

IV. RESULTADOS

1. INTERACCIÓN Tcf-4- β -CATENINA Y Tcf-4-PLAKOGLOBINA. REGULACIÓN POR LA FOSFORILACIÓN DEL Tcf-4

1.1 LA SERINA/TREONINA QUINASA CKII FOSFORILA AL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Tcf-4 EN SU EXTREMO AMINO TERMINAL

La proteína quinasa CKII es un enzima constitutivamente activo que se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma de células eucariotas. Fosforila serinas o treoninas inmersas en secuencias acídicas y actúa sobre un gran número de proteínas sustrato, muchas de las cuales juegan papeles importantes en la replicación y transcripción de genes y en proliferación celular (revisado en Litchfield, 2003).

Existían evidencias de que el mecanismo de fosforilación en tirosinas de las cateninas estaba involucrado en la regulación de las uniones adherentes (Daniel y Reynolds, 1997) pero poco se conocía sobre el papel de la fosforilación en serinas/treoninas de β -catenina en la modulación de la función de los complejos de adhesión. Únicamente se había descrito que la fosforilación de β -catenina por GSK-3 β determinaba su estabilidad y su capacidad transductora de las señales Wnt (Aberte et al. 1997; Orford et al. 1997).

La participación de CKII en la cascada de proteínas de la vía Wnt, interaccionando y fosforilando dishevelled (Willert et al. 1997), y la presencia en la secuencia aminoacídica de β -catenina de múltiples posibles centros de fosforilación por la CKII nos llevó al estudio de la modificación de la β -catenina por esta proteína quinasa.

Los ensayos de fosforilación con γ -³²P-ATP se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado *Materiales y Métodos*. 1 μ g de GST- β -catenina o GST recombinantes se incubaron con 50 miliunidades de la proteína quinasa CKII y 0,1 mM de ATP [γ -³²P] (a unas 1000 cpm/pmol) durante 2 horas a 30°C. Las muestras se procesaron por electroforesis, se fijaron, secaron y se pusieron en contacto con películas de rayos-X. No se encontró fosforilación de β -catenina ni de GST por la caseína quinasa CKII (figura 20, panel B, carriles 2 y 3). La tinción del gel con *Coomassie Blue* nos confirmó que las mismas cantidades de las dos proteínas estaban siendo utilizadas en los ensayos (figura 20, panel A, carriles 2 y 3).

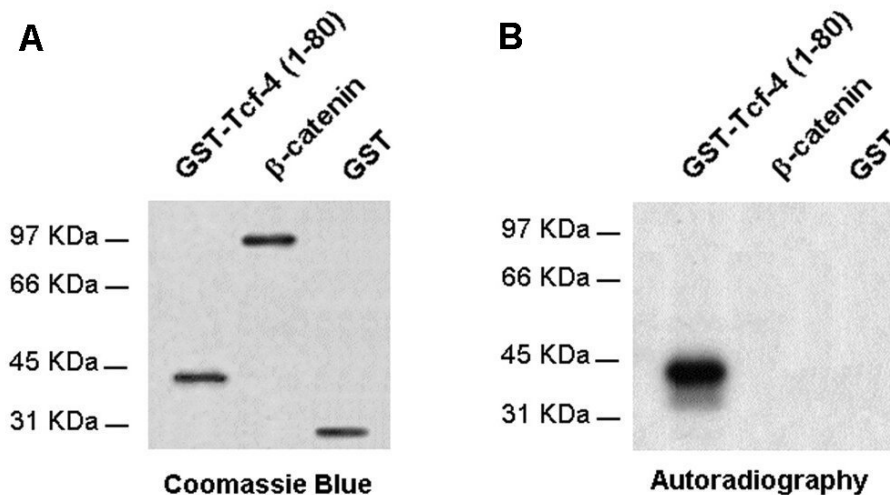


Fig.20 **Fosforilación de β -catenina y GST-Tcf-4(1-80) por CKII.** 1 μ g de GST- β -catenina, GST-Tcf-4(1-80) o GST sola (como control) fueron fosforilados en presencia de [γ - 32 P]-ATP por 50 miliunidades de CKII. (A) Tinción del gel con *Coomassie Blue* y (B) autorradiografía expuesta 12h a -80°C .

Había sido descrita la fosforilación de diversos factores de transcripción por la CKII, entre ellos c-myc, c-myb, c-jun y el factor de respuesta al suero (Manak y Prywes, 1993; Bousset et al. 1994; Lin et al. 1992). En algunos casos, la fosforilación afectaba a la localización del factor de transcripción, de forma que, cuando era fosforilado, se translocaba al núcleo; en otros casos, la fosforilación afectaba a la interacción con el DNA, disminuyendo o aumentando según el caso.

Estudiando la secuencia aminocídica del factor Tcf-4, otro miembro de la ruta Wnt, observamos que presentaba posibles centros de fosforilación para la caseína quinasa CKII en su extremo amino terminal. Decidimos estudiar esta fosforilación *in vitro* mediante proteínas recombinantes.

De igual forma que habíamos realizado la fosforilación de β -catenina, se llevo a cabo la fosforilación de 1 μ g de GST-Tcf-4(1-80) con 50 miliunidades de la proteína quinasa CKII. Se encontró que CKII fosforilaba muy eficientemente al extremo amino terminal del Tcf-4(1-80) (figura 20, panel B, carril 1).

Estudio de la estequiometría de fosforilación del Tcf-4 por CKII. Se analizó la incorporación de fosfato al Tcf-4 por CKII a lo largo del tiempo. Para ello, se tomaron diversas alícuotas de las reacciones a diferentes tiempos, se sometieron a electroforesis y la cantidad de fosfato incorporado en cada muestra se detectó sometiendo cada banda recortada del gel al contador de centelleo. Los datos se

representan en la figura 21. Se observó que 50 miliunidades de CKII eran capaces de incorporar 1,4 pmoles de P/pmol de Tcf-4(1-80). Esta estequiometría indicaba que más de un residuo estaba siendo modificado.

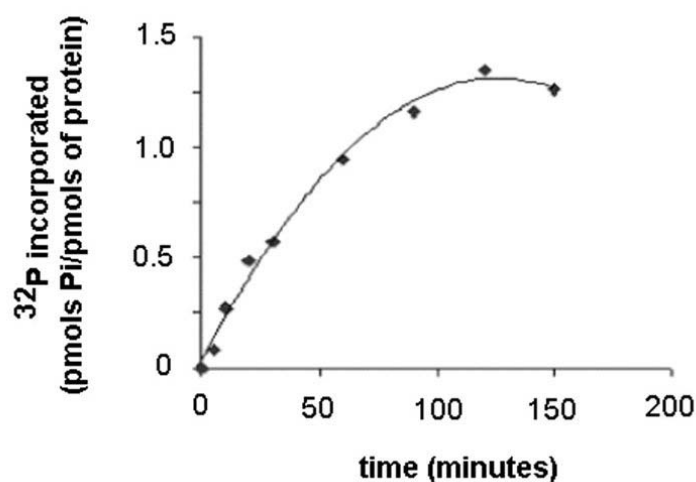


Fig.21 **Estequiometría de la fosforilación del GST-Tcf-4(1-80) por CKII.** La estequiometría de la fosforilación fue determinada con un contador de centelleo líquido estudiando la incorporación de ³²P a lo largo del tiempo.

Identificación de los residuos serina modificados por la CKII. La secuencia consenso mínima de fosforilación por la CKII es: S/T-X-X-D/E/Sfosforilada/Yfosforilada; es decir, se requiere la presencia de residuos cargados negativamente en posición +3. Estudiando la secuencia aminoacídica del factor de transcripción Tcf-4 vimos que presentaba varios posibles centros de fosforilación en su extremo amino terminal:

```

1  MPQLNGGGGDDLGANDELISFKDEGEQEEKSSSENSAERDLADVKSSLVN 50
51 ESETNQNSSDSEAERRPPRSEFRDKS 80

```

Los residuos marcados son posibles centros de fosforilación de la CKII que se encuentran en una secuencia consenso.

Para la identificación de las serinas concretas que estaban siendo fosforiladas por CKII, se construyeron fragmentos delecionados del extremo amino terminal del Tcf-4. Mediante digestión con endonucleasas de restricción sobre el cDNA del Tcf-4(1-80) se obtuvieron los fragmentos que comprendían los aminoácidos 1-30 y 1-49.

El estudio de la fosforilación de estos fragmentos por CKII nos indicó que los centros de fosforilación por CKII en el Tcf-4 estaban comprendidos entre los residuos 50-80, ya que ninguna de las dos formas delecionadas era fosforilada por esta quinasa (figura 22).

