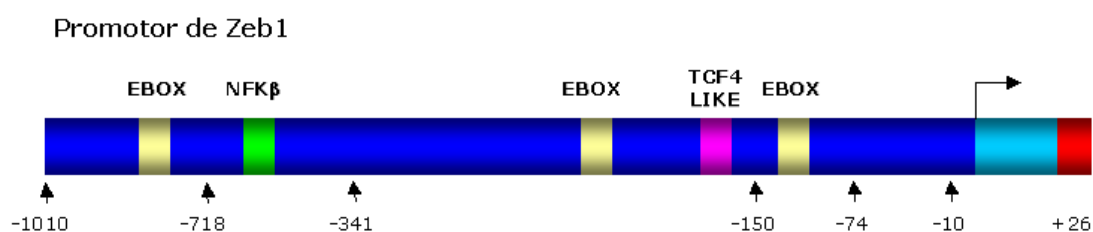


Figura RII.12. Esquema del promotor de Zeb1 (-1010/+26). Es va analitzar la seqüència del promotor de Zeb1 (-1010/+26) per mitjà d'un programa informàtic i es van obtenir una sèrie de llocs putatius per unió de diversos factors de transcripció, alguns d'ells es mostren en la figura.

VP-16 TCF-4 indueix el promotor (-1010/+26) de Zeb1 però no el (-150/+26).

Primerament ens va semblar interessant centrar-nos amb el lloc d'unió putatiu per TCF-4, ja que el complex β-catenina/TCF4 és un important complex activador. Es van fer assaigs reporters i es va estudiar que succeïa amb l'activitat de dos promotor un cop s'hi transfectava VP16-TCF4 (domini d'unió al DNA de TCF4 i domini transactivador de VP16) (fig. RII.13).

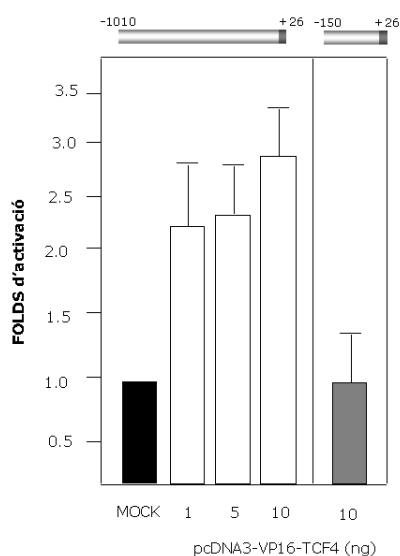


Figura RII.13. VP16-TCF4 activa el promotor de Zeb1 (-1010/+26), però no el (-150/+26). Les cèl·lules MDCK es van transfectar 100 ng de promotor de Zeb1 (-1010/+26) o de (-150/+26) i dosis creixents de VP16-TCF4 (1-10 ng). Els valors eren normalitzats utilitzant l'activitat de la luciferasa de la Renilla (pRSV-Luc, 5 ng). L'activitat Luc era expressada com a folds d'activació del promotor respecte al control amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

Els resultats obtinguts mostren com VP16-TCF-4 era capaç d'activar el promotor de Zeb1 (-1010/+26) però no així el (-150/+26). En aquest últim promotor no s'hi troba la caixa putativa per a TCF-4.

L'expressió ectòpica d'E-cadherina disminueix els nivells de mRNA de Zeb1.

Ens vam plantejar en aquest moment que la via de la β -catenina/TCF-4 estigués implicada en l'activació del promotor de Zeb1. Es va voler trobar un mecanisme per mitja del qual es pogués impedir la funció transcripcional del complex β -catenina/TCF-4.

S'havien realitzat uns clons estables al laboratori que podien expressar tan Snail o E-cadherina o ambdues proteïna a la vegada. Utilitzant aquests clons es va voler estudiar que succeiria amb l'expressió de Zeb1 si en la cèl·lula hi hagués co-expressió d'E-cadherina i de Snail (fig. RII.14)

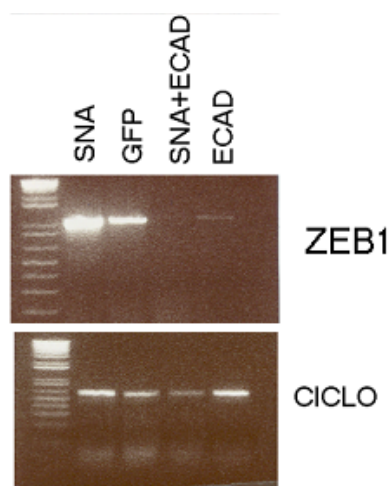


Figura RII.14. L'Expressió d'E-cadherina disminueix l'expressió de Zeb1. Es van fer clons estables de les cèl·lules SW480. Els diferents clons van ser els següents: GFP (com a control), Snail (SNA), E-cadherina (ECAD) i Snail més E-cadherina (SNA+ECAD). Es van obtenir els RNAs pel protocol de la casa comercial i es van realitzar les RT-PCR de Zeb1 i ciclofilina com s'indica als materials i mètodes. Com a control de càrrega es va utilitzar la ciclofilina (ciclo).

El que es va poder observar va ser que quan a la cèl·lula hi ha una alta expressió d'E-cadherina els nivells de Zeb1 disminueixen, independentment de la presència o no de Snail. Es va creure doncs que, en aquestes condicions en les quals la cèl·lula presentava alts nivells d'E-cadherina, l'activació de l'expressió de Zeb1 seria difícil, ja que la β -catenina es trobaria estabilitzada i localitzada en els contactes i no podria realitzar el seu mecanisme d'activació transcripcional. A més alguns grups també havien descrit que alts nivells d'E-cadherina cel·lular implicaven una disminució de la via de les MAPK i això també ens podria estar afectant a l'expressió del nostre gen.

VP-16 REL activa el promotor (-1010/+26) i també el mRNA de Zeb1.

També es va observar que en el promotor de Zeb1 es preveien llocs d'unió per varis factors de transcripció importants per a l'expressió d'aquest factor de transcripció en la gastrulació i que es va pensar que també podien ser importants en els nostres sistemes cel·lulars. Per una banda, es sabia que Snail clarament activava Zeb1 en les nostres línies cel·lulars. Ara ens vam centrar en altres factors implicats en la via d'activació de Zeb1 durant

el desenvolupament, concretament en dorsal/p65 i Twist. Primerament es va estudiar si la transfecció del domini d'interacció al DNA de p65 fusionat amb el trans-activador VP16 era capaç d'induir l'expressió de Zeb1 en varis tipus cel·lulars (RWP1 i MDCK)(fig. RII.15).

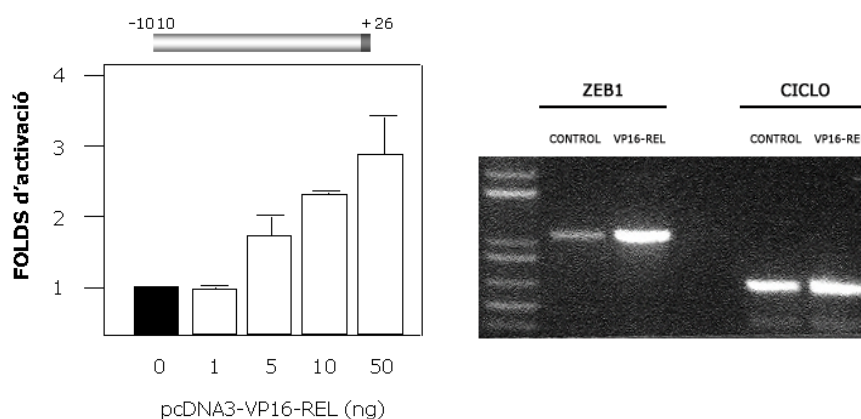


Figura RII.15. VP16-REL activa el promotor de Zeb1 (-1010/+26). Esquerra; Les cèl·lules RWP1 es van transfectar 100 ng de promotor de Zeb1 (-1010+26) i dosis creixents de VP16-REL (1-50 ng). Els valors eren normalitzats utilitzant l'activitat de la luciferasa de la Renilla (pRSV-Luc, 5 ng). L'activitat Luc era expressada com a folds d'activació del promotor respecte al control amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard. Dreta; les cèl·lules MDCK eren transfectades amb 3 µg de VP16-REL, a les 48h es feien "pools" amb les cèl·lules, de la següent manera, es seleccionaven amb genèticina (G418) durant una setmana i després s'extreia el RNA amb els mètodes estàndards. Seguidament es feia la RT-PCR com es descriu a materials i mètodes.

El que es va poder observar era que VP16-Rel activava el promotor de Zeb1 (-1010/+26) de manera dosi dependent en les cèl·lules RWP1 (els mateixos resultats van ser obtinguts en la línia cel·lular MDCK). Aquesta activació del promotor també es veia reflectida a nivell de RNA.

Snail i Twist activen la transcripció de Zeb1 de manera sinèrgica.

També ens va semblar molt interessant el fet de que en el promotor (-1010/+26) s'hi poden predir tres caixes E. Ens vam plantejar si hi podria haver alguns factors de transcripció que sent capaços d'unir-se a aquestes seqüències ens poguessin activar els nostres promotors, per exemple factors bHLH. Ens va interessar molt centrar el nostre estudi en Twist, un

factor clau en el desenvolupament embrionari i recentment descrit també per ser important en la metàstasi tumoral (Yang et al 2004). Es van utilitzar dos tipus cel·lulars, les MDA-MB 435 descrites pels autors per tenir alts nivells de Twist, a més nosaltres sabíem que també tenien alts nivells de Snail, i l'altre les MCF-7, que no tenen ni Twist ni Snail i es va estudiar que passava amb els nivells de Zeb1 (fig. RII.16).



Figura RII.16. Les cèl·lules de mama MDA-MB 435 tenen alta expressió de Twist i de Zeb1. S'extreia el RNA amb els mètodes estàndards de les cèl·lules MDA-MB 435 i MCF7 (ambdues de càncer de mama). Seguidament es feia la RT-PCR com es descriu a materials i mètodes per Twist, Zeb1 i HPRT (com a control).

Es va voler observar que passava si transfectàvem Twist i Snail en cèl·lules que no n'expressen de manera endògena. Per això es van transfectar les cèl·lules i es van seleccionar durant una setmana com s'explica a la figura RII.17 i seguidament es van fer les RT-PCR (fig. RII.17). Les cèl·lules que expressaven Snail (S) o Twist (T) per separat tenien un subtil augment de l'expressió de Zeb1, però aquest augment es feia clarament evident en els dobles transfectants (Snail + Twist: S+T).

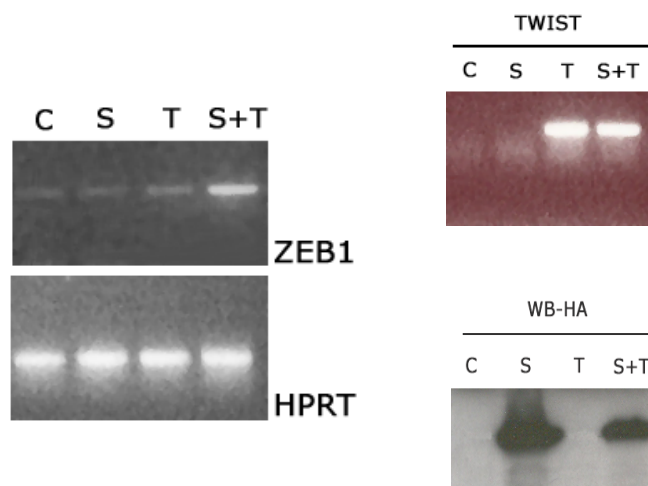


Figura RII.17. Snail i Twist indueixen l'expressió de Zeb1. Les cèl·lules RWP1 eren transfectades amb 3 μ g de Snail o Twist o ambdós, a les 48h es feien "pools" amb les cèl·lules, de la següent manera, es seleccionaven amb genèticina (G418) durant una setmana i després s'extreia el RNA o proteïna amb els mètodes estàndards. Seguidament es feia la RT-PCR o WB com es descriu a materials i mètodes. Panell esquerre RT-PCR de Zeb1 i com a control HPRT. El panell esquerre es va comprovar l'expressió de les diferents proteïnes transfectades en els pools (RT-PCR de Twists, superior, i WB contra HA, que ens detecta Snail, inferior). C, cèl·lules control; S, cèl·lules transfectades amb Snail; T, cèl·lules transfectades amb Twist; S+T, cèl·lules transfectades amb Snail i Twist.

Seguidament, es van transfectar de manera transitòria cèl·lules RWP1 o MDCK amb Snail o Twist o ambdós i es va observar que passava amb el promotor de Zeb1 (-1010/+26) (fig. RII.18).

