

## **II. OBJETIVOS**

El objetivo principal de esta tesis consistió en caracterizar las diferencias estructurales y funcionales entre  $\beta$ -catenina y plakoglobina. Para ello se analizaron las dos funciones de estas proteínas:

- 1) como activadores transcripcionales, lo que requiere su interacción con el factor de transcripción Tcf-4 y
- 2) como reguladores de las uniones adherentes (plakoglobina y  $\beta$ -catenina) o de los desmosomas (plakoglobina).

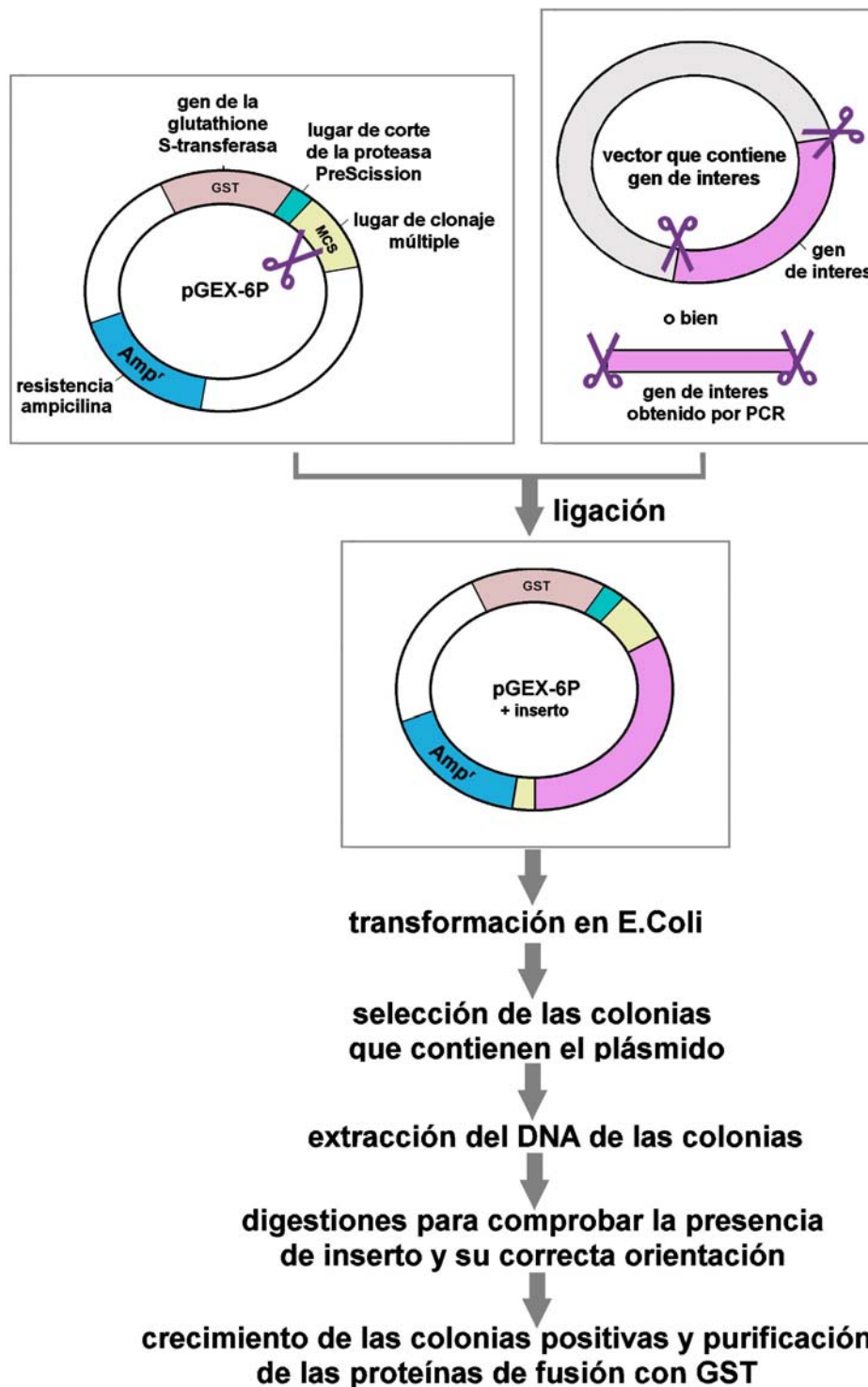
Se pretendía identificar cómo se regula la interacción de  $\beta$ -catenina y plakoglobina tanto con el Tcf-4 y otros factores implicados en la actividad transcripcional (TBP) como también con proteínas constituyentes de las uniones adherentes (E-cadherina,  $\alpha$ -catenina) y desmosomas (desmogleína, desmoplakina).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

# 1. OBTENCIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN PROCARIOTAS

## 1.1 ESQUEMA GENERAL

Los diferentes productos recombinantes necesarios para llevar a cabo este trabajo fueron obtenidos como se indica en el siguiente esquema general:



En la siguiente tabla, se citan con más detalle las características de cada construcción llevada a cabo:

Tabla II. Detalle de las construcciones llevadas a cabo para la realización de este trabajo.

Nombre construcción	Origen/ obtención del inserto	Insertado en
A.- pGEX-βcatenina (aa 1-782)	cDNA cedido por Dr.R.Kemler, digerido <i>BamHI</i>	pGEX-6P-3 abierto con <i>BamHI</i> y defosforilado
B.- pGEX-βcatenina (aa 138-683) “Repeticiones Armadillo”	por PCR a partir de A. Los cebadores contienen dianas <i>BamHI</i> y <i>SmaI</i>	pGEX-6P-1 abierto <i>BamHI</i> + <i>SmaI</i>
C.- pGEX-Ecadherina (aa 732-883) “Región citosólica”	por PCR a partir de cDNA murino total. Los cebadores contienen dianas <i>BamHI</i> y <i>EcoRI</i>	pGEX-6P-3 abierto <i>BamHI</i> + <i>EcoRI</i>
D.- pcDNA-βcatenina (aa 1-782)	digestión de A con <i>BamHI</i>	pcDNA3.1/His(C) abierto con <i>BamHI</i> y defosforilado
E.- pGEX-α-catenina (aa 1-472) “Dominio N-ter”	Por RT-PCR a partir de RNA total. Los cebadores contienen dianas <i>EcoRI</i> y <i>Sal I</i>	pGEX-6P-3 abierto <i>EcoRI</i> + <i>Sal I</i>
F.- pGEX-α-catenina (aa 1-906)	α-cat(mouse)-pBKS cedida por Dr.R.Kemler, digerida <i>NotI</i> + <i>XhoI</i> y purificación de la banda de 2500pb	E digerido con <i>NotI</i> + <i>XhoI</i> , (banda aislada de 5400 pb).
G.-pGEX-Tcf-4 (aa 1-597)	Por RT-PCR a partir de RNA total. Los cebadores contienen dianas <i>BamHI</i> y <i>EcoRV</i>	pGEX-6P-1 abierto <i>BamHI</i> + <i>SmaI</i>
H.- pGEX-Tcf-4 (aa 1-80)	digestión de G con <i>SmaI</i> y <i>XhoI</i> , purificación de la banda de 5150 pb, relleno con Klenow y ligado	
I.- pGEX-Tcf-4 (aa 1-49)	digestión de G con <i>BsmBI</i> y <i>NotI</i> , purificación de la banda de 5050 pb, relleno con Klenow y ligado	
J.- pGEX-Tcf-4 (aa 1-30)	digestión de G con <i>EcoICRI</i> y <i>NotI</i> , purificación de la banda de 5000 pb, relleno con Klenow y ligado	
K.- pGEX-Tcf-4 (aa 1-51)	por PCR a partir de G. Los cebadores contienen dianas <i>BamHI</i> y <i>XhoI</i>	pGEX-6P-1 abierto <i>BamHI</i> + <i>XhoI</i>
L.- pGEX-Tcf-4 (aa 1-110)	por PCR a partir de G. Los cebadores contienen dianas <i>BamHI</i> y <i>XhoI</i>	pGEX-6P-1 abierto <i>BamHI</i> + <i>XhoI</i>
M.- pGEX-Tcf-4 (aa 10-51)	por PCR a partir de G. Los cebadores contienen dianas <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i>	pGEX-6P-1 abierto <i>EcoRI</i> + <i>XhoI</i>
N.- pGEX-Tcf-4 (aa 51-110)	por PCR a partir de G. Los cebadores contienen dianas <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i>	pGEX-6P-1 abierto <i>EcoRI</i> + <i>XhoI</i>
O.- pGEX-Tcf-4 (aa 51-80)	digestión de N con <i>SmaI</i> y <i>XhoI</i> , purificación de la banda de 5050 pb, relleno con Klenow y ligado	
P.- pGEX-plakoglobina (aa 1-745)	plakoglobina-pBKS cedida por Dr.A.Ben-Ze’ev digerida <i>EcoRI</i> y purificación de la banda de 3200pb	pGEX-6P-2 abierto <i>EcoRI</i> y defosforilado

