

Tesis doctoral

**Similitudes y diferencias en la estructura y
función de β -catenina y plakoglobina**

Susana Miravet Delgado

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la disponibilidad y dedicación de mis directores de tesis, la Dra. Mireia Duñach y el Dr. Antonio García de Herreros.

También quiero expresar mi agradecimiento a los cateninos de todos los tiempos, a la gente de la unidad de Biofísica y a los compañeros del IMIM por todo lo que me han ayudado.

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
Ala	alanina
Amp	ampicilina
ATP	adenosintrifosfato
BSA	albúmina de suero bovino
CKII	caseína quinasa II
CytoEcad	dominio citosólico de E-cadherina
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilendiaminotetraacetato de sodio
EGF	factor de crecimiento epidérmico
Glu	glutámico
GST	glutathion-S-transferasa
IPTG	β -D-isopropil-tiogalactopiranosido
K _a	constante de afinidad
kDa	kilodalton
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
LEF	factor activador de linfocitos
mAb	anticuerpo monoclonal
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	par de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
Phe	fenilalanina
PS	proteasa PreScission™
RT-PCR	PCR con transcriptasa reversa
SDS	dodecilsulfato de sodio
Ser	serina
St	estándar, muestra de referencia
TAE	tampón Tris/ acetato/ EDTA
TBP	proteína de unión a cajas TATA
TBS	tampón Tris salino
Tcf	factor derivado de células T
TE	tampón Tris/ EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
Thr	treonina
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
TSS	solución de transformación
TTBS	tampón Tris salino con 0,2% de Triton X-100
Tyr	tirosina
Tyr(P)	fosfotirosina
WT	salvaje (<i>wild type</i>)

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. LAS UNIONES CELULARES	1
1.1 UNIONES ESTRECHAS	1
1.2 UNIONES DE ANCLAJE	2
1.2.1 Uniones adherentes	2
1.2.2 Desmosomas	2
1.2.3 Hemidesmosomas	2
1.2.4 Contactos focales	3
1.3 UNIONES COMUNICANTES	3
2. LAS UNIONES ADHERENTES	4
2.1 LAS CADHERINAS CLÁSICAS	5
2.1.1 E-cadherina	6
2.2 LAS CATENINAS	8
2.2.1 α -catenina	9
2.2.2 β -catenina	11
2.2.3 p120-catenina (p120 ^{ctn})	14
2.3 REGULACIÓN DE LAS UNIONES ADHERENTES	16
3. LOS DESMOSOMAS	18
3.1 LAS CADHERINAS DESMOSÓMICAS	20
3.2 PLAKOGLOBINA (γ -CATENINA)	22
3.3 PLAKOFILINA	25
3.4 LAS PLAKINAS	26
3.4.1 Desmoplakina	27
3.5 REGULACIÓN DE LOS DESMOSOMAS	29
4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT	29
II. OBJETIVOS	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. OBTENCIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN PROCARIOTAS	37
1.1 ESQUEMA GENERAL	37
1.2 CEPA DE <i>E. COLI</i> , CULTIVO BACTERIANO Y VECTOR UTILIZADO ..	39
1.2.1 Cepa bacteriana y preparación de células competentes	39

1.2.2 Medio de cultivo bacteriano	40
1.2.3 Vector	40
1.3 MÉTODOS DE CLONAJE DE DNA.....	41
1.3.1 Extracción del DNA plasmídico (método de lisis alcalina).	41
1.3.2 Amplificación de fragmentos de DNA por PCR.	41
1.3.3 Amplificación de fragmentos de RNA por RT-PCR.	42
1.3.4 Digestión de DNA	42
1.3.5 Defosforilación de vectores	43
1.3.6 Relleno con la polimerasa Klenow.....	43
1.3.7 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	43
1.3.8 Extracción del DNA del gel de agarosa	44
1.3.9 Ligación.....	44
1.3.10 Transformación en XL1-Blue.....	44
1.3.11 Obtención de los mutantes puntuales	45
1.3.12 Secuenciación de DNA	46
1.4 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	46
1.4.1 Purificación por cromatografía de afinidad	46
1.4.2 Corte entre la GST y la proteína recombinante.....	47
1.4.3 Cuantificación de proteínas.....	48
2. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN EUCARIOTAS.....	48
2.1 LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS	48
2.1.1 Cultivo celular.....	49
2.1.2 Contaje de células	49
2.1.3 Congelación y almacenaje.....	50
2.2 VECTOR PARA EXPRESIÓN EUCARIÓTICA	50
2.3 TRANSFECCIONES TRANSITORIAS	51
2.4 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES	51
2.5 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS EXPRESADOS EN EUCARIOTAS	52
3. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS	53
3.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	53
3.2 ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS. WESTERN BLOT	53

4. ENSAYOS PROTEÍNA QUINASA.....	54
4.1 TIROSINA QUINASAS	54
4.2 SERINA/TREONINA QUINASAS	55
5. ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA	56
5.1 INTERACCIÓN DIRECTA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PURIFICADAS	56
5.2 ENSAYOS DE <i>OVERLAY</i>	57
5.3 ENSAYO DE <i>PULL-DOWN</i>	58
5.4 ENSAYO DE PURIFICACIÓN CON NÍQUEL-AGAROSA.....	58
5.5 CO-INMUNOPRECIPITACIÓN	59
5.6 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD. REPRESENTACIÓN DE SCATCHARD.....	59
6. ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-DNA.....	59
7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL.....	60
8. ENSAYOS DE MARCAJE CELULAR CON ÁCIDO ORTOFOSFÓRICO- ³² P	61
IV. RESULTADOS.....	63
1. INTERACCIÓN Tcf-4-β-CATENINA Y Tcf-4-PLAKOGLOBINA. REGULACIÓN POR LA FOSFORILACIÓN DEL Tcf-4	63
1.1 LA SERINA/TREONINA QUINASA CKII FOSFORILA AL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Tcf-4 EN SU EXTREMO AMINO TERMINAL	63
1.2 LA FOSFORILACIÓN <i>IN VITRO</i> DE Tcf-4 POR CKII NO AFECTA A SU INTERACCIÓN CON β-CATENINA	69
1.3 LA FOSFORILACIÓN <i>IN VITRO</i> DE Tcf-4 POR CKII MODIFICA NEGATIVAMENTE SU INTERACCIÓN CON PLAKOGLOBINA.....	70
1.4 INTERACCIÓN <i>IN VIVO</i> DE PLAKOGLOBINA Y β-CATENINA CON Tcf-4(1-80).	72
1.5 LA FOSFORILACIÓN DEL Tcf-4 POR CKII ESTÁ REGULADA POR LA PRESENCIA DE β-CATENINA Y PLAKOGLOBINA	73
1.6 PLAKOGLOBINA Y β-CATENINA INTERACCIONAN SIMULTÁNEAMENTE CON Tcf-4	74
1.7 PLAKOGLOBINA Y β-CATENINA INTERACCIONAN EN ZONAS ADYACENTES DE Tcf-4	76

1.8 LA INTERACCIÓN PLAKOGLOBINA/Tcf-4 y β -CATENINA/Tcf-4 ESTÁ REGULADA POR LOS EXTREMOS TERMINALES DE LAS CATENINAS.....	78
1.9 AUSENCIA DE PLAKOGLOBINA EN LOS COMPLEJOS Tcf-4/DNA...	81
1.10 LA FORMA MUTADA DEL Tcf-4 Ser-60→Glu PRESENTA MAYOR ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL QUE LA FORMA <i>WILD-TYPE</i>	82
2. REGULACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE β -CATENINA POR FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS TIROSINA.....	84
2.1 LA FOSFORILACIÓN DE β -CATENINA POR LA TIROSINA QUINASA Src AFECTA NEGATIVAMENTE A SU INTERACCIÓN CON E-CADHERINA.....	84
2.1.1 Src fosforila <i>in vitro</i> a las tirosinas 86 y 654 de β -catenina	84
2.1.2 La fosforilación <i>in vitro</i> de β -catenina por Src disminuye su interacción con E-cadherina.....	86
2.2 EL RECEPTOR DE EGF Y SU HOMÓLOGO erbB2 FOSFORILAN LA TIROSINA 654 DE β -CATENINA	88
2.3 LA FOSFORILACIÓN DE β -CATENINA POR LAS TIROSINAS QUINASAS Fer Y Fyn AFECTA NEGATIVAMENTE A SU INTERACCIÓN CON α -CATENINA	89
2.3.1 Fer y Fyn fosforilan <i>in vitro</i> a la tirosina 142 de β -catenina.....	89
2.3.2 La fosforilación <i>in vitro</i> de la tirosina 142 de β -catenina disminuye su interacción con α -catenina	90
3. REGULACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE PLAKOGLOBINA POR FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS TIROSINA.....	92
3.1 LA FOSFORILACIÓN DE LA PLAKOGLOBINA POR EL RECEPTOR DE EGF AFECTA NEGATIVAMENTE A SU INTERACCIÓN CON DESMOPLAKINA.....	94
3.1.1 EGFR fosforila <i>in vitro</i> al extremo C-terminal de plakoglobina...94	
3.1.2 La fosforilación <i>in vitro</i> de plakoglobina por EGFR disminuye su interacción con desmoplakina	95
3.2 LA FOSFORILACIÓN DE LA PLAKOGLOBINA POR Src REGULA SU INTERACCIÓN CON E-CADHERINA, α -CATENINA Y DESMOPLAKINA.....	96
3.2.1 Src fosforila la tirosina 643 de plakoglobina.....	96

3.2.2 La fosforilación de plakoglobina por Src modula su interacción con α -catenina, E-cadherina y desmoplakina	97
3.3 LA FOSFORILACIÓN DE LA PLAKOGLOBINA POR LA TIROSINA QUINASA Fer REGULA SU INTERACCIÓN CON DESMOPLAKINA Y α -CATENINA	101
3.3.1 Fer fosforila la tirosina 549 de plakoglobina.....	101
3.3.2 La fosforilación de plakoglobina por Fer aumenta su interacción con α -catenina y disminuye su asociación con desmoplakina.....	103
3.4 LA FOSFORILACIÓN DE LA PLAKOGLOBINA POR LA TIROSINA QUINASA Fyn REGULA SU INTERACCIÓN CON DESMOPLAKINA , α -CATENINA Y Tcf-4.....	105
3.4.1 Fyn fosforila las tirosinas 133 y 549 de plakoglobina	105
3.4.2 La fosforilación de plakoglobina por Fyn aumenta su interacción con α -catenina y disminuye su asociación con desmoplakina y Tcf-4	106
3.5 EFECTO DE LAS MUTACIONES PUNTUALES (Tyr-133→Glu, Tyr-549→Glu Y Tyr-643→Glu) EN LA ASOCIACIÓN DE PLAKOGLOBINA A SUS COFACTORES CELULARES	108
3.6 Src y Fer REGULAN <i>IN VIVO</i> LA ASOCIACIÓN DE PLAKOGLOBINA CON SUS COFACTORES CELULARES	109
3.7 EFECTO DE LOS MUTANTES (Tyr→Glu) DE PLAKOGLOBINA EN LA TRANSCRIPCIÓN MEDIADA POR β -CATENINA	111
3.8 K-ras ALTERA LA INTERACCIÓN E-CADHERINA/PLAKOGLOBINA Y α -CATENINA/PLAKOGLOBINA	113
V. DISCUSIÓN	117
1. PLAKOGLOBINA Y β -CATENINA INTERACCIONAN EN ZONAS ADYACENTES DE Tcf-4.....	117
2. REGULACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE β -CATENINA POR FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS TIROSINA.....	127
2.1 REGULACIÓN DE LA INTERACCIÓN β -CATENINA-E-CADHERINA POR FOSFORILACIÓN DE LA TIROSINA 654 DE β -CATENINA	127
2.2 REGULACIÓN DE LA INTERACCIÓN β -CATENINA- α -CATENINA POR FOSFORILACIÓN DE LA TIROSINA 142 DE β -CATENINA	129

3. REGULACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE PLAKOGLOBINA POR FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS TIROSINA.....	130
VI. CONCLUSIONES	139
VII. BIBLIOGRAFIA	141

I. INTRODUCCIÓN

1. LAS UNIONES CELULARES

Los tejidos epiteliales consisten en láminas continuas de células que revisten y protegen el interior de órganos, cavidades y canales del organismo. Las uniones celulares son necesarias para dar al epitelio la integridad estructural y la actividad celular necesaria para llevar a cabo sus funciones específicas. Aunque son especialmente abundantes e importantes en el tejido epitelial también se localizan en regiones de contacto célula-célula y célula-matriz de todos los tejidos.