Es va observar que Snail i Twist activaven el promotor de Zeb1 (-1010/+26) de manera sinèrgica i dosi-depenent, en les cèl·lules RWP1 (els mateixos resultats van ser observats en les cèl·lules MDCK).

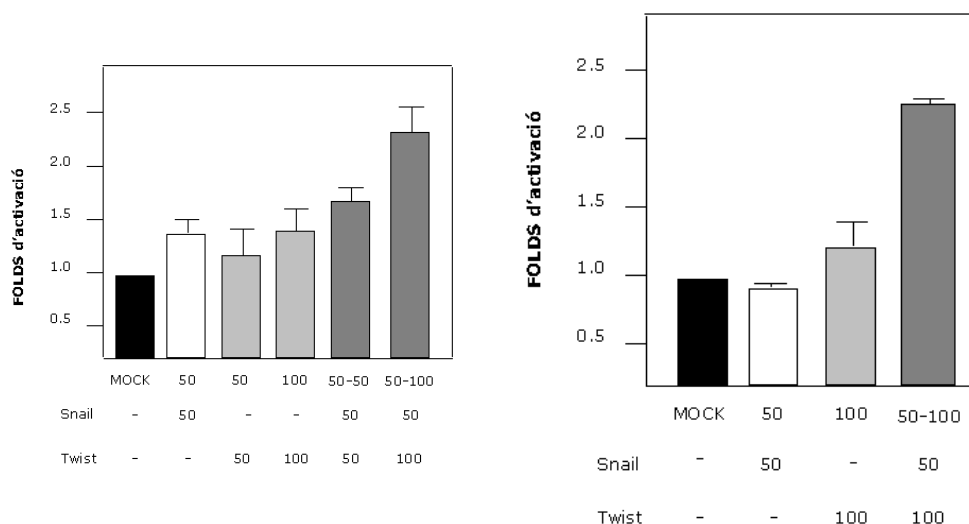


Figura RII.18. Snail i Twist activen el promotor de Zeb1 (-1010/+26) de manera sinèrgica. Panell superior, cèl·lules RWP1; Panell inferior; cèl·lules MDCK; ambdues es van transfectar 100 ng de promotor de Zeb1 (-1010+26) i Snail(50 ng) o dosis creixents de Twist (5-100 ng) o ambdós. Els valors eren normalitzats utilitzant l'activitat de la luciferasa de la Renilla (pRSV-Luc, 5 ng). L'activitat Luc era expressada com a folds d'activació del promotor respecte al control amb el plàsmid buit Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

Es va voler estudiar que succeïa amb l'activació sinèrgica del promotor quan s'anaven fent deleccions per 5' del promotor (fig. RII.19). El que es va observar va ser que a mida es feien deleccions per 5' del promotor de Zeb1, aquest cada vegada responia pitjor a l'activació per Snail i Twist, sent l'últim promotor que respon lleugerament, el promotor mínim. Les caixes E les trobem localitzades en els nucleòtids -857, -243 i -86.

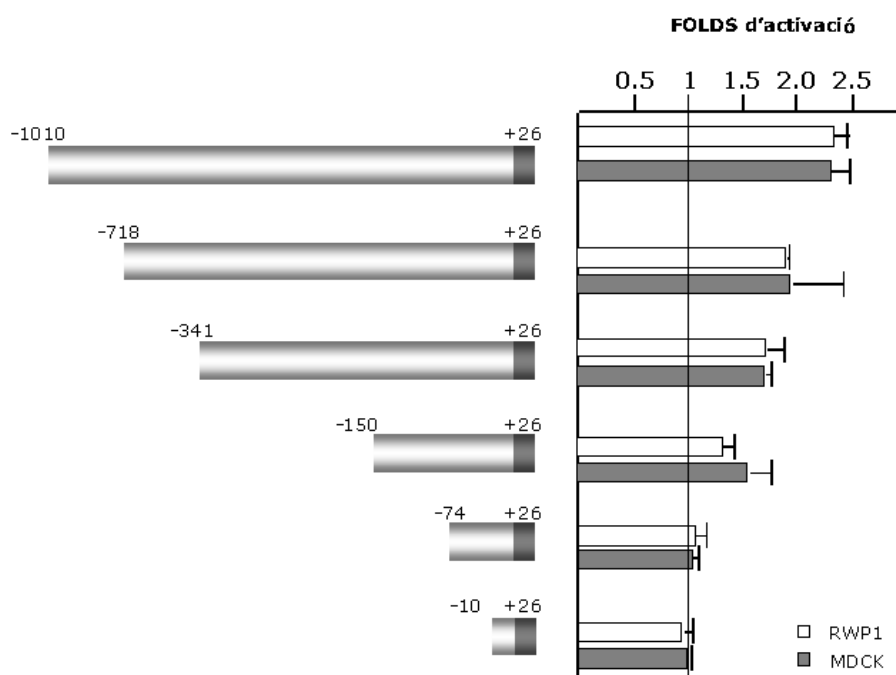


Figura RII.19. Regulació dels diferents promotors de Zeb1 per Snail i Twist. Les cèl·lules RWP1 i les cèl·lules MDCK es van transfectar 100 ng de promotor de Zeb1 (-1010+26) i Snail(50 ng), més Twist (100 ng). Els valors eren normalitzats utilitzant l'activitat de la luciferasa de la Renilla (pRSV-Luc, 5 ng). L'activitat Luc era expressada com a folds d'activació del promotor respecte al control amb el plàsmid buit. Els resultats mostrats corresponen a la mitjana de tres experiments independents, cada un realitzat per triplicat. Les barres d'error indiquen les desviacions estàndard.

Així doncs, tal com succeeix en la gastrulació de *Drosophila*, es va observar que en les nostres línies cel·lulars l'expressió d'un gen mesenquimal com és Zeb1 depenia de l'expressió de Snail, Twist i NF κ B. A més, es pensa que en la inducció de l'expressió de Zeb1 també hi pot tenir un paper important l'activació via β -catenina/TCF-4 i d'ERK.

DISCUSSIÓ

En determinades circumstàncies, les cèl·lules epitelials pateixen canvis en el seu fenotip i es converteixen en cèl·lules mesenquimals. Aquesta transició epiteli-mesenquima ha estat observada en varies fases del desenvolupament embrionari, la invasió en carcinomes i la metastasi (Thiery et al 2004). La transcripció de l'E-cadherina és regulada a la baixa durant aquest procés (Vleminckx et al 1991; Perl et al 1998). De qualsevol manera, la TEM implica disminució d'un conjunt de molècules específiques de teixit epitelial o altres marcadors a més de l'E-cadherina i una inducció de gens mesenquimals (Hay et al 1995). S'havia demostrat que el repressor transcripcional Snail bloqueja l'expressió de l'E-cadherina unint-se a les caixes E específiques del seu promotor (Batlle et al 2000; Cano et al 2000), però el mecanisme pel qual el nivell d'altres molècules eren regulades en la TEM es desconeixia. Aproximacions genètiques en *Drosophila* havien demostrat que dos factors de transcripció, Snail i Twist, regulaven l'expressió de gens mesenquimals i epitelials, encara que alguns gens mesenquimals podien ser regulats també per Dorsal i Tailless (Casal et al 1996). Estudis durant el desenvolupament, així com també resultats obtinguts després de la transfecció de cèl·lules epitelials han demostrat que Snail indueix una completa TEM quan es transfecta en cèl·lules epitelials en cultius. Aprofitant aquesta capacitat de Snail, es va voler estudiar el mecanisme de repressió de gens epitelials i la inducció de gens mesenquimals.

Altres gens epitelials, a més de l'E-cadherina, com MUC1, citoqueratina 18 i VDR, també tenen caixes E en els seus promotors. Els nostres resultats mostren a nivell de mRNA (MUC1 i Citoqueratina 18. Fig. RI.3) i a nivell de promotor (MUC1 i VDR. Fig. RI.5 i 7) que Snail reprimeix l'expressió d'aquests gens i que per a la repressió necessita les caixes E dels promotors intactes. Per això semblava que el mecanisme de repressió transcripcional d'aquests gens podia ser el mateix i implicava el factor de transcripció Snail.

Va resultar curiós observar que alguns mutants que s'havien realitzat en el laboratori i que no podien unir-se al DNA, encara tenien la capacitat de reprimir el promotor d'E-cadherina de manera bastant eficient, tal és el cas de Snail 1-138 i de Snail Δ 82-123 (fig. RI.6). S'ha de tenir en compte

que, encara que aquests mutants no poden unir el DNA, la seva localització és com a mínim un 50% nuclear, a diferència del domini N-terminal sencer. Per aquest motiu es va pensar que potser hi havia una proteïna implicada en la repressió dels mutants de Snail, que facilitaria que aquests mutants arribessin al DNA i poguessin així realitzar la seva funció repressora (d'això parlarem més endavant).

La diana més estudiada de Snail és l'E-cadherina. Fa uns anys es va proposar que la modificació de la cromatina podia ser clau en la regulació de l'expressió de l'E-cadherina. El remodelament de la cromatina i les modificacions de les histones tenen un mecanisme principal en el control de l'expressió gènica. L'hiperacetilació de les histones H3 i H4 està generalment associada a una cromatina activa transcripcionalment, mentre que les regions de cromatina inactiva estan enriquides per les histones deacetilades H3 i H4. L'estat d'acetilació de les histones en seqüències específiques reguladores del DNA depèn del reclutament d'activitats d'histones acetiltransferases o histones deacetilases (HDAC), normalment com a part d'un gran complex multi-protèic de co-activadors o co-repressors, respectivament. Varis complexos co-repressors han estat identificats (per exemple, els complexos SIN3, Mi-2/NuRD, i CoREST) amb la capacitat d'interaccionar amb varis repressors transcripcionals. S'ha establert durant els últims 5 anys una connexió entre metilació del DNA i desacetilació d'histones en el silenciament de gens. Aquest mecanisme involucra la participació de proteïnes que pertanyen a la família de les proteïnes de dominis d'unió a metil-CpG i HDAC. De qualsevol manera, altres modificacions de les histones, com la metilació, semblen estar associats a la regulació gènica, això suggereix la participació de diferents activitats modificadores d'histones i del DNA en complexos multi-protèics reguladors (Peinado et al 2004).

Nosaltres vam poder observar que el mecanisme de repressió per Snail sobre el promotor de l'E-cadherina era un mecanisme dependent d'HDAC. Això ho vam poder observar ja que quan s'hi afegia trichostatina A (un inhibidor de les HDAC) a les cèl·lules, el promotor de l'E-cadherina era des-reprimit (fig. RI.7, panell superior). Recentment, Peinado et al 2004, van demostrar que la repressió del promotor de l'E-cadherina per part de Snail involucra el reclutament d'un complex co-repressor, format, al menys

en part, pel co-repressor mSin3A, HDAC1 i HDAC2. Van demostrar que el reclutament d'aquest complex es donava pel domini SNAG situat a N-terminal, que prèviament havia estat descrit com el domini repressor. Segons Peinado et al, la presència d'aquest complex resulta en una disminució neta de la quantitat d'histones H3 i H4 acetilades i en un augment de la metilació en l'histona H3 en K9 en el promotor endogen de l'E-cadherina. Al seu torn, això portaria a una compactació de la cromatina. Alguns estudis també apunten a una paper de les metilases de DNA sobre el promotor de l'E-cadherina (Peinado et al 2004).

Tot i això, aquest mecanisme no és general ja que segons els nostres resultats altres promotors epitelials, com el de VDR, patien una repressió per Snail independent d'HDAC (fig. RI.7 panell inferior).

Recentment s'ha descrit un complex co-repressor de CtBP que contenia diferents activitats metilases i HDAC, així com també els factors de transcripció Zeb1(δ EF1) i Zeb2(SIP1). Aquest complex permetria una efectiva repressió del gens diana per a CtBP. Inhibint l'expressió de CtBP i les seves activitats modificadores d'histones mitjançant interferència de RNA, s'aconseguien alteracions en les modificacions d'histones en el promotor de l'E-cadherina i un augment de l'activitat del promotor en els assaigs reporter. S'ha vist que aquest complex co-repressor era plenament funcional i suposava un fort suport en la participació del complex amb CtBP en la regulació a la baixa de l'E-cadherina (Shi et al 2003). Ens vam plantejar si en les nostres línies cel·lulars, el control del promotor de l'E-cadherina venia també mitjançada per CtBP. Per tal d'estudiar això es van utilitzar varies aproximacions. Primerament, ens vam basar en la mateixa hipòtesi de treball usada per Grootclaes et al 2000, en el que es va poder veure que la interacció entre CtBP i E1A activava el promotor de l'E-cadherina. El que es va trobar va ser que en les nostres línies cel·lulars mesenquimals, el promotor de l'E-cadherina estava reprimat per un mecanisme depenent de CtBP, ja que quan hi afegíem E1A a la cèl·lula l'activitat del promotor augmentava considerablement (fig. RI.8). A més, la repressió transcripcional del promotor d'E-cadherina mitjançant Snail es donava per un mecanisme parcialment depenent de CtBP (fig. RI.9). Però de la mateixa manera que abans, el mecanisme de repressió utilitzat per Snail no era el mateix en els diferents gens diana, ja que Snail reprimeix el

promotor de VDR de manera totalment dependent de CtBP, però en canvi el mecanisme de repressió s'obre el promotor de MUC1 (un altre gen epitelial) era totalment independent (fig. RI.11). La segona aproximació usada per acabar de reforçar els resultats anteriors va ser afegir a les cèl·lules NADH, ja que s'havia descrit que quan en una cèl·lula s'augmentava el nivell nuclear de NADH, també augmentava la repressió mitjançant CtBP (Zhang et al 2002). Amb aquesta segona aproximació es van obtenir els mateixos resultats (fig. RI.10), CtBP estava implicat en la repressió de l'E-cadherina per part de Snail.