Nombre construcción	Origen/ obtención del inserto	Insertado en
<b>Q.-</b> pcDNA-plakoglobina (aa 1-745)	digestión de <b>P</b> con <i>EcoRI</i> y purificación de la banda de 3200 pb	pcDNA3.1/His(C) abierto con <i>EcoRI</i> y defosforilado
<b>R.-</b> pGEX-plakoglobina (aa 111-672) “Repeticiones armadillo”	por PCR a partir de <b>P</b> . Los cebadores contienen dianas <i>BamHI</i> y <i>EcoRV</i>	pGEX-6P-1 abierto <i>BamHI</i> + <i>SmaI</i>
<b>S.-</b> pGEX-plakoglobina (aa 111-385) “Repeticiones armadillo 1-6”	por PCR a partir de <b>P</b> . Los cebadores contienen dianas <i>BamHI</i> y <i>EcoRV</i>	pGEX-6P-1 abierto <i>BamHI</i> + <i>SmaI</i>
<b>T.-</b> pGEX-plakoglobina (aa 380-672) “Repeticiones armadillo 7-12”	digestión de <b>N</b> con <i>SmaI</i> y <i>XhoI</i> , purificación de la banda de 5050 pb, relleno con Klenow y ligado	pGEX-6P-1 abierto <i>BamHI</i> + <i>SmaI</i>
<b>U.-</b> pGEX-plakoglobina (aa 1-113) “extremo N-terminal”	digestión de <b>P</b> con <i>PstI</i> y <i>EcoRI</i> , purificación de la banda de 460 pb y relleno con Klenow	pGEX-6P-2 abierto <i>EcoRI</i> + <i>SmaI</i>
<b>V.-</b> pGEX-plakoglobina (aa 667-745) “extremo C-terminal”	digestión de <b>P</b> con <i>EcoICRI</i> y purificación de la banda de 1100pb)	pGEX-6P-2 abierto <i>SmaI</i>
<b>W.-</b> pGEX-Nter( $\beta$ cat)-Arm(plakoglobina)-Cter( $\beta$ cat) “Quimera $\beta$ -p- $\beta$ ”	a partir de <b>P</b> creamos dianas de restriccc. para <i>Afl3</i> (aa140) y <i>KpnI</i> (aa698) y digerimos con estos enzimas (banda 1700 pb)	<b>A</b> modificada con una diana de restriccc. para <i>KpnI</i> en el C-ter de $\beta$ -cat (aa 701) y digerimos con <i>Afl3</i> + <i>KpnI</i> (banda de 5800pb)
<b>X.-</b> pGEX-Nter( $\beta$ cat)-Arm( $\beta$ cat)-Cter(plakoglobina) “Quimera $\beta$ -p- $\beta$ ”	<b>A</b> modificada con una diana de restriccc. para <i>KpnI</i> en el C-ter de $\beta$ -cat (aa 701) y digerimos con <i>BamHI</i> + <i>KpnI</i> (banda de 2400pb)	a partir de <b>P</b> con dianas de restriccc. para <i>Afl3</i> (aa140) y <i>KpnI</i> (aa698) digerimos con <i>BamHI</i> + <i>KpnI</i> (banda 5000 pb)
<b>Y.-</b> pGEX-Nter(plakoglobina)-Arm( $\beta$ cat)-Cter(plakoglobina) “Quimera p- $\beta$ -p”	<b>A</b> modificada con una diana de restriccc. para <i>KpnI</i> en el C-ter de $\beta$ -cat (aa 701) y digerimos con <i>Afl3</i> + <i>KpnI</i> (banda de 1700 pb)	a partir de <b>P</b> creamos dianas de restriccc. para <i>Afl3</i> (aa140) + <i>KpnI</i> (aa698) y digerimos con estos enzimas (banda 6600 pb)

## 1.2 CEPA DE *E.coli*, CULTIVO BACTERIANO Y VECTOR UTILIZADO

### 1.2.1 Cepa bacteriana y preparación de células competentes

La cepa utilizada para expresar las proteínas recombinantes fue la XL1-blue de *E.coli*. Para preparar XL1-blue competentes, se creció un cultivo durante 16 h de 2 mL de LB (10 g Triptona/L, 5 g levadura/L, 5 g NaCl/L, ajustado a pH 7 con NaOH) con unos pocos microlitros de células XL1. A continuación, se diluyó 1/100 en LB recién preparado y se creció hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,4-0,5. Se centrifugó suavemente a 2.500 xg durante 15 min y se resuspendió el pellet celular

en una décima parte del volumen inicial (20 mL) en tampón TSS (10% PEG, 5% DMSO en LB con 50 mM MgCl<sub>2</sub>); se alicuotó y congeló a -80°C.

### 1.2.2 Medio de cultivo bacteriano

Para el crecimiento de las XL1-blue se utilizó un medio rico: el LB en su forma líquida o sólida (con un 2% de agar). El medio se esterilizó por autoclave (121°C, 20 min). Para la selección de las bacterias transformadas se añadió al medio ampicilina (Sigma), a una concentración de 125 mg/L (siempre después de autoclavar y cuando la temperatura del medio había bajado por debajo de los 50°C).

En el caso del medio sólido, tras la adición del antibiótico, se vertió el LB-agar en placas de Petri y se dejaron solidificar al aire en una atmósfera estéril como por ejemplo una campana de flujo laminar.

CONDICIONES DE CULTIVO : En placa a 37°C sin agitación.

Líquido a 37°C y 220 rpm.

CONDICIONES DE ALMACENAJE de COLONIAS TRANSFORMADAS:

En placa a 4°C durante 4-6 semanas.

Líquido con glicerol al 50% a -80°C por años.

### 1.2.3 Vector

Como vehículo de expresión de los productos a clonar se utilizaron los vectores pGEX-6P –en sus tres pautas de lectura 1,2 o 3- (Amersham-Pharmacia). Este tipo de vector permite expresar cualquier producto clonado como proteína de fusión con GST (Glutation-S-transferasa). Además de un origen de replicación, contiene:

- 1.- gen para resistencia a ampicilina (Amp<sup>r</sup>),
- 2.- gen codificante para la GST controlado por el promotor Tac, que permite alta expresión de forma controlada (inducible) químicamente con IPTG,
- 3.- una secuencia con múltiples sitios de corte único por enzimas de restricción a continuación del gen de la GST para facilitar el clonaje unidireccional del producto de interés,

4.- el sitio de reconocimiento para la proteasa PreScission (PS) (Amersham-Pharmacia) para cortar entre la GST y la proteína deseada una vez obtenida la proteína de fusión.