Las uniones celulares pueden clasificarse en tres grupos funcionales:

- Uniones estrechas
- Uniones de anclaje
- Uniones comunicantes

1.1 UNIONES ESTRECHAS

Las uniones estrechas (*tight junctions*) son los contactos más íntimos conocidos entre células. Previenen la difusión de moléculas entre células adyacentes y la migración lateral de las proteínas y lípidos de membrana. En las células epiteliales del intestino contribuyen a la polarización celular diferenciando en la membrana dos dominios funcionalmente diferentes: el apical, que contiene microvellosidades y está especializado en la absorción de los nutrientes desde el lumen del intestino, y el basolateral que tiene la función de transferir los nutrientes a la sangre. Por lo general, las uniones estrechas se sitúan inmediatamente debajo de la superficie apical de las microvellosidades.

La primera proteína asociada a las uniones estrechas que se identificó fue ZO-1 y posteriormente se han caracterizado otras 30 proteínas más (Mitic et al. 2000). Se ha descrito que proteínas de membrana denominadas ocludina y proteínas de la familia de las claudinas establecen interacciones homofílicas o heterofílicas con ocludinas y claudinas de células adyacentes, y que proteínas tipo ZO-1 (ZO-2, ZO-3, AF6 y cingulina) las acoplan con otras proteínas citoplasmáticas y con microfilamentos de actina (Anderson, 2001).

1.2 UNIONES DE ANCLAJE

La función de las uniones de anclaje es establecer uniones entre los citoesqueletos de las células epiteliales permitiendo la transmisión de fuerzas mecánicas a lo largo de la lámina epitelial. Se dividen en cuatro grupos: uniones adherentes, desmosomas, hemidesmosomas y contactos focales.

1.2.1 Uniones adherentes

Las uniones adherentes unen la red de filamentos de actina entre células adyacentes a través de glicoproteínas de membrana, denominadas cadherinas, asociadas entre sí. El dominio citoplásmico de las cadherinas interacciona con el citoesqueleto de actina (F-actina) indirectamente, a través de su unión con β -catenina o γ -catenina (plakoglobina) y α -catenina (Nagafuchi, 2001). La capacidad de mediar la adhesión intercelular de las cadherinas depende de la presencia de calcio.

1.2.2 Desmosomas

Su función es mantener unidas las células del epitelio asociando los filamentos intermedios de células vecinas, formando una red transcelular con una alta resistencia a la tracción mecánica. Permiten así que las células mantengan su forma y que la lámina epitelial exista en forma estable. Las cadherinas desmosómicas, desmogleína y desmocolina, conectan con los filamentos intermedios a través de la plakoglobina, plakofilina y desmoplakina (Kowalczyk et al.1999).

1.2.3 Hemidesmosomas

Los hemidesmosomas, estructuras morfológicamente similares a los desmosomas, se encuentran en las regiones de las células epiteliales en contacto con la lámina basal. Asocian el citoesqueleto de citoqueratina con la matriz extracelular a través de moléculas transmembrana denominadas integrinas, como la integrina $\alpha 6\beta 4$ que interacciona con la laminina de la lámina basal y por el dominio citoplásmico de la subunidad $\beta 4$ con los filamentos intermedios de citoqueratina a través de plectina y los antígenos BP (Borradori y Sonnenberg, 1996).

1.2.4 Contactos focales

Los contactos focales unen la red de actina de la célula con la matriz extracelular a través de la interacción de las integrinas con la fibronectina de la matriz. Las integrinas son heterodímeros transmembranales compuestos por dos cadenas polipeptídicas (α y β) unidas por enlaces no covalentes. Hay 20 tipos de integrinas diferentes expresadas de forma diferencial por los distintos tipos celulares. En los contactos focales el dominio citosólico de la cadena β de la integrina se fija directamente a los filamentos de actina o a través de diversas proteínas de unión a actina tales como α -actinina, talina, vinculina y tensina (Martin et al. 2002).

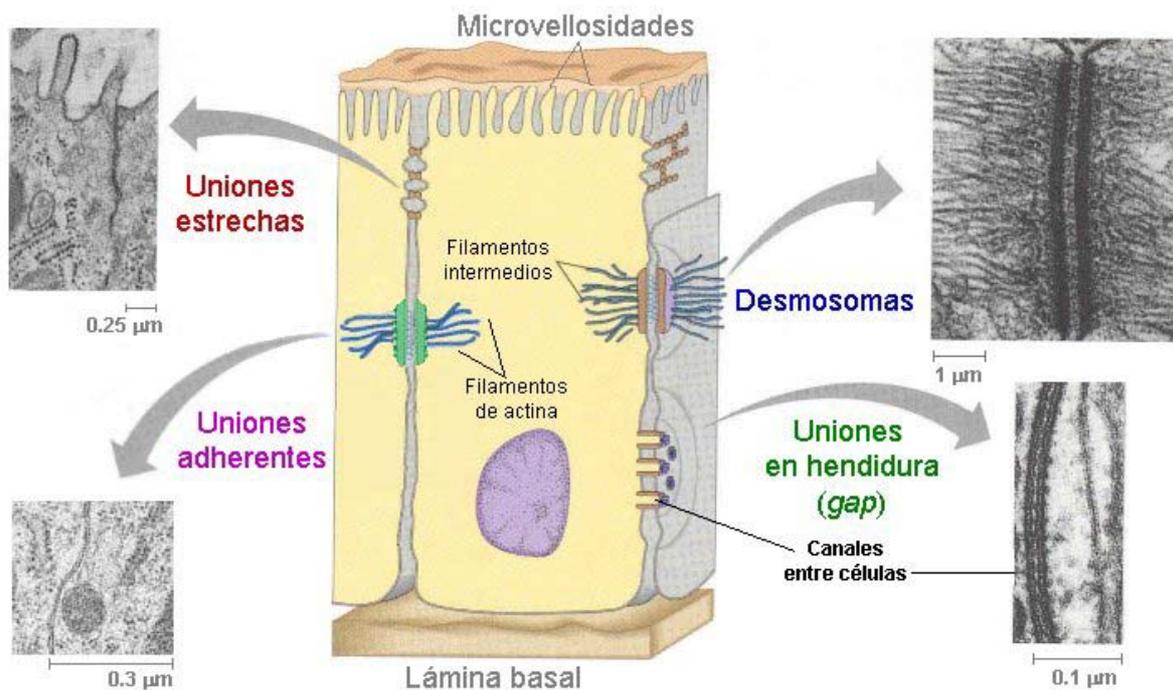


Fig. 1 Representación de los diferentes tipos de uniones celulares que se establecen en células epiteliales (adaptado de Campbell, 1993).

1.3 UNIONES COMUNICANTES

Las uniones comunicantes (*gap junctions*) están formadas por proteínas hexaméricas llamadas conexones. Cada conexón está formado por seis subunidades proteicas llamadas conexinas. Existen más de 11 tipos de conexinas

expresadas en diferentes tejidos y con diversas funciones fisiológicas. Cada conexón es un poro que permite el paso de pequeños iones (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) y moléculas (AMPc, inositol 1,4,5 trifosfato) a la célula vecina. Facilitan el acoplamiento eléctrico y metabólico entre células a diferencia de las otras uniones que conectan a las células mecánicamente (Evans et al. 2002).

2. LAS UNIONES ADHERENTES

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

Las proteínas transmembrana que forman contactos homotípicos en las uniones adherentes son las cadherinas. La principal cadherina en el tejido epitelial es la E-cadherina que, para su correcta funcionalidad, requiere interactuar con los filamentos de actina del citoesqueleto. Esta interacción se da a través de unas proteínas citosólicas denominadas cateninas: α , β y γ (también llamada plakoglobina) (Cowin y Burke, 1996). Otra catenina, la p120^{ctn}, también interacciona con E-cadherina (Daniel y Reynolds, 1995) aunque su función exacta aún no ha sido determinada. En las uniones adherentes, la E-cadherina se une por su extremo citosólico a la región central de repeticiones armadillo de la β -catenina o plakoglobina quien, por su región amino terminal, interacciona con el dominio amino terminal de la α -catenina. A su vez, la α -catenina se une a través de su extremo carboxilo terminal a los filamentos de actina del citoesqueleto (Fig.2).

Cada día está más claro que las uniones adherentes van más allá de la mera adhesión estructural o mecánica de los tejidos. El hecho de que algunos de sus elementos estén implicados en la transducción de señales amplía sus posibilidades funcionales, desde la adhesión celular y morfogénesis hasta la señalización y diferenciación.

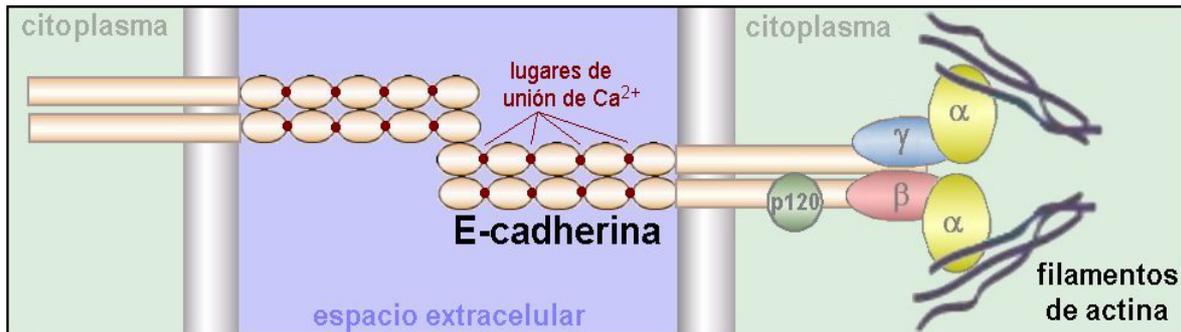


Fig. 2 **Representación de las uniones adherentes entre dos células epiteliales adyacentes.** Las moléculas de E-cadherina de células adyacentes establecen contactos homotípicos entre sí y mediante las cateninas (β -o γ - y α -catenina) interaccionan con el citoesqueleto de actina. La p120^{ctn} también se asocia a E-cadherina pero no interacciona con α -catenina.

2.1 LAS CADHERINAS CLÁSICAS

Las cadherinas son glicoproteínas transmembrana de 750-900 aminoácidos mediadoras de la adhesión célula-célula de forma homotípica y dependiente de calcio. La familia de las cadherinas clásicas incluye más de 20 tipos diferentes, de las cuales, las más estudiadas son la E-cadherina (epitelial), la N-cadherina (neuronal), la P-cadherina (placentaria) y la LI-cadherina (hepática-intestinal).

A diferencia de lo que ocurre con otras moléculas de adhesión (lectinas por ejemplo), las cadherinas establecen uniones celulares estables, jugando así un papel importante en la morfogénesis y mantenimiento de la estructura tisular tanto en la embriogénesis como en la vida adulta. En los tejidos embrionarios las cadherinas son las principales moléculas de adhesión que mantienen las células unidas. Mutaciones que inactivan la función de las cadherinas impiden el desarrollo embrionario tardío (Takeichi, 1990).

Las cadherinas clásicas comparten una estructura similar. Poseen diferentes dominios funcionales a través de los cuales interaccionan con las moléculas de cadherina adyacentes y con iones calcio, se integran en la membrana plasmática y se asocian al citoesqueleto de actina. El dominio extracelular supone la mayor parte de la cadena polipeptídica y generalmente se estructura en cinco dominios, de 100 residuos cada uno. Cuatro de estos subdominios son capaces de unir iones calcio. En ausencia de calcio, la estructura global sufre un gran cambio conformacional y es

degradada por enzimas proteolíticas (Shapiro et al. 1995; Overduin et al. 1995). La región citoplásmica consta de unos 150 aminoácidos, está altamente conservada entre las cadherinas clásicas y media la unión de la cadherina con las fibras de actina del citoesqueleto a través de las cateninas.

2.1.1 E-cadherina

La E-cadherina es la cadherina mejor caracterizada y la primera en ser descrita. Se concentra en las uniones adherentes de las células epiteliales maduras, donde conecta los citoesqueletos de actina de células adyacentes.

Posee un gran dominio extracelular estructurado en cinco subdominios de unos cien residuos cada uno. Estudios bioquímicos con la cadherina de *Xenopus* (Brieher et al. 1996) indican que el dímero lateral es la unidad funcional del dominio extracelular de la cadherina. La región responsable del reconocimiento homofílico contiene 40 aminoácidos y está localizada en el extremo carboxilo terminal del primer dominio extracelular (EC1). En presencia de calcio extracelular se establecen uniones homotípicas entre los extremos amino terminales de los dímeros de cadherina de células vecinas, constituyendo una especie de cremallera entre células.