Es va pensar que seria molt interessant comprovar que succeïa amb els mutants de Snail 1-138 i Δ 82-123 que havíem vist prèviament que eren capaços de reprimir l'E-cadherina. Com havíem esperat, la repressió d'aquest mutants venia regulada per CtBP, i en aquest cas l'efecte co-repressor de CtBP semblava més important que en la proteïna sencera (fig. RI.13).

S'ha de recordar però, que el domini d'interacció entre CtBP i Snail (PLDLS) que es troba present en el Snail de *Drosophila*, s'ha perdut en el Snail de mamífers. Encara que es va trobar que la repressió del promotor de l'E-cadherina venia mitjançada per Snail i, parcialment per CtBP, en cap moment es va trobar interacció entre les dues proteïnes (fig. RI.12). Això, juntament amb els resultats dels mutants, ens va fer plantejar la possibilitat de l'existència d'una proteïna pont entre Snail i CtBP. Es van buscar varis candidats i ens vam centrar en un primer moment en CtIP (CtBP-Interaction Protein).

CtIP és una proteïna poc coneguda que va ser descrita per primera vegada com un cofactor del co-repressor transcripcional CtBP (Schaeper et al 1998). Posteriorment s'ha demostrat que CtIP interacciona amb proteïnes de la família de Rb, pRb i p300 (Fusco et al 1998; Meloni et al 1999), el supressor tumoral de mama BRCA1 (Li et al 1999; Sum et al 2002; Wang et al 1996) així com també membres de la família Ikaros (Koipally et al 2002). CtIP és una proteïna de 897 aa que s'expressa de manera ubiqua en diferents tipus cel·lulars (Fusco et al 1998; Wang et al 1996). Té dos motius específics d'interacció, un amb pRB (LECEE) i l'altre amb CtBP (PLDLS), a part d'això també té dos dominis coiled-coil. El de N-terminal s'utilitza per l'homodimerització de la proteïna (Dubin et al 2004) (fig. RI.24).

El gen de CtIP solament ha estat trobat en eucariotes superiors, incloent *Homo sapiens*, *Mus musculus* i *Rattus norvegicus*, amb una divergència en la seqüència significativa, implicant una participació tardana en l'evolució (Chen et al 2005).

La interacció entre CtIP i CtBP es creu que juga un paper important en la repressió transcripcional dependent de CtBP i mitjançada per CtIP. CtBP pot funcionar de manera dependent i independent de HDAC i pot jugar papers clau durant el desenvolupament primerenc i l'oncogènesi (Chinnadurai G 2002).

Com CtBP, CtIP també posseeix activitat repressora transcripcional quan és unit de manera artificial amb el domini d'unió al DNA de GAL4 i és coexpressat amb el gen reporter conduït pel promotor de SV40 amb llocs d'unió a GAL4 "upstream" (Meloni et al 1999). Tot això suggereix que CtIP pot funcionar com a co-repressor transcripcional (Chen et al 2005).

Amb els estudis que es van dur a terme, es va concloure que Snail i CtIP reprimeixen el promotor de l'E-cadherina de manera sinèrgica, així com també el promotor de VDR (fig. RI.14 i RI.16). Les mutacions en el domini d'interacció de CtIP amb CtBP afecten lleugerament aquesta repressió sinèrgica del promotor de l'E-cadherina, però no altres mutacions en CtIP (mutacions en el domini d'interacció amb pRb). També es va observar que CtIP necessitava de Snail per tal d'unir-se al promotor de l'E-cadherina i que de totes maneres aquesta unió entre els dos factors no feia que en el complex es pogués detectar CtBP. Per últim el que vam poder observar va ser que CtIP estabilitzava la proteïna Snail, una proteïna que, com s'ha descrit recentment té un alt grau de degradació via proteasoma (fig. RI.14-18)(Zhou et al 2004). Aquest darrer punt podria ser molt important en quan a la funcionalitat de la proteïna, ja que el fet de que CtIP fes que la proteïna fos més estable, també podria implicar que Snail pot reprimir durant més temps els seus gens diana. De qualsevol manera aquest resultat, encara que molt interessants, no ens explicaven el fet de que Snail reprimis el promotor de l'E-cadherina de manera dependent de CtBP, ni que els mutants de Snail poguessin reprimir-lo també. Així en els assaigs de BOPA Snail fa que CtIP s'uneixi al DNA, però en cap cas ens baixava CtBP amb la sonda. A més, perquè CtIP no se'ns uneix a la sonda

per si sol, així doncs no ens explicaria com els mutants aconsegueixen unir-se al DNA.

Vàrem pensar que l'efecte d'E1A sobre la transcripció de l'E-cadherina era degut a Zeb1 o Zeb2, ja que aquests factors de transcripció poden unir-se al DNA com interaccionar amb CtBP. S'havia descrit que la interacció de Zeb1 i CtBP era necessària per a la repressió del promotor d'E-cadherina (Grootclaes et al 2000). Primerament es va observar que Zeb1 era capaç de reprimir el promotor de l'E-cadherina, però de manera menys eficient del que ho feia Snail. Per altre banda la repressió del promotor d'E-cadherina per Zeb2, en el nostre sistema cel·lular, va ser molt pitjor. A més el que vam poder observar va ser que Snail i Zeb1 reprimien el promotor de l'Ecadherina de manera additiva i que el mateix succeïa amb Zeb2 (encara que aquest últim per si sol reprimia molt pitjor l'activitat del promotor) (fig. RI.20 i 22). També es va descriure que per a una correcta funció de Zeb1, era necessari que les caixes E presents en el promotor estiguessin intactes (fig. RI.21), ja que si es mutaven les tres caixes presents en el promotor, Zeb1 ja no podia exercir el seu efecte repressor. Així doncs es va pensar que Zeb1 o Zeb2 podien ser uns bons candidats per a interaccionar amb Snail i realitzar una repressió conjunta. Però no es va observar unió *in vivo* entre Snail i Zeb1.

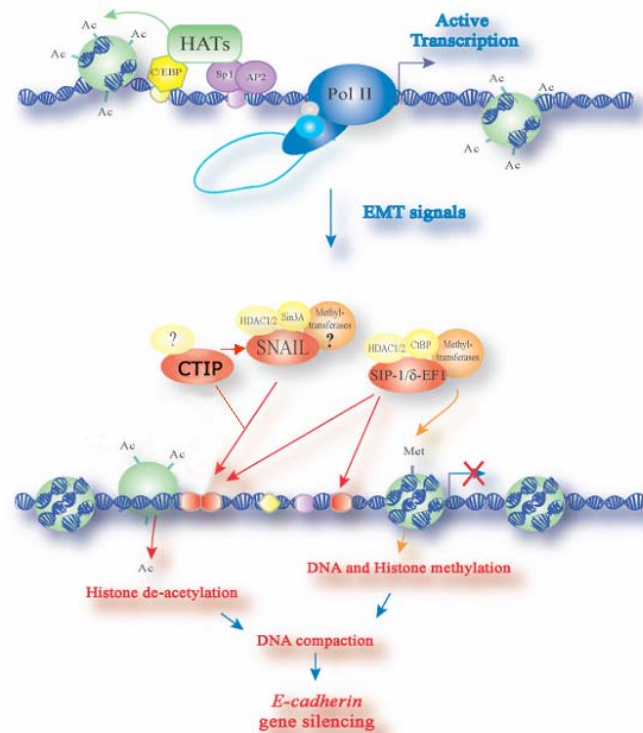


Figura D.1. Un model per a la regulació de l'expressió de l'E-cadherina implicant diferents repressors transcripcionals i mecanismes epigenètics. En la figura es mostra una il·lustració esquemàtica dels mecanismes epigenètics putatius involucrats en la regulació de l'E-cadherina. En aquest model, la transcripció activa és probablement portada a cap per la interacció de varis activadors transcripcionals, que involucra l'acetilació de residus d'histones els quals promouen que la cromatina adopti una conformació oberta. Sota la influència dels estímuls apropiats, varis repressors i co-repressors són reclutats (depenent tant del teixit com del context cel·lular), agafant la maquinària de repressió, que inclou molècules de co-repressors, HDACs, metilases i molècules encara no identificades les quals modificaran l'estat d'acetilació i metilació de la cromatina, promovent el silenciament de l'E-cadherina (Adaptat de Peinado et al 2004).

El que vam concloure és que segons el promotor, i potser també segons les diferents circumstàncies en les que es troba la cèl·lula, Snail podia realitzar la seva funció repressora sobre els gens epitelials de diverses maneres. Per un mecanisme depenent d'HDAC (per exemple el promotor d'E-cadherina), per un mecanisme depenent de CtBP; en aquest cas pensem que seria necessària una proteïna pont entre Snail i CtBP, però encara desconeixem quina és aquesta. En aquest punt m'agradaria remarcar que el fet d'utilitzar una proteïna pont entre CtBP i els repressors que no contenen el domini PLDLS ja ha estat descrit (Chinnadurai G 2002), una repressió depenent de CtBP l'observem per exemple en el promotor de

VDR o parcialment el promotor d'E-cadherina. També es pot donar una repressió depenent de CtIP (aquesta és observada tant en el promotor d'E-cadherina com en el de VDR). Finalment, també es va pensar que la repressió podia ser una conjunció de varis mecanismes (per exemple, podria donar-se el cas de que depengués d'HDAC o CtIP, o d'HDAC i CtBP i de CtIP i CtBP). Es va pensar que el fet de que es comportés d'una manera o d'una altre podria ser degut a les seqüències flanquejants a les caixes E, o a la proximitat o número de caixes E presents en el promotor. És a dir, depenent de quines seqüències flanquejants hi hagi en el promotor, els "partners" de Snail seran diferents i això farà que Snail utilitzi determinades proteïnes en un promotor que potser no podrà utilitzar en un altre. De fet Snail no és el primer factor de transcripció que en diverses situacions reprimeix la transcripció d'una manera o d'una altre, hi ha varis factors que també actuen de la mateixa manera. Aquest és el cas per exemple de Ikaros (Koipally et al 2002) Aquest factor de transcripció ha estat descrit per realitzar la repressió transcripcional de manera dependent i independent d'HDAC, de manera depenent i independent de CtBP i de manera depenent de CtIP; Ikaros pot reprimir la transcripció mitjançant HDAC, però quan CtBP està unit a la proteïna el mecanisme de repressió és independent d'HDAC. També és el cas de CtIP; que pot realitzar la seva funció de manera depenent o independent de CtBP (Koipally et al 2002) o inclòs de CtBP que pot funcionar com a co-repressors de manera dependent o independent d'HDAC, segons el context cel·lular o el promotor (Chinnadurai G 2002).

Entre els gens regulats a l'alça per Snail, vam trobar el repressor transcripcional Zeb1, que també és capaç d'unir-se a les mateixes caixes E que Snail. Zeb1 i Zeb2 són els homòlegs del *Zfh-1* de *Drosophila*, el qual és actiu per sota de Snail en el desenvolupament embrionari. Snail es necessita per a l'expressió de *Zfh-1* en el primordi del mesoderm; en els mutants per Snail, l'expressió de *Zfh-1* es reduïda de manera molt severa (Lai et al 1991). Els nostres resultats obtinguts dels clons induïbles i estables per Snail mostren clarament que Snail indueix Zeb1 tan a nivell de RNA (fig. RII.2) com de proteïna (fig. RII.3) durant la TEM. A més de l'augment del mRNA de Zeb1 en els clons induïbles per Snail, quan l'expressió de Snail era apagada, l'expressió de Zeb1 necessitava de més de

20 dies per tornar de manera gradual al seu nivell basal (fig.RII.2) Aquesta observació suggereix que en circumstàncies d'una expressió transitòria de Snail, Zeb1 prolonga la repressió dels gens epitelials induïda per Snail. D'acord amb aquesta hipòtesi, en els embrions de *Drosophila*, *Zfh-1* persisteix després de la regulació a la baixa de Snail (Leptin M 1991; Gray et al 1996). No obstant, mentre que els ratolins knock-out per Snail no són viables degut a defectes en la gastrulació (Carver et al 2001). Zeb1 és prescindible per aquest procés. Els animals knock-out per Zeb1 arriben a desenvolupar-se , encara que mostren severes deficiències en la producció de cèl·lules T en el timus i varis defectes en l'esquelet (Takagi et al 1998). Per tan, Snail, però no Zeb1, és necessari per a la regulació a la baixa de l'E-cadherina necessària per una correcta gastrulació.