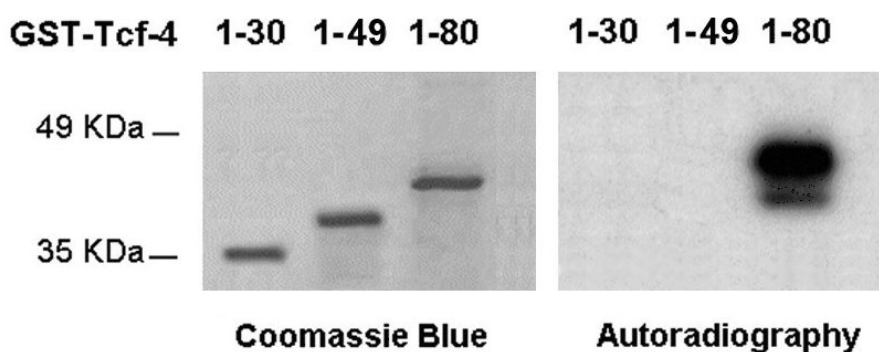


Fig.22 **Fosforilación de los diferentes fragmentos de Tcf-4 con CKII.** 1 μ g de GST-Tcf-4(1-30), GST-Tcf-4(1-49) o GST-Tcf-4(1-80) fueron fosforilados en presencia de [γ - 32 P]-ATP por 50 miliunidades de CKII. Tinción del gel con *Coomassie Blue* (izquierda) y autorradiografía expuesta 12h a -80°C (derecha).

Analizando la secuencia primaria de la región comprendida entre los aminoácidos 50-80 de Tcf-4 se eligieron las serinas 58,59,60 como las mejores candidatas a ser modificadas por CKII. Entre ellas, la Ser-58 (con dos residuos Ser en las posiciones +1 y +2 y un Asp en la posición +3) y la Ser-60 (con Asp y Ser en las posiciones +1 y +2 y un Glu en la posición +3) eran los residuos más idóneos.

Se generaron mutantes puntuales de Tcf-4(1-80) con el residuo 58 ó 60 sustituidos por glutámico (mutación que aporta una carga negativa y simula los efectos de la fosforilación en el residuo sustituido) o con los tres residuos 58,59,60 sustituidos por alanina (mutación que impide la fosforilación).

En la figura 23 se muestra la fosforilación *in vitro* de GST-Tcf-4(1-80) y de los distintos mutantes puntuales.

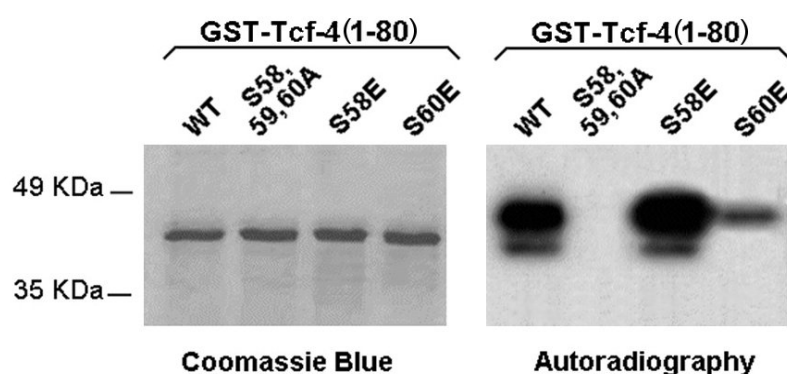


Fig.23 **Fosforilación de GST-Tcf-4(1-80) wild-type y de los mutantes S58,59,60A, S58E y S60E por CKII.** 1 μ g de proteína fueron fosforilados en presencia de [γ - 32 P]-ATP por 50 miliunidades de CKII. Tinción del gel con *Coomassie Blue* (izquierda) y autorradiografía expuesta 12h a -80°C (derecha). **WT**, wild-type; **S58,59,60A**, Ser-58,59,60 \rightarrow Ala; **S58E**, Ser-58 \rightarrow Glu; **S60E**, Ser-60 \rightarrow Glu.

El mutante Ser-58 \rightarrow Glu se fosforiló más eficientemente que la forma *wild-type* del Tcf-4(1-80), probablemente debido al nuevo sitio de fosforilación creado en la treonina 54 al introducir una carga negativa en el residuo 58. La forma mutada Ser-60 \rightarrow Glu se fosforiló en mucho menor grado que el Tcf-4 *wild-type* y el triple mutante Ser-58,59,60 \rightarrow Ala no se fosforiló. Estos resultados indicaban que estas tres serinas eran los únicos residuos fosforilados por CKII en el extremo amino terminal del Tcf-4 y que la serina 60 era el residuo fosforilado más eficientemente por la quinasa.

Interacción de la β -catenina y el Tcf-4(1-80) con la CKII. Puesto que se había descrito que β -catenina y CKII co-precipitaban con dishevelled, un componente de la ruta de señalización Wnt (Song et al. 2000), y habíamos visto que el GST-Tcf-4(1-80) se fosforilaba por esta quinasa, quisimos comprobar si el Tcf-4(1-80) y la β -catenina interaccionaban directamente con CKII. Para ello realizamos ensayos de interacción con el GST-Tcf-4(1-80) o la GST- β -catenina recombinantes y CKII purificada de hígado de rata (figura 24). Como puede apreciarse en la figura, β -catenina y el Tcf-4(1-80) interaccionaban con CKII directamente y con una afinidad similar.

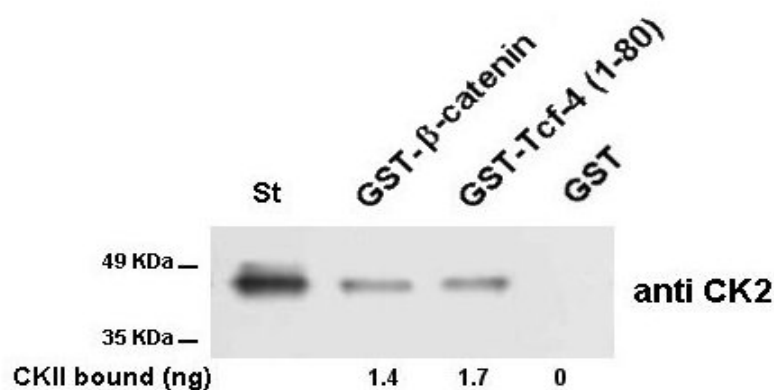


Fig.24 **β -catenina y Tcf-4(1-80) interaccionan con CKII.** 0,85 pmoles de CKII se incubaron con 1,2 pmoles de GST-Tcf-4(1-80) o GST- β -catenina. Los complejos proteicos formados fueron purificados por glutation-Sepharosa y se analizaron en SDS-PAGE y Western blot. La cantidad de caseína quinasa II unida se analizó con un anticuerpo específico contra la CKII. Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a la CKII unida proporcionada por el análisis densitométrico de las películas fotográficas en comparación con una cantidad conocida de CKII (**St**).

Por lo tanto, aunque CKII no era capaz de fosforilar directamente a β -catenina si encontrábamos una asociación *in vitro* entre las dos proteínas.

Fosforilación del Tcf-4 *in vivo*. Tras estudiar la fosforilación *in vitro* del GST-Tcf-4(1-80) por la CKII nos interesamos por saber si el Tcf-4 se encontraba fosforilado *in vivo* y si era así, si la CKII podía ser la responsable de esta fosforilación.

Para ello, células SW480 y HT29-M6 fueron transfectadas con Tcf-4 en pcDNA3 y, tras 36 h de transfección, se crecieron durante 12 h en medio libre de fosfatos suplementado con ácido ortofosfórico marcado radioactivamente (^{32}P) a una concentración de 0,25 mCi/mL. El marcaje se realizó en presencia o ausencia de apigenina 40 μM , un inhibidor de CKII. Se prepararon extractos celulares y el Tcf-4 se purificó por inmunoprecipitación. Las muestras se procesaron por electroforesis, se fijaron, secaron y se pusieron en contacto con películas de rayos-X.

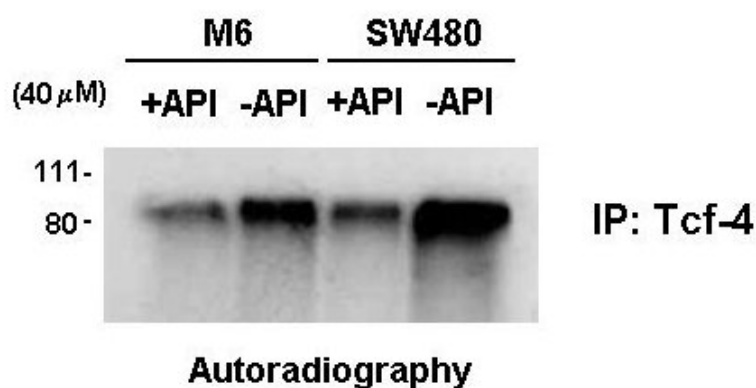


Fig. 25 **El Tcf-4 se encuentra fosforilado *in vivo*.** Se transfectaron células SW480 y HT29-M6 con 5 μg de pcDNA3-Tcf-4. A las 36 h, se crecieron las células en medio con ácido ortofosfórico marcado (^{32}P) y en los casos indicados en presencia de 40 μM de apigenina. Tras de 12h de marcaje se prepararon extractos celulares en condiciones desnaturalizantes y el Tcf-4 fue purificado por inmunoprecipitación. Las muestras se procesaron por SDS-PAGE y la autorradiografía se expuso 12h a -80°C .