El dominio citoplásmico, de unos 150 residuos, contiene el lugar de unión para β -catenina o plakoglobina, con las que interacciona en proporción 1:1. Otras cateninas pueden interaccionar con el dominio citoplásmico de la cadherina, como es el caso de la p120^{ctn}. Esta catenina se une a la región contigua a la membrana de la E-cadherina y diversos autores (Yap et al. 1998) sugieren que la p120^{ctn} podría jugar algún papel en la regulación de la interacción y reagrupamiento lateral de las cadherinas, aunque este último punto aún no ha sido demostrado. El dominio citoplásmico de la E-cadherina es imprescindible para el correcto establecimiento de las uniones adherentes ya que se ha visto que moléculas de E-cadherina sin este dominio son incapaces de mantener las células unidas (Pokuta y Weis, 2002).

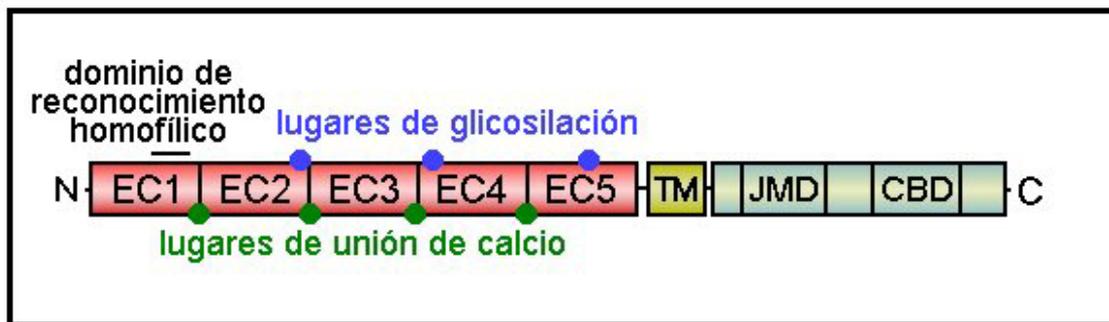


Fig.3 **Representación esquemática de la E-cadherina.** Las cajas numeradas indican los cinco dominios extracelulares (EC), en los que encontramos lugares específicos de unión a iones calcio (verde) y glicosilación (azul). Se muestran también el dominio transmembrana (TM), el dominio juxtamembrana de unión a p120^{casin} (JMD) y el dominio de unión a cateninas (β -catenina y plakoglobina) (CBD).

La E-cadherina es esencial en determinados procesos morfogénicos que tienen lugar en el desarrollo embrionario (Thiery, 2002). Es la primera cadherina en expresarse durante el desarrollo, donde participa en la compactación, un importante cambio morfológico que tiene lugar en las primeras divisiones del embrión (estado de ocho células). Su importancia en las primeras fases del desarrollo queda latente en ensayos donde embriones de ratón carentes del gen de E-cadherina no superan el cuarto día, la fase de blastocisto, por la incapacidad de formar epitelio trofotodermal (Larue et al. 1994). Su aparición y desaparición en estadios posteriores también está íntimamente ligada a acontecimientos morfogénicos en los cuales los tejidos deban separarse selectivamente unos de otros.

El nivel de expresión de E-cadherina parece ser el paso limitante en la formación de los complejos de adhesión (Gumbiner, 2000). La transcripción basal de E-cadherina, en las células epiteliales, está constitutivamente activada por un complejo transcripcional donde se combinan factores como RB, c-Myc o AP-2 (Batsche et al. 1998). Esta activación constitutiva se considera la base del fenotipo epitelial. Otros factores como el Wt-1 (Hosono et al. 2000) o el Receptor de Vitamina D (Palmer et al. 2001), también estimulan la expresión de E-cadherina. Factores nucleares como la *Smad Interacting Protein* (SIP1), E12/E47 o miembros de la familia de Snail, se unen al promotor de E-cadherina (en unas regiones del promotor denominadas *E-boxes*) e inhiben la transcripción de E-cadherina. La sobreexpresión en células epiteliales de Snail o E12/E47, comporta la desestabilización del aparato

de adhesión celular e induce transiciones epitelio-mesénquima en estas células (Batlle et al. 2000; Pérez-Moreno et al. 2001).

Se ha encontrado pérdida de la funcionalidad de E-cadherina en el desarrollo de la mayoría de los cánceres epiteliales. Aunque el mecanismo responsable de su pérdida de funcionalidad parece ser epigenético, aparecen deleciones o mutaciones en el gen de la E-cadherina e hipermetilación de su promotor en ciertos tumores. Estos mecanismos afectan negativamente a la expresión de E-cadherina y comprometen el mantenimiento de las uniones adherentes (Hirohashi, 1998). En tumores colo-rectales, la parte central del tumor tiene mucha E-cadherina unida a β -catenina, pero el frente del tumor presenta la mayoría de la β -catenina en el núcleo e inapreciable expresión de E-cadherina (Brabletz et al. 2001). En general, E-cadherina es considerada como producto supresor de tumores, por su capacidad de interaccionar con β -catenina y limitar así la concentración de esta catenina libre en el citosol, y la sobreexpresión de E-cadherina afecta negativamente a procesos proliferativos (Orsulic et al. 1999).

2.2 LAS CATENINAS

Como ya se ha descrito, cuatro tipos de cateninas (α -, β -, plakoglobina y p120-) median la interacción, de forma no covalente, del dominio citosólico de la E-cadherina con componentes del citoesqueleto de actina en las uniones adherentes. De ellas, β -, p120-catenina y plakoglobina interaccionan directamente con E-cadherina, mientras que α -catenina interacciona con β -catenina o plakoglobina por un lado y elementos del citoesqueleto por otro (ver Figura 2). Aunque plakoglobina puede unirse a la E-cadherina, su localización preferencial aparece en los desmosomas, asociada a las cadherinas desmosómicas. La participación de las cateninas es imprescindible para el fortalecimiento y estabilización de las adhesiones entre células y son un importante punto de regulación de los complejos de adhesión. Defectos en la expresión o función de las cateninas se asocian con el crecimiento, invasión y metástasis de algunos carcinomas (revisado en Beavon, 2000).

2.2.1 α -catenina

La α -catenina es una proteína citosólica de 100 kDa que contiene tres regiones de gran homología a vinculina (proteína que une F-actina). Tiene dos isoformas específicas de neuronas y de tejido epitelial, denominadas N o E- α -catenina, generadas por *splicing* alternativo de su RNA (Hirano et al. 1992). Recientemente se ha caracterizado una tercera isoforma, denominada T- α -catenina, predominante en testículo y corazón (Janssens et al. 2001).

α -catenina se presenta como homodímero, en solución, que se disocia para unirse 1:1 por su extremo amino terminal con β -catenina o plakoglobina (Koslov et al. 1997). La zona de α -catenina necesaria y suficiente para esta interacción se limitó inicialmente a los aminoácidos 117-143 (Huber et al. 1997a). La resolución de la estructura tridimensional de una quimera constituida por los fragmentos N-terminales de α - y β -catenina, mostró que los residuos de α -catenina del 57 al 81 son importantes para unir de forma completa la β -catenina (Pokutta y Weis, 2000). Los residuos del 82 al 279 constituyen el dominio de dimerización entre α -cateninas y más hacia el extremo C-terminal se median los contactos con el citoesqueleto.

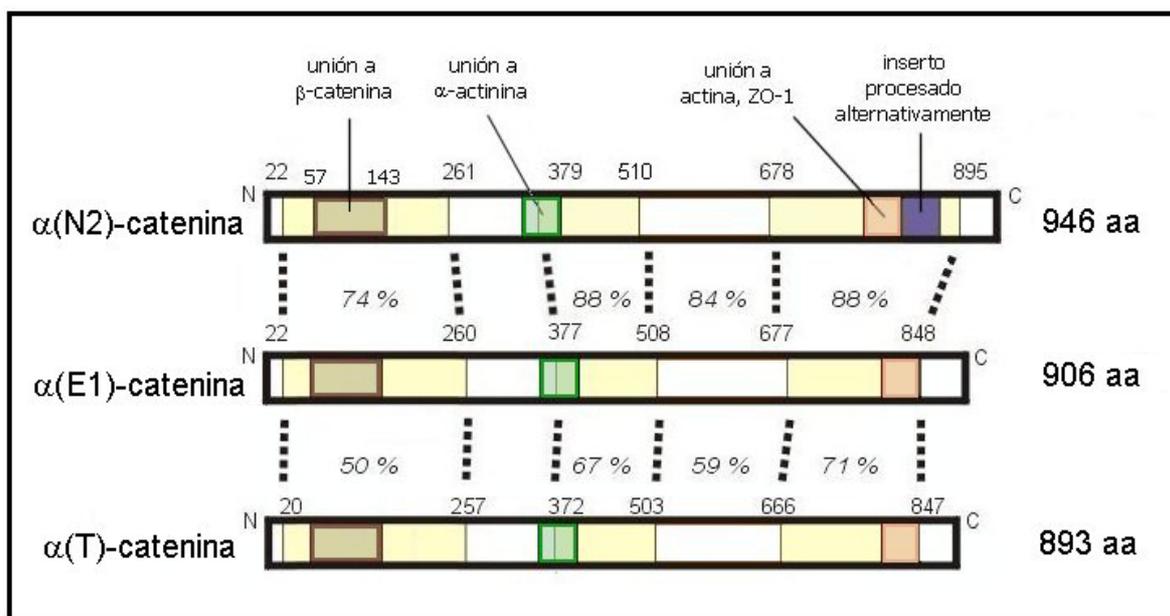


Fig.4 Esquema de las tres isoformas conocidas de α -catenina: N neural, E epitelial y T de testículo. En amarillo se indican los dominios principales de homología a vinculina. Con recuadros coloreados se indican las zonas de unión a varias proteínas o el dominio que es objeto de *splicing* (adaptado de Yang et al. 2001; Janssens et al. 2001).

Por su extremo carboxilo terminal, α -catenina puede interactuar directamente con la F-actina de los microfilamentos o bien de forma indirecta a través de su asociación con proteínas que unen actina como vinculina y α -actinina (Aberle, 1996; Nagafuchi, 2001). Las interacciones que α -catenina establece con el citoesqueleto varían específicamente según el tipo celular analizado (Pokutta y Weis, 2002).

Hay multitud de evidencias que indican que la participación de la α -catenina es imprescindible para el correcto establecimiento de las uniones adherentes. Se ha visto que la expresión de α -catenina delecionada, incapaz de unir β -catenina, comporta la imposibilidad de formar uniones adherentes correctas (Bullions et al. 1997) y que condiciones que inducen la disociación de α -catenina de los complejos de adhesión provocan la pérdida de los contactos celulares (Ozawa y Kemler, 1998). La pérdida de α -catenina en las uniones adherentes mediada por competición directa con IQGAP1, un efector de las GTPasas Rac1 y Cdc42 (pertenecientes a la familia de Rho), induce disociación celular (Fukata et al. 2001).

Aunque su principal papel es estructural, mediando la unión entre el complejo E-cadherina- β -catenina y el citoesqueleto, la acción de α -catenina se extiende también a procesos de señalización y proliferación celular (Ben-Ze'ev, 1999). La sobreexpresión de α -catenina, tiene efectos anti-proliferativos, inhibiendo básicamente la transcripción mediada por β -catenina; el exceso de α -catenina parece unir β -catenina libre e impedir que ésta interactúe en el núcleo con el factor de transcripción Tcf-4 (Giannini et al. 2000). La eliminación condicionada del gen de α -catenina induce hiperproliferación en células de la piel (Vasioukhin et al. 2001a) y defectos en el gen de α -catenina, que conllevan importantes reducciones en la expresión de la proteína, se encuentran en varias líneas cancerosas (Hirano et al. 1992; Morton et al. 1993; Kallakury et al. 2001) y tumores primarios (Papadavid y Katsambas, 2001). En algunos tipos de cáncer, la pérdida de la expresión de α -catenina se correlaciona con el grado de infiltración y metástasis (Kadowaki et al. 1994). Al igual que sucede con E-cadherina, la expresión de α -catenina es importante en los primeros estadios del desarrollo, ya que embriones de ratón sin α -catenina mueren en la fase de blastocisto (Torres et al. 1997).

2.2.2 β -catenina

La β -catenina es una proteína de 782 aminoácidos (92 kDa) cuya estructura primaria consta de un extremo amino terminal de unos 149 aminoácidos, un cuerpo central de unos 525 aminoácidos que contiene 12 repeticiones de 42 aminoácidos, conocidas como repeticiones armadillo, y una zona carboxilo terminal de unos 108 aminoácidos (Peifer et al. 1994).