### 1.3 MÉTODOS DE CLONAJE DE DNA

#### 1.3.1 Extracción del DNA plasmídico (Método de lisis alcalina)

A partir de un cultivo líquido saturado de bacterias, se puede obtener su DNA plasmídico aislado para ser digerido, subclonado o transformado. Se han utilizado indistintamente los kits comerciales de minipreps de Pharmacia, Gibco y QiaGen, y seguido sus instrucciones. En todos ellos, se partió de un cultivo de 16 h de 1-5 mL en LB-ampicilina (que generalmente contenía bacterias de una de las colonias crecidas en placa). Se centrifugó y el pellet se resuspendió en un tampón que contenía RNasa, SDS y NaOH para provocar la lisis celular y degradar RNA. Se dejó actuar 5 min tras los cuales se neutralizó la solución y se precipitó el dodecil sulfato con acetato potásico. Se centrifugó 10 min a 14.000 xg y se descartó el pellet (compuesto por membranas y restos celulares).

Se aplicó el sobrenadante a unas columnas que tienen una matriz generalmente de silica gel o algún otro material capaz de adsorber selectivamente el DNA plasmídico a alta fuerza iónica. Posteriormente, se eluyó el DNA bajando la concentración de sales del medio.

#### 1.3.2 Amplificación de fragmentos de DNA por PCR

En algunas ocasiones los fragmentos de DNA a clonar se han obtenido a partir de la *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR). En presencia de DNA (en estos casos genómico), se añadieron al medio un par de oligonucleótidos que hibridan al principio y al final del fragmento a amplificar y uno con cada una de las dos hebras de DNA, 1,5 mM Mg<sup>2+</sup>, 125 μM dNTPs, tampón para PCR (Gibco), agua autoclavada y tratada con luz UV (para provocar dimerización de timidinas de un posible DNA contaminante y evitar que sea amplificado) y la DNA polimerasa Taq o Pfx.



Todos estos elementos se introdujeron en un termociclador (Perkin-Elmer) que los mantuvo, consecutivamente:

1.-a 95°C durante 15 segundos para deshibridar las dos cadenas del DNA

2.-a 53-60°C (dependiendo de la temperatura de ensamblaje de los cebadores) durante 30 segundos para permitir el anillamiento de los cebadores con las cadenas madre de DNA

3.-a 72°C o 68°C (dependiendo de que la polimerasa sea Taq o Pfx) por varios minutos (a razón de 1 min por kilobase del fragmento a amplificar) para que la polimerasa pueda elongar las cadenas.

Los pasos 1, 2 y 3 se sucedieron repetidamente durante 20-30 ciclos para conseguir la amplificación exponencial del DNA donde hibridan los cebadores.

Los cebadores utilizados llevaban en su extremo 5' dianas para enzimas de restricción. Se obtuvo así un producto de DNA de doble hebra flanqueado por estas dianas de restricción, que permitió su clonaje en el vector de expresión.

### **1.3.3 Amplificación de fragmentos de RNA por RT-PCR**

En la realización de algunas construcciones ha sido necesaria la amplificación de fragmentos de DNA a partir de RNA. En estos casos se partió de 0,5 µg de RNA total de células SW480 y se empleó el “Superscript™ one-step™ RT-PCR System” (Life Technologies). Las reacciones de RT-PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) en las condiciones: 30 seg 50°C, 2 min 94 °C (RT); 15 seg 94°C, 30 seg 50°C, 2 min 72°C (PCR). Los oligonucleótidos utilizados llevaban en su extremo 5' dianas para enzimas de restricción que permitieron su clonaje en el vector de expresión. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio.

### **1.3.4 Digestión de DNA**

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

La cantidad de DNA a digerir osciló entre 100 ng y 4  $\mu\text{g}$  en un volumen de 20 a 100  $\mu\text{L}$ . La cantidad de enzima, el tampón utilizado y la temperatura fueron en cada caso los especificados por el fabricante, en un tiempo de reacción de 2 a 3 h.

### 1.3.5 Defosforilación de vectores

La defosforilación se realiza cuando se digiere el vector con un solo enzima de restricción, para evitar que el vector linearizado pueda recircularizar. A los 5  $\mu\text{g}$  de vector digerido, se añadieron 0,1 unidades de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Promega) disuelta en el tampón adecuado y se incubó por 30 min a 37°C. A continuación se inactivó el enzima a 85°C durante 15 min y se aisló el DNA de la mezcla extrayendo con fenol y cloroformo y precipitándolo con 0,3 M de acetato sódico a -80°C. El DNA se resuspendió en TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA).

### 1.3.6 Relleno con la polimerasa Klenow

Los fragmentos de DNA digeridos necesitan en ocasiones tener extremos romos para poder ligarlos con los extremos romos de un vector. En este caso se rellenó con la polimerasa Klenow aquellos nucleótidos que estaban desaparejados tras una digestión previa. La reacción tuvo lugar a 37°C durante 1h mezclando unos 3-4  $\mu\text{g}$  de DNA con 2  $\mu\text{L}$  de Klenow (10 unidades) con 25  $\mu\text{M}$  de deoxiribonucleósidos trifosfato en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ .

### 1.3.7 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Esta técnica ha sido usada rutinariamente para visualizar el DNA obtenido en los distintos pasos del clonaje de todos los productos: tras las digestiones, aislamiento de DNA plasmídico de E.coli, etc. En la mayor parte de los casos se utilizó una concentración de agarosa del 1% en TAE (50 mM Tris, 1 mM acetato, 2 mM EDTA, pH 8,5) usando como marcador de peso molecular DNA del fago  $\lambda$  digerido con Hind III y corriendo el gel a 5-10 V/cm.

Las bandas se visualizaron sumergiendo el gel durante 10 min en una solución con 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de bromuro de etidio en TAE (1x) y colocando el gel sobre una fuente de luz UV. La emisión de luz se captó con una cámara fotográfica o de vídeo.

### 1.3.8 Extracción del DNA del gel de agarosa

La digestión nos conduce generalmente a la obtención de fragmentos de distinto tamaño que se separan electroforéticamente. Para aislar el fragmento deseado, se recortó la banda concreta del gel y se extrajo el DNA de la agarosa. Se utilizó el kit *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 1.3.9 Ligación

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

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

Si los extremos de vector e inserto eran romos, se aumentó la cantidad de ligasa hasta 10-15 unidades y se realizó la reacción a 20-24°C.

### 1.3.10 Transformación en XL1-Blue

Se mezcló, en hielo, 0.15 mL de XL1-Blue competentes (recién preparadas o descongeladas lentamente a 4°C) con el producto de ligación. A continuación, se dejó en hielo durante 30-45 min. Se propició un choque térmico poniendo las bacterias 1min 30s a 42°C, seguido de 1min 30s a 4°C. Se añadió 0,9 mL de LB (sin ampicilina) y se incubó 1 h a 37°C, para permitir que las bacterias transformadas pudieran desarrollar la resistencia a antibiótico que llevan codificada en el vector. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min para descartar parte del volumen del sobrenadante. Unos 100  $\mu\text{L}$  de bacterias se sembraron en placas de LB-agar-ampicilina y se incubaron durante 16 h a 37°C.

Cada colonia aislada que se obtiene proviene de una sola E.coli que ha incorporado el pGEX y de esta manera se ha hecho resistente al antibiótico. Se comprobó, mediante digestión con enzimas de restricción, que el pGEX tuviera el inserto del tamaño deseado y colocado en la orientación correcta.