En la figura 25 puede apreciarse que el Tcf-4 se encuentra fosforilado *in vivo* tanto en las células SW480 como en las HT29-M6 y que esta fosforilación es sensible a apigenina.

1.2 LA FOSFORILACIÓN *IN VITRO* DE Tcf-4 POR CKII NO AFECTA A SU INTERACCIÓN CON β -CATENINA

Tras determinar que el factor de transcripción Tcf-4 era fosforilado por CKII, decidimos estudiar si esta fosforilación afectaba a su interacción con β -catenina. Puesto que la fosforilación tiene lugar en el extremo amino terminal y es en esta zona donde interacciona con la β -catenina, pensamos que la introducción de cargas negativas por la fosforilación podía afectar a la unión de las dos proteínas.

Había sido descrito que los primeros 80 aminoácidos del Tcf-4 eran suficientes para unir a la β -catenina (Behrens et al. 1996; Omer et al. 1999). En estos ensayos se incubaron 0,64 pmoles de β -catenina con 1,2 pmoles del fragmento GST-Tcf-4(1-80) no modificado o GST-Tcf-4(1-80) fosforilado por CKII. Como control se incubó la misma cantidad de β -catenina con 1,2 pmoles de GST sola. Los complejos formados se aislaron por afinidad a glutation-sepharosa y la β -catenina unida se analizó por Western blot con anti- β -catenina. Como se muestra en la figura 26 la fosforilación del Tcf-4(1-80) no afecta a su interacción con la β -catenina.

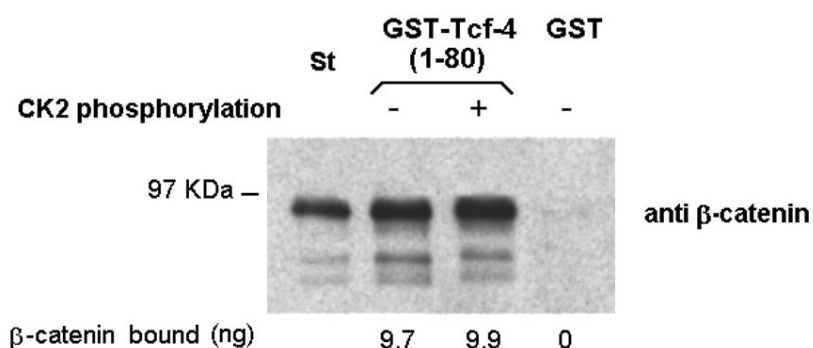


Fig.26 **La fosforilación del dominio N-terminal del Tcf-4 no modifica su interacción con β -catenina.** Tras la fosforilación del GST-Tcf-4(1-80) a 30°C durante 1 h se realizaron los ensayos de afinidad y se analizaron por geles SDS-PAGE al 10% poliacrilamida. Los geles se transfirieron y revelaron con anti- β -catenina. Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a la β -catenina unida proporcionada por el análisis densitométrico de las películas fotográficas. **St**, standard, cantidad conocida de β -catenina incluida como referencia.

El mismo resultado se obtuvo cuando se analizó la interacción de β -catenina y el GST-Tcf-4(1-80) control o fosforilado por CKII mediante experimentos de *pull-down*. Como se observa en la figura 27 no se encontraron diferencias de β -catenina unida al fosforilar el GST-Tcf-4(1-80) (carriles 1 y 2). Se llevaron a cabo los mismos

experimentos de interacción entre la β -catenina y el triple mutante de GST-Tcf-4(1-80) Ser-58,59,60→Ala (la mutación impide la fosforilación) o con la forma mutada Ser-60→Glu (la mutación mimetiza los efectos de la fosforilación). Tal y como esperábamos, no se encontraron diferencias en la cantidad de β -catenina unida a las formas mutadas del Tcf-4 modificadas o no por CKII.

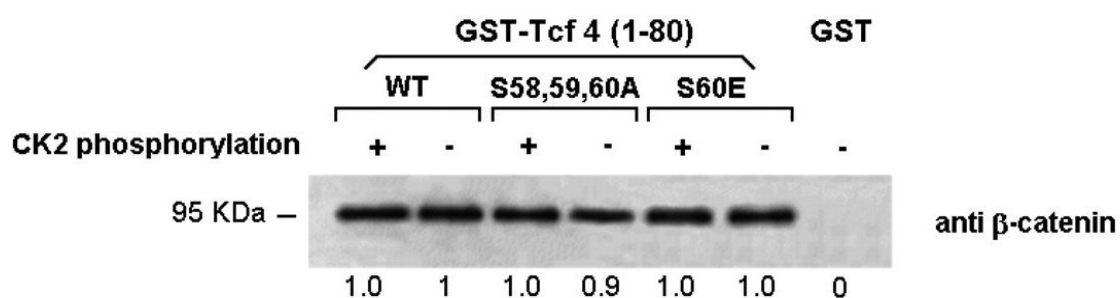


Fig.27 La fosforilación de las serinas 58,59 y 60 del extremo amino terminal del Tcf-4 no modifica su interacción con β -catenina. Tras la fosforilación de 12 pmoles de GST-Tcf-4(1-80) (*wild-type*, fosforilado por CKII o las formas mutadas Ser-58,59,60→Ala y Ser-60→Glu) se realizaron los ensayos de *pull-down* con 50 μ g de extracto celular total de SW480. La cantidad de β -catenina unida se analizó por Western blot con un anticuerpo específico contra la β -catenina. Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a los proporcionados por el análisis densitométrico de las películas fotográficas.

1.3 LA FOSFORILACIÓN *IN VITRO* DE Tcf-4 POR CKII MODIFICA NEGATIVAMENTE SU INTERACCIÓN CON PLAKOGLOBINA

Para comprobar la relevancia funcional que la fosforilación de las serinas 58,59,60 del Tcf-4 pudiera tener, estudiamos si esta modificación afectaba a la interacción con plakoglobina, ya que esta catenina también interacciona con el Tcf-4 por su extremo amino terminal (Simcha et al. 1998).

Se procedió, de igual manera que con la β -catenina, a la realización de ensayos de interacción directa y experimentos de *pull-down*. Se llevaron a cabo ensayos de interacción entre plakoglobina y GST-Tcf-4(1-80) (*wild-type*, fosforilado o no por CKII) (figura 28, panel A) y experimentos de *pull-down* con GST-Tcf-4(1-80) (*wild-type*, fosforilado por CKII o mutado) con extractos celulares totales de SW480 (figura 28, panel B). Los complejos proteicos formados en ambos tipos de ensayos se aislaron por afinidad a glutation-sepharosa y la plakoglobina unida se analizó por SDS-PAGE y Western blot con anti-plakoglobina (figura 28).

Los ensayos de interacción entre plakoglobina y GST-Tcf-4(1-80) nos indicaron que la afinidad de la asociación era 2,5 veces inferior a la presentada por β -catenina con GST-Tcf-4(1-80).