El homólogo de β -catenina en *Drosophila* es Armadillo; proteína que participa en la vía de señalización que regula el establecimiento de la polaridad durante el desarrollo de la mosca (McCrea et al. 1991). Hasta el momento la β -catenina ha sido encontrada en tres compartimentos celulares distintos: en membrana (formando parte del complejo de adhesión celular cadherina-cateninas), en el citoplasma (en forma libre o asociada a otras proteínas como APC, axina y GSK3 β) o en el núcleo (unida a factores de transcripción de la familia Tcf/LEF) (Hülken y Behrens, 2000).

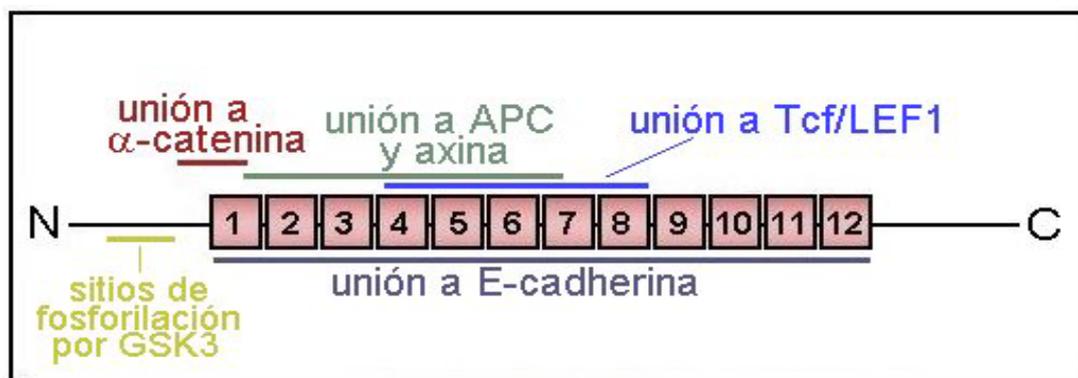


Fig.5 **Dominios de interacción de la β -catenina.** Se representan con recuadros numerados las doce repeticiones armadillo así como las zonas de interacción con diferentes cofactores.

En los últimos años ha sido determinada por difracción de RX la estructura tridimensional del dominio armadillo de la β -catenina con una resolución de 2.1 Å (Huber et al. 1997b). Cada una de las repeticiones armadillo forma tres hélices α que a su vez constituyen una gran superhélice cilíndrica confiriendo al conjunto una estructura de gran rigidez. Las cargas están distribuidas dejando un surco de potencial positivo por donde la β -catenina se une a otras proteínas como E-cadherina, APC o hTcf-4. La proteína entera todavía no ha podido ser cristalizada.

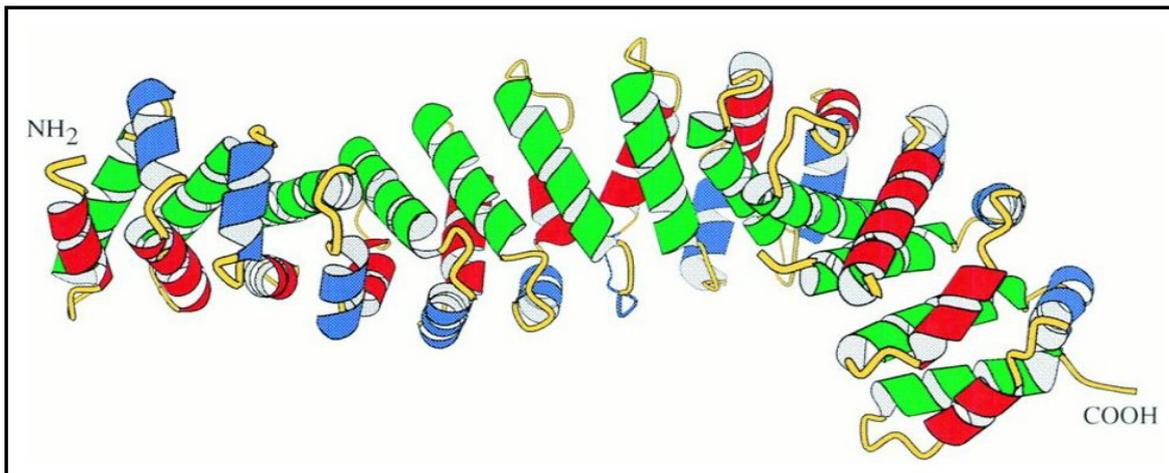


Fig.6 **Estructura de las doce repeticiones armadillo de la β -catenina.** Cada repetición armadillo (de 42 aa) forma tres hélices α que se representan en rojo, verde y azul. Estos motivos repetidos doce veces presentan un grado de homología elevado en su secuencia y determinan una estructura compacta donde cada repetición interacciona fuertemente con las repeticiones vecinas (de *Huber et al., 1997b*).

La primera función atribuida a β -catenina fue la de proteína estructural constituyente de las uniones adherentes. En estas uniones, interacciona por la región central de repeticiones armadillo con el dominio citosólico de E-cadherina. Se ha cristalografiado el dominio de unión del complejo E-cadherina/ β -catenina y se ha visto que esta interacción requiere cien residuos del extremo terminal de la cadherina y toda la longitud del dominio de repeticiones armadillo de β -catenina (Huber y Weis, 2001).

El dominio N-terminal de β -catenina interacciona a su vez con α -catenina. Intervienen en esta unión una secuencia de 31 aminoácidos, del 120 al 151, de β -catenina (Aberle et al. 1994). Para el correcto establecimiento de las uniones adherentes es requisito imprescindible la conexión entre cadherina y α -catenina mediada por la β -catenina. La falta de β -catenina en embriones de ratón provoca su muerte temprana, justo tras la gastrulación (Haegel et al. 1995).

Además del papel regulador de la funcionalidad de la E-cadherina, se demostró posteriormente que la β -catenina también actuaba como activador transcripcional de genes implicados en el desarrollo tumoral y como componente de la vía de señalización de Wnt (Korinek et al. 1997; Behrens et al. 1996). La capacidad de β -catenina de translocarse al núcleo depende de los niveles de esta proteína que se

encuentran libres en el citosol, no asociados a E-cadherina. El control de los niveles citosólicos de la β -catenina está finamente regulado. Así, en una célula normal de colon, la β -catenina que no se encuentra unida a α -catenina y E-cadherina (en los complejos de adhesión celular) se localiza en el citosol formando un complejo con la axina, APC y las Ser/Thr quinasas $CKI\alpha$ (caseína quinasa I alfa) y $GSK3\beta$ (glicógeno sintasa quinasa 3 β), entre otros factores. En estas condiciones, cuatro residuos del extremo N-terminal de la β -catenina (serinas 33, 37 y 45 y treonina 41) son fosforilados, lo que induce su rápida degradación por el sistema ubiquitin-proteosoma (Cavallo et al. 1997; Polakis et al. 1997; Cadigan y Nusse, 1997; Liu et al. 2002). Recientemente se ha descrito otro mecanismo paralelo de degradación de la β -catenina que depende de la actividad del producto del gen Siah-1. Esta proteína, cuya expresión es activada por p53, interacciona con el extremo carboxilo terminal de APC y promueve la degradación de β -catenina independientemente de la fosforilación de β -catenina por $GSK3\beta$ y sin requerir la interacción de β -catenina con β -TrCP (Matzusawa y Reed, 2001; Liu et al. 2001).

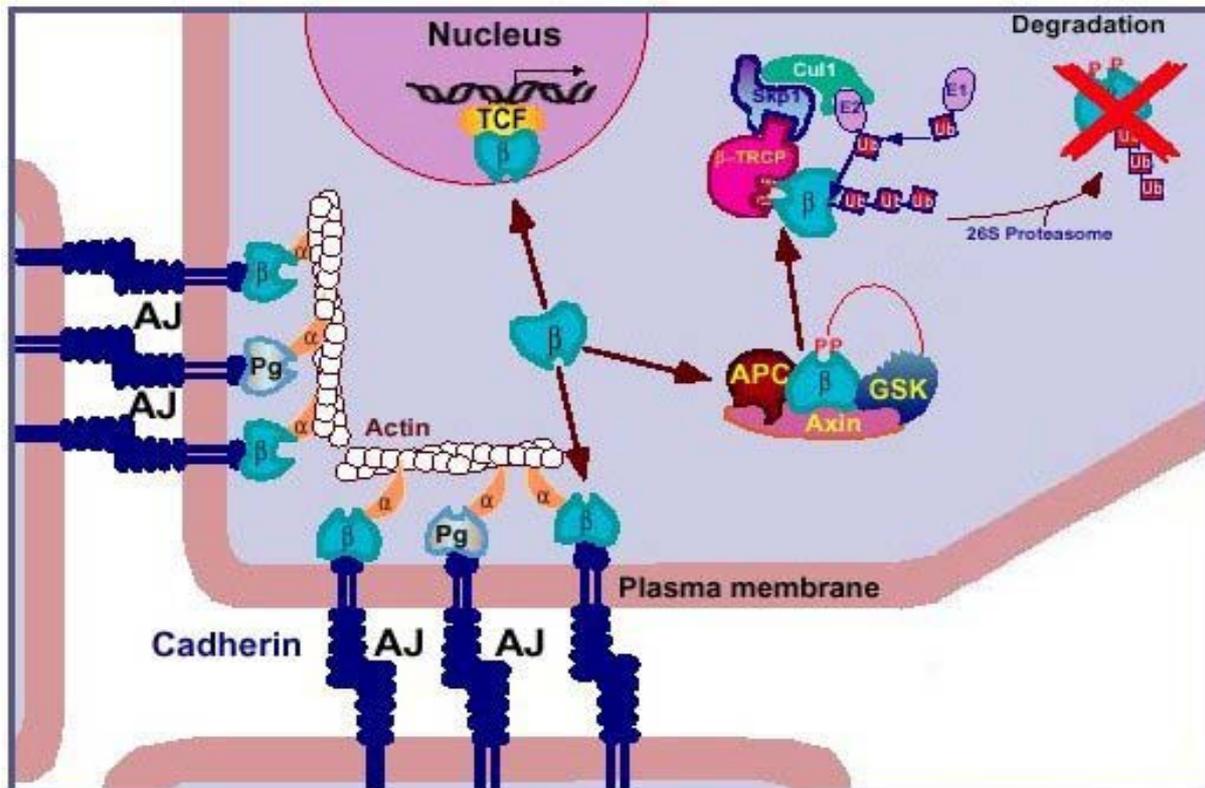


Fig.7 Regulación de los niveles de β -catenina en una célula normal de colon. En condiciones normales los niveles de β -catenina están regulados por el complejo $GSK3\beta$ /axina/ β -catenina/APC (adaptado de Zhurinsky et al. 2000b).

Cuando este sistema de regulación se altera, la β -catenina no puede ser degradada y se transloca al núcleo por un mecanismo independiente a la acción de importinas/carioferinas que son los clásicos receptores de sustratos con secuencias de localización nuclear (NLS). La β -catenina, que carece de estas secuencias, parece que se une directamente por las repeticiones armadillo a los poros de la membrana (Fagotto et al. 1998). En el núcleo interacciona con factores de transcripción de la familia LEF/Tcf (Miller et al. 1999). La interacción de β -catenina con estos factores los convierte en activadores transcripcionales (Van de Wetering et al. 1997), estimulando la transcripción de genes que contienen secuencias diana para Tcf-4 en sus promotores, tales como c-myc, ciclina D1, c-jun y fra-1 (He et al. 1998 y 1999; Tetsu y McCormick, 1999; Roose et al. 1999).

La importancia de este nuevo papel de la β -catenina como coactivador transcripcional viene resaltada por el hecho de que niveles elevados de β -catenina en el núcleo son una de las alteraciones más habituales en cáncer de colon, cualquiera que sea su estadio. Mutaciones en la proteína acopladora APC, que impiden que la β -catenina sea fosforilada y por tanto degradada, se detectan en más del 85% de los tumores de colon (Kinzler y Vogelstein, 1996). En un amplio porcentaje de los tumores restantes, en los que no se ha detectado lesión en APC, aparecen mutaciones en la β -catenina que impiden que la proteína pueda ser fosforilada en Ser/Thr y por lo tanto degradada (Morin et al. 1997). Alteraciones en APC o β -catenina que conducen a niveles incrementados de esta proteína en el núcleo son detectados también en la práctica totalidad de líneas celulares derivadas de tumores de colon (Morin et al. 1997; Mahmoud et al. 1997). También se han detectado alteraciones en estos elementos en otros tumores de origen muy diferente, como en melanomas (Rubinfeld et al. 1997).