### 1.3.11 Obtención de los mutantes puntuales

Para la realización de los mutantes puntuales de plakoglobina y Tcf-4, se partió de la construcción de plakoglobina o Tcf-4 nativa (*wild type*) clonada en pGEX-6P. Se empleó para ello el Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene.

Se aisló el DNA plasmídico por miniprep (ver 1.3.1). Este DNA de doble cadena y en forma de *supercoil* se desnaturaliza y se hibridan dos oligonucleótidos que contienen la mutación deseada (uno con cada hebra del DNA). En la siguiente tabla se muestran los mutantes puntuales que se han obtenido para la realización de este trabajo y los oligonucleótidos que se han empleado:

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados para la obtención de los mutantes puntuales.

mutación	oligonucleótidos utilizados
Plakoglobina Tyr-133→Glu	5'- CATCTCATCAAC <b>GAAC</b> AGGACGATGCC -3'
Plakoglobina Tyr-133→Phe	5'- CATCTCATCAACT <b>TTT</b> CAGGACGATGCC -3'
Plakoglobina Tyr-549→Glu	5'- GGCACTGCCAC <b>CGAAG</b> CTGCTGCCGTC -3'
Plakoglobina Tyr-549→Phe	5'- GGCACTGCCAC <b>CTTT</b> GCTGCTGCCGTC -3'
Plakoglobina Tyr-643→Glu	5'- ACACAGCAGCC <b>CGAAAC</b> GGATGGTGTG -3'
Plakoglobina Tyr-643→Phe	5'- ACACAGCAGCC <b>CTTT</b> ACGGATGGTGTG -3'
Tcf-4 Ser-58→Glu	5'-AAACGAATCAA <b>ACGAAT</b> CCTCCGATTCCG -3'
Tcf-4 Ser-60→Glu	5'-TCAAACAGCTCC <b>GAAG</b> ATTCCGAGGCGGA -3'
Tcf-4 Ser-58,59,60→Ala	5'-GAATCAA <b>ACGCCGCCG</b> CGATTCCGAGGC -3'
β-catenina Tyr-86→Glu	5'- GCT GAT ATT GAC GGG CAG <b>GAA</b> GCA ATG ACT AGG -3'
β-catenina Tyr-86→Phe	5'- GCT GAT ATT GAC GGG CAG <b>TTT</b> GCA ATG ACT AGG -3'
β-catenina Tyr-142→Glu	5'- TTG ATT AAC <b>GAG</b> CAG GAT GAC -3'
β-catenina Tyr-142→Phe	5'- TTG ATT AAC <b>TTT</b> CAG GAT GAC -3'
β-catenina Tyr-654→Glu	5'- GGC GTG GCA ACA <b>GAA</b> GCA GCT GCT GCT GTC C -3'
β-catenina Tyr-654→Phe	5'- GGC GTG GCA ACA <b>TTT</b> GCA GCT GCT GCT GTC C -3'

Los oligonucleótidos son extendidos en un ciclo de PCR por la DNA polimerasa *Pfu* de forma que se genera un nuevo vector completo, de doble hebra, que contiene el gen de interés alterado en las bases adecuadas. Para eliminar de la mezcla el vector parental, se añade *Dpn I*, enzima de restricción que digiere DNA metilado y hemimetilado. El nuevo vector generado *in vitro*, al no presentar ningún tipo de metilación, no es digerido. La mezcla de reacción es entonces transformada en *E.coli* XL1-Blue. Varias de las colonias que crecen se analizan por secuenciación en busca de positivas con el vector modificado adecuadamente.

### 1.3.12 Secuenciación del DNA

Se utiliza el *dRhodamine terminator Cycle Sequencing Kit* (Perkin Elmer) en un secuenciador automático de DNA *ABI Prism 310* (Perkin Elmer), utilizando cebadores de plakoglobina o Tcf-4 próximos a la mutación a analizar (máximo 300 pb de distancia).

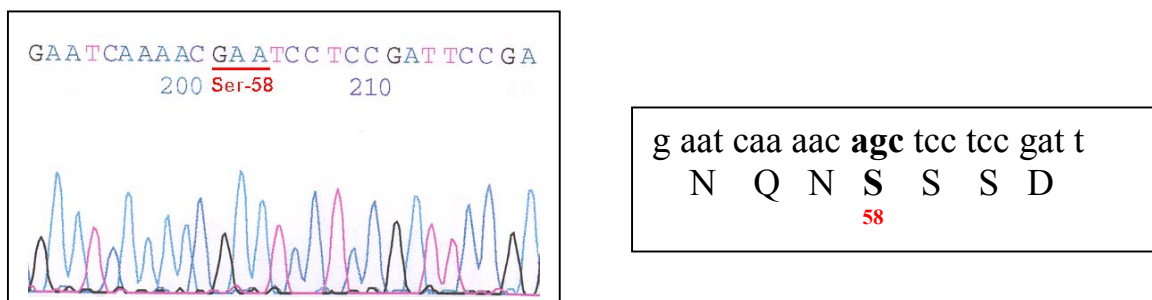


Fig.17 **Secuencia del Tcf-4 salvaje (WT) y del mutante S58E.** A la derecha se muestra parte de la secuencia del Tcf-4 WT (GenBank™, Accession Y11306). A la izquierda, detalle de la secuencia del mutante Ser58→Glu.

## 1.4 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

### 1.4.1 Purificación por cromatografía de afinidad

Una vez conseguida una colonia de *E.coli* XL1-Blue transformada con un pGEX que incluía el producto deseado, se creció hasta saturación en un pequeño volumen de LB-ampicilina. Se diluyó en 50% glicerol y se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Una pequeña alícuota se creció 16 h a  $37^{\circ}\text{C}/220$  rpm en LB-ampicilina (125 mg/L). A continuación

se diluyó 1:10 en LB-ampicilina recién preparado y se mantuvo en agitación a 37°C/220 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6-0,8 (lo que indica que el cultivo está en fase de crecimiento exponencial). Entonces se indujo la expresión de los productos codificados en el pGEX añadiendo al medio 0,1 mM de isopropil  $\beta$ -D-tiogalactosido (IPTG) manteniendo las condiciones de crecimiento durante 2 h más.

Se centrifugaron las células a 8000 xg/ 4°C durante 10 min y el pellet se resuspendió en PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3). A continuación, se lisaron las bacterias sometiendo la mezcla a sonicación durante 1x15 s en pequeñas alícuotas. Se añadió Triton X-100 (Sigma) a una concentración final del 1% para ayudar a solubilizar las proteínas de fusión. Se centrifugó a 10.000 rpm/ 4°C durante 10 min y se descartó el pellet, que contiene los fragmentos de membrana y otros restos celulares.

Para aislar la proteína de interés (que se encuentra como producto de fusión unida a la GST) se incubó el sobrenadante (que contiene una mezcla de proteínas bacterianas) con 1:100 (vol:vol) de glutathione-Sepharose-4B (Pharmacia). Esta sepharosa lleva unida glutation lo que permite la unión específica de la GST. De esta manera, en un solo paso de cromatografía, la proteína de fusión con GST es retenida, mientras el resto de proteínas son descartadas. Tras lavar la sepharosa con PBS, la resina se incubó con 10 mM glutation reducido (Sigma) en 50 mM Tris pH 8,0, con lo que se consiguió separar la proteína de fusión unida a GST de la glutathione-sepharosa-4B (ya que la GST tiene más afinidad por el glutation reducido de la fase móvil que por el glutation oxidado inmovilizado en la resina).

Estas condiciones estándar han sido aplicadas con éxito sobre todos los productos clonados, en cultivos de volúmenes entre 50 y 500 mL obteniendo un rendimiento de 0,5-2  $\mu$ g de proteína/ mL cultivo.