Es va caracteritzar el promotor de Zeb1 i es va veure que l'inici de transcripció es troba a 19 pb de l'inici de traducció (fig. RII.4). A més també es va observar que en aquest promotor li manca la caixa TATA. Analitzant la seqüència del promotor, es van trobar varis elements reguladors proximals putatius, que poden ser reconeguts per els factors de transcripció constitutius AP2 i SP1; sent factible que aquests factors actuessin activant la transcripció basal.

Hem demostrat per experiments de reporter, que l'augment de Zeb1 es deu, al menys en part, per l'augment de l'activitat transcripcional del promotor de Zeb1 (fig. RII.7). Encara que el promotor de Zeb1 presenta caixes E, no pensem que l'activació del promotor per Snail es doni per un mecanisme directe, ja que la inducció de Zeb1 es dona a temps més llargs del que caldria esperar si el mecanisme d'acció de Snail fos directe (fig. RII.2)

Es va veure que l'activitat del promotor mínim de Zeb1 (-150/+26) és molt alta en línies mesenquimals, mentre que es trobava molt disminuïda en cèl·lules epitelials (fig. RII.6-7) A més, es va observar que hi havia una correlació positiva entre l'expressió de Snail i l'expressió de Zeb1 i que aquests dos factors correlacionaven de manera negativa amb l'expressió de l'E-cadherina en cèl·lules mesenquimals (fig. RII.1). A més, l'activitat del promotor (-150/+26), així com també els nivells de mRNA, és augmentada en cèl·lules forçades a patir una TEM , suggerint que aquest promotor conté molts dels elements requerits per l'estimulació de Zeb1 durant aquest

procés (fig. RII. 8-9). També es va poder observar que aquesta resposta a estímuls de TEM era dependent d'Erk, ja que si s'afegia un inhibidor d'Erk, l'activitat del promotor disminuïa un 50% (fig. RII.10). Com ja s'ha dit en la introducció, la via d'Erk podria ser necessària per a l'activació de gens mesodèrmics durant el desenvolupament (Christen and Slack 1999; Yao et al 2003) o per induir una complerta TEM a través de citoquinaes o altres estímuls en línies cel·lulars tumorals (Ellenrieder et al 2001; Grande et al 2002; Janda et al 2002; Bates and Mercurio 2003; Peinado et al 2003). A més recentment s'ha descrit que la via d'Erk està implicada en l'activació del factor de transcripció Snail (Barberà et al 2004; Peinado et al 2003).

Tot i així, hem trobat un lloc de resposta a β -catenina/TCF-4 (entre el -341 i el -150), així com també un lloc de resposta per NF κ B (entre el -718 i el -341) i dos caixes E, susceptibles a ser regulades per Twist (entre el -1010 i el -150), fora d'aquest promotor mínim. Hem demostrat que l'activació del promotor per β -catenina/TCF-4, tan sols es dona en aquells promotors en els que existeix un element funcional per a TCF4, a més pensem que es necessita d'alts nivells de β -catenina nuclear i de l'absència de contactes per a una clara inducció de Zeb1 (fig. RII.13-14). Els nostres resultats ens han fet plantejar-nos un model de treball en que pensem inicialment Snail regulació a la baixa de l'E-cadherina, això possibilitaria que hi hagués més β -catenina lliure a la cèl·lula, la qual podria entrar a nucli i augmentar la transcripció mitjançant el complex β -catenina/TCF-4, això, per la seva banda, facilitaria un augment de l'expressió de Zeb1.

Hem demostrat que aquests diferents factors de transcripció ens activen el promotor de Zeb1 (-1010/+26). En el cas de NF κ B hem vist alhora una clara inducció del mRNA de Zeb1 (fig. RII.15). A més també hem pogut observar que Snail i Twist ens activen el promotor de Zeb1 (-1010/+26) de manera sinèrgica. Els mateixos resultats van ser obtinguts amb el mRNA de Zeb1 (fig. RII.17-19).

Tots aquests resultats acompanyen de manera molt forta el que s'observa en el desenvolupament embrionari, on els gens claus per a la gastrulació Dorsal/NF κ B, Snail i Twist, es troben per sobre en la via d'activació de *Zfh1* (Lai et al 1993, Ip et al 2002).

MODEL DEL TREBALL.

Amb tots aquests resultats hem generat un model del que pensem que podria passar en la progressió tumoral.

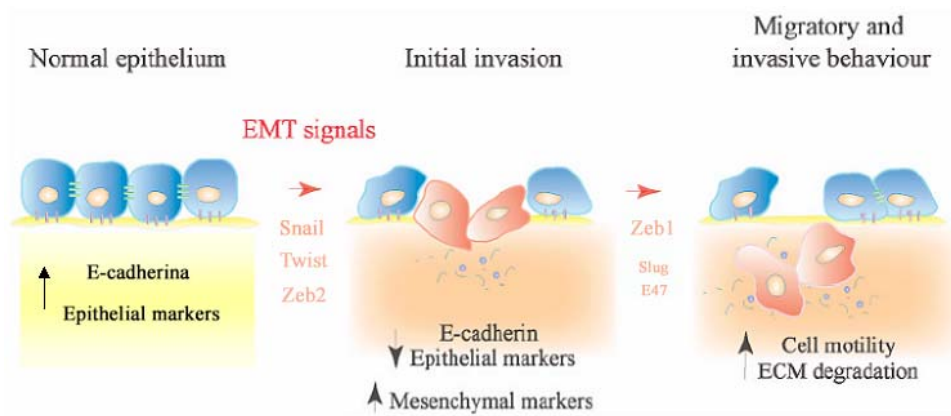


Figura D.2. Model de la participació dels diferents repressors de l'E-cadherina durant la invasió tumoral. En aquest model, varis repressors com Snail i Zeb2 podrien jugar un paper en els primers passos de la progressió tumoral, portant a la iniciació del procés invasiu, per la regulació a la baixa de l'E-cadherina i altres gens epitelials, i la inducció de marcadors mesenquimals que promourien la invasió. Zeb1 pot contribuir al manteniment del fenotip maligne per la repressió sostinguda de l'E-cadherina. En aquest procés podrien també contribuir altres repressors de l'E-cadherina, com Slug o E47, a més aquests també podrien estar implicats en la degradació de la matriu extra-cel·lular i la migració (adaptat de Peinado et al 2004)

En un estadi inicial, les cèl·lules epitelials tenen una estructura ben definida, amb polaritat apico-basal i amb uns contactes ben definits amb les cèl·lules veïnes. Per diferents senyals de transició epiteli-mesènquima (H-Ras, ILK, cPK-C α i també TGF- β) es produiria la inducció de gens determinants en aquesta transició com per exemple Snail, Twist i Zeb2. L'expressió d'aquests gens porta a la cèl·lula a patir una sèrie de canvis, un dels més importants és la repressió del gen de l'E-cadherina, funció que poden realitzar els tres factors mitjançant les caixes E presents en aquest promotor. En aquest moment la cèl·lula perd els contactes amb les cèl·lules veïnes i perd també altres marcadors epitelials, com per exemple: MUC1, Citoqueratina 18 i VDR. Snail reprimeix aquests gens epitelials per varis mecanismes que són diferents segons els promotors. Hem vist que pot reprimir per un mecanisme depenen d'HDAC i/o de CtBP, així com també de CtIP. Concomitantment, es dona un augment dels marcadors mesenquimals

(vimentina, fibronectina i N-cadherina; revisat en Kang et al 2004) i de β -catenina lliure. Totes aquestes circumstàncies són favorables per a què es doni una inducció del gen mesenquimal Zeb1. Altres grups han proposat que en aquest punt també es podrien induir altres repressors de l'E-cadherina com Slug i E47. Sembla ser que en aquest moment l'inducció inicial de Snail tornaria als seus nivells basals, o Snail seria exportat fora del nucli de manera molt eficient, impedit així la seva funció. Tot i així, Zeb1 podria continuar la funció repressora de l'E-cadherina i altres gens epitelials iniciada per Snail. Sembla ser que E47 i/o Slug també podrien contribuir en aquesta repressió secundària de l'E-cadherina. Tots aquests canvis a nivell d'expressió gènica, es veuran reflectits en canvis fenotípics que facilitaran a la cèl·lula la migració i la invasió.

CONCLUSIONS.

- 1) Snail reprimeix el promotor de l'E-cadherina, de MUC1 i de VDR de manera depenent de les caixes E. Aquesta repressió és depenent d'HDAC i/o de CtBP segons el promotor.
- 2) Snail i CtIP reprimeixen el promotor d'E-cadherina i de VDR de manera sinèrgica. CtIP necessita de Snail per poder unir-se a la sonda del promotor de l'Ecadherina. A més, CtIP estabilitza la els nivells de proteïna de Snail.
- 3) Snail indueix la expressió de Zeb1 en línies cel·lulars tumorals testades, però l'expressió de Zeb1 encara es manté després de la disminuir els nivells de Snail. A més, Snail i Zeb1 reprimeixen el promotor d'E-cadherina de manera aditiva.
- 4) Es va clonar un fragment de DNA de 1036 pb amb la mateixa especificitat d'expressió que el mRNA de Zeb1. L'inici de transcripció es va trobar a 19 pb d'ATG, així el promotor es va anomenar (-1010/+26).
- 5) L'expressió de Zeb1 augmenta com a resposta a estímuls de la via d'Erk.
- 6) β -catenina/TCF4 i NF κ B activen el promotor de Zeb1. A més, la presència d'un dominant negatiu d'aquestes vies com és l'E-cadherina manté els nivells de Zeb1 molt baixos.
- 7) Twist coopera en l'augment de l'activitat del promotor de Zeb1 produït per Snail Aquest augment també es veu reflectit a nivell de mRNA.

MATERIALS I MÈTODES:**Cultius Cel·lulars.**

| Nom | Espècie | D'on deriven | Fenotip |
|--|---------|--------------|--------------|
| HT-29 M6 | Humà | Còlon | Epitelial |
| SW480 | Humà | Còlon | Intermig |
| SW620 | Humà | Còlon | Mesenquimals |
| Caco-2 | Humà | Còlon | Epitelial |
| IEC-18 | Rata | Íleon | Epitelial |
| MCF-7 | Humà | Mama | Epitelial |
| MDA-MB 435 | Humà | Mama | Mesenquimals |
| MBA-MB 231 | Humà | Mama | Mesenquimals |
| EpH4 | Ratolí | Mama | Epitelial |
| RWP1 | Humà | Pàncreas | Epitelial |
| Mia Paca-2 | Humà | Pàncreas | Mesenquimals |
| NIH3T3 | Ratolí | Fibroblasts | Mesenquimals |
| Madin-Darby-Canine-Kidney (MDCK) | Gos | Ronyó | Epitelial |

Les línies cel·lulars van ser crescudes en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM; Life Technologies), suplementat amb 4.5 g/l de glucosa (Life Technologies), 2 mM de glutamina, 56 U/ml de penicil·lina, 56 µg/l, d'estreptomicina i 10% de sèrum fetal boví (FCS; GIBCO). Es van mantenir a 37°C en una atmosfera humida contenint el 5% de CO₂ i el 95% d'aire.

En alguns experiments es van afegit les següents drogues: els inhibidors de la MEK (mitogen-activated protein kinase kinase) PD98059, a una concentració final de 50 µM, o U0126 a una concentració final de 20 µM, l'inhibidor de la quinasa p38 SB203580 a una concentració de 10 µM o, finalment, l'inhibidor de la PI3K (phosphatidyl inositol-3 kinase) LY294002 a una concentració final de 30 µM (tots ells de Calbiochem). Per fer els controls es van suplementar les cèl·lules amb els mateixos volums del diluïent, DMSO (dimethyl sulfoxide).

