
**REGULACIÓN DE LA ESTRUCTURA-FUNCIÓN
DE β -CATENINA Y p120-CATENINA: DOS
PROTEÍNAS ASOCIADAS A LAS UNIONES
ADHERENTES**

Julio Castaño Cardoso



Unidad de Biofísica
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Barcelona

**REGULACIÓN DE LA ESTRUCTURA-FUNCIÓN
DE β -CATENINA Y p120-CATENINA: DOS
PROTEÍNAS ASOCIADAS A LAS UNIONES
ADHERENTES**

Julio Castaño Cardoso

Memoria de la tesis presentada para obtener el grado de Doctor en
Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Autónoma de
Barcelona, Octubre 2005

Directores :

Mireia Duñach Masjuan

Antonio García de Herreros

A mi familia (presente y futura),
a mis amigos.

Si lo que tú has encontrado está formado por materia pura, jamás se pudrirá. Y tú podrás volver un día. Si fue sólo un momento de luz, como la explosión de una estrella, entonces no encontrarás nada cuando regreses. Pero habrás visto una explosión de luz. Y esto sólo ya habrá merecido la pena.

El Alquimista

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
ATP	adenosintrifosfato
BSA	albúmina de suero bovino
cyto-Ecad	dominio citosólico de la E-cadherina
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilendiaminotetraacetato de sodio
EGF	factor de crecimiento epidérmico
GAP	GTPase activating proteins
GDI	Rho GDP dissociation inhibitors
GEF	GDP/GTP exchange factors
GEB	Glutathion reducido
GST	Glutathion-S-transferasa
IPTG	β -D-isopropil-tiogalactopiranosido
kDa	kilodalton
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
mAb	anticuerpo monoclonal
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	par de bases
PBS	tampón fosfato salino
PS1	presenilina-1
PEG	polietilenglicol
PS	proteasa PreScission™
SDS	dodecilsulfato de sodio
SOB	medio para preparar competentes (HANAHAN'S BROTH)
St	estándar, muestra de referencia
TAE	tampón Tris/acetato/ EDTA
TBP	proteína de unión a cajas TATA
TBS	tampón Tris salino
TE	tampón Tris/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina

Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
TBS-T	tampón Tris salino con 0,2% de Triton X-100
wt	salvaje (<i>wild type</i>)

ÍNDICE

Esta tesis doctoral está estructurada en dos capítulos independientes: el primero basado en los mecanismos que modulan la interacción de β -catenina con cofactores y el segundo en la regulación de la interacción de p120-catenina con RhoA e implicación en la funcionalidad de ambas proteínas.

<u>CAPÍTULO I</u>	1
INTRODUCCIÓN	3
I.1. E-CADHERINA	6
I.1.1. Características generales	6
I.1.2. Estructura	7
I.2. β-CATENINA: UNA PROTEÍNA, DOS FUNCIONES	8
I.2.1. Características generales	8
I.2.2. Estructura	9
I.2.3. Función	14
I.2.4. Vía de señalización Wnt	18
I.3. p120-CATENINA: UN SUSTRATO DE SRC CONVERTIDO EN CATENINA	20
I.3.1. Características generales	20

I.4. α-CATENINA	21
I.4.1. Características generales	21
I.4.2. Estructura	21
I.4.3. Función	22
I.5. REGULACIÓN LAS UNIONES ADHERENTES	23
ANTECEDENTES	27
OBJETIVOS	29
RESULTADOS	31
I.1. INTERACCIÓN DE LOS EXTREMOS TERMINALES DE β-CATENINA CON EL DOMINIO ARMADILLO	31
I.1.1. El extremo C-terminal interacciona con el dominio armadillo de β -catenina	31
I.1.2. Los último 20 residuos de β -catenina (aa 760-781) son suficientes para la interacción del extremo C-terminal con el dominio armadillo	32
I.1.3. La unión de E-cadherina a β -catenina facilita la digestión del extremo C-terminal con carboxipeptidasa Y	35
I.1.4. El extremo N-terminal también interacciona con el dominio armadillo	36
I.1.5. La fosforilación en tirosinas del extremo N-terminal modifica la interacción de éste con el dominio armadillo	37
I.2. LOS EXTREMOS TERMINALES DE β-CATENINA SON INTERDEPENDIENTES	38
I.2.1. El extremo aminoterminal dificulta la unión del extremo carboxiterminal al dominio armadillo de β -catenina	39