#### **1.4.2 Corte entre la GST y la proteína recombinante**

La utilización vectores de la serie pGEX-6P permite la posibilidad, una vez aislada la proteína de fusión unida a GST, de cortar específicamente entre la GST y el producto de interés gracias a ocho aminoácidos que son codificados en el extremo C-terminal de la GST y que son diana de corte para la proteasa PreScission (PS).

La proteína obtenida tal como se describe en el apartado anterior, se dializó frente al tampón de corte de la PS (50 mM Tris pH7,8, 120 mM NaCl, 1mM DTT y 1mM EDTA). Se añadió 1 unidad de PS por cada 100 µg de proteína de fusión y la mezcla se mantuvo a 4°C y en agitación durante 4-16 h. Tras la digestión y para eliminar la GST y la PS (que es a su vez una proteína de fusión con GST), la mezcla volvió a incubarse con glutation-Sepharosa. La GST que había sido cortada de nuestro producto y la GST-PS fueron retenidas, mientras que la proteína deseada se obtuvo de forma libre en la fracción eluída.

### 1.4.3 Cuantificación de proteínas

Se llevó a cabo con el kit Bio-Rad Protein Assay basado en el método desarrollado por Bradford (1976). Alternativamente, se valoró por electroforesis en poliacrilamida comparando la intensidad de las bandas con cantidades conocidas de albúmina de suero bovino (BSA).

## 2. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN EUCARIOTAS

### 2.1 LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS

Para la realización de este trabajo se han utilizado las siguientes líneas celulares:

RWP1: línea epitelial humana derivada de carcinoma pancreático con uniones adherentes bien definidas.

HT29-M6: línea celular epitelial humana, derivada de carcinoma colorectal. Presentan uniones estrechas bien definidas que forman un cinturón alrededor de las células que impermeabiliza la monocapa al paso de sustancias paracelularmente.

SW-480: línea epitelial humana establecida a partir de un adenocarcinoma primario de colon. Presenta contactos celulares poco definidos y deficiente expresión de E-cadherina. Hay poca  $\beta$ -catenina retenida en membrana y alta actividad transcripcional mediada por el complejo  $\beta$ -catenina-Tcf-4.

MDCK: línea epitelial de riñón procedente de perro. Presenta baja actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina.

IEC-18 control: línea enterocítica de rata, inmortalizada, no tumorigénica, de epitelio intestinal normal.

IEC-18 Kras: IEC-18 tranfectadas establemente con el mutante Val-12 del gen humano del oncogén K-ras. Presentan pérdida de contactos celulares. Cedita por H.G<sup>a</sup>. Palmer (I. Investigaciones Biomédicas, CSIC).

### **2.1.1 Cultivo celular**

Las líneas celulares se mantuvieron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Life Technologies, Inc.) suplementado con un 10% de suero bovino fetal - FCS- (Biological Industries), al que se añade además piruvato sódico, glutamina y penicilina/streptavidina (Life Technologies, Inc.) creciendo a 37°C en una atmósfera con 1/20 parte de CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzaron la confluencia fueron tratadas con Tripsina (Life Technologies) y sembradas.

### **2.1.2 Contaje de células**

Para determinar el número de células presente en una solución, se recurrió a la ayuda de un microscopio óptico y una cámara de Neubauer, de volumen acotado. Así, se pudieron visualizar y contar las células presentes en un determinado volumen de solución. La adición de Trypan Blue (Sigma) a la mezcla aplicada a la Neubauer, permitió a su vez controlar la supervivencia e integridad celular, descartando siempre cultivos con más de un 5% de tinciones positivas.



### 2.1.3 Congelación y almacenaje

Para conservar durante largo tiempo las líneas celulares, entre 4 y 8 millones de células se resuspendieron en 900  $\mu$ L de DMEM/10% FCS y fueron pasadas a un criotubo con 100 $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) a 0°C. Suavemente se homogenizó la mezcla a temperatura ambiente. El criotubo se congeló en etapas sucesivas pasando varias horas a -20°C, -40°C, -80°C y finalmente al tanque de nitrógeno líquido.

La descongelación de células desde los tanques de nitrógeno se llevó a cabo de forma inmediata sometiendo los criotubos a un baño de 37°C hasta la casi completa licuación de su contenido, que rápidamente se diluyó 10-20 veces en DMEM/10% FCS y se procesó con normalidad.

## 2.2 VECTOR PARA EXPRESIÓN EUCARIÓTICA

El vector utilizado para producir las distintas proteínas (nativas o mutantes puntuales) en células eucariotas fueron los pcDNA3.1/His (Invitrogen). A parte de ser adecuados como vehículos de alto nivel de expresión en eucariotas, estos vectores generan la proteína de interés con una cola de histidinas y el epítipo Xpress™ en su extremo N-terminal. La cola de histidinas es útil para purificar luego la proteína (utilizando columnas de níquel, ión con afinidad por la histidina) y el epítipo Xpress™ es reconocido por un anticuerpo comercial.

De esta manera, se generaron en pcDNA3.1/His:  $\beta$ -catenina WT, plakoglobina WT, plakoglobinaTyr133→Glu, plakoglobinaTyr133→Phe, plakoglobinaTyr549→Glu, plakoglobinaTyr549→Phe, plakoglobinaTyr643→Glu, plakoglobinaTyr643→Phe, Tcf-4Ser60→Glu, Tcf-4Ser58,59,60→Ala; todos ellos subclonados de su construcción correspondiente en pGEX-6P.

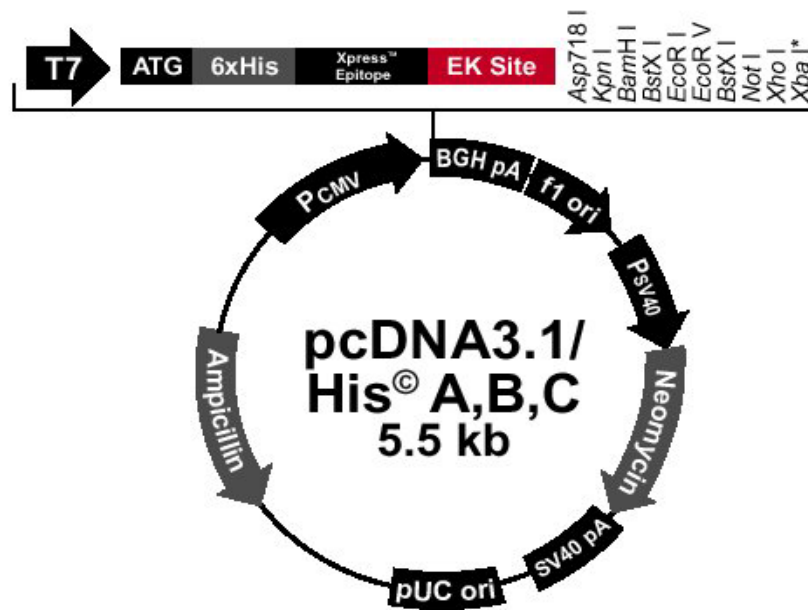


Fig.18 Mapa de las características generales de los pcDNA3.1/His (Invitrogen).

### 2.3 TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

Se solubilizaron, contaron y sembraron entre  $2-5 \cdot 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de distinto tamaño, según el experimento. Las células se incubaron entre 16-24 horas (como en 2.1.1) hasta alcanzar entre un 50-75% de confluencia.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se mezclaron unos 0,2 µg de DNA/cm<sup>2</sup> (del plásmido adecuado), 2-5 µL de LipofectAMINE™ y Plus™ por µg de DNA en Opti-MEM® (todos de Life Technologies). La mezcla de transfección se añadió a las células y se incubaron durante 4-5 horas.