Construccions dels Plàsmids.

mSnail: Els constructes de pcDNA3-Snail-HA, pcDNA3-Snail P2A, pcDNA3-Snail Delta 7 i pcDNA3-Snail delta 28 havien estat descrites en Batlle et al 2000. També s'han utilitzat altres mutats per Snail (eGFP-Snail 1-138, eGFP-Snail 1-151 i eGFP-Snail Δ82-123 que van ser descrits en Dominguez et al 2003.

mZeb1: el cDNA era cedit per Tom Genetta del *Children's Hospital of Philadelphia*, Filadèlfia, PA. en forma de pcDNA3HisC-Zeb1 de ratolí. Està clonat en el vector d'expressió pcDNA3HisC (Promega) en la diana de restricció EcoRI. Les proteïnes recombinants pels fragments dels dits de zinc de C-terminal de Zeb (CTZF) (nt 2677-2983) era obtinguda per amplificació de PCR utilitzant els següents oligonucleòtids: 5'-ATCGGAATTCGCAGCTC ACTGTTGAGACACA (sense) i 5'-ACGTCTCGAGGGGCACCAACAT GCTCAG (antisense) i els dits de zinc de N-terminal (NTZF) (nt 505-909) amb 5'-ATCGGAATTCAGTACCGCCATGAGAAGAACGAGG (sense) i 5'-ACGTCTCGAGGTGTGGGACTGCCTGGTG (antisense) eren clonats en el pGEX-6P2 (Pharmacia) en EcoRI-XhoI. La construcció de pcDNA3HisA-RD (domini repressor nt 849-2730) era realitzada mitjançant digestió de pcDNA3HisC-Zeb1 amb StuI i el insert resultant, clonat en pcDNA3HisA prèviament digerit amb EcoRV. La construcció de la proteïna antisense de Zeb1 era obtinguda mitjançant la digestió de pcDNA3HisC-Zeb per EcorI, desfosforilació del vector i la posterior religació de l'insert amb el vector desfosforilat.

hZeb-2: El constructe de Zeb-2-CS2MT va ser amablement cedit per Dr. A. Postigo de la *Washington University*, St. Lluís, M.O.

hCtIP: El constructe de pcDNA3-myc-CTIP va ser amablement cedit per Dr. PA Hamel de la *University of Toronto*, Toronto, Ontario, Canada.

hTwist: Aquest constructe va ser realitzat pel D. Domínguez. En breu, es va amplificar el cDNA utilitzant els següents oligos: 5'-GGCGGATCCACCATGATGCAGGACGTGTCCAGC i AATCAGCTGTGTGGGACGCGGACTATGGACCes va clonar mitjançant els següents enzims de restricció, BamHI i PvuII, en el pcDNA3.

VP16-Rel i Rel: Va ser descrit prèviament en Barberà et al 2004.

VP16-TCF4: La fusió VP16-TCF4 es va generar en el nostre laboratori per la Dr. I Puig. Es va obtenir l'ADNc codificant de VP16 a partir d'un

constructe anterior, VP16-Snail prèviament referenciat a E. Batlle, 2000. Aquesta regió es va fusionar en pauta amb el domini d'unió a DNA del TCF4. Aquesta fusió fou subclonada de nou al vector pcDNA3.

E1A: El constructe de pcDNA3-E1A i PGEX-E1A va ser amablement cedit per Dr. Xavier Mayol de la Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular, Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques, Barcelona.

Determinació de l'inici de transcripció del gen de Zeb1

L'inici de transcripció va ser determinat utilitzant el mètode del RACE (rapid amplification of 5-cDNA ends). 1 μ de RNA de cèl·lules SW620 o MIA PACA-2 vas ser sotmès al RACE utilitzant el Kit SMARTTM-RACE de Clontech i dos oligonucleotids específic de la seqüència de Zeb1 (-11/+7 i +1707/+1688 des d'ATG, inici de traducció). Els fragments amplificats van ser analitzats en un gel d'agarosa i visualitzats amb bromur d'etidi, aïllats i seqüenciats. Seguint les instruccions de la casa comercial, RNA de placenta humana i un oligonucleòtid corresponent a al receptor de la transferrina van ser usats com a controls positius.

Clonatges dels promotors.

E-cadherina: El fragment del promotor d'E-cadherina -178 a +92 era clonat dins del vector pGL3 (Promega), posteriorment es va mutar la caixa E present en el plàsmid (Batlle et al 2000). Els constructes d'E-cadherina mutada es realitzaven per canvis de la seqüència 5'-CACCTG de cada caixa per 5'-**AACCTA** (Batlle et al 2000).

MUC1: La seqüència corresponent al promotor de MUC-1 humà -759/+49 es va clonar fent una amplificació del promotor per PCR a partir d'ADN genòmic de cèl·lules HT-29, utilitzant una taq polimerasa d'alta fidelitat (Pfx, GIBCO) i els següents oligonucleòtids: 5'-CATGGTACCGCAAGGCTCCCGGTGACC-3' i 5'-CGTAAGCTTGGGAGGGGCAGAACAGATT-3' que contenen dues dianes de restricció per KpnI i HindIII (subratllades). El producte de la PCR purificat es va clonar en una versió mutada del vector pGL3 Luciferasa (Promega) (E. Batlle, 2000; es va eliminar un lloc putatiu d'unió a Snail) mitjançant les dianes KpnI i HindIII. El promotor de MUC-1 amb les dues caixes-E mutants es va obtenir

utilitzant el kit *QuikChangeTM site-directed mutagenesis* (Stratagene). La seqüència de l'oligonucleòtid sens va ser la següent: 5'-GAGGGGGCGGGGTTTTGTAAACCTATAACCTACTCGCTGTGCCTAGGGCCG-3', en negreta s'indiquen els nucleòtids mutats.

ZEB1: El promotor de Zeb1 era amplificat de DNA genòmic de cèl·lules HT-29 M6 mitjançant PCR amb els següents oligonucleòtids: (sense) (-1010; genBank 13582460) 5'-ATTTACGCGTCCTTAAGG TCCTGCACGGCG (-718; genBank 13582752) 5'-ATTTACGCGTGTCA CTTCCCATCCCGGTTCG (-341; genBank 13583129) 5'- ATTTACGCGT CCGCCGAGCCTCCAACCTTTA, (-74; genBank 13583417) 5'-ATTTACGCGTGGAGGGGTGGGGGGGAAGGG (antisense +26; genBank 13583494) 5'-TAAAAGCTTCCGCCATGATCCTCTCGC amb una temperatura d'anellament de 58°C i 40 cicles mitjançant la Taq Pfx de Gibco i segons les condicions de la casa comercial. Seguidament el clonem en el vector pGL3 (Promega) per les dianes de restricció MluI i HinDIII. D'aquesta manera es van obtenir els següents promotors: -1010/+26, -718/+26, -341/+26 i -74/+26. El clonatge dels promotors -177/+26 i -35/+26 van ser obtinguts per digestió com continua: -177/+26 digestió BstZI i MluI. Seguidament s'omple els parells de bases que han quedat buits (fillin) i després es relliga. Pel que fa al -35/+26 es van fer digestions MluI i XhoI, també es va fer fillin i després es va relligar. Tots els promotors van ser clonats en el plàsmid pGL3 (Promega).

Assaigs "Reporter".

L'activitat de la luciferasa Firefly (Luc) i la luciferasa Renilla Reniformis (pRTK-Luc o pRSV-Luc de Promega RLuc) era mesurada utilitzant el "Dual Luciferase Reporter Assay System" (Promega) 48 hores després de la transfecció, seguint les instruccions de la casa comercial. En tots els experiments la quantitat de DNA transfectada era estandarditzada utilitzant vector buit (Batlle et al 2000).

En les cèl·lules RWP1 eren transfectats 200 i 250 ng de promotor d'E-cadherina (-178/+92), el promotor de VDR i el promotor de MUC1; amb diferents quantitats creixents dels factors de transcripció dels quals volíem conèixer el seu comportament, que anaven des d'un mínim de 0.1 ng, aquests és el cas de Snail, fins a un màxim de 100 ng (per exemple: Zeb1,

Zeb2, E1A o CTIP). Amb d'altres cèl·lules de difícil transfecció s'augmentava la quantitat de DNA al doble (per exemple: HT-29 M6 o MDCK)

Per analitzar l'activitat basal dels diferents constructes dels promotors de Zeb-1 o bé els promotors d'E-cadherina o MUC-1, clonats tots ells en pGL3, es van transfectar en les línies cel·lulars indicades.

Per mirar l'activació del promotor de Zeb1 es transfectava 100 ng de promotor amb diferents quantitats creixents dels factors de transcripció dels quals volíem conèixer el seu comportament, que anaven des d'un mínim de 0.1 ng, aquests és el cas de Snail, fins a un màxim de 100ng (per exemple: VP-16 Rel, VP-16 TCF4, o twist). Aquests assaigs es feien en cèl·lules epitelials on els basals del promotor eren més baixos i això ens permetria veure de manera més clara les activacions.

Anàlisis RT-PCR.

El RNA total era aïllat de diferents tipus cel·lulars utilitzant procediments estàndard i analitzat per RT-PCR com ho descriu la casa comercial amb els següents oligonucleòtids:

| Nom | Seqüència | Regió | Condicions | Núm. en GenBank |
|---------------------------|---|---------------------------------|-------------------------|-----------------|
| MmActina | 5'-TGAACAACATACAATTCCATCATGAAGTGTGA 5'-AGGAGCGATAATCTTGATCTTCATCATGGTGCT | 916-949 1090-1058 | X25; 55°C | BC049611 |
| hsCiclofilina A | 5'-ATGGTCAACCCACCGTG 5'-TGCAATCCAGCTAGGCATG | 45-62 690-708 | X22; 60°C | BC005320 |
| hsCitoqueratina 18 | 5'-CTGGAGACCGAGAACCGGA 5'-TCCGAGCCAGCTCGTCAT | 352-370 818-835 | X40; 55°C | M26326 |
| hsEcadherina | 5'-TTCCTCCCAATACATCTCCCTTCACAGCAG 5'-CGAAGAAACAGCAAGAGCAGCAGAATCAGA | 1977-2006 2287-2316 | X29; 55°C | AB025106 |
| hsFibronectina | 5'-GTGCCTGGGCAACGGA 5'-CCCGACCCTGACCGAAG | 922-938 1554-1571 | X30; 55°C | X02761 |
| hsLEF-1 | 5'-ACTGCGCCACGGACGAG 5'-GAGAGGATGGACCGCATGG | 704-720 1098-1116 | X35; 55°C | AF288571 |
| hsMUC-1 | 5'-CATGGTACCGCAAGGCTCCCGGTGACC 5'-CGTAAGCTTGGGAGGGGGCAGAACAGATT | 556-574 748-765 | X30; 60°C | X80671 |
| hsSlug | 5'-ATTCGCACCCACACATTACCTTG 5'-TGGAGAAGGTTTTGGAGCAGTTT | 696-718 918-896 | X35; 55°C | NM003068 |
| rnSlug | 5'-ATGCCGCGCTCCTTCCTCGTC 5'-GCTTTTCCCCAGTGTGTGTTT | 1-21 634-613 | X35; 55°C | AF497973 |
| hsSnail | 5'-GGCGGATCCACCATGCCGCGCTCCTTCCTGGTC 5'-CCGGATATCCGCGAGGGCCTCCGGAGCA | 1-24 778-791 | X39; 60°C | M95604 |
| mmSnail | 5'-TTCCAGCAGCCCTACGACCAG 5'-GCCTTTCCCACTGTCCTCATC | 104-125 290-310 | X32; 60°C | NM005985 |
| rnSnail | 5'-TTCCAGCAGCCCTACGACCAG 5'-GCCTTTCCCACTGTCCTCATC | 104-125 290-310 | X32; 60°C | XM230866 |
| hsZeb-1 | 5'-TTCAGCATCACCAGGCAGTC 5'-GAGTGGAGGAGGCTGAGTAG 5'-GCTCCCTGTGCAGTTACACC | 972-991 1707-1688 628-648 | X40; 53 °C X27; 55°C | U12170 |
| hsZeb-2 | 5'-GCTACCGACATACCCAGGAC 5'-TCTCGCCCGAGTGAAGCC | 2756-2776 3139-3157 | X28; 55°C | AB011141 |
| HPRT | 5'-GGCCAGACTTTGTTGGATTTG 5'-TGCCTCATCTTAGGCTTTGT | 556-576 679-699 | X28; 55°C | BC083145 |

La transcripció reversa amb l'anàlisi per reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR) era realitzat amb 1 µg de RNA total utilitzant el Kit "SuperSrip One-Step RT-PCR amb Taq Platinum (Gibco).

Producció de Proteïnes recombinants.

Les bactèries BL21 eren transformades amb els constructes de pGEX que contenien les proteïnes dels dits de zenc de C-terminal (CTZF) i de N-terminal (NTZF), així com també el pGEX-mmSnaHA (Batlle et al. 2000), les bactèries eren induïdes per produir proteïna recombinant seguint les instruccions de la casa comercial (Pharmacia). Els lisats eren comprovats i quantificats per electroforesis en gel d'acrilamida al 10% SDS i tenyits amb Coomassie.