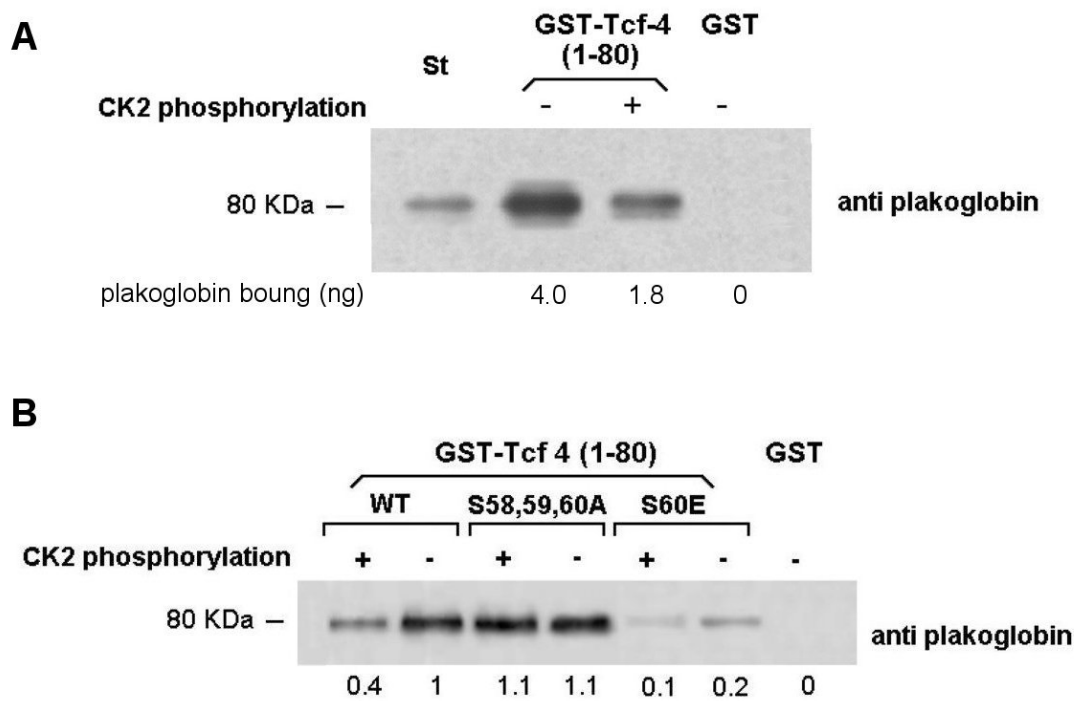


Fig.28 La fosforilación del extremo amino terminal del Tcf-4 inhibe su asociación con plakoglobina. (A) 0,64 pmoles de plakoglobina se incubaron con 1,2 pmoles de GST-Tcf-4(1-80) no modificado, GST-Tcf-4(1-80) fosforilado por CKII o GST sola como control. (B) 12 pmoles de GST-Tcf-4(1-80) (*wild-type*, fosforilado por CKII o las formas mutadas Ser-58,59,60→Ala y Ser-60→Glu) se incubaron con 50 μ g de extracto celular total de SW480. La cantidad de plakoglobina unida se analizó por Western blot con un anticuerpo específico contra la plakoglobina. Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a los proporcionados por el análisis densitométrico de las películas fotográficas. **St**, standard, cantidad conocida de β -catenina incluida como referencia.

Los ensayos de interacción con proteínas recombinantes nos mostraron que la fosforilación de GST-Tcf-4(1-80) por CKII disminuía significativamente su interacción con plakoglobina (figura 28, panel A). Los ensayos de *pull-down* llevados a cabo con las formas mutadas de GST-Tcf-4(1-80) nos indicaban que esta disminución en la unión con plakoglobina era debida a la fosforilación de las serinas 58,59,60 del Tcf-4 ya que, como se puede apreciar, el triple mutante (fosforilado o no por CKII) unía la misma cantidad de plakoglobina que el GST-Tcf-4(1-80) *wild-type* (figura 28, panel B, carriles 2, 3 y 4). Comparando la capacidad de unir plakoglobina de GST-Tcf-4(1-80) Ser-60→Glu con la forma *wild-type* deducíamos que era concretamente la

introducción de la carga negativa en el residuo 60 la principal responsable del efecto negativo en la unión entre estas dos proteínas (compárese carril 2 con 5 y 6).

1.4 INTERACCIÓN *IN VIVO* DE PLAKOGLOBINA Y β -CATENINA CON Tcf-4(1-80)

Para comprobar si estas mismas diferencias se observaban *in vivo* se transfectaron transitoriamente células RWP1 con Tcf-4(1-80) *wild-type* o las formas mutadas Ser-60→Glu y Ser-58,59,60→Ala, todas ellas en pcDNA3.1/His. Las proteínas se expresaron con cola de histidinas y el epitopo Xpress™ para facilitar su purificación y posterior reconocimiento. La purificación de los productos transfectados se llevó a cabo con níquel-agarosa y los complejos proteicos purificados fueron analizados mediante Western blot con anticuerpos específicos (figura 29).

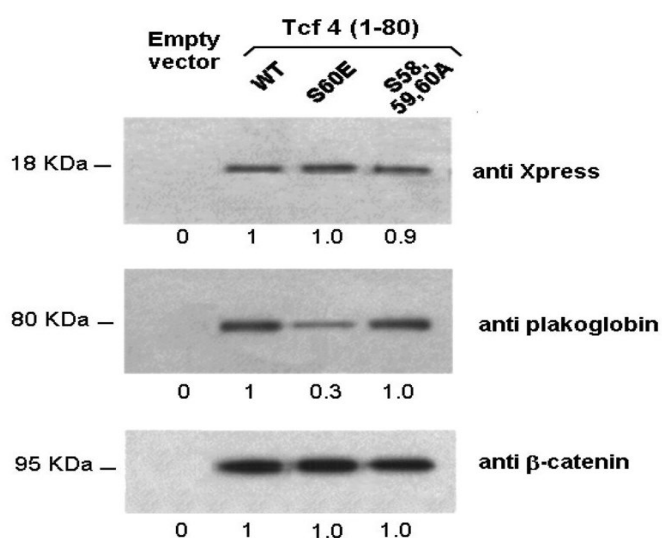


Fig.29 **El Tcf-4(1-80) Ser-60→Glu disminuye su interacción *in vivo* con plakoglobina.** Se transfectaron células RWP1 con 5 μ g de pcDNA3-His-Tcf-4(1-80) (*wild type*) o los mutantes Ser-60→Glu y Ser-58,59,60→Ala) o vector vacío como control. Tras 48 h, se prepararon extractos celulares y el His-Tcf-4(1-80) fue purificado por níquel-agarosa. Las muestras se procesaron por SDS-PAGE y Western blot. La plakoglobina asociada al Tcf-4(1-80) fue detectada con anticuerpo anti-plakoglobina. La membrana se estripó y reanalizó con anti- β -catenina o anti-Xpress™ para verificar que niveles similares de expresión de los transgenes se daban en las distintas muestras. Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a los proporcionados por el análisis densitométrico de las películas fotográficas referidos al valor obtenido para el Tcf-4(1-80) *wild-type*.

Como se muestra en la figura 29, la cantidad de plakoglobina copurificada con el mutante Tcf-4 Ser-60→Glu fue sustancialmente inferior que la de la forma *wild-type*. En cambio, no se detectaron diferencias entre el triple mutante Ser-58,59,60→Ala y

la forma *wild-type*, debido probablemente a la poca fosforilación del Tcf-4 *wild-type* en estas células. En el panel inferior se observa que todas las formas del Tcf-4 unieron niveles similares de β -catenina.

1.5 LA FOSFORILACIÓN DEL Tcf-4 POR CKII ESTÁ REGULADA POR LA PRESENCIA DE β -CATENINA Y PLAKOGLOBINA

Quisimos comprobar si la fosforilación del Tcf-4 por CKII se veía afectada por la interacción del factor de transcripción con β -catenina o plakoglobina. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de fosforilación *in vitro* de GST-Tcf-4(1-80) previamente incubado con β -catenina o plakoglobina recombinante. Los complejos proteicos GST-Tcf-4(1-80)/ β -catenina o GST-Tcf-4(1-80)/plakoglobina formados se aislaron por afinidad en glutation-sepharosa y los ensayos de fosforilación se realizaron con los complejos purificados.

En la figura 30 (panel izquierdo) se muestra como la fosforilación de GST-Tcf-4(1-80) se ve drásticamente reducida por su interacción con β -catenina o plakoglobina, lo que sugiere que únicamente el Tcf-4 libre es fosforilado con alta eficiencia por la CKII. La tinción del gel con *Coomassie Blue* nos confirmó que la misma cantidad de Tcf-4 estaba siendo fosforilada en los ensayos (figura 30, panel derecho).