Una vez transfectadas, las células se reincubaron con DMEM/ 10% FCS durante unas 40-48 horas para permitir la expresión de los productos de interés. Transcurrido este tiempo, las células fueron lisadas para la obtención de extractos celulares o para realizar ensayos de actividad transcripcional.

### 2.4 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

Las células se solubilizaron en PBS (mediante *scrapping* o rascado). Tras varios lavados y resuspensiones en PBS para eliminar restos de suero y medio, las células se resuspendieron en tampón de Lisis (10 mM Tris·HCl, pH 7,6, 200 mM NaCl, 0,1%

Nonidet P-40, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) suplementado con 10 mM NaF, 10 µg/mL aprotinina, 10 µg/mL leupeptina, 1 mM PMSF y 0,2 mM Na<sub>3</sub>VaO<sub>4</sub>.

Así homogeneizadas, se mantuvieron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron a 12000 rpm, 15 minutos y 4°C. Tras la centrifugación, se descarta el precipitado celular y el sobrenadante se cuantifica por Bradford (Bio-Rad) y se almacena a -20°C para su uso posterior.

En algunas ocasiones y para favorecer la solubilización de proteínas de membrana se utilizó como tampón de lisis: 25 mM Tris·HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% digitonina, 10 mM NaF, 10 µg/mL aprotinina, 10 µg/mL leupeptina y 1 mM PMSF. Tras resuspender las células se mantuvieron en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 16000 rpm, 18 minutos a 4°C.

La preparación de extractos en condiciones desnaturalizantes para llevar a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación con anti-Tcf-4 se realizó en las siguientes condiciones: 10 mM Tris·HCl, pH 7,6, 200 mM NaCl, 1% Triton TX-100, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, 20 mM β-glicerolfosfato, 10 µg/mL aprotinina, 10 µg/mL leupeptina, 1 mM PMSF y 0,2 mM Na<sub>3</sub>VaO<sub>4</sub>.

## 2.5 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS EXPRESADOS EN EUKARIOTAS

Las células transfectadas con pcDNA, expresan los productos de interés con una cola de histidinas. Se aprovechó la afinidad de las histidinas por el ión níquel para purificar cromatográficamente tales productos. 250-500 µg de extractos celulares se incubaron en un volumen final de 250 µL con 60 µL de una suspensión al 50% (p/V) de níquel-NTA-agarosa® (Qiagen) durante 30-60 minutos a 4°C. Tras centrifugación, lo retenido en la resina se lava 3-4 veces con 500 µL de tampón de Lisis (ver 2.4) suplementado con 20 mM Imidazol y 10-50 mM NaCl, para eliminar uniones inespecíficas en la níquel-agarosa. Según el caso, las proteínas unidas a la resina fueron eluidas con Tampón de Lisis /200 mM Imidazole para su posterior uso o bien directamente solubilizadas en tampón de carga de electroforesis y sometidas a PAGE (ver 3.1).

### 3. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

#### 3.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Para determinar el grado de pureza de las proteínas recombinantes, tanto en forma de proteínas de fusión como en forma libre, se utilizó la electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida, siguiendo el método de Laemmli.

Se utilizaron geles de 1,5 mm de grosor con porcentajes de acrilamida (en el gel separador) entre el 8 y el 16,5% según el peso molecular de los fragmentos proteicos a resolver. Se mantuvo una relación acrilamida:bis-acrilamida de 37,5:1 en todos los casos. A las muestras se les añadió tampón de carga 5x (con 20% glicerol, 10% SDS, 0,32% de 2-mercaptoetanol en Tris 0.5 M pH 6,8) y se hirvieron 4 minutos. Se corrió a voltaje constante y las muestras se visualizaron sumergiendo el gel unos 15 minutos en una solución 0,1% de Coomasie Brilliant Blue, 40% metanol y 10% acético y destiñendo con 40% metanol y 10% acético. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron el Broad Range, Low Range o Kaleidoscope (todos ellos de Bio-Rad).

#### 3.2 ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS. WESTERN BLOT

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a un filtro de nitrocelulosa (0.45  $\mu\text{m}$  Protran, Schleicher & Schuell) en una cámara de transferencia (BioRad) a 400 mA durante 90 minutos. Los filtros se bloquearon con 1% BSA en TBS (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 136 mM NaCl, 4 mM KCl) suplementado con 0,2% Triton X-100 (TTBS) durante 1 hora a temperatura ambiente o durante 16 h a 4°C. A continuación, se incubaron con la dilución recomendada por el fabricante del anticuerpo primario adecuado durante 1-4 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas tres veces, 10 minutos cada vez, con tampón TTBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron con anticuerpo secundario -anti IgG- conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) durante 1-1,5 h a temperatura ambiente. Se reveló con luminol utilizando el kit SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate de Pierce y películas fotográficas Kodak X-Omat (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla IV. Lista detallada de los anticuerpos utilizados.

Organismo	Anticuerpo 1ario	Epítipo	Casa Comercial
ratón	$\alpha$ -Catenina, <i>clon 5</i>	729-906(final)	BD Transduction Labs
ratón	$\beta$ -Catenina, <i>clon 14</i>	571-781(final)	BD Transduction Labs
ratón	$\gamma$ -catenina, <i>clon15</i>	553-738	BD Transduction Labs
ratón	E-Cadherina, <i>clon 36</i>	735-883(final)	BD Transduction Labs
cabra	GST, <i>27-4577</i>	no caracterizado	Amersham Pharmacia
ratón	Fosfotirosina, <i>PY20/PY54</i>	Tyr-P	BD Transduction Labs
ratón	p120 <sup>ctn</sup> , <i>clon 98</i>	790-911(final)	BD Transduction Labs
ratón	TBP, <i>clon 17</i>	no caracterizado	BD Transduction Labs
conejo	CKII $\alpha$	70-89	Stressgene
cabra	TCF-4, <i>clon C-19</i>	C-terminal	Santa Cruz biotech.
cabra	TCF-4, <i>clon N-20</i>	N-terminal	Santa Cruz biotech.
ratón	Desmoplakina, <i>DP1&amp;2-2.15</i>	no caracterizado	Progen Biotechnik
ratón	Desmogleina, <i>clon 62</i>	705-1029	BD Transduction Labs
ratón	Desmocolina, <i>clon 7G6</i>	dominio extracelular democolina-2	Zymed
ratón	X-press	X-press	Invitrogen
Organismo	Anticuerpo 2ario	Casa Comercial	
cabra	Immunopure <sup>®</sup> Goat Anti-Mouse IgG-HRP	Pierce	
conejo	Peroxidase-conjugated Rabbit Anti-Goat IgGs	Dako	
cabra	Peroxidase-conjugated Goat Anti-Rabbit IgGs	Dako	

Una vez revelada, la membrana de nitrocelulosa se estripó sumergiéndola en *Stripping buffer* (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7, 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 2% SDS) a 55°C durante 45 minutos. Se comprobó cada vez la ausencia de señal tras los *strippings* incubando la nitrocelulosa con el anticuerpo secundario correspondiente y revelando nuevamente con luminol.

#### 4. ENSAYOS PROTEÍNA QUINASA

##### 4.1 TIROSINA QUINASAS

Los ensayos de fosforilación se llevaron a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L en las siguientes condiciones: 25 mM Tris-HCl pH 6,8, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 0,25 mM ortovanadato sódico (Na<sub>3</sub>VaO<sub>4</sub>), 1 mM DTT, 0,1 mM ATP o  $\gamma$ -

$^{32}\text{P}$ -ATP (1.000 cpm/pmol) según el ensayo. La quinasa empleada y los tiempos y temperaturas de reacción varió según el caso (ver tabla).