I.2.2.	El extremo C-terminal potencia la interacción del extremo N-terminal con el dominio armadillo	40
I.3.	DIFERENTES PATRONES DE TRIPSINOLISIS DE β-CATENINA (WT, Y86E, Y654E), ΔN β-CATENINA Y ΔC β-CATENINA	41
I.4.	DIFERENTE INTERACCIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE β-CATENINA CON E-CADHERINA, α-CATENINA Y TBP.	44
I.4.1.	Los extremos terminales de β -catenina dificultan su unión con E-cadherina	44
I.4.2.	El extremo N-terminal modula la interacción de β -catenina con α -catenina	46
I.4.3.	TBP interacciona mejor con el dominio armadillo que con la proteína entera	47
I.5.	α-CATENINA FACILITA LA INTERACCIÓN DE β-CATENINA CON E-CADHERINA	48
I.6.	TCF-4 FACILITA LA INTERACCIÓN DE β-CATENINA CON TBP	49
	DISCUSIÓN	51
1.	IMPLICACIONES ESTRUCTURALES EN β -CATENINA.	51
2.	INTERACCIÓN DE β -CATENINA CON SUS COFACTORES	55
3.	UNIÓN COOPERATIVA DE FACTORES	56
	CONCLUSIONES	61

<u>CAPÍTULO II</u>	63
INTRODUCCIÓN	65
II.1. LA FAMILIA DE LAS RHO-GTPASAS	65
II.1.1. Características generales	65
II.1.2. Regulación	66
II.1.3. Las proteínas Rho: RhoA	68
II.1.4. Función	72
II.2. p120-CATENINA	75
II.2.1. Características generales	75
II.2.2. Estructura y nomenclatura	76
II.2.3. Función	78
ANTECEDENTES	85
OBJETIVOS	87
RESULTADOS	89
II.1. p120-CATENINA-1 (1-911) SE FOSFORILA POR LA QUINASAS SRC, FER, YES Y FYN	89
II.2. EL EXTREMO N-TERMINAL DE p120-CATENINA REGULA LA INTERACCIÓN E-CADHERINA/p120-CATENINA	90
II.3. INTERACCIÓN DE p120-CATENINA CON RHOA	91
II.3.1. RhoA interacciona en el extremo N-terminal de p120-catenina	91
II.3.2. La región 96-234 de p120-catenina es la responsable de la interacción con RhoA	92

II.4. INTERACCIÓN DE p120-CATENINA CON LAS TIROSINA QUINASAS YES, FYN Y SRC	93
II.4.1. Fyn y Yes interaccionan en el dominio N-terminal de p120-catenina	93
II.4.2. La fosforilación de p120-catenina por la serina/treonina quinasa CKI dificulta su interacción con Fyn y Yes	94
II.4.3. RhoA potencia la interacción de Fyn con p120-catenina	95
II.5. REGULACIÓN DE LA INTERACCIÓN p120-CATENINA/RHOA POR FOSFORILACIÓN EN TIROSINAS	96
II.5.1. La fosforilación de p120-catenina por Src y Fyn tiene efectos opuestos en la interacción p120-catenina/RhoA	96
II.5.2. Las tirosinas implicadas en la regulación de la interacción p120-catenina/RhoA se localizan en el extremo N-terminal de p120-catenina	98
II.5.3. Las tirosinas 96 y 228 son fosforiladas tanto por Src como por Fyn	99
II.5.4. La fosforilación de la tirosina 112 inhibe la interacción p120-catenina/RhoA	100
II.5.5. La fosforilación de la tirosina 217 potencia la interacción p120-catenina/RhoA	101
II.5.6. Las quinasas Src y Fyn fosforilan con mayor eficiencia la Tyr-217 y 112, respectivamente	102
II.5.7. Src fosforila la Tyr-112 con menor afinidad que Fyn.	103
II.6. LA FOSFORILACIÓN DE LAS TIROSINAS 112 Y 217 DE p120-CATENINA POTENCIA SU INTERACCIÓN CON E-CADHERINA.	104

II.7. RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN p120-CATENINA/RHOA	105
II.7.1. La fosforilación de la tirosina 112 de p120-catenina tiene lugar in vivo	106
II.7.2. La fosforilación de p120-catenina por Src inactiva Rho	107
II.7.3. La mutación a glutámico de la tirosina 112 previene de la represión de Rho por p120-catenina	108
II.7.4. La fosforilación de la tirosina 217 promueve el branching, mientras que la fosforilación de la tirosina 112 lo bloquea	109
II.8. p120-CATENINA-1 ACTÚA COMO UN GDI DE RHOA	111
II.9. E-CADHERINA NO COMPITE CON RHOA POR UNIRSE A p120-CATENINA	113
II.9.1. E-cadherina no compite con RhoA por unirse a p120-catenina	113
II.9.2. RhoA facilita la interacción de p120-catenina con E-cadherina	114
II.10. LA INTERACCIÓN p120-CATENINA/RHOA EN CÉLULAS EPITELIALES	115
II.10.1.p120-catenina interacciona mejor con RhoA en células IEC-Kras	115
II.10.2.Rho se inactiva en las células IEC-Kras	116
II.11. RELEVANCIA DE LA FOSFORILACIÓN DE p120-CATENINA EN LAS UNIONES ADHERENTES Y EN LA FUNCIONALIDAD DE RHO	118
II.12. INTERACCIÓN DE p120-CATENINA CON RAC1 Y CDC42	119
II.12.1.p120-catenina interacciona con Rac1 y Cdc42	119
II.12.2.La fosforilación en tirosinas de p120-catenina afecta a su interacción con Rac1 y Cdc42	121

DISCUSIÓN	123
1. p120 ES UNA FOSFOPROTEÍNA	123
2. p120 COMO ACOPLADOR DE TIROSINA QUINASAS Y FOSFATASAS	125
3. INTERACCIÓN p120-CATENINA/E-CADHERINA	126
4. INTERACCIÓN RHOA/p120-CATENINA	128
5. p120-CATENINA INHIBE A RHOA	130
6. p120-CATENINA ES UN GDI PARA RHOA	132
7. EFECTOS DE RHOA SOBRE p120-CATENINA	134
CONCLUSIONES	139
<u>ANEXOS</u>	141
ANEXO 1 MATERIALES Y MÉTODOS	143
1. TÉCNICAS RELACIONADAS CON LA MANIPULACIÓN DEL DNA	143
1.1. Preparación de bacterias competentes y transformación	143
1.2. Aislamiento del DNA plasmídico	144
1.3. Análisis del DNA en geles de agarosa	144
1.4. Construcción de plásmidos	145
1.4.1. Subclonaje de fragmentos	145
1.4.2. Mutagénesis dirigida	147
1.5. Secuenciación del DNA	148

2.	TÉCNICAS RELACIONADAS CON LA MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	148
2.1.	Extracción o purificación de proteínas	148
2.1.1.	Expresión y purificación de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	148
2.1.2.	Extracción de proteínas a partir de cultivos celulares	151
2.2.	Técnicas electroforéticas para el análisis de proteínas	151
2.2.1.	Electroforesis SDS-PAGE (Método de Laemmli)	151
2.2.2.	Electrotransferencia de proteínas. Western blot.	152
2.2.3.	Inmunodetección	152
2.3.	Ensayos de interacción proteína-proteína	154
2.3.1.	Interacción directa de proteínas recombinantes purificadas	154
2.3.2.	Ensayos de <i>Overlay</i>	155
2.3.3.	Ensayos de <i>Pull-Down</i>	155
2.3.4.	Ensayos de purificación con níquel-agarosa	156
2.3.5.	Coinmunoprecipitación	157
2.4.	Ensayos de sensibilidad a proteasas	157
2.5.	Ensayos de fosforilación	158
2.5.1.	Tirosina quinasas	158
2.5.2.	Serina/Treonina quinasas	158
2.6.	Ensayos de intercambio de GTP/GDP	159
3.	CULTIVOS CELULARES	159
3.1.	Líneas celulares utilizadas	159
3.2.	Condiciones de cultivo	160
3.3.	Contaje de células	160

3.4.	Congelación y almacenaje	160
3.5.	Transfecciones	161
3.6.	Preparación de extractos celulares	161
3.7.	Preparación de las células para fluorescencia	162
4.	REACTIVOS Y TAMPONES UTILIZADOS	163
5.	PLÁSMIDOS	168
5.1.	Vectores de expresión en procariotas	168
5.2.	Vectores de expresión en eucariotas	172
	ANEXO 2 LA FAMILIA DE QUINASAS SRC	177
	ANEXO 3 BIBLIOGRAFÍA	179

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La adhesión celular es crucial para que las células se agrupen formando tejidos y para ello han de interactuar entre ellas así como con el medio que las rodea (matriz extracelular). La matriz extracelular ayuda a las células y a los tejidos a mantenerse unidos, además de proporcionar una superficie por donde las células pueden migrar e interactuar unas con otras.

Las uniones celulares son unas modificaciones especializadas de la membrana plasmática que permiten la interacción célula-célula o célula-matriz extracelular. La función de dichas uniones es el anclaje de las células, el reconocimiento y la adhesión celular y su desestabilización facilita la desdiferenciación y la adquisición de la capacidad invasiva. Son especialmente abundantes en los tejidos epiteliales cuya transformación causa el 90 % de los cánceres en el hombre, aunque también se localizan en todos los tejidos.

En mamíferos la adhesión entre células epiteliales se produce mediante tres tipos diferentes de uniones: las uniones estrechas, las uniones adherentes y los desmosomas. Todas ellas constituyen los complejos de unión intercelular (ver **Figura 1**). Estos complejos están formados por receptores transmembrana, generalmente glicoproteínas, que interactúan con el citoesqueleto de la célula mediante su asociación a unas proteínas citoplasmáticas.

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.

Los desmosomas son un tipo de unión cuya 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 placoglobina, plakofilina y desmoplakina [1].

Las uniones adherentes son el tipo más abundante e importante de contacto célula-célula en tejidos epiteliales y su formación es necesaria para el establecimiento tanto de las uniones estrechas como de los desmosomas [2, 3]. Son importantes para el mantenimiento de la arquitectura tisular, la polaridad celular y el desarrollo del epitelio embrionario [4], además de poder limitar el movimiento celular y la proliferación [5]. Recientemente también se les ha otorgado un papel en la transmisión de información desde el exterior hacia el interior de la célula.