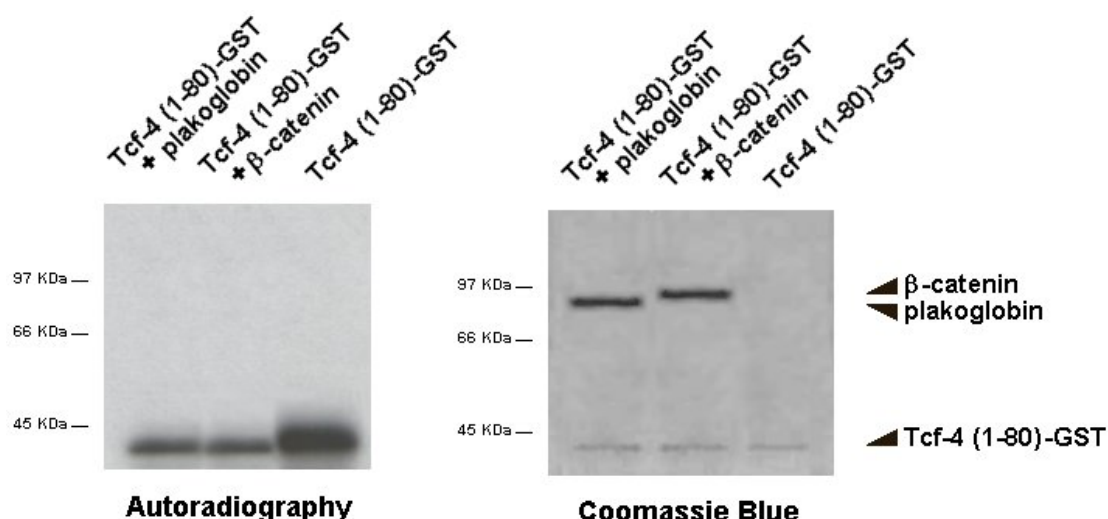


Fig.30 **Fosforilación de GST-Tcf-4(1-80) asociado a β -catenina o plakoglobina.** 0,25 μ g de GST-Tcf-4(1-80) se incubaron con 2 μ g de β -catenina o plakoglobina. Los complejos formados se aislaron con glutation-sepharosa y fueron fosforilados en presencia de [γ - 32 P]-ATP por 50 miliunidades de CKII. Tinción del gel con *Coomassie Blue* (derecha) y autorradiografía expuesta 12h a -80°C (izquierda).

1.6 PLAKOGLOBINA Y β -CATENINA INTERACCIONAN SIMULTÁNEAMENTE CON Tcf-4

Ya que la fosforilación del extremo amino terminal del Tcf-4 no afectaba por igual a la interacción con plakoglobina y β -catenina, pensamos que estas dos cateninas podían estar interaccionando en regiones distintas del Tcf-4. Para confirmar si el GST-Tcf-4(1-80) interaccionaba simultáneamente con plakoglobina y β -catenina o lo hacía de forma excluyente, se llevaron a cabo varios ensayos de interacción directa con las proteínas recombinantes.

Tal y como se muestra en la figura 31, la adición de β -catenina era incapaz de desplazar plakoglobina de los complejos GST-Tcf-4(1-80)/plakoglobina formados. Los ensayos se realizaron en presencia de dos cantidades variables de β -catenina, y el mismo resultado se obtuvo incluso cuando la β -catenina se añadió en exceso. Al no encontrar una disminución de plakoglobina unida a GST-Tcf-4(1-80) todo indicaba que β -catenina no competía con plakoglobina por su asociación con Tcf-4(1-80).

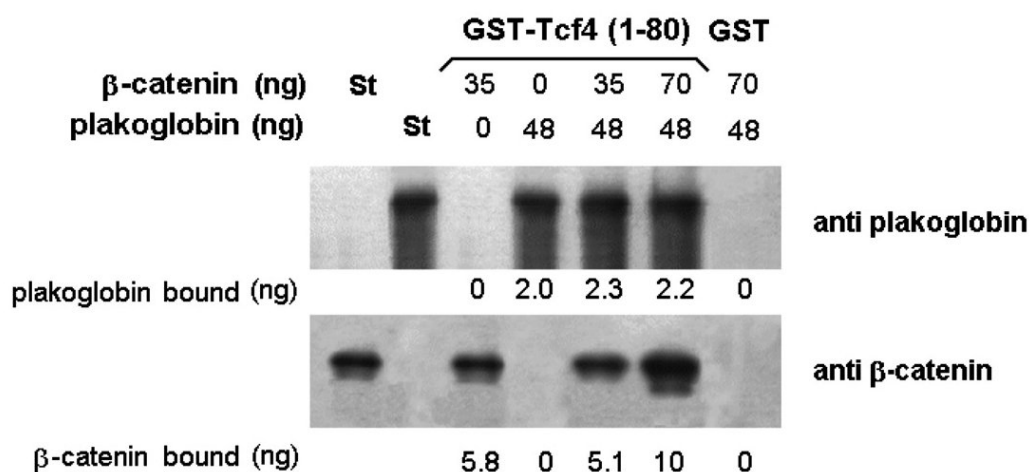


Fig.31 β -catenina no desplaza a plakoglobina de los complejos formados con Tcf-4. 0,6 pmoles de plakoglobina fueron incubados con 0,8 pmoles de GST-Tcf-4(1-80) o GST en un volumen final de 200 μ L. 0,4 ó 0,8 pmoles de β -catenina se añadieron para desplazar a la plakoglobina de los complejos. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y Western blot con anti-plakoglobina. Para comprobar que la β -catenina estaba asociada a los complejos, las membranas se estriparon y re-analizaron con anticuerpo anti- β -catenina. 0,025 pmoles (2 ng) de plakoglobina y 0,055 (5 ng) de β -catenina se incluyeron como referencias internas (St). Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a los proporcionados por el análisis densitométrico de las películas fotográficas referidos a las referencias internas.

Para verificar estos resultados, se realizaron ensayos de interacción entre Tcf-4(1-80) y GST-plakoglobina en presencia o ausencia de β -catenina.

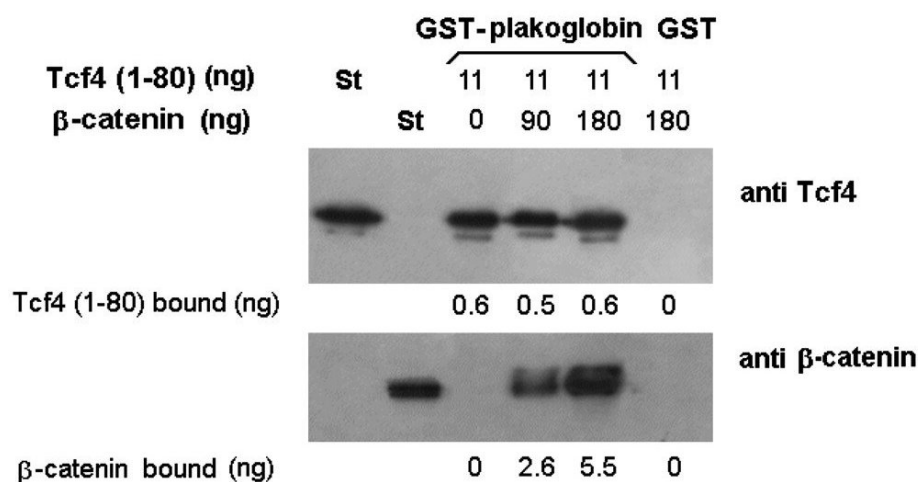


Fig.32 **Plakoglobina y β -catenina interactúan en regiones distintas del Tcf-4.** 1,2 pmoles de GST-plakoglobina o GST se incubaron con 1,2 pmoles de Tcf-4(1-80) en presencia de dos concentraciones de β -catenina (1 y 2 pmoles). La cantidad de Tcf-4 o β -catenina asociada se determinó utilizando anticuerpos específicos para estas dos proteínas. Se incluyeron como referencias internas (St) 0,06 pmoles de Tcf-4(1-80) y 0,04 pmoles de β -catenina. Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a los proporcionados por el análisis densitométrico de las películas fotográficas referidos a las referencias internas.

Se vio que la asociación del Tcf-4(1-80) con plakoglobina no se afectaba por la adición de un exceso de β -catenina (figura 32, panel superior), indicando que β -catenina no interfería en la asociación plakoglobina/Tcf-4. Sólo en presencia de Tcf-4(1-80) β -catenina era retenida por los complejos GST-plakoglobina (figura 32, panel inferior, carriles 4 y 5), evidenciando una unión simultánea de ambas cateninas con el factor de transcripción.

Para concluir que ambas cateninas se asociaban simultáneamente con Tcf-4(1-80) se realizaron ensayos de interacción con GST- β -catenina y plakoglobina en presencia o ausencia de Tcf-4(1-80). Tal y como se muestra en la figura 33, la presencia de Tcf-4(1-80) (carriles 3 y 4) permitía la unión de plakoglobina a los complejos formados por GST- β -catenina. En estos experimentos se demostró de forma concluyente que ambas cateninas se asociaban únicamente en presencia de Tcf-4(1-80).

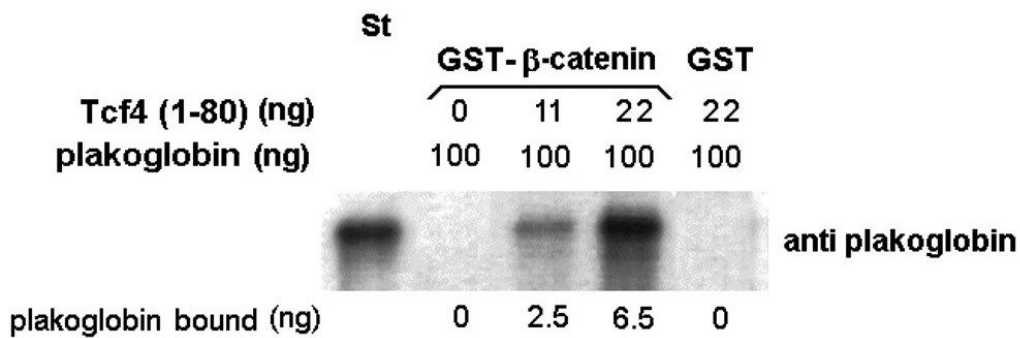


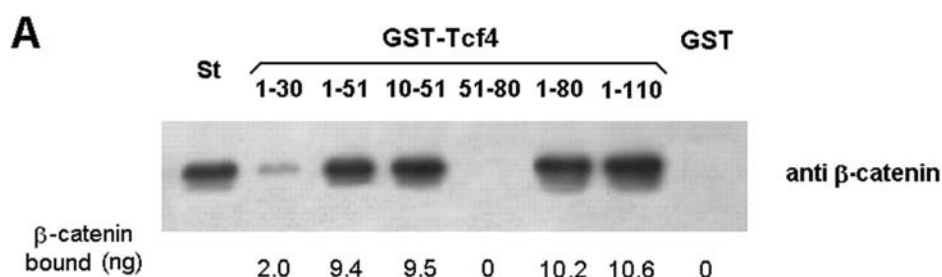
Fig.33 **Plakoglobina y β -catenina se asocian simultáneamente a Tcf-4(1-80)**. 1,2 pmoles de GST- β -catenina o GST se incubaron con 1,2 pmoles de plakoglobina en presencia de dos concentraciones de Tcf-4(1-80). La cantidad de plakoglobina unida se determinó tal como se ha descrito previamente. Se incluyeron como referencias internas (St) 0,08 pmoles de plakoglobina.

De nuestros resultados concluimos que plakoglobina y β -catenina interaccionaban con Tcf-4(1-80) simultánea e independientemente.

1.7 PLAKOGLOBINA Y β -CATENINA INTERACCIONAN EN ZONAS ADYACENTES DE Tcf-4

Se generaron diferentes fragmentos delecionados del extremo amino terminal del Tcf-4 para localizar los dominios de interacción con ambas cateninas. Se expresaron como proteínas de fusión con GST los fragmentos que comprendían los aminoácidos 1-30, 1-51, 10-51, 51-80 y 1-110.

Los ensayos de interacción llevados a cabo entre plakoglobina o β -catenina con los mutantes delecionados identificaron regiones distintas de interacción. Tal y como se muestra en la figura 34, la β -catenina interaccionaba prácticamente igual con el fragmento de GST-Tcf-4(10-51) que con el GST-Tcf-4(1-80). En cambio la plakoglobina se unía preferentemente al GST-Tcf-4(51-80).



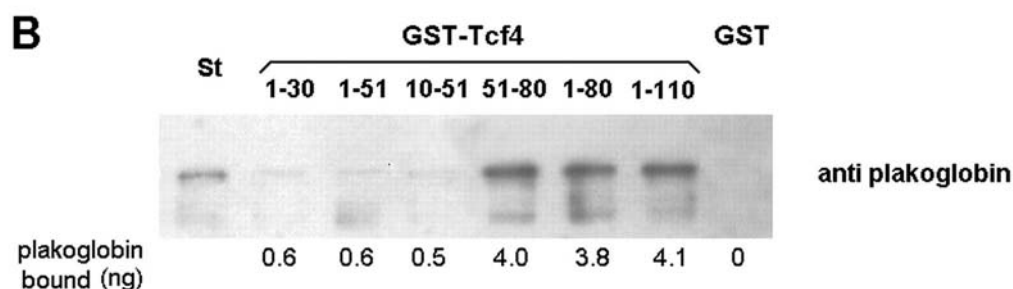


Fig.34 **Identificación de las secuencias implicadas en las interacciones Tcf-4/plakoglobina y Tcf-4/ β -catenina.** 1,2 pmoles de los fragmentos delecionados del GST-Tcf-4 o GST se incubaron con 0,7 pmoles de β -catenina (**A**) o plakoglobina (**B**). La cantidad de β -catenina o plakoglobina asociada se determinó con anticuerpos específicos. 0,10 pmoles de β -catenina o 0,025 pmoles de plakoglobina se incluyeron como referencia (St). Los números bajo cada carril indican la cantidad de proteína unida.

Para caracterizar mejor la interacción del Tcf-4 con β -catenina y plakoglobina se llevaron a cabo análisis de Scatchard. Para ello se realizaron ensayos de afinidad entre la β -catenina o la plakoglobina y el GST-Tcf-4(1-80) utilizando concentraciones crecientes de β -catenina y plakoglobina (1.6, 3.3, 8.2, 16.3 y 27.2 nmol/L). Las películas fotográficas obtenidas en los ensayos de interacción fueron densitometradas (ver *materiales y métodos*) y la concentración de β -catenina o plakoglobina unida fue determinada comparando con patrones internos de β -catenina o plakoglobina de concentración conocida presentes en el mismo Western blot. De estos análisis se determinó una constante de asociación, k_a , para ambas interacciones, a partir de la pendiente de la recta de regresión obtenida. El número de ensayos realizados para cada concentración fue de 5 y los valores que aparecen en las tablas corresponden al valor medio encontrado en esos cinco experimentos.

[β -catenina] total $\times 10^{-10}$ (mol/L)	[β -catenina] unida $\times 10^{-10}$ (mol/L)	[β -catenina] unida/ [β -catenina] libre
16,6	2,22	0,158
32,6	4,08	0,143
81,5	9,84	0,137
163	16	0,113
271,7	22	0,088

[plakoglobina] total $\times 10^{-10}$ (mol/L)	[plakoglobina] unida $\times 10^{-10}$ (mol/L)	[plakoglobina] unida/ [plakoglobina] libre
16,6	0,92	0,059
32,6	1,81	0,058
81,5	4,25	0,055
163	7,9	0,051
271,7	12,25	0,047

Tabla VI. Concentraciones de β -catenina y plakoglobina incubadas con 6×10^{-9} mol/L de GST-Tcf-4(1-80).

La representaciones de Scatchard obtenidas para las uniones del GST-Tcf-4(1-80) con β -catenina y plakoglobina se muestran en la figura 35.

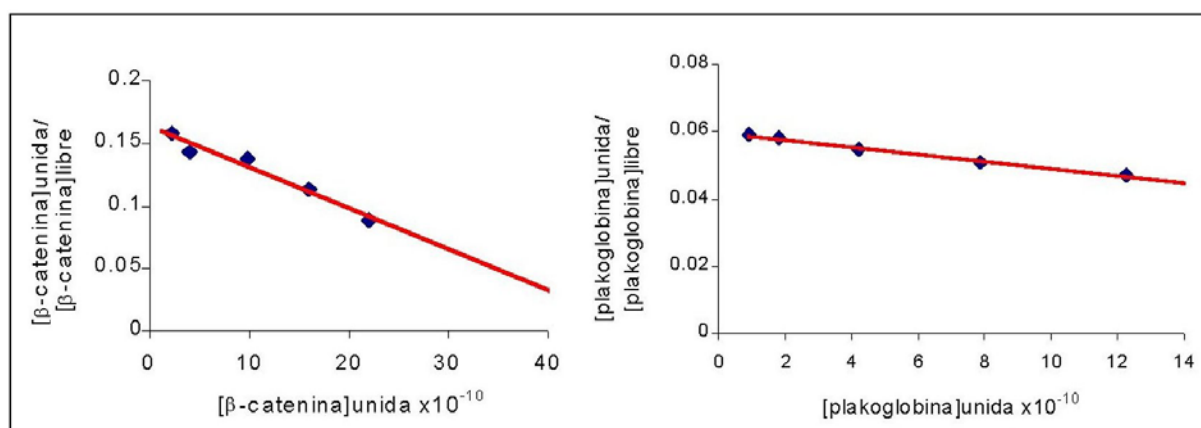


Fig. 35 Análisis de Scatchard de la unión del Tcf-4 a β -catenina y plakoglobina. La pendiente de la recta de estas representaciones es la constante de afinidad (k_a).

Para la interacción Tcf-4(1-80)/ β -catenina se determinó una k_a de $3,2 \cdot 10^7$ M^{-1} y una k_a de $1,1 \cdot 10^7$ M^{-1} para la unión de Tcf-4(1-80)/plakoglobina, indicando que la afinidad del Tcf-4 por plakoglobina es 2,9 veces menor que por β -catenina.