Las muestras se analizaron por electroforesis SDS-PAGE. En los ensayos no radioactivos, a la PAGE le siguió el Western Blot revelado con anti Phosphotyrosine (Transduction). En el caso de los ensayos radioactivos, los geles se tiñeron con Coomassie en 40% metanol y 10% ácido acético, se secaron y se expusieron a una película sensible a rayos X a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 12 h. La cuantificación de la fosforilación del Tcf-4 se determinó cortando la banda radioactiva del gel y analizándola en un contador de centelleo líquido.

Tabla V. Quinasas utilizadas, tiempos y temperaturas de reacción.

quinasa	obtención	condiciones de reacción
pp60 <sup>c-src</sup>	recombinante, adquirida de Upstate biotechnology	1-4h a 22°C
Fer	clonada en pcDNA3-His, expresada en células como proteína con poli-histidina en su N-terminal y purificada con níquel-agarosa	1h a 30°C
Fyn	purificada de extractos celulares (nativos o que sobreexpresan la quinasa) mediante inmunoprecipitación	1h a 30°C
erbB2	clonada en pcDNA3, y sobreexpresada en células	30 min a 30°C
EGF-R dominio citosólico	recombinante, adquirida de Sigma	30 min a 30°C
Yes	purificada de extractos celulares (nativos o que sobreexpresan la quinasa) mediante inmunoprecipitación	1h a 30°C

## 4.2 SERINA/TREONINA QUINASAS

La fosforilación del factor de transcripción hTcf-4 y  $\beta$ -catenina por la caseína quinasa CKII se llevó a cabo en 0,5 mM EGTA, 9 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,55 mM EDTA, 1 mM DTT, 27.8 mM  $\beta$ -glicerolfosfato pH 7,0 y 0,1 mM de ATP o  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP (1000 cpm/pmol) según el ensayo, en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . Se incubaron 100 ng de cada uno de los distintos fragmentos de hTcf-4-GST y de GST sola con 5  $\mu\text{L}$  de CKII (actividad 10 U/mL) (purificada de hígado de rata y cedida por el Dr. Emili Itarte, Universidad Autónoma de Barcelona) a 30°C durante 1 h.

Tras la fosforilación las muestras se analizaron por electroforesis de SDS-poliacrilamida. Los geles se tiñeron con Coomassie, 40% metanol y 10% ácido acético, se secaron y se expusieron a una película sensible a rayos X durante 12 h a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La cantidad de fosfato incorporado por pmol de hTcf-4 se determinó cortando

la banda radioactiva del gel y cuantificando la radioactividad con el contador de centelleo líquido.

## 5. ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA

A lo largo de todo el trabajo, se han realizado ensayos de interacción proteína-proteína. Pueden clasificarse en cinco grupos principales que llamaremos: interacción directa (unión de proteínas recombinantes con purificación por cromatografía de afinidad), overlays (unión de proteínas recombinantes en nitrocelulosa), pull-down (incubación de una proteína con extractos celulares totales), ensayos con niquel-agarosa (expresión de un gen en células y purificación proteica posterior), y co-inmunoprecipitación (purificación selectiva de una proteína endógena de un extracto celular).

### 5.1 INTERACCIÓN DIRECTA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PURIFICADAS

Aprovechando la capacidad de generar proteínas en *E.coli* fusionadas o no a GST y la afinidad de la Glutathione-sepharose<sup>®</sup> para unir específicamente los productos con GST, se mezclaron las diversas formas proteicas como se describe en el siguiente ejemplo: los distintos ensayos de unión de la plakoglobina con el dominio citosólico de la E-cadherina se llevaron a cabo incubando concentraciones crecientes de plakoglobina con una cantidad fija de E-cadherina unida a GST (GST-cytoEcadherina) en un volumen final de 200  $\mu$ L en 50 mM Tris pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 3 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,1% (p/V) Triton X-100 (tampón de *Binding*) durante 40 min a 25°C.

Los complejos de GST-cytoEcadherina/plakoglobina formados se aislaron añadiendo 20  $\mu$ L de Glutathione-sepharose 4B<sup>®</sup> (retiene específicamente a la GST) e incubando 20 min a 25 °C. Seguidamente, se lavó la resina tres veces con 500  $\mu$ l de tampón de *Binding* para eliminar la plakoglobina libre, no unida a la cytoE-cadherina. Los complejos GST-cytoEcadherina/plakoglobina retenidos por la resina se solubilizaron añadiendo tampón de carga de electroforesis (5x) e hirviendo las muestras 4 min.

Los complejos solubilizados se analizaron por electroforesis de poliacrilamida, SDS-PAGE, siempre por duplicado. Posteriormente el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para ser analizada por western blot con anticuerpo monoclonal (Transduction Labs) contra la plakoglobina. En todos los casos se llevaron a cabo experimentos control en los que se incubó la plakoglobina con GST sola.

En los ensayos en que se determinó la afinidad de proteínas fosforiladas se incluyeron en el mismo blot incubaciones con las proteínas no fosforiladas, como control. Estas proteínas no fosforiladas se mantuvieron en las mismas condiciones que las fosforiladas: el mismo tiempo, a la misma temperatura y en una mezcla de reacción (ver punto 4 para más detalle) carente únicamente de ATP.

Para cuantificar la cantidad de proteína, las películas fotográficas se analizaron en un densitómetro G-700 de BioRad. Los resultados obtenidos se compararon con cantidades conocidas de cada proteína presentes en el mismo western blot.

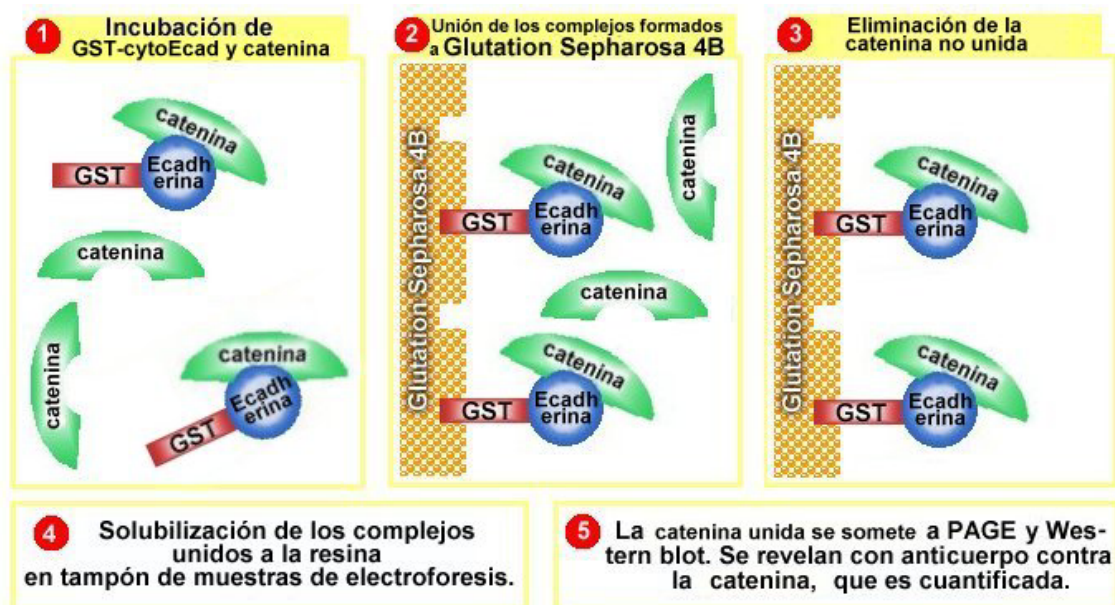


Fig.19 Representación esquemática de los ensayos de interacción *in vitro* llevados a cabo.