Assaigs de retardament en Gel.

Els oligonucleòtids de doble cadena corresponents al promotor d'E-cadherina utilitzats en aquests assatjos eren els següents: E-box 1 (nt -64 a -92): 5'-GGCTGAGGGTTCACCTGCCGCCACAGCC, E-box 2 (nt -40 a -12) 5'-CCTCCGGGGCTCACCTGGCTGAGCCACG i E-box 3 (nt +10 a +38) 5'-GGAAGTAAAGCACCTGTGAGCTTGCGG, com a oligonucleòtids mutants, s'utilitzaven els mateixos canviant les lletres subratllades per una A.

Anellàvem els oligos sense i antisense amb tampó TEN durant 10' 70°C i després deixàvem refredar a temperatura ambient durant 2-3h. Després fèiem el marcatge amb P³² mitjançant la "T4 Polinucleotide Kinase" (Gibco) segons les instruccions de la casa comercial i trèiem l'excés de sonda no marcada amb "MicroSpinTM G-25 Columns" (Amersham Pharmacia Biotech Inc).

L'assaig el realitzàvem amb 130 ng de proteïna de fusió, incubant-les amb gel durant 30' amb 200fm d'oligonucleòtid marcat (qualsevol de les tres caixes) amb el següent tampó d'unió: 20 mM d'HEPES, pH 7.6, 150 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10% glicerol, 0.2 mM ZnSO₄, 0.3 mg/ml BSA i 500 ng de Poli-(dl-dC) com a competidor inespecífic. A més en alguns casos un excés de 10 o 100 vegades oligonucleòtid fred. Les mostres es resolien en un gel d'acrilamida al 4% (19:1 acrilamida:bisacrilamida) fet en Tris-Borat 22 mM durant 1h a 35 mV en TBX1.

Assaig de "BOPA" (Biotinilated Oligonucleotide Precipitation Assay) Snail i CTIP sobre promotor d'E-cadherina.

Les cèl·lules RWP1 es van transfectar amb Snail-HA (SNA-HA) o CTIP o amb ambdues. A les 48 hores de la transfecció les cèl·lules es van lisar amb tampó RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.5% NaDOC, 1% Tritó X-100, 0.1% SDS, 1 mM DTT, 0.1 mM Ortovanadat Sòdic, 10mM Naf, 1 mM PefaBloc, 10 µg/ml Leupeptina i 0.7 ug/ml Pepstatina) durant 30 minuts en gel, es van centrifugar durant 5 minuts a 14 000 r.p.m. i es va obtenir el sobrenadant. Seguidament es van incubar 1 mg de proteïna total amb 4 µg de la sonda corresponent al fragment del promotor d'E-cadherina (-92 a -12) marcat amb una molècula de biotina en l'extrem 5' i 10 µg de poli dI-dC (Promega) durant tota la nit a 4°C.

Al dia següent es va afegir a cada mostra 25 µl efectius de *Streptavidin-agarose* (SIGMA) i es van incubar durant una hora en rotació a 4°C. Tot seguit es van centrifugar les mostres per precipitar l'agarosa a 3.000 rpm, es va descartar el sobrenadant i es van rentar tres vegades l'agarosa amb RIPA. Seguidament es van resuspendre les mostres amb 20 µl de RIPA i 5 µl de SB5X (Tris 10 mM, 1% SDS, beta-mercaptoetanol, blau de bromofenol i 10% glicina. Sample Buffer concentrat 5 vegades), es van bullir durant 5 minuts a 95°C i es van resoldre en un gel d'acrilamida-SDS al 10%. El gel es va transferir a una membrana de nitocel·lulosa (PROTAN®) amb un tampó que contenia Tris i Glicina a 400 mA i posteriorment, aquesta membrana, es va analitzar mitjançant la tècnica de Western blot (WB).

La immunodetecció de les proteïnes transferides a una membrana de nitocel·lulosa es va realitzar amb un protocol de Western blot freqüent: incubació de 1 hora en solució de bloqueig (Tampó Tris-Salí, Tween al 0.1% (TBS-T), llet en pols desnatada al 5%). En aquesta mateixa solució de bloqueig es diluïa l'anticòs primari específic, contra HA-tag (Roche) (per visualitzar Snail) o contra Myc-tag obtingut d'ascitis de ratolins del nostre departament, per visualitzar CTIP. Per últim, per detectar CTBP1 s'utilitzava un anticòs monoclonal comercial de Transduction Laboratories.

Després de tres rentats de 10 minuts a temperatura ambient amb TBS-T més llet, es feia la incubació amb l'anticòs secundari conjugat a peroxidasa de rave, específic contra l'espècie originària del primari, durant 1 hora a temperatura ambient, a una dilució d'1:2000 en tampó de bloqueig.

Es tornaven a fer els mateixos rentats, però en aquest cas, l'últim d'ells es feia sense llet, solament amb TBT-T. Tot seguit es revelava la reacció amb un substrat específic per a l'HRP, quimioluminiscent (*Enhanced ChemiLuminescence, ECL, Amersham-Pharmacia*) durant un minut, per després exposar diferents temps la membrana a pel·lícules autoradiogràfiques Agfa-Curix.

Assaig de "pulldown".

Cèl·lules RWP1 eren transfectades amb Snail, Snail P2A, Snail delta7, Snail delta 28 o el vector buit coma control, com he descrit anteriorment. A les 48h de la transfecció les cèl·lules eren lisades amb tampó Nonidet: 50mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 0.5mM MgCl₂, 0.1% Nonidet, 1mM DTT, 0.1mM Ortovanadat Sòdic, 10mM NaF, 1mM Pefabloc, 10ug/ml Leupeptina i 0.7ug/ml Pepstatina durant 30' en gel, centrifugades durant 5' a 14.000 r.p.m i obtenim el sobrenadant.

Seguidament eren preincubades durant 30' a temperatura ambient 100ul d'extracte i 40ul efectius de resina (Glutathione Sepharose™ 4B. Amersham Pharmacia Biotech Inc). Centrifuguem per precipitar la resina i ens quedem amb el sobrenadant al que li afegim 5ug de proteïna de fusió (pGEX-NTZF o pGEX-CTZF) o de vector buit ho incubem 40' a temperatura ambient. Seguidament hi posem 20ul efectius de resina i ho incubem 20' a temperatura ambient. Finalment fem tres rentats amb TBSX1 i resuspenem les mostres amb 25ul SBx1, les bullim durant 5' a 95°C i les resolem en un gel d'acrilamida-SDS al 10%. Els gel van ser transferits a una membrana de nitrocel·lulosa (PROTRAN®) i las membranes analitzades mitjançant Western Blot (WB) utilitzant anticossos contra HA, que porten totes les proteïnes transfectades.

Co-Immunoprecipitació amb proteïnes transfectades.

Transfectem les cèl·lules RWP1 amb Zeb1 i Snail, segons condicions de la casa comercial, abans descrites. 48h després de la transfecció lisem amb tampó Nonidet (veure Pulldown). Fem una Preabsorció de 6h a 4°C i seguidament fem la immunoprecipitació amb 500 ng d'extracte i 4ug/ml d'anticòs policlonal de cabra anti-Zeb (SantaCruz) o amb un Ab irrellevant (també policlonal de cabra), durant tota la nit a 4°C.

Incubem amb la resina (Proteïna G-agarosa. Roche) durant 1h a temperatura ambient, seguit de cinc rentats de 10' amb tampó de lisis i resuspensió de la resina amb 25 µl de SBx1. Resolem en gel d'acrilamida-SDS al 10%. El gel es va transferir a una membrana de nitocel·lulosa (PROTAN®) amb un tampó que contenia Tris i Glicina a 400 mA i posteriorment, aquesta membrana, es va analitzar mitjançant la tècnica de Western blot (WB) amb anticossos contra l'HA.

Immunofluorescència.

Diferents tipus cel·lulars eren fixats en PFA i posteriorment permeabilitzats en Tritó 0.2% en PBS i sotmesos a immunofluorescència utilitzant com a anticòs primari el policlonal de cabra anti-Zeb amb diluït 1/50 i com a secundari un policlonal de conill anti cabra marcat amb fluoresceïna que dóna color verd. Un cop rentats els cubreobjectes es van muntar en Mowiol-DABCO i visualitzats al microscopi confocal. Les imatges de microscopia confocal es van captar per un sistema de Microscòpia Confocal Invertida Leica TCS-SP2, amb el software pertinent. Els canals d'emissió i excitació amb làser foren colimats en cada cas per tal de no tenir senyal creuat. En cada imatge es varen realitzar d'entre 4 i 8 talls per a generar després una projecció. El contrast i la intensitat de la senyal foren retocats mitjançant programes de processament d'imatges (Adobe Photoshop 6.0).

BIBLIOGRAFIA

B

Barbera MJ, Puig I, Dominguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, Peiro S, Baulida J, Franci C, Dedhar S, Larue L, Garcia de Herreros A. *Oncogene*. 2004 Sep 23;23(44):7345-54. Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells.

Bates RC, Mercurio AM. *Mol Biol Cell*. 2003. May; 14(5):1790-800. Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids.

Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baudila J i García de Herreros A. *Nature Cell Biology* 2:84-89 2000. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in the epithelial tumor cells.

Batlle E, Verdu J, Dominguez D, del Mont Llosas M, Diaz V, Loukili N, Paciucci R, Alameda F, Garcia de Herreros A. *J Biol Chem*. 1998. Jun 12; 273(24):15091-8. Protein kinase C-alpha activity inversely modulates invasion and growth of intestinal cells.

Becker JC, Brableiz T, Kirchnert T, Conrad CT. *Proc.Nat.Acad. Sci*. 92:2375-2378 1995. Negative transcriptional regulation in anergic T cells.

Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W. *J Cell Biol*. 1989 Jun;108(6):2435-47. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion.

Behrens L, Löwrick O, Klein-Hitpass L, Birchmeier W. *Proc.Natl.Acad.Sci* 88:11495-11499 1991. The E-cadherin promoter: Functional ananlysis of a GC-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element.

Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F. EMBO J. 1995 Dec 15;14(24):6107-15. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers.

Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, Nieto MA. Oncogene. 2002. May 9; 21(20):3241-6. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas.

Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. J Cell Sci. 2003. Feb 1; 116(Pt 3):499-511. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors.

Boyd JM, Subramanian T, Schaeper U, La Regina M, Bayley S, Chinnadurai G. EMBO J. 1993 Feb;12(2):469-78. A region in the C-terminus of adenovirus 2/5 E1a protein is required for association with a cellular phosphoprotein and important for the negative modulation of T24-ras mediated transformation, tumorigenesis and metastasis.

Boyer B, Valles AM, Edme N. *Biochem Pharmacol.* 2000. Oct 15; 60(8):1091-9. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions.

Brabant G, Hoang-Vu C, Cetin Y, Dralle H, Scheumann G, Molne J, Hansson G, Jansson S, Ericson LE, Nilsson M. Cancer Res. 1993 Oct 15;53(20):4987-93. E-cadherin: a differentiation marker in thyroid malignancies.

Burdsal CA, Damsky CH, Pedersen RA. Development. 1993 Jul;118(3):829-44. The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak.

C

Cabanillas AM, Darling DS. DNA Cell Biol. 1996 Aug;15(8):643-51. Alternative splicing gives rise to two isoforms of Zfh1, a zinc finger/homeodomain protein that binds T3-response elements.

Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. Nature Cell Biology 2:76-83 2000. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transition by repressing E-cadherin expression.

Carl TF, Dufton C, Hanken J, Klymkowsky MW. Dev Biol. 1999 Sep 1;213(1):101-15. Inhibition of neural crest migration in *Xenopus* using antisense slug RNA.

Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oran KF, Gridley T. Molecular Cell Biology 21,23:8184-8188 2001. The mouse gene snail encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition.

Casal FC i Leptin M. Proc.Natl.Acad.Sci 93:10327/10332 1996. Identification of novel genes in *Drosophila* reveals the complex regulation of early activity in the mesoderm.

Chaberlain EM i Sanders MM. Molecular and Cellular Biology 19,5:3600-3606 1999. Identification of the novel player deltaEF1 in estrogen transcriptional cascades.

Chen PL, Liu F, Cai S, Lin X, Li A, Chen Y, Gu B, Lee EY, Lee WH. Mol Cell Biol. 2005 May;25(9):3535-42. Inactivation of CtIP leads to early embryonic lethality mediated by G1 restraint and to tumorigenesis by haploid insufficiency.

Chinnadurai G. Bioessays. 2003 Jan;25(1):9-12. CtBP family proteins: more than transcriptional corepressors.

Chinnadurai G. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004;273:139-61. Modulation of oncogenic transformation by the human adenovirus E1A C-terminal region.