1.8 LA INTERACCIÓN PLAKOGLOBINA/Tcf-4 y β -CATENINA/Tcf-4 ESTÁ REGULADA POR LOS EXTREMOS TERMINALES DE LAS CATENINAS

Tras caracterizar la secuencia del Tcf-4 que interaccionaba con la plakoglobina, se mapeó la zona de interacción de la plakoglobina con el Tcf-4(51-110) utilizando diferentes mutantes de plakoglobina que se expresaron como

proteínas de fusión con GST. Se realizaron ensayos de interacción *in vitro* con las proteínas recombinantes.

Como puede verse en la figura 36 ni el extremo amino terminal (Ntail, aa 1-113) ni el extremo carboxilo terminal (Ctail, aa 667-745) interaccionaban con Tcf-4(51-110). La interacción tenía lugar por el dominio de repeticiones armadillo (111-672), que incluso interacciona mejor con el Tcf-4(51-110) que la plakoglobina entera. Esto sugiere que los extremos N y C-terminales dificultan la interacción del Tcf-4 con el dominio central de plakoglobina. La asociación del Tcf-4(51-110) al dominio armadillo de plakoglobina requiere únicamente las primeras seis repeticiones armadillo (aa 111-385), ya que el Tcf-4(51-110) interacciona de igual forma con los fragmentos de plakoglobina que corresponden a los aminoácidos 111-672 y 111-385.

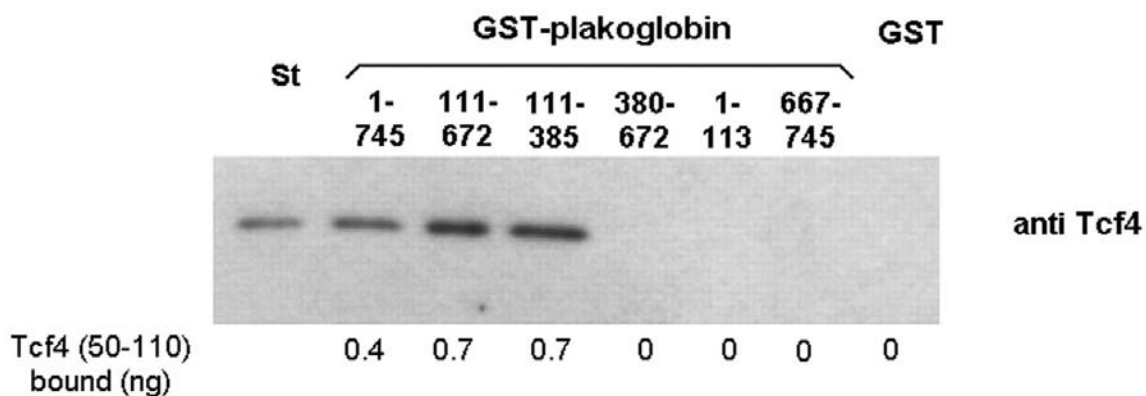


Fig. 36 **Identificación de la región de plakoglobina implicada en la interacción con Tcf-4.** 1,2 pmoles de los fragmentos delecionados de GST-plakoglobina o GST se incubaron con 1,2 pmoles de Tcf-4(51-110). La cantidad de Tcf-4 unida fue analizada con un anticuerpo específico anti-Tcf-4. Se incluyó como referencia interna (St) 0,05 pmoles de Tcf-4(51-110). Los números que aparecen bajo cada carril corresponden a los proporcionados por el análisis densitométrico de las películas fotográficas referidos a la referencia interna.

Nuestros resultados indicaban que la plakoglobina interaccionaba con los aminoácidos 51-80 del Tcf-4 por sus primeras seis repeticiones armadillo. Por el contrario, β -catenina interaccionaba con los residuos 1-51 del Tcf-4 por una región más extensa que comprendía las repeticiones armadillo 3-10 (Graham et al. 2000).

Puesto que los dominios armadillo de plakoglobina y β -catenina comparten un 83% de similitud, pensamos que los extremos N y C terminales de ambas cateninas podían estar afectando a su interacción con el Tcf-4.

Para comprobar la relevancia de los extremos terminales de las cateninas en la interacción con el Tcf-4, se llevaron a cabo ensayos de *overlay* en los que los fragmentos delecionados de β -catenina y GST-plakoglobina separados por SDS-PAGE y transferidos a la nitrocelulosa, se incubaron con GST-Tcf-4(1-51). La cantidad de GST-Tcf-4(1-51) unida a cada fragmento se determinó revelando la membrana con anti-Tcf-4.

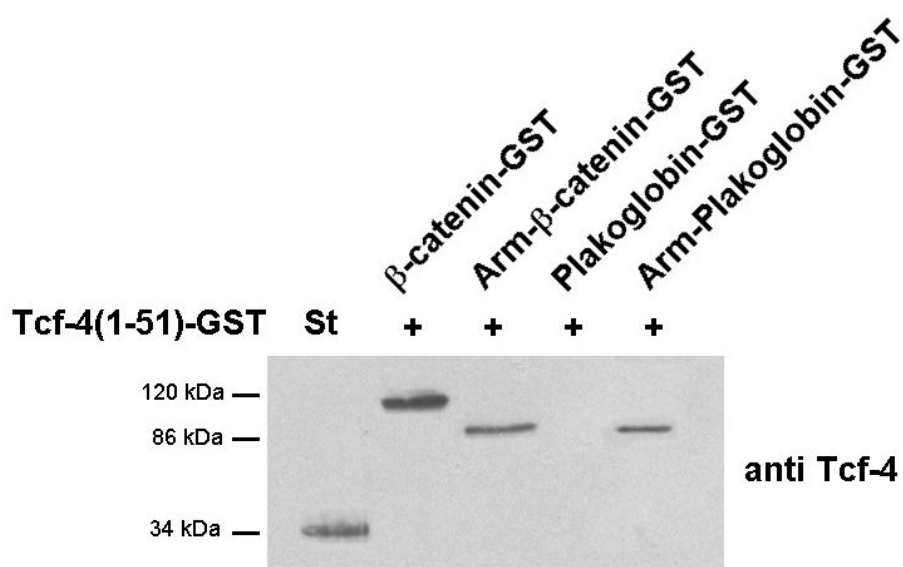


Fig. 37 **Interacción de los dominios armadillo de β -catenina y plakoglobina con Tcf-4(1-51).** 7 pmoles de las diferentes proteínas recombinantes con GST indicadas se separaron por SDS-PAGE y transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La interacción entre las proteínas recombinantes se determinó por ensayos de *overlay* incubando las membranas con GST-Tcf-4(1-51) (10 μ g/mL) y posteriormente revelando con un anticuerpo específico anti-Tcf-4. Se indican los pesos moleculares estimados de las bandas detectadas con el anticuerpo.

Como se muestra en la figura 37, el fragmento Tcf-4(1-51) interacciona con la β -catenina *wild-type* y con el dominio armadillo de β -catenina (carriles 2 y 3). Aunque este fragmento no interacciona con la plakoglobina (carril 4) si se asocia a su dominio armadillo (carril 5), evidenciando un efecto negativo de los extremos terminales de plakoglobina sobre la interacción con la secuencia (1-51) del Tcf-4.

Los mismos ensayos se realizaron con GST-Tcf-4(51-110) y los fragmentos de β -catenina y plakoglobina separados por SDS-PAGE. En este caso la cantidad de GST-Tcf-4(51-110) asociada se determinó con anticuerpo anti-GST (figura 38).

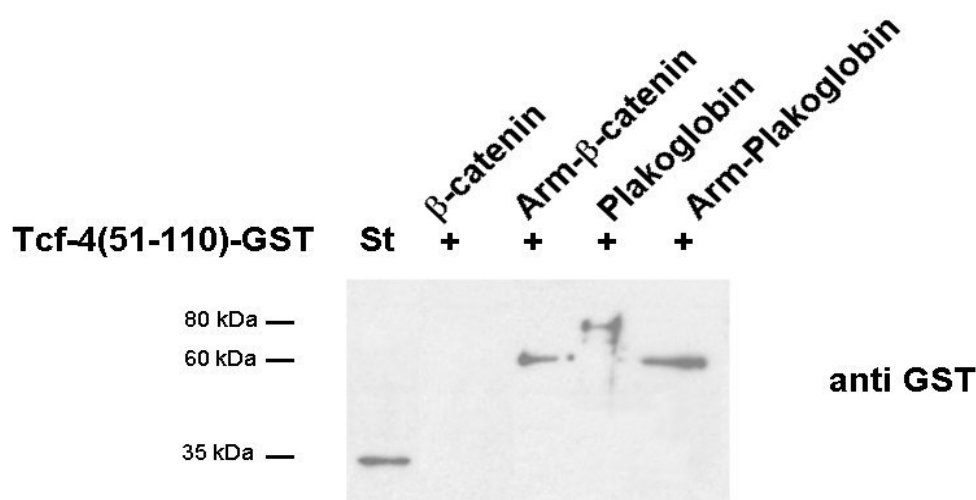


Fig.38 **Interacción de los dominios armadillo de β -catenina y plakoglobina con Tcf-4(51-110).** 7 pmoles de las diferentes proteínas recombinantes indicadas se separaron por SDS-PAGE y transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La interacción entre las proteínas recombinantes se determinó por ensayos de *overlay* incubando las membranas con GST-Tcf-4(51-110) (10 μ g/mL) y posteriormente revelando con un anticuerpo específico anti-GST. Se indican los pesos moleculares estimados de las bandas detectadas con el anticuerpo.

De acuerdo con los experimentos de interacción que habíamos realizado (apartado 1.7) se observó que el fragmento 51-110 del Tcf-4 interaccionaba con plakoglobina (carril 4) pero no con β -catenina (carril 2). Al igual que con el fragmento 1-51, obtuvimos que los dominios armadillo de ambas cateninas pueden interaccionar con el fragmento 51-110 del Tcf-4. Por tanto, de manera análoga al caso de la plakoglobina, la unión de Tcf-4(51-110) a la β -catenina está impedida por sus extremos terminales.

1.9 AUSENCIA DE PLAKOGLOBINA EN LOS COMPLEJOS Tcf-4/DNA

Como se ha indicado, se había propuesto que los extremos terminales de la plakoglobina impedían la interacción de los complejos plakoglobina/LEF-1 con el DNA (Zhurinsky et al. 2000a). Se trató de comprobar si los complejos Tcf-4/plakoglobina también eran incapaces de unirse al DNA.

Para ello se incubaron extractos celulares totales de MDCK, transfectadas con pcDNA3-Tcf-4 (*wild-type* o Ser-60→Glu), con oligonucleótidos que contenían la secuencia de unión del Tcf-4 en el promotor de c-myc, un gen diana de la transcripción mediada por β -catenina (He et al. 1998). Estos oligonucleótidos se encontraban marcados con biotina para favorecer su purificación con estreptavidina-

agarosa. Como muestra la figura 39, el Tcf-4 se unió bien al oligonucleótido tanto en su forma *wild-type* como en su forma mutada Ser-60→Glu, que no puede interaccionar con plakoglobina. En ambos casos, en los complejos que formaba el Tcf-4 (*wild-type* o Ser-60→Glu) con el oligonucleótido se detectó β -catenina asociada pero no se encontró plakoglobina unida.

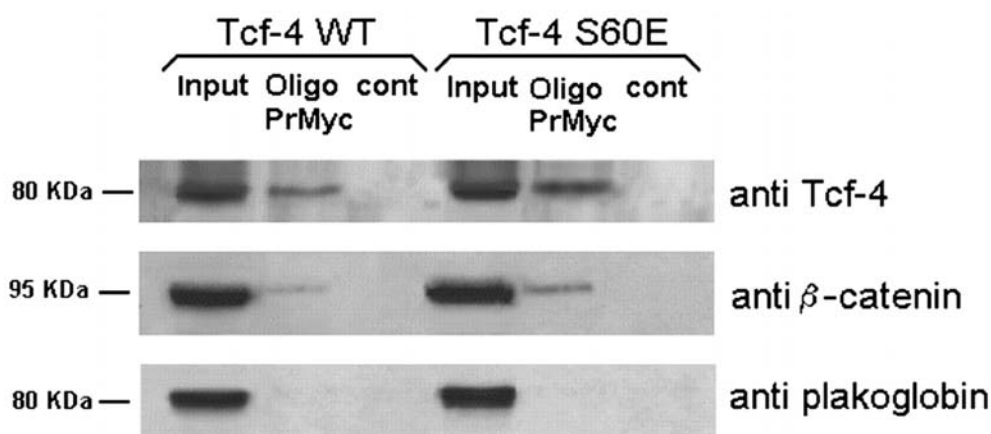


Fig.39 **Plakoglobina no se encuentra presente en los complejos Tcf-4/DNA.** Células MDCK se transfectaron con 5 μ g de pcDNA3-His-Tcf-4 (*wild type* o el mutante Ser-60→Glu). A las 48 h se prepararon los extractos celulares y se incubaron 200 ng de oligo biotinilado que contenía la secuencia de unión del Tcf-4 en el promotor de c-myc (*Oligo PrMyc*) con 200 μ g del extracto celular. El oligo biotinilado se purificó por cromatografía en estreptavidina-agarosa y el Tcf-4 asociado se analizó por Western blot con un anticuerpo policlonal anti-Tcf-4. Las membranas fueron estripadas y reanalizadas con anti- β -catenina y plakoglobina. **Input**, 30% del extracto celular total; **cont**, control con oligo no específico.

Los mismos resultados se obtuvieron cuando en el ensayo se utilizó un oligonucleótido que contenía la secuencia de interacción con el Tcf-4 presente en el plásmido TOP, un promotor sintético ampliamente utilizado para medir la actividad transcripcional del Tcf-4 (Korinek et al. 1997).

Teniendo en cuenta que la interacción plakoglobina-Tcf-4 es fácilmente detectable en los extractos celulares y que no hemos encontrado complejos plakoglobina/Tcf-4/DNA, todo parece indicar, como describían Ben-ze'ev y colaboradores, que los complejos que contienen plakoglobina no se unen al DNA.

1.10 LA FORMA MUTADA DEL Tcf-4 Ser-60→Glu PRESENTA MAYOR ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL QUE LA FORMA WILD-TYPE

Tras confirmar que la plakoglobina impedía la formación de los complejos Tcf-4/DNA y como el mutante de Tcf-4 Ser-60→Glu tenía disminuida su unión con

plakoglobina, pensamos que la forma mutada del Tcf-4 presentaría menor capacidad de inhibición de la interacción Tcf-4/DNA y esto se traduciría en un aumento de la actividad transcripcional *in vivo*.

Se determinó la actividad transcripcional mediada por β -catenina de las diferentes formas mutadas del Tcf-4 en células MDCK (figura 40). Para ello se cotransfectaron las distintas formas del pcDNA3.1His-Tcf-4 con un gen *reporter* situado bajo el control de un promotor sensible a β -catenina-Tcf-4 (sistema *TOP reporter*; Korinek et al. 1997).

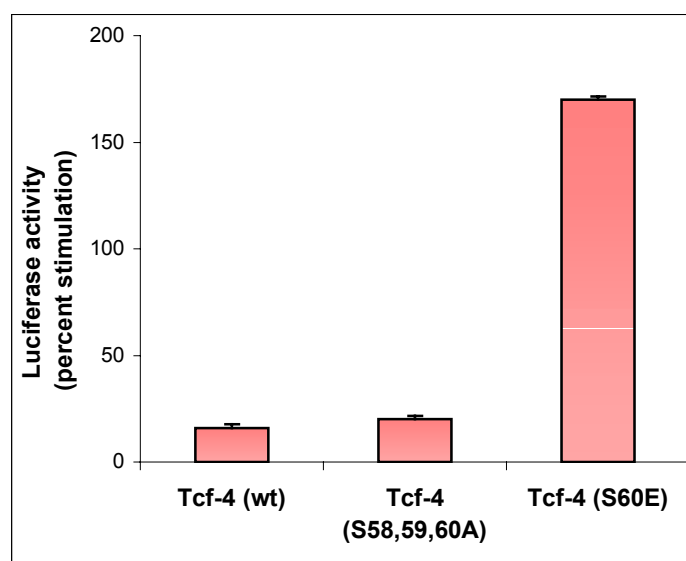


Fig. 40 **Activación de la transcripción por las diferentes formas del Tcf-4.** Células MDCK fueron cotransfectadas con los plásmidos de Tcf-4 insertados en pcDNA3.1His (150 ng), TOP-FLASH-*Firefly luciferase* (20 ng), y pTK-*Renilla luciferase* (20 ng). Tras 48 h, se determinó la actividad luciferasa relativa de cada muestra como se describe en el apartado de *Materiales y Métodos*. Los niveles de actividad se refirieron a los de las células transfectadas con pcDNA3.1His solo. Los segmentos indican la desviación estándar de tres o cuatro transfecciones independientes. **WT**, wild-type; **S58,59,60A**, Ser-58,59,60→Ala; **S60E**, Ser-60→Glu.

Tal y como esperábamos, la sobreexpresión del mutante Ser-60→Glu del Tcf-4 produjo un aumento de la activación transcripcional 2,3 veces superior al que producía la forma *wild-type*. La expresión del mutante Ser-58,59,60→Ala del Tcf-4 no produjo diferencias en la estimulación de la actividad del promotor respecto a la forma *wild-type*, debido probablemente a la poca fosforilación del Tcf-4 *wild-type* en estas células.