2.2.3 p120-catenina (p120^{ctn})

La p120^{ctn} es una proteína estructuralmente similar a β -catenina y plakoglobina que posee como éstas repeticiones de tipo armadillo. Identificada primero como sustrato de variantes oncogénicas de la tirosina-quinasa pp60^{c-src} (Reynolds et al. 1989) y de varios receptores tirosina quinasa como los receptores de EGF, PDGF y

CSF-1 (Downing y Reynolds, 1991), posteriormente se descubrió que formaba también parte del complejo cadherina-cateninas uniéndose a la región citosólica de la E-cadherina en la zona más próxima a la membrana.

La $p120^{ctn}$ es una proteína con diversas isoformas con un rango de peso molecular de 85 a 115 kDa. Estas isoformas se derivan de un solo gen, por procesamiento o *splicing* alternativo de dicho gen. Estos fenómenos de *splicing* en la zona N-terminal, provocan el uso de cuatro ATG iniciales distintos, que dan lugar a las isoformas 1, 2, 3 o 4 de $p120^{ctn}$. Procesos de *splicing* en la zona C-terminal, llevan al uso del exón A, B, ambos o ninguno de ellos. En total, las diversas combinaciones generan un mínimo de 32 isoformas que se expresan diferencialmente según los tejidos (Keirsebilck et al. 1998; Anastasiadis y Reynolds, 2000). Por ejemplo, las células epiteliales expresan mayoritariamente isoformas de tipo 3 (ver figura). Las isoformas difieren en sus extremos terminales pero todas mantienen intacto el dominio armadillo, con el que interaccionan con las cadherinas. Se ha especulado que las diversas isoformas pudieran afectar diferencialmente a la actividad de las cadherinas mediante su interacción con distintas proteínas (Anastasiadis y Reynolds, 2000).

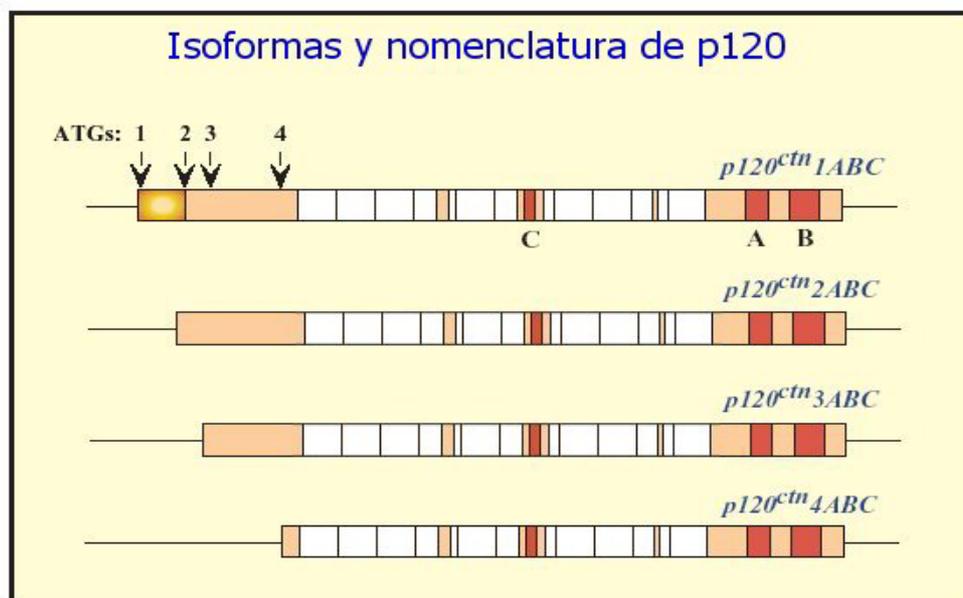


Fig.8 Esquema de las distintas isoformas de $p120^{ctn}$ por *splicing* alternativo. Las cajas blancas representan las 10 repeticiones armadillo de la $p120^{ctn}$, interrumpidas en algunas secuencias por pequeños *loops*. Los cuatro posibles ATGs se indican con flechas numeradas. Los exones denominados A, B y C también se indican en rojo. En amarillo, el dominio *coiled-coil* sólo presente en las isoformas de tipo 1 (adaptado de Anastasiadis y Reynolds, 2000).

La zona de unión de la p120^{ctn} al dominio citosólico de la E-cadherina se localiza en una zona mínima de unos 10 aminoácidos, adyacente a la membrana plasmática. Este dominio yuxtamembrana es el más altamente conservado entre las cadherinas clásicas (Thoreson et al. 2000).

Existe una fuerte controversia sobre la funcionalidad de la p120^{ctn} en las uniones adherentes. Por un lado hay autores que implican a p120^{ctn} en un papel positivo en la adhesión celular interviniendo en el agrupamiento o *clustering* lateral de las cadherinas (Yap et al. 1998; Thoreson et al. 2000). Por otro lado, hay evidencias sobre la p120^{ctn} como regulador negativo de la adhesión entre células; por ejemplo en células Colo205 (con el complejo cadherina-cateninas básicamente intacto) la hiperfosforilación de p120^{ctn} se correlaciona con la imposibilidad de formar uniones adherentes (Aono et al. 1999; Ohkubo y Ozawa, 1999).

p120^{ctn} se ha localizado también en el núcleo (Van Hengel et al. 1999) donde interacciona por su dominio armadillo al menos con kaiso (Daniel y Reynolds, 1999), un nuevo factor de transcripción del tipo BTB/POZ/ZF que ha sido descrito como represor transcripcional (Kim et al. 2002). El significado funcional de la interacción p120^{ctn}/ kaiso es aún especulativo y debe profundizarse en su estudio pero abre nuevas posibilidades funcionales y de regulación para los complejos de adhesión.

2.3 REGULACIÓN DE LAS UNIONES ADHERENTES

El establecimiento de las uniones adherentes es un proceso dinámico que debe ser finamente regulado en el tiempo y en el espacio para permitir la correcta funcionalidad de los órganos y tejidos.

Los complejos de adhesión cadherina-cateninas están regulados por mecanismos post-transcripcionales que afectan a su funcionalidad. Gran parte de los datos existentes sugieren que la regulación se da principalmente por fosforilación y defosforilación de residuos tirosina (Daniel y Reynolds, 1997). Se ha demostrado que β -catenina, plakoglobina y p120^{ctn} se asocian y son sustrato de quinasas citoplásmicas de la familia de Src y de receptores tirosina quinasa transmembrana, tales como el receptor de EGF, HGF, PDGF y erbB2 (Tsukita et al. 1993; Kim y Wong, 1995; Rosato et al. 1998; Thomas y Brugge, 1997; Gaudry et al. 2001). La estimulación de estas quinasas está implicada en la regulación negativa de las

uniones adherentes (Behrens et al. 1993; Shibata et al. 1996, Hazan y Norton, 1998). El aumento de fosforilación de la β -catenina en residuos tirosina se correlaciona con el desensamblaje de las uniones adherentes (revisado en Lilien et al. 2002). Por otro lado, la actividad de varias tirosina fosfatasas, como LAR o PTP κ que son capaces de unir y defosforilar a β -catenina, está asociada con el aumento de la adhesión y la prevención de la migración celular (Kypka et al. 1996; Fuchs et al. 1996). Existen evidencias de que ciertas serina/treonina quinasas también modulan la funcionalidad de las uniones adherentes. Recientemente se ha descrito la fosforilación de la β -catenina por la caseína quinasa II (CKII) en su extremo amino terminal y cómo esta fosforilación regula su interacción con α -catenina y su estabilidad citoplasmática (Bek y Kemler, 2002). Sobre la fosforilación de E-cadherina hay menos evidencias, pero también se ha encontrado fosforilada en tirosinas en condiciones experimentales que provocan la pérdida de los contactos celulares (Xu et al. 1999; Fujita et al. 2002). Recientemente se ha descrito que el dominio citosólico de E-cadherina puede fosforilarse en serinas por la CKII aumentando su interacción con β -catenina (Lickert et al. 2000).

Además del papel que juegan las quinasas en la regulación post-transcripcional del complejo cadherina-cateninas, las GTPasas también parecen jugar un papel importante en la regulación de la funcionalidad de estos complejos. Hay estudios que indican que las pequeñas GTPasas de la familia de Rho (Rac, Rho y Cdc42), están implicadas en la adhesión mediada por las cadherinas (Kaibuchi et al. 1999). En la regulación de los complejos de adhesión por Rho, está implicada la p120^{ctn} ya que se ha visto que esta catenina interacciona de forma excluyente con la forma inactiva de RhoA o con E-cadherina (Anastasiadis et al. 2000). Además, Cdc42 y Rac1 indirectamente regulan la actividad de E-cadherina (Kaibuchi et al. 1999). Cuando Cdc42 y Rac1 se encuentran en su forma inactiva, IQGAP1 se une al dominio citosólico de E-cadherina y a β -catenina causando la disociación de la α -catenina de los complejos cadherina-cateninas y disminuyendo la adhesión celular (Kuroda et al. 1998; Fukata et al. 1999).

3. LOS DESMOSOMAS

Los desmosomas son estructuras especializadas necesarias para la formación y el mantenimiento de la adhesión en tejidos epiteliales. Estas uniones intercelulares sirven para anclar los filamentos intermedios del citoesqueleto a la membrana de la célula y establecer puntos adhesivos estrechos con células adyacentes así como también contribuir al mantenimiento de la integridad mecánica y la resistencia al estrés celular. Son estructuras altamente insolubles que pueden aguantar severas condiciones desnaturalizantes (Schwarz et al. 1990). Esta propiedad de los desmosomas ha facilitado la identificación de los componentes desmosómicos pero, por otro lado, ha dificultado su análisis bioquímico.

Los desmosomas son frecuentes en los tejidos epiteliales pero también se han localizado en tejido neuronal y muscular. La composición de los desmosomas varía dependiendo del tipo celular y del estado de diferenciación de la célula (Green y Gaudry, 2000).

Las proteínas que componen los desmosomas se dividen en tres grupos: las cadherinas desmosómicas (desmogleínas y desmocolinas), la familia de proteínas armadillo (plakoglobina y plakofilinas) y las plakinas (desmoplakina, plectina, envoplakina y periplakina).

Se ha propuesto un modelo de unión lineal cadherina-armadillo-plakina análogo al de las uniones adherentes en el que las desmogleínas y desmocolinas se asocian por su extremo citosólico a la plakoglobina y ésta a su vez interacciona con la desmoplakina que se une a los filamentos intermedios (Mathur et al. 1994; Troyanovsky et al. 1993; Kowalczyk et al. 1997). En este modelo, las plakofilinas intervendrían en los desmosomas extendiendo las uniones de forma lateral a través de interacciones plakofilina-desmoplakina (Kowalczyk et al. 1999). Pero no se descarta la posibilidad de otros modelos de interacción ya que se ha visto que los extremos citosólicos de las cadherinas desmosómicas pueden interaccionar directamente con la desmoplakina (Bornslaeger et al, 2001), las plakofilinas pueden unirse directamente con los filamentos intermedios (Hofmann et al. 2000) y que la plakofilina-2 interacciona con desmogleína 1 y 2, desmocolina 1 y 2, plakoglobina y desmoplakina (Chen et al. 2002).

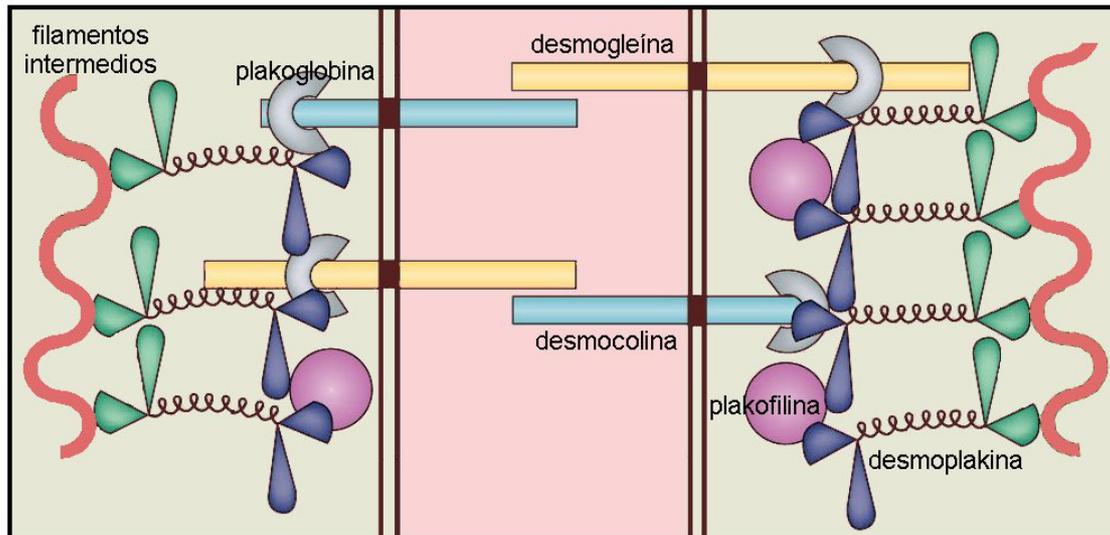


Fig.9 **Representación esquemática de los desmosomas.** Este modelo simplificado representa las interacciones proteína-proteína de los principales componentes de los desmosomas (adaptado de Green y Gaudry, 2000).