## 5.2 ENSAYOS DE OVERLAY

En este caso, las proteínas recombinantes fueron separadas por SDS-PAGE y posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Tras bloquear las membranas con 1% de BSA en TTBS, se incubaron con 5-10  $\mu\text{g/mL}$  de proteína



recombinante en TTBS con 0,1% de BSA durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 min con TTBS, para eliminar los restos de proteína no unida, las membranas fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo monoclonal específico, seguido del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa.

### 5.3 ENSAYO DE *PULL-DOWN*

Una aproximación más fisiológica al estudio de las interacciones que una proteína establece con el resto de proteínas celulares son estos ensayos que denominamos de *pull-down*, donde una proteína recombinante que dispone de una modificación o *tag* fusionada, es incubada con extractos celulares para posteriormente ser purificada y analizar las proteínas que se hayan copurificado con ella o el grado de fosforilación que haya podido sufrir. Este tipo de ensayo se ha usado, sobretodo para comparar el comportamiento de proteínas nativas y mutantes puntuales frente a distintos entornos celulares.

En general, entre 6 y 12 picomoles de GST o proteína-GST(nativa o mutantes puntuales) se incubaron con 50-100  $\mu$ g de extractos celulares totales de IEC18 K-ras, SW480 o RWP1 en las mismas condiciones citadas en el apartado anterior (5.1). Los complejos proteicos formados fueron purificados con Glutathione-sepharose 4B<sup>®</sup>, lavados y procesados (ver 5.1).

### 5.4 ENSAYO DE PURIFICACIÓN CON NIQUEL-AGAROSA

Otro tipo de experimento desarrollado consistió en la transfección de diversos productos, clonados en pcDNA, en células y la subsiguiente expresión como proteínas de fusión con poli-histidinas. Aprovechando la capacidad de la niquel-NTA-agarosa<sup>®</sup> de unir polihistidinas (ver apartado 2.5), los complejos formados fueron retenidos. La realización de lavados en condiciones poco restringentes (20 mM imidazol y 50 mM NaCl), permitió aislar los complejos formados por las proteínas fusionadas a histidinas con el resto de proteínas celulares.

### 5.5 CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

Se purificaron las proteínas endógenas a partir de extractos celulares y se analizó su asociación a diversas proteínas celulares de interés. Para ello, se incubaron de 200 a 400  $\mu\text{g}$  de extractos totales (preparados como se describe en 2.4) con 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del anticuerpo correspondiente durante 16 horas a 4°C. Se centrifugó brevemente para eliminar el material insoluble a 12.000 rpm. El sobrenadante se incubó durante 90 minutos a 4°C con 60  $\mu\text{L}$  (de una solución al 50% p/V) de proteína A-agarosa (Sigma).

El material inmunoprecipitado se lavó dos veces con 500  $\mu\text{L}$  de tampón de Lisis (ver 2.4). Los complejos proteicos se eluyeron directamente con tampón de carga de electroforesis (ver 3.1) y fueron analizados por Western blot o bien fueron utilizados para ensayos quinasa (ver 4.1).

## **5.6 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD. REPRESENTACIÓN DE SCATCHARD**

Con el fin de caracterizar la interacción de  $\beta$ -catenina con Tcf-4, los datos se analizaron mediante representaciones de Scatchard. Este tipo de análisis permitió determinar la constante de asociación,  $K_a$ , del equilibrio, representando el cociente de las concentraciones de ligando unido/ligando libre *versus* la concentración de ligando unido (todo para una cantidad fija de GST-cytoEcadherina). La pendiente de la gráfica corresponde a la constante de asociación.

En nuestro caso la concentración de  $\beta$ -catenina unida al Tcf-4-GST se determinó a partir del densitometrado de las películas, por comparación con cantidades conocidas de  $\beta$ -catenina que se incluyen en el mismo gel. La concentración de  $\beta$ -catenina libre se determinó sustrayendo, a la concentración total de  $\beta$ -catenina puesta en el ensayo, la cantidad de  $\beta$ -catenina unida.

## **6. ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-DNA**

Para llevar a cabo los ensayos de interacción de Tcf-4 con el DNA se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes a la zona del promotor de *myc* que presenta mayor afinidad por Tcf-4 (He et al. 1998). Estos dos oligonucleótidos (sense y

antisense), que corresponden a la zona de unión del Tcf-4 TBE2 (5'-CTCTTGATCAAAGCGCGG-3'), se sintetizaron marcados en su extremo 5' con biotina para facilitar su purificación.

Los ensayos de unión del Tcf-4 con el DNA se llevaron a cabo incubando 200 ng del oligonucleótido marcado con 200  $\mu$ g de extracto total de células MDCK (transfectadas con la forma nativa o mutada del Tcf-4). Las células fueron transfectadas tal como se detalla en 2.3 y los extractos celulares se prepararon como se cita en 2.4. Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 200  $\mu$ L en 20 mM HEPES pH 7,6, 150 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glicerol y 0,3 mg/mL BSA durante 45 min a 4°C. Los complejos Tcf-4-DNA fueron aislados incubando con 40  $\mu$ L de estreptavidina-agarosa (Sigma) durante 30 min a 4°C. A continuación, se lavó la resina tres veces con 500  $\mu$ L del tampón de incubación para eliminar las proteínas del extracto no unidas y se eluyeron los complejos DNA-proteína formados añadiendo tampón de carga de electroforesis. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos monoclonales específicos contra  $\beta$ -catenina, plakoglobina o Tcf-4.

## 7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL

Para analizar la actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina, células MDCK fueron cotransfectadas con 20 ng de TOP-FLASH, 20 ng de pTK-*Renilla luciferase* y, según el caso, 150 ng de pcDNA-Tcf-4 (nativo o mutante), 150 ng de pcDNA- $\beta$ -catenina, 150 ng de pcDNA-plakoglobina (nativa o mutante) o 150 ng de pcDNA vacío.

Los plásmidos TOP-FLASH contienen tres copias de la secuencia de unión del Tcf-4 al DNA, un promotor mínimo de Fos y, a continuación (hacia el 3') está el gen de la luciferasa de *Firefly*.

Los plásmidos pTK-*Renilla* contienen el gen de la luciferasa de *Renilla* bajo el control de un promotor constitutivamente activo de timidina kinasa.

48 horas después de la cotransfección, las células se lisaron y se expusieron a distintos sustratos que son procesados por cada una de las luciferasas, siguiendo las instrucciones del fabricante (Dual Luciferase Reporter Assay System, Promega). La actividad de las luciferasas se siguió con un luminómetro FB-12 (Berthold

Detection Systems). La actividad relativa de la luciferasa de *Firefly* fue normalizada respecto a la de la luciferasa de *Renilla* en cada caso para evitar disparidad de resultados debidos a la distinta eficiencia de transfección entre muestras. Cada transfección se repitió por triplicado y se calculó la media y la desviación estándar.

## 8. ENSAYOS DE MARCAJE CELULAR CON ÁCIDO ORTOFOSFÓRICO-<sup>32</sup>P

Se solubilizaron, contaron y sembraron  $2 \cdot 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 60mm. Las células se incubaron 16 horas (como en 2.1.1) hasta alcanzar entre un 50-75% de confluencia. A continuación, se crecieron durante 12 h en DMEM libre de fosfatos (suplementado con un 10% de suero bovino fetal, piruvato sódico, glutamina y penicilina/streptavidina) con ácido ortofosfórico marcado radioactivamente (<sup>32</sup>P) a una concentración de 0,25 mCi/mL. El marcaje se realizó en presencia o ausencia de 40 μM de apigenina, un inhibidor de CKII. Transcurrido este tiempo, las células fueron lisadas para la obtención de extractos celulares en condiciones desnaturalizantes (como se describe en 2.4) y se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación con anti-Tcf-4.