Chinnadurai G. *Mol Cell.* 2002 Feb;9(2):213-24. CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis.

Christofori G, Semb H. *Trends Biochem Sci.* 1999 Feb;24(2):73-6. Review. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene.

Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F. *Mol Cell.* 2001 Jun;7(6):1267-78. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion.

Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev AJ. *Cell Biol.* 2003 Nov 24;163(4):847-57. Epub 2003 Nov 17. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK.

Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS. *Cell.* 1995 Jun 30;81(7):1137-46. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway.

D

Damjanov I, Damjanov A, Damsky CH. Developmentally regulated expression of the cell-cell adhesion glycoprotein cell-CAM 120/80 in peri-implantation mouse embryos and extraembryonic membranes. *Dev Biol.* 1986 Jul;116(1):194-202.

del Barrio MG, Nieto MA. *Development.* 2002 Apr;129(7):1583-93. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation.

Dominguez D, Montserrat-Sentis B, Virgos-Soler A, Guaita S, Grueso J, Porta M, Puig I, Baulida J, Franci C, Garcia de Herreros A. Mol Cell Biol. 2003. Jul; 23(14):5078-89. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor.

Dorudi S, Hart IR. Curr Opin Oncol. 1993 Jan;5(1):130-5. Mechanisms underlying invasion and metastasis.

Dubin MJ, Stokes PH, Sum EY, Williams RS, Valova VA, Robinson PJ, Lindeman GJ, Glover JN, Visvader JE, Matthews JM. J Biol Chem. 2004 Jun 25;279(26):26932-8. Epub 2004 Apr 14. Dimerization of CtIP, a BRCA1- and CtBP-interacting protein, is mediated by an N-terminal coiled-coil motif.

E

Edelman GM, Gallin WJ, Delouee A, Cunningham BA, Thiery JP. Early epochal maps of two different cell adhesion molecules. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Jul;80(14):4384-8.

Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G, Gress TM. Cancer Res. 2001. May 15; 61(10):4222-8. Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation.

F

Fontemaggi G, Gurtner A, Strano S, Higashi Y, Sacchi A, Piaggio G, Blandino G. Molecular and Cellular Biology 21,24:8461-8470 2001. The transcriptional repressor ZEB regulates p73 expression at the crossroad between proliferation and differentiation.

Fortini ME, Lai ZC, Rubin GM. Mech Dev. 1991 Jun;34(2-3):113-22. The Drosophila zfh-1 and zfh-2 genes encode novel proteins containing both zinc-finger and homeodomain motifs.

Funahashi J, Kamachi Y, Goto K i Kondoh H. Nucleic Acids Research 19,13:3543-3547 1991. Identification of nuclear factor DeltaEF1 and its binding site essential for lens-specific activity of the Delta1-crystallin enhancer.

Funahashi J, Sekido R, Murai K, Kamachi Y i Kondoh H. Development 119:433-446 1993. Delta crystallin enhancer binding protein deltaEF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis.

Furusawa T, Moribe H, Kondoh H i Higashi Y. Molecular and Cellular Biology 19,12:8581-8590 1999. Identification of CtBP1 and CtBP2 as corepressors of zinc finger-homeodomain factor DeltaEF1.

Fusco C, Raymond A, Zervos AS. Genomics. 1998 Aug 1;51(3):351-8. Molecular cloning and characterization of a novel retinoblastoma-binding protein.

Fuse N, Hirose S, Hayashi S. Development. 1996 Apr;122(4):1059-67. Determination of wing cell fate by the escargot and snail genes in Drosophila.

G

Genetta T, Kadesch T. Gene. 1996 Mar 9;169(2):289-90. Cloning of a cDNA encoding a mouse transcriptional repressor displaying striking sequence conservation across vertebrates.

Genetta T, Ruezinsky D, Kadesch T. Mol Cell Biol. 1994 Sep;14(9):6153-63. Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-loop-helix proteins: implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer.

Genetta T, Ruezinsky D, Kadesch T. Mol Cell Biol. 1994. Sep; 14(9):6153-63. Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-

loop-helix proteins: implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer.

Gill G, Ptashne M. Cell. 1987 Oct 9;51(1):121-6. Mutants of GAL4 protein altered in an activation function.

Giroldi LA, Bringuier PP, de Weijert M, Jansen C, van Bokhoven A, Schalken JA. Biochem Biophys Res Commun. 1997 Dec 18;241(2):453-8. Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression.

Grande M, Franzen A, Karlsson JO, Ericson LE, Heldin NE, Nilsson M. Cell Sci. 2002. Nov 15; 115(Pt 22):4227-36. Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes.

Gray S, Levine M. Genes Dev. 1996. Mar 15; 10(6):700-10. Short-range transcriptional repressors mediate both quenching and direct repression within complex loci in Drosophila.

Grégoire JM i Roméo PH. The Journal of Biological Chemistry 274,10:6567-6578 1999. T-cell expression of the human GATA-3 gene is regulated by a non-lineage-specific silencer.

Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tschlis PN, Larue L. Cancer Res. 2003. May 1; 63(9):2172-8. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines.

Grooteclaes MC i Frisch SM. Oncogen 19:3823-3828 2000. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis.

H

Hajra KM, Ji X, Fearon ER. *Oncogene*. 1999 Dec 2;18(51):7274-9. Extinction of E-cadherin expression in breast cancer via a dominant repression pathway acting on proximal promoter elements.

Hay ED. *Acta Anat (Basel)*. 1995. 154(1):8-20. An overview of epithelio-mesenchymal transformation.

Hemavathy K, Ashraf SA i Ip T. *Gene* 257:1-12 2000. Snail/Slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer.

Hemavathy K, Hu X, Ashraf SI, Small SJ, Ip YT. *Dev Biol*. 2004 May 15;269(2):411-20. The repressor function of snail is required for *Drosophila* gastrulation and is not replaceable by Escargot or Worniu.

Hemavathy K, Yeng Xianglun i Ip T. *Development* 124,19:3684-3691 1997. Differential regulation of gastrulation and neuroectodermal gene expression by Snail in the *Drosophila* embryo.

Hennig G, Behrens J, Truss M, Frisch S, Reichmann E, Birchmeier W. J. *Oncogene*. 1995 Aug 3;11(3):475-84. Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter in vivo.

Hennig G, Lowrick O, Birchmeier W, Behrens J. *J Biol Chem*. 1996 Jan 5;271(1):595-602. Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression.

Higashi Y, Moribe H, Takagi T, Sekido R, Kawakami K, Kikutani H, Kondoh H. *Journal of Exp.Med*. 185,8:1467-1479 1997. Impairment of T cell development in deltaEF1 mutant mice.

Hlubek F, Lohberg C, Meiler J, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. J. Biochemistry 129:635-6412001. TIP-60 is a Cell-type-Specific transcriptional regulator.

Hope IA, Mahadevan S, Struhl K. Nature. 1988 Jun 16;333(6174):635-40. Structural and functional characterization of the short acidic transcriptional activation region of yeast GCN4 protein.

I

Ikeda K i Kawakami K. Eur.J.Biochem 18,1:10-18 1995. DNA binding through distinct domains of zinc finger-homeodomain protein AREB6 has different effects on gene transcription.

Ikeda K, Halle JP, Steizer G, Meisterernst M i Kawakami K. Molecular and Cellular Biology 1998. Involvement of negative cofactor NC2 in active repression by zinc finger-homeodomain transcription factor AREB6.

Immergluck K, Lawrence PA, Bienz M. Cell. 1990 Jul 27;62(2):261-8. Induction across germ layers in Drosophila mediated by a genetic cascade.

Ip YT, Gridley T. Curr Opin Genet Dev. 2002 Aug;12(4):423-9. Cell movements during gastrulation: snail dependent and independent pathways.

Ip YT, Gridley T. Curr Opin Genet Dev. 2002. Aug; 12(4):423-9. Cell movements during gastrulation: snail dependent and independent pathways.

Ip YT, Maggert K, Levine M. EMBO J. 1994 Dec 15;13(24):5826-34. Uncoupling gastrulation and mesoderm differentiation in the Drosophila embryo.

Ip YT, Park RE, Kosman D, Yazdanbakhsh K, Levine M. Genes Dev. 1992. Aug; 6(8):1518-30. Dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the Drosophila embryo.

J

Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grunert S. J Cell Biol. 2002 Jan 21;156(2):299-313. Epub 2002 Jan 14. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways.

Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grunert S. J Cell Biol. 2002. Jan 21; 156(2):299-313. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways.

Ji X, Woodard AS, Rimm DL, Fearon ER. Cell Growth Differ. 1997 Jul;8(7):773-8. Transcriptional defects underlie loss of E-cadherin expression in breast cancer.

K

Kamachi Y i Kondoh H. Molecular and Cellular Biology 13,9:5206-5215 1993. Overlapping Positive and Negative regulatory elements determine Lens-specific activity of the Delta1-crystallin enhancer.

Kang Y, Massague J. Cell. 2004 Aug 6;118(3):277-9. Review.Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis.

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

Kispert A, Hermann BG. EMBO J. 1993 Dec;12(12):4898-9. The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein.

Knoepfler PS, Eisenman RN. Cell. 1999 Nov 24;99(5):447-50. Sin meets NuRD and other tails of repression.

Koipally J, Georgopoulos K. J Biol Chem. 2002 Jun 28;277(26):23143-9. Epub 2002 Apr 16. Ikaros-CtIP interactions do not require C-terminal binding protein and participate in a deacetylase-independent mode of repression.

Kosman D, Ip YT, Levine M i Arora K. Science 1991. Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo.

Kovarik A, Peat N, Wilson D, Gendler SJ, Taylor-Papadimitriou J. J Biol Chem. 1993 May 5;268(13):9917-26. Analysis of the tissue-specific promoter of the MUC1 gene.

Krasilnikov MA. Biochemistry (Mosc). 2000 Jan;65(1):59-67. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation.

L

LaBonne C, Bronner-Fraser M. Dev Biol. 2000 May 1;221(1):195-205. Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration.

Lai ZC, Fortini ME, Rubin GM. Mech Dev. 1991. Jun; 34(2-3):123-34. The embryonic expression patterns of *zfh-1* and *zfh-2*, two *Drosophila* genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins.

Lai ZC, Rushton E, Bate M i Rubin GM. Proc.Natl.Acad.Sci. 90:4122-4126 1993. Loss of function of the *Drosophila* *Zfh-1* gene results in abnormal development of mesodermally derived tissues.

Lazarova DL, Bordonero M i Sartorelli AC. Cell Growth and Differentiation 12:319-326 2001. Transcriptional regulation of the vitamin D3 receptor gene by ZEB.

Leptin M, Grunewald B. Development. 1990 Sep;110(1):73-84. Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*.

Leptin M. EMBO J. 1999 Jun 15;18(12):3187-92. Gastrulation in *Drosophila*: the logic and the cellular mechanisms.

Leptin M. Genes Dev. 1991 Sep;5(9):1568-76. twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development.

Lerchner W, Lahnkic BV, Remacle JE, Huylebroeck D i Smith JC. Development 127:2729-2739 2000. Region-specific activation of the *Xenopus* Brachyury promoter involves active repression in ectoderm and endoderm: a study using a transgenic frog embryos.

Li S, Chen PL, Subramanian T, Chinnadurai G, Tomlinson G, Osborne CK, Sharp ZD, Lee WH. J Biol Chem. 1999 Apr 16;274(16):11334-8. Binding of CtIP to the BRCT repeats of BRCA1 involved in the transcription regulation of p21 is disrupted upon DNA damage.

Linker C, Bronner-Fraser M, Mayor R. Dev Biol. 2000 Aug 15;224(2):215-25. Relationship between gene expression domains of Xsnail, Xslug, and Xtwist and cell movement in the prospective neural crest of *Xenopus*.

M

Manzanares M, Locascio A, Nieto MA. Trends Genet. 2001 Apr;17(4):178-81. The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution.

Mauhin V, Lutz Y, Dennefeld C, Alberga A. Nucleic Acids Res. 1993. Aug 25; 21(17):3951-7. Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL.

Meloni AR, Smith EJ, Nevins JR. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Aug 17;96(17):9574-9. A mechanism for Rb/p130-mediated transcription repression involving recruitment of the CtBP corepressor.

Mitchell PJ, Tjian R. Science. 1989 Jul 28;245(4916):371-8. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins.

Morinaga T, Yasuda H, Hashimoto T, Higashio K i Tamaoi T. Molecular and Cellular Biology 11,12:6041-6049 1991. A Human alfa-fetoprotein enhancer-binding protein, ATBF1, contains four homeodomains and seventeen zinc fingers.