Hay muchos autores que creen que la formación de las uniones adherentes es un requisito para el ensamblaje de los desmosomas debido a que las uniones adherentes aparecen y se ensamblan antes en el desarrollo de los organismos (Keiffer-Combeau et al. 2001). Sin embargo, cada vez hay más evidencias sobre una recíproca interdependencia entre desmosomas y uniones adherentes. Así, embriones de ratón sin desmoplakina no pueden formar desmosomas en la epidermis porque no pueden asociarse al citoesqueleto y se produce la pérdida de adhesión incluyendo la mediada por uniones adherentes (Vasioukhin et al. 2001b). El desensamblaje de los dos tipos de uniones celulares, desmosomas y uniones adherentes, también tiene lugar al sobreexpresar la forma mutada de desmoplakina a la que le falta el dominio de interacción con los filamentos intermedios (Huen et al. 2002). También hay estudios en los que el desensamblaje de los desmosomas, debido a la pérdida de plakoglobina o a la expresión de un dominante negativo de la desmoplakina, provoca una mezcla de los componentes de las uniones adherentes y los desmosomas (Ruiz et al. 1996; Bornslaeger et al. 1996) y evidencias de que bajo determinadas circunstancias desmocolina 1 y desmogleína 1 pueden unir β -catenina (Bierkamp et al. 1999).

Todas las evidencias parecen indicar que los desmosomas no son simplemente lugares de unión entre células sino que, debido a que responden a factores de

crecimiento y se asocian a quinasas y fosfatasas, podrían intervenir en la propagación de señales intracelulares que controlan la movilidad, crecimiento y diferenciación celular.

3.1 LAS CADHERINAS DESMOSÓMICAS

Las cadherinas desmosómicas desmogleína y desmocolina son dos familias de glicoproteínas de membrana pertenecientes a la superfamilia de moléculas de adhesión dependientes de calcio.

Existen tres isoformas de cada una de ellas, desmogleína 1-3 y desmocolina 1-3, que son producto de la expresión de distintos genes. Cada desmocolina está adicionalmente sujeta a *splicing* alternativo, resultando las formas 'a' y 'b', las cuales difieren en la longitud de su extremo citoplásmico (Collins et al.1995). A las formas 'b' les falta segmento intracelular de unión a cateninas (ICS) y son incapaces de unir plakoglobina.

Las cadherinas desmosómicas son proteínas con un solo dominio transmembrana que en su región extracelular contienen cuatro dominios extracelulares homólogos (EI-IV) de unos 110 aminoácidos cada uno y un dominio más pequeño de anclaje extracelular (EA). Al igual que las cadherinas clásicas pueden dimerizar lateralmente y el dominio EI puede formar dímeros antiparalelos con cadherinas desmosómicas de células opuestas. A diferencia de las cadherinas clásicas, las interacciones entre desmogleína y desmocolina son heterofílicas (North et al. 1999).

La región intracelular de las cadherinas desmosómicas presenta dos dominios: un segmento característico altamente conservado entre los miembros de la familia y que media la unión de las cadherinas a las proteínas de la familia de las cateninas (plakoglobina y plakofilina) (ICS) y un dominio de anclaje intracelular (IA) inmediatamente adyacente a la región transmembrana. En el caso de las desmogleínas, presentan también un dominio de unión rico en prolinas (IPL), un dominio de repetición (RUD) y un dominio terminal (DTD) todos ellos de función desconocida (Garrod et al. 2002).

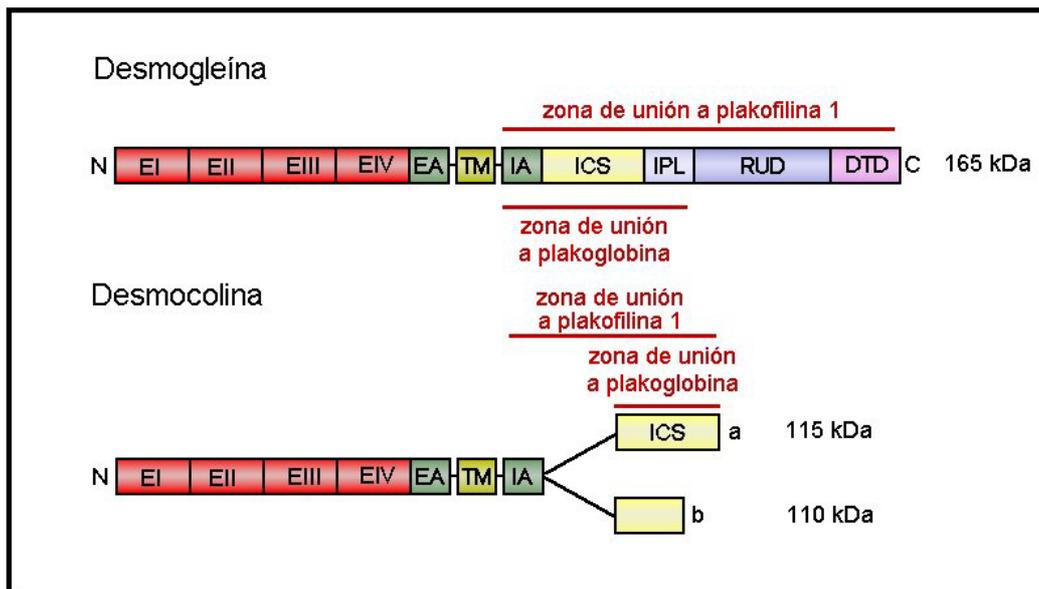


Fig.10 **Esquema de las cadherinas desmosómicas.** Representación de los diversos dominios de la desmogleína y desmocolina y las zonas de interacción con plakoglobina y plakofilina.

La expresión de las diferentes formas de las cadherinas desmosómicas depende del tipo celular y del estado de diferenciación de las células en que se encuentren (Garrod et al. 1996). Desmogleína-2 y desmocolina-2 se expresan en todos los tejidos que contienen desmosomas mientras que la expresión de desmogleína-1, desmocolina-1, desmogleína-3 y desmocolina-3 está restringida al epitelio estratificado. Dentro del epitelio estratificado de la epidermis, las isoformas 3 presentan una distribución basal asociada a las células proliferativas, y las isoformas 1 presentan una expresión en las capas diferenciadas superficiales. De forma que hay un aumento de la proporción de isoforma 1 respecto de isoforma 3 desde la parte basal hasta la superficie apical de las células del epitelio (Arnemann et al. 1993). Esta expresión diferencial de las cadherinas desmosómicas se cree que está asociada a la formación de gradientes adhesivos que proporcionan información posicional a las células epiteliales y participan, de forma directa o indirecta, en la regulación de la proliferación y diferenciación del tejido (North et al. 1996; Merrit et al. 2002).

3.2 PLAKOGLOBINA (γ -CATENINA)

La plakoglobina es una proteína de 80 kDa homóloga a β -catenina que forma parte de las uniones adherentes y de los desmosomas. Su estructura primaria consta de un extremo amino terminal de 136 aminoácidos, un dominio central de 13 repeticiones armadillo de aproximadamente 40 aminoácidos cada una y un extremo carboxilo terminal de unos 85 aminoácidos. Las regiones centrales armadillo de plakoglobina y β -catenina comparten un 83% de similitud en su cadena aminoacídica mientras que los extremos N y C terminales sólo comparten un 57 y 15% respectivamente (Williams et al. 2000). La poca homología que presentan los extremos terminales de la plakoglobina y β -catenina junto con el hecho de que los dominios terminales están implicados en la regulación de las interacciones de estas cateninas con otras proteínas podría explicar las diferencias funcionales de estas dos proteínas.

En las uniones adherentes, la plakoglobina interacciona por la región central de repeticiones armadillo con el dominio citosólico de E-cadherina (Hulsken et al. 1994) y por una región de 29 aminoácidos de su extremo amino terminal (109-137aa) con α -catenina (Aberle et al. 1996).

En los desmosomas, la plakoglobina se asocia por la región central de las repeticiones armadillo con la región amino terminal de desmoplakina (Kowalczyk et al. 1997). En su interacción con las cadherinas desmosómicas, se pueden distinguir tres regiones de plakoglobina involucradas en esta asociación: (1) un dominio cerca del extremo amino terminal (que se solapa parcialmente con el dominio de plakoglobina que se asocia a α -catenina); (2) una secuencia hidrofóbica cerca del extremo carboxilo-terminal y (3) una región central por donde también se une a las cadherinas clásicas (Wahl et al. 1996). La unión cadherina desmosómica-plakoglobina-desmoplakina es imprescindible para el correcto establecimiento de los desmosomas. La falta de plakoglobina en embriones de ratón provoca su muerte tras la organogénesis, ya que, al no poder ensamblarse los desmosomas correctamente, aparecen problemas en la formación del corazón que acaban siendo letales para el embrión (Bierkamp et al. 1996).



Fig.11 Esquema de los dominios de interacción de plakoglobina con α -catenina, desmoplakina y las cadherinas (clásicas y desmosómicas).

Al igual que β -catenina, los niveles de plakoglobina libres en el citosol están regulados por el complejo GSK3 β /axina/APC/ β -TrCP (Kodama et al. 1999; Sadot et al. 2000). La plakoglobina que no forma parte de los desmosomas ni de las uniones adherentes se localiza en este complejo donde la GSK3 β fosforila su extremo amino terminal. Esta fosforilación induce su degradación por el sistema ubiquitin-proteosoma.

El papel de plakoglobina como activador transcripcional y su participación en la vía de señalización Wnt está menos estudiado y caracterizado que el de la β -catenina. Al igual que β -catenina, plakoglobina contiene un dominio de transactivación en su extremo carboxilo terminal, puede translocarse al núcleo y unirse a factores de transcripción de la familia Tcf/LEF con una afinidad similar a la de β -catenina (Hecht et al. 1999; Zhurinsky et al. 2000a). Existe controversia sobre si plakoglobina activa directamente la transcripción mediada por los factores de transcripción Tcf/LEF o actúa indirectamente regulando la funcionalidad de β -catenina.

Algunos autores, basándose en trabajos en los que la sobreexpresión de plakoglobina conlleva la translocación de β -catenina al núcleo y en los que observan que los complejos formados por plakoglobina-LEF-1 no pueden unirse al DNA, proponen que la plakoglobina lleva a cabo su papel positivo sobre la transcripción interfiriendo en la maquinaria de degradación de β -catenina, siendo esta última quien realmente activa la transcripción (Fig.12 panel A) (Miller et al. 1999; Simcha et al. 1998; Zhurinsky et al. 2000a).

Por el contrario, otros trabajos muestran que la plakoglobina puede transformar células RK3E a través de la activación de la expresión del gen de c-myc de forma

independiente a β -catenina (Kollings et al. 2000). Según estos autores la plakoglobina intervendría directamente en la activación de genes implicados en la proliferación celular (Fig.12 panel B).

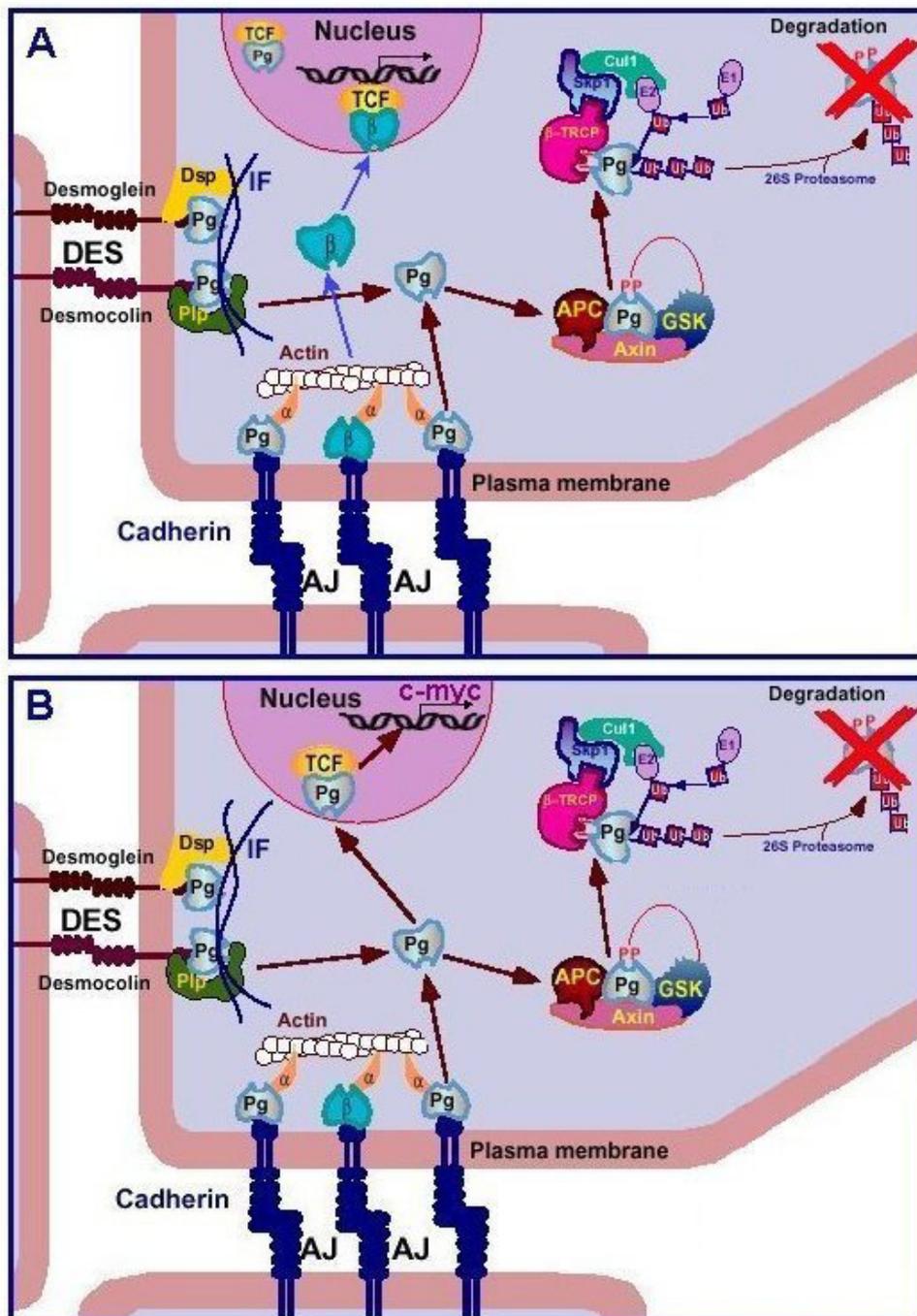


Fig.12 **Modelos propuestos para la plakoglobina como activador transcripcional.**

(A) Los complejos plakoglobina/Tcf no se unirían al DNA, la plakoglobina no activaría la transcripción mediada por Tcf/LEF directamente sino que lo haría a través de β -catenina bloqueando la maquinaria de degradación; (B) la activación transcripcional mediada por plakoglobina se daría de forma directa.

El papel de la plakoglobina en proliferación y cáncer está poco estudiado. Sin embargo, varios trabajos sugieren que, al contrario que la β -catenina, la plakoglobina podría actuar como supresor de tumores. Por ejemplo, se ha visto que sus niveles se encuentran a menudo reducidos en células tumorales (Aberle et al. 1995; Navarro et al. 1993) y la sobreexpresión de plakoglobina en células altamente transformadas suprime la tumorigenicidad (Simcha et al. 1996).

3.3 PLAKOFILINA

Las plakofilinas 1, 2 y 3 pertenecen a la familia de proteínas armadillo tipo p120^{ctn} y han sido localizadas en los desmosomas y en el núcleo. Cada una está compuesta por un extenso dominio amino terminal, de carácter básico, seguido de diez repeticiones armadillo, de 42 aminoácidos cada una, y un pequeño extremo carboxilo terminal (Bonne et al. 1999). Para plakofilina 1 y 2 se han identificado dos formas de *splicing* alternativo, una más corta 'a' y una más larga 'b'. Aunque los extremos amino terminales de las diferentes plakofilinas no presentan gran homología existe una secuencia consenso denominada HR2 que la presentan todas las isoformas (Schmidt et al. 1999).

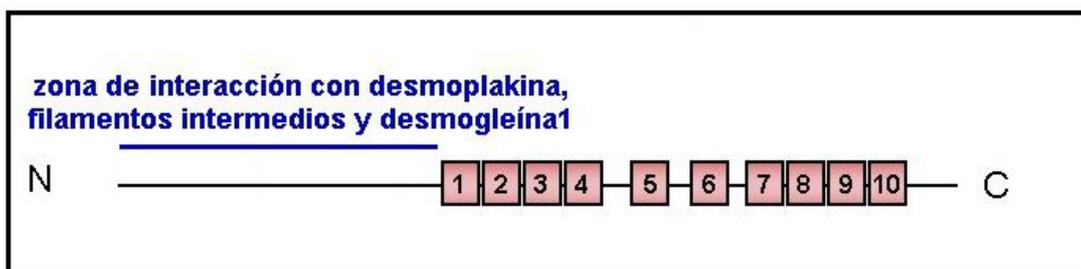


Fig.13 **Esquema de la plakofilina.** Representación de las repeticiones armadillo y de las zonas de interacción con desmoplakina, filamentos intermedios y desmogleína1.

En cuanto a su distribución, la plakofilina 1 se concentra en los desmosomas de las capas suprabasales estratificadas del epitelio; la plakofilina 3 se detecta en los desmosomas de casi todos los epitelios estratificados y simples a excepción de hepatocitos; y la plakofilina 2 presenta la mayor distribución, tanto en desmosomas de tejidos epiteliales, como en miocardio y folículos del nódulo linfático. Las

plakofilinas 1 y 2 presentan un patrón de expresión dependiente del estado de diferenciación de las células, de forma que, mientras que la plakofilina 2 se concentra en las capas basales de la mayoría de los epitelios escamosos estratificados, la plakofilina 1 se localiza en los desmosomas de las capas superiores (Schmidt et al. 1997; Moll et al. 1997).

La plakofilina 1 juega un papel crítico en el mantenimiento de la integridad tisular, ya que pacientes que no presentan esta plakofilina muestran desmosomas aberrantes, una escasa interacción con los filamentos intermedios y una distribución citoplásmica difusa de la desmoplakina (McGrath et al. 1997). Estas observaciones sugirieron la hipótesis de que la plakofilina 1 es necesaria para la asociación de la desmoplakina en los desmosomas. En trabajos posteriores se ha visto que la plakofilina 1 interacciona directamente con el extremo amino terminal de la desmoplakina y la recluta hacia la membrana para la formación de los desmosomas (Bornslaeger et al. 2001; Kowalczyk et al. 1999). Todos estos resultados han llevado a proponer que la plakofilina 1 es importante en el ensamblaje de los desmosomas a través de las interacciones laterales proteína-proteína.

Las plakofilinas también pueden localizarse en el núcleo pero su función allí es hasta ahora desconocida. Un estudio reciente muestra que, *in vitro*, la plakofilina 2 en el núcleo interacciona directamente con la RNA polimerasa III (Mertens et al. 2001). También se ha visto que la plakofilina 2 puede asociarse a la β -catenina libre no unida a E-cadherina y regular su actividad transcripcional, estableciéndose una conexión entre los dos tipos principales de uniones celulares (Chen et al. 2002).

3.4 LAS PLAKINAS

Las plakinas son una familia de proteínas acopladoras que se asocian con elementos del citoesqueleto y de los complejos de adhesión. Han sido identificados siete miembros de la familia de las plakinas: desmoplakina, plectina, *bullous pemphigoid* antígeno1, *microtubule-actin crosslinking factor*, envoplakina, periplakina y epiplakina. Esta familia de proteínas se caracteriza por la presencia de siete dominios funcionales:

* dominio plakina, formado por seis hélices α (denominadas NN,Z,Y,X,W y V), lo presentan todos los miembros de la familia excepto la epiplakina y es importante en la dirección de las plakinas a uniones celulares específicas.

* dominio de repeticiones plakina (PRD), cada repetición (clasificadas en A, B y C) está formada por 38 residuos y el número de repeticiones varía desde ninguna en la periplakina a 13 en la epiplakina. Es el dominio de unión a los filamentos intermedios.

* dominio de unión a los filamentos de actina (ABD), consiste en dos dominios homólogos a calponina que pueden presentar formas de *splicing* alternativo, aunque estas formas más cortas son incapaces de unirse a los filamentos de actina.

* dominio de unión a microtúbulos. Existen dos tipos: los tipo Gas2 (GAR) y los dominios glicina-serina-arginina (GSR). Aunque son la zona de las plakinas de unión a microtúbulos, en la desmoplakina no tienen esta función y regulan la unión con los filamentos intermedios.

* dominio ROD, consiste en una hélice alfa superenrollada implicada en la homo- y heterodimerización de las plakinas.

* dominio de repeticiones espectralina, formados por tres hélices α , es importante en la dimerización y flexibilidad de las plakinas que lo presentan.

La mayoría de las plakinas se expresan en tejidos que sufren estrés mecánico, como epitelio y músculo, donde juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad del tejido. Por esto, enfermedades autoinmunes o hereditarias que afectan a las plakinas llevan asociadas fragilidad tisular (Leung et al. 2002).

3.4.1 Desmoplakina

La desmoplakina es un componente básico de los desmosomas necesaria para unir los filamentos intermedios a la membrana plasmática. Presenta dos isoformas que proceden de un solo gen por *splicing* alternativo, desmoplakina I (250 kDa) y desmoplakina II (210 kDa). Ambas formas se localizan en tejidos epiteliales (donde se asocian a filamentos intermedios de citoqueratina) y la desmoplakina I también se ha encontrado en células de Purkinje y de miocardio (donde se asocia a filamentos

intermedios de desmina) y en nódulos linfáticos (donde se asocia a filamentos intermedios de vimetina).

Su dominio ROD es responsable de la dimerización y posible oligomerización de las moléculas de desmoplakina (Stappenbeck y Green, 1992). El dominio plakina es donde tiene lugar la interacción con plakoglobina y plakofilina 1 y 2 y es también responsable de la interacción con las cadherinas desmosómicas (Bornslaeger et al. 2001; Kowalczyk et al. 1997). Por su dominio de repeticiones plakina (PRD) es capaz de interactuar directamente con varios tipos de filamentos intermedios. El dominio glicina-serina-arginina (GSR) que presenta en su extremo carboxilo terminal regula su interacción con los filamentos intermedios; la fosforilación en serinas de este dominio supone la pérdida de la unión con los filamentos (Stappenbeck et al. 1994).

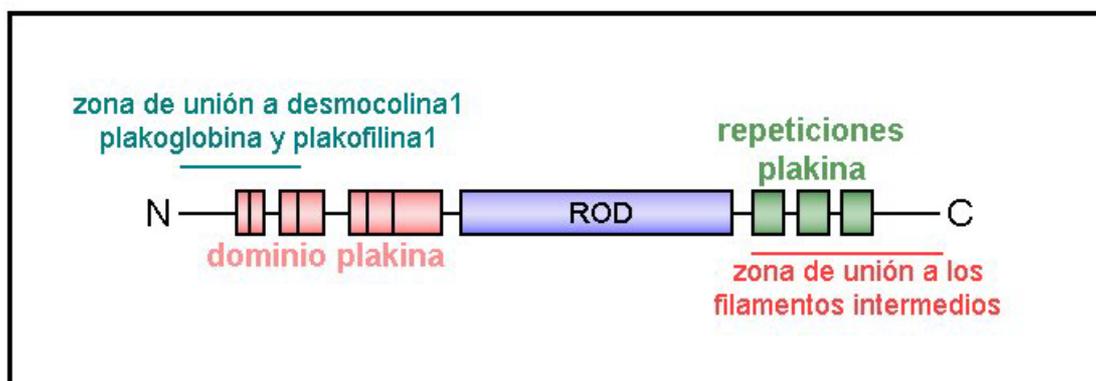


Fig.14 **Esquema de la desmoplakina.** Representación de los diversos dominios de la desmoplakina y las zonas de interacción con plakoglobina, plakofilina y desmocolina.

La importancia de la desmoplakina *in vivo* se vio claramente cuando trabajando con embriones de ratón sin desmoplakina se observó que morían a los 6,5 días por pérdida de la integridad del endodermo extraembrionario (Gallicano et al.1998). Además en gran variedad de enfermedades, asociadas con anomalías en la piel, se han encontrado mutaciones en su gen (Armstrong et al. 1999; Norgett et al. 2000).

3.5 REGULACIÓN DE LOS DESMOSOMAS

Varios son los mecanismos que se cree que regulan la formación de los desmosomas.

Se ha visto que los bajos niveles de calcio extra e intracelulares promueven su desensamblaje (Watt et al.1984; Stuart et al.1996). El ensamblaje de los desmosomas en respuesta a calcio es reversible durante los primeros estadios del desarrollo, pero posteriormente los desmosomas maduran y no pueden ser disociados por depleción de calcio. Sin embargo, se ha demostrado que la independencia de calcio que presentan los desmosomas en células epiteliales confluentes revierte a dependencia al lesionarlas y este proceso depende de la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Wallis et al. 2000).

La fosforilación en residuos serina o tirosina de algunas proteínas que forman parte de los desmosomas es otro posible mecanismo de regulación. La fosforilación en serina de la desmoplakina por PKC provoca su disociación de los filamentos intermedios del citoesqueleto y disminuye el contacto celular (Amar et al. 1999). Por un mecanismo hasta ahora desconocido, la desmogleína 3 se fosforila en respuesta al tratamiento con *pemphigus* inmonoglobulina G y disminuye su interacción con la plakoglobina (Aoyama et al. 1999). Otra evidencia es la fosforilación en serinas del extremo carboxilo terminal de la desmoplakina que inhibe su interacción con los filamentos intermedios (Stappenbeck et al. 1994). Recientemente, se ha observado que la fosforilación de la plakoglobina en tirosinas en su extremo carboxilo terminal por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) reduce su unión a desmoplakina pero no a desmogleína 2 (Gaudry et al. 2001).

4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT

La vía de señalización Wnt interviene en el crecimiento celular, diferenciación, organogénesis y oncogénesis (Nusse y Varmus,1992). Esta vía consiste en una cascada intracelular en la que participan las proteínas de secreción Wnt (*wingless* en *Drosophila*), el receptor de membrana *frizzled*, la proteína *dishevelled* (Dsh), las serina-treonina quinasas $CKI\alpha$ y GSK-3 β , la axina, APC y la β -catenina. Esta vía,

que fue inicialmente caracterizada en *Drosophila*, es muy importante en la formación de los ejes embrionarios tanto en vertebrados como en invertebrados (Parr y McMahon, 1994; Moon et al., 1997).

Los **Wnts** son una familia de glicoproteínas (hay 14 diferentes en mamíferos) de unos 350-400 aminoácidos. Se han encontrado homólogos en un elevado número de organismos y todos ellos se caracterizan por presentar una secuencia rica en cisteínas.

Los receptores de Wnt se denominan **frizzled**. Estos receptores de 7 hélices transmembrana presentan una región extracelular de 120 aminoácidos rica en cisteínas por donde interaccionan con Wnt, y una cola citoplasmática larga con lugares de interacción con dominios PDZ.

Como respuesta a Wnt se hiperfosforila la proteína **dishevelled** (Dsh) que puede interaccionar con Frizzled, a través de su dominio PDZ, en la membrana. Dsh también se une a axina a través de sus dominios DIX. Como consecuencia, por un mecanismo todavía desconocido, se inactiva la quinasa GSK-3 β ; en estas condiciones, la β -catenina no puede ser fosforilada en su extremo amino terminal y por lo tanto no es degradada.

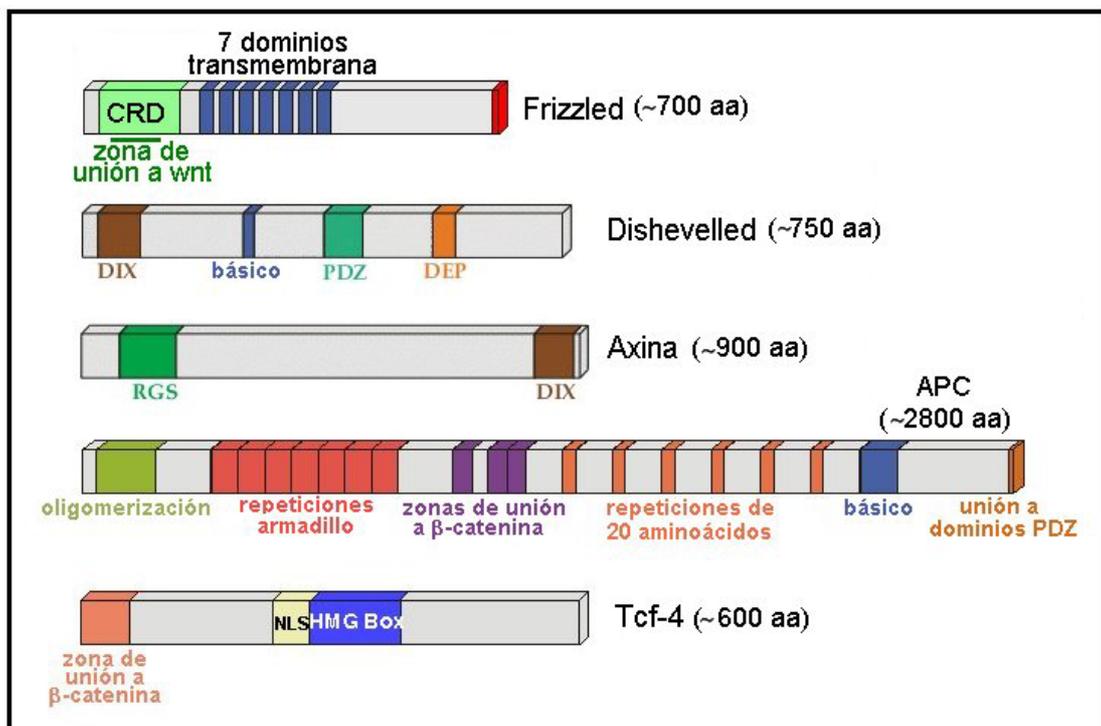


Fig.15 Esquema de los diferentes miembros de la vía de señalización Wnt. Se detallan los diferentes dominios funcionales de las distintas proteínas.

Por tanto, como resultado de la activación de esta vía, hay una acumulación de la β -catenina en el citosol que provoca la translocación de la β -catenina al núcleo. En el núcleo la β -catenina interacciona a través de la región central de repeticiones armadillo con miembros de la familia de los factores de transcripción Tcf (*T cell factor*) (Molenaar et al. 1996; Behrens et al. 1996). Estos factores de transcripción pertenecen a la superfamilia de proteínas con dominios HMG (*High Mobility Group*) y fueron identificados inicialmente por su implicación en la diferenciación de las células T (Oosterwegel et al. 1991). Aunque por si solos estos factores son capaces de unirse al DNA por sus dominios HMG, necesitan interaccionar por su extremo amino terminal con la β -catenina para activar la transcripción de genes implicados en proliferación y diferenciación (Behrens et al. 1996).

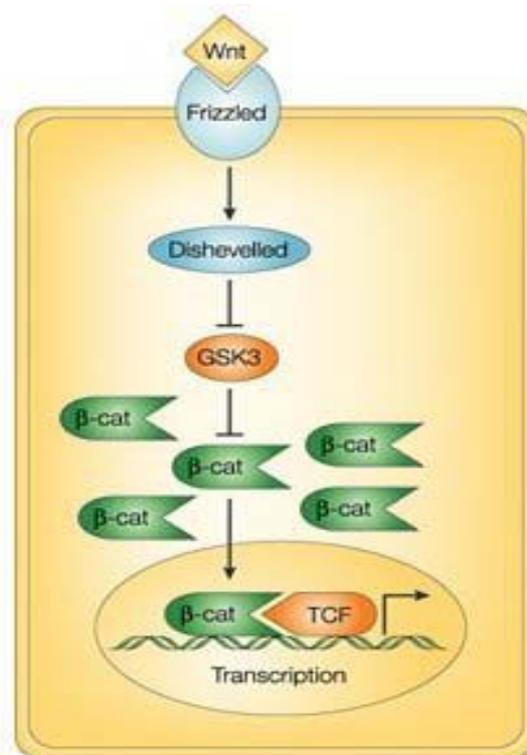


Fig.16 Vía de señalización en respuesta a Wnt.

Cuando esta vía no está activada, la GSK3 β se encuentra en su forma activa y a través del complejo que forma con axina y APC puede fosforilar a β -catenina induciendo su poliubiquitinación y degradación por el proteosoma. Recientemente se ha descrito que previa a la fosforilación por GSK3 β , la β -catenina es fosforilada en su extremo amino terminal por CKI α . Esta fosforilación por CKI es crítica en la vía de señalización Wnt y necesaria para la posterior fosforilación por GSK3 β . La

disminución de los niveles de $CKI\alpha$ inhibe la fosforilación y degradación de β -catenina y provoca una anormal embriogénesis asociada con una excesiva señalización Wnt/ β -catenina (Liu et al. 2002). También se ha descrito que la $CKI\epsilon$ es un regulador positivo de la vía Wnt ya que fosforila la Ser-45 de β -catenina favoreciendo la fosforilación por GSK3 β y afectando a la interacción con axina y β -TrCP (Sakanaka, 2002).

En los últimos años se han identificado más de 50 genes susceptibles de ser regulados por los complejos β -catenina/Tcf tanto en cáncer colorectal, como en *Drosophila*, *Xenopus* y ratón. En la tabla siguiente se detallan los genes identificados que están implicados en el desarrollo de cáncer de colon.

Gen	Función	Referencia
c-Myc	Proliferación	He,1998
Ciclina D1	Proliferación	Tetsu,1999; Shtutman,1999
Tcf-1	Diferenciación	Roose,1999
PPARdelta	Proliferación/Diferenciación	He,1999
c-jun	Diferenciación/Proliferación	Mann,1999
fra-1	Diferenciación/Proliferación	Mann,1999
uPAR	Adhesión/Migración/Invasión	Mann,1999
matrilisina	Invasión/Migración	Brabletz,1999; Crawford,1999
Axina-2	Degradación de β -catenina	Yan,2001; Lustig,2002; Jho,2002
Nr-CAM	Adhesión/Proliferación	Conacci-Sorrell, 2002
ITF-2	Proliferación/Diferenciación	Kolligs, 2002
Gastrina	Proliferación	Koh, 2000
CD44	Adhesión	Wielenga,1999
EphB/ephrina-B	Repulsión/Adhesión	Battle, 2002
BMP4	Diferenciación	Kim, 2002
claudina-1	Adhesión	Miwa, 2002
VEGF	Proliferación	Zhang, 2001
Id2	Diferenciación	Rockman, 2001; Willert, 2002

Tabla I. **Genes activados directa o indirectamente por el complejo β -catenina/Tcf-4.** No todas las funciones asociadas a los genes activados han sido demostradas en el cáncer colorectal.

Aunque el marco general de la ruta Wnt ya ha sido caracterizado, siguen identificándose nuevos componentes que regulan la vía de señalización de forma positiva o negativa. Se ha identificado a LRP, otro receptor transmembrana que puede asociarse con los receptores *frizzled* en la interacción con las proteínas Wnt (Tamai, 2000). Otros componentes adicionales en esta ruta son: Frat-1, que interacciona con la axina desplazando a GSK3 β del complejo de degradación de β -catenina (Thomas et al. 1999); la serina/treonina fosfatasa PP2A, que interacciona con la axina y APC e inhibe la vía a través de su subunidad reguladora B56 (Seeling et al. 1999; Li et al. 2001); la caseína quinasa II, un regulador positivo de la ruta que fosforila en serinas/treoninas a *dishevelled* y β -catenina (Song et al. 2000); recientemente se ha caracterizado Frodo, que mediante su asociación a *dishevelled* regula positivamente la señalización (Gloy et al. 2002); a nivel nuclear, los co-represores CtBP y groucho mediante su asociación a los factores de transcripción Tcf reprimen la transcripción a través de un mecanismo en el que interviene la histona deacetilasa (HDAC) (Cavallo et al. 1998); por último, las proteínas pontina/reptina que interaccionan con β -catenina y TBP presentan acciones opuestas en la transactivación mediada por β -catenina: así, pontina regula de forma positiva y reptina de forma negativa la activación (Bauer et al. 2000).

Aunque la identificación de estos nuevos factores de la vía de señalización y la caracterización de sus mecanismos de acción son un paso importante en la comprensión del papel de la vía Wnt en el desarrollo embrionario o en la tumorigénesis, queda todavía mucho por hacer en el esclarecimiento de puntos importantes como son la activación de *dishevelled* o el mecanismo de inhibición de la actividad de GSK3 β .