Murray D, Prescht P, Balakir R i Hurton WE. The Journal of Biological Chemistry 275,5:3610-3618 2000. The transcription factor deltaEF1 is inversely expressed with typeII collagen mRNA and can repress Col2a1 in transfected chondrocytes.

N

Nakayama H, Scott IC, Cross JC. Dev Biol. 1998. Jul 1; 199(1):150-63. The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor.

Nibu Y, Senger K, Levine M. Mol Cell Biol. 2003 Jun;23(11):3990-9. CtBP-independent repression in the Drosophila embryo.

Nibu Y, Zhang H, Levine M. Science. 1998 Apr 3;280(5360):101-4. Interaction of short-range repressors with Drosophila CtBP in the embryo.

Nieto MA, Bennett MF, Sargent MG, Wilkinson DG. Development. 1992 Sep;116(1):227-37. Cloning and developmental expression of Sna, a murine homologue of the Drosophila snail gene.

Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J. Science. 1994 May 6;264(5160):835-9. Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene.

Nieto MA. Mech Dev. 2001 Jul;105(1-2):27-35. The early steps of neural crest development.

Nieto MA. Nature Reviews/Molecular Cell Biology 3:155-166 2002. The Snail superfamily of Zinc-finger transcription factors.

Novak A, Hsu SC, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Papkoff J, Montesano R, Roskelley C, Grosschedl R, Dedhar S. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Apr 14;95(8):4374-9. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways.

O

Oda H, Tsukita S, Takeichi M. Dev Biol. 1998 Nov 15;203(2):435-50. Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during Drosophila gastrulation.

Oda H, Uemura T, Harada Y, Iwai Y, Takeichi M. Dev Biol. 1994 Oct;165(2):716-26. A Drosophila homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion.

Ozes O.N., Mayo L.D., Gustin J.A., Pfeffer S.R., Pfeffer L.M., Donner D.B. Nature. 1999. Sep 2; 401(6748):82-5. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase.

P

Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, de Herreros AG, Lafarga M, Munoz A. J Cell Biol. 2001. Jul 23; 154(2):369-87. Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling.

Palmer HG, Larriba MJ, Garcia JM, Ordonez-Moran P, Pena C, Peiro S, Puig I, Rodriguez R, de la Fuente R, Bernad A, Pollan M, Bonilla F, Gamallo C, de Herreros AG, Munoz A. Nat Med. 2004 Sep; 10(9):917-9. The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer.

Papin C, Van Grunsven LA, Verschueren K, Huylebroeck D i Smtih JC. Mechanism of development 111:37-46 2002. Dynamic regulation of Brachyury expression in the amphibian embryo by XSIP1.

Peinado H, Portillo F, Cano A. Int J Dev Biol. 2004;48(5-6):365-75. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis.

Peinado H, Quintanilla M, Cano A. J Biol Chem. 2003. Jun 6; 278(23):21113-23. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions.

Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, Cano A. J Biol Chem. 2001, Jul 20; 276(29):27424-31. A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions.

Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. Nature. 1998 Mar 12;392(6672):190-3. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma.

Poortinga G, Watanabe M, Parkhurst SM. EMBO J. 1998 Apr 1;17(7):2067-78. Drosophila CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression.

Porter AC, Vaillancourt RR. Oncogene. 1998 Sep 17;17(11 Reviews):1343-52. Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis.

Postigo AA i Dean DC. Molecular and Cellular Biology 19,12:7961-7971 1999. Independent repressor domain in ZEB regulate muscle and T-cell differentiation.

Postigo AA i Dean DC. Proc.Natl.Acad.Sci 96:6683-6688 1999. ZEB represses transcriton through interaction with the corepressor CtBP.

Postigo AA i Dean DC. Proc.Natl.Acad.Sci 97,12:6391-6396 2000. Differential expression and function of members of the Zfh-1 family of zinc fingers/homeodomain repressors.

Postigo AA i Dean DC. The EMBO Journal 16,13:3935-3943 1997. ZEB, a vertebrate homolog of *Drosophila* Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation.

Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ, Kroll KL. EMBO J. 2003 May 15;22(10):2453-62. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins.

Postigo AA, Sheppard AM, Mucenski MC, Dean DC. The EMBO Journal 16,13:3924-3934 1997. c-Myb and Ets proteins synergize to overcome transcriptional repression by ZEB.

Postigo AA, Ward E, Skeath JB i Dean DC. Molecular and Cellular Biology 19,10:7255-7263 1999. Zfh-1, the *Drosophila* Homologue of ZEB, is a transcriptional repressors that regulates somatic myogenesis.

Postigo AA. EMBO J. 2003 May 15;22(10):2443-52. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway.

R

Remacle JE, Kraft H, Lerchner W, Wuytens G, Collart C, Verschueren K, Smith JC, Huylebroeck D. The EMBO Journal 18,18:5073-5084 1999. New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites.

Reuter R, Panganiban GE, Hoffmann FM, Scott MP. Development. 1990 Dec;110(4):1031-40. Homeotic genes regulate the spatial expression of putative growth factors in the visceral mesoderm of *Drosophila* embryos.

Ringwald M, Baribault H, Schmidt C, Kemler R. Nucleic Acids Res. 1991 Dec 11;19(23):6533-9. The structure of the gene coding for the mouse cell adhesion molecule uvomorulin.

Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Boyd J. Nat Genet. 1994 May;7(1):98-102. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers.

Rodrigo I, Cato AC, Cano A. Exp Cell Res. 1999 May 1;248(2):358-71. Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element.

Rodriguez-Boulan E, Nelson WJ. Science. 1989 Aug 18;245(4919):718-25. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype.

Rommel C, Hafen E. Curr Opin Genet Dev. 1998 Aug;8(4):412-8. Ras--a versatile cellular switch.

Rommel C., Hafen E. Curr Opin Genet Dev. 1998. Aug; 8(4):412-8. Ras--a versatile cellular switch.

Ruezinsky D, Beckman H, Kadesch T. Genes and Development 29-37 1990. Modulation of the IgH enhancer's cell type specificity through a genetic switch.

S

Savagner P. Bioassays 23,10:912-923 2001. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition.

Schaeper U, Boyd JM, Verma S, Uhlmann E, Subramanian T, Chinnadurai G. Proc.Natl.Acad.Sci 7, /92,23:10467-10471 1995. Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interact with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved a negative modulation of oncogenic transformation.

Schaeper U, Subramanian T, Lim L, Boyd JM, Chinnadurai G. J Biol Chem. 1998 Apr 10;273(15):8549-52. Interaction between a cellular protein that binds to the C-terminal region of adenovirus E1A (CtBP) and a novel cellular protein is disrupted by E1A through a conserved PLDLS motif.

Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. Cancer Res. 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6328-37. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis.

Schwartz RH. Current Opinion In Immunology 9:351-357 1997. T cell clonal anergy.

Sefton M., Sanchez S., Nieto M.A. Development. 1998. Aug; 125(16):3111-21. Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo.

Seipel K, Georgiev O, Schaffner W. EMBO J. 1992 Dec;11(13):4961-8. Different activation domains stimulate transcription from remote ('enhancer') and proximal ('promoter') positions.

Sekido R, Murai K, Funahashi J, Kamachi Y, Fujisawa-Sehara A, Nabeshima Y, Kondoh H. Molecular and Cellular Biology 14,9:5692-5700 1994. The delta-Crystallin enhancer-binding protein deltaEF1 is a repressor of E2-Box-Mediated gene activation.

Sekido R, Murai K, Kamachi Y i Kondoh H. Gens to Cells 2:771-783 1997. Two mechanisms in the action of repressor DeltaEF1: Binding site competition with an activator and active repression.

Shi Y, Sawada J, Sui G, Affar el B, Whetstine JR, Lan F, Ogawa H, Luke MP, Nakatani Y, Shi Y. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. Nature. 2003 Apr 17;422(6933):735-8.

Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. Cancer. 1996. Apr 15; 77(8 Suppl):1605-13. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells.

Simon AM i Burden SJ. Molecular and Cellular Biology 13,9:5133-5140 1993. An E-box mediates activation and repression of the Acetylcholine receptor Delts-subunit gene during myogenesis.

Sum EY, Peng B, Yu X, Chen J, Byrne J, Lindeman GJ, Visvader JE. J Biol Chem. 2002 Mar 8;277(10):7849-56. Epub 2001 Dec 18. The LIM domain protein LMO4 interacts with the cofactor CtIP and the tumor suppressor BRCA1 and inhibits BRCA1 activity.

Sweeton D, Parks S, Costa M, Wieschaus E. Development. 1991 Jul;112(3):775-89. Gastrulation in Drosophila: the formation of the ventral furrow and posterior midgut invaginations.

T

Takagi T, Moribe H, Kondoh H i Higashi Y. Development 125:21-31 1998. DeltaEF1, a zinc finger homeodomain transcription factor, is required for skeleton patterning in multiple lineages.

Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Wilson KT, James SP, Silverberg SG, Nishizuka S, Terashima M, Motoyama T, Meltzer SJ. J Natl Cancer Inst. 2000 Apr 5;92(7):569-73. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas.

Tan C, Costello P, Sanghera J, Dominguez D, Baulida J, de Herreros AG, Dedhar S. Oncogene. 2001 Jan 4;20(1):133-40. Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells.

Tepass U, Gruszynski-DeFeo E, Haag TA, Omatyar L, Torok T, Hartenstein V. *Genes Dev.* 1996 Mar 15;10(6):672-85. Shotgun encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia.

Terraz C, Toman D, Delauche M, Ronco P i Rossert J. *The Journal of Biological Chemistry* 276,40:37011-37019 2001. DeltaEF1 binds to a far upstream sequence of the mouse Pro- α 1(I) collagen gene represses its expression in osteoblasts.

Thiery JP, Chopin D. *Cancer Metastasis Rev.* 1999. 18(1):31-42. Epithelial cell plasticity in development and tumor progression.

Thiery JP, Morgan M. *Nat Med.* 2004 Aug;10(8):777-8. Breast cancer progression with a Twist.

Thiery JP. *Curr Opin Cell Biol.* 2003. Dec; 15(6):740-6. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies.

Thiery JP. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jun;2(6):442-54. Review.Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.

Thiery JP. *Nat Rev Cancer.* 2002. Jun; 2(6):442-54. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.

Turner J i Crosslen M. *Bioassays* 23:683-690 2001. The CtBP family: enigmatic and enzymatic transcriptional co-repressors.

V

Vandewalle B, Adenis A, Hornez L, Revillion F, Lefebvre J. *Cancer Lett.* 1994. Oct 28; 86(1):67-73. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in normal and malignant human colorectal tissues.

Veltmaat JM, Orelia CC, Ward-Van Oostwaard D, Van Rooijen MA, Mummery CL, Defize LH. *Int J Dev Biol.* 2000 Apr;44(3):297-307. Snail is an immediate early target gene of parathyroid hormone related peptide signaling in parietal endoderm formation.

Vernon AE, LaBonne C. *Curr Biol.* 2004 Sep 7;14(17):R719-21. Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions.

Verschuere K, Remacle JE, Collart C, Kraft H, Baker BS, Tylzanowski P, Nelles L, Wuytens G, Su MT, Bodmer R, Smith JC, Huylebroeck D. *Journal of Biological Chemistry* 274,29:20489-20498 1999. SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes.

Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. *Cell.* 1991 Jul 12;66(1):107-19. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role.

W

Watanabe Y, Kawakami K, Hirayama Y i Nagano K. *J.Biochem* 114:849-855 1993. Transcription factors positively and negatively regulating the NA,K-ATPase α 1 subunit gene.

Wolffe AP. *Essays Biochem.* 2001;37:45-57. Transcriptional regulation in the context of chromatin structure.

Y

Yamada T, Placzek M, Tamaka H, Dodd J i Jessel TM. *Cell* 64:635-647 1991. Control of the cell pattern in the developing nervous system: Polarizing Activity of the Floor plate and Notochord.

Yamasaki H, Sekimoto T, Ohkubo T, Douchi T, Nagata Y, Ozawa M, Yoneda Y. *Genes Cells.* 2005 May;10(5):455-64. Zinc finger domain of Snail functions as a nuclear localization signal for importin beta-mediated nuclear import pathway.

Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Cell. 2004. Jun 25; 117(7):927-39. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis.

Yasui DH, Genetta T, Kadesch T, Williams TM, Swain SL, Tsui LV, Huber BT. The Journal of Immunology 160:4433-4440 1998. Transcriptional repression of the IL-2 gene in Th cells by ZEB.

Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 1;92(16):7416-9. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas.

Z

Zhang Q, Piston DW, Goodman RH. Science. 2002 Mar 8;295(5561):1895-7. Epub 2002 Feb 14. Regulation of corepressor function by nuclear NADH.

Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC. Nat Cell Biol. 2004 Oct;6(10):931-40. Epub 2004 Sep 26. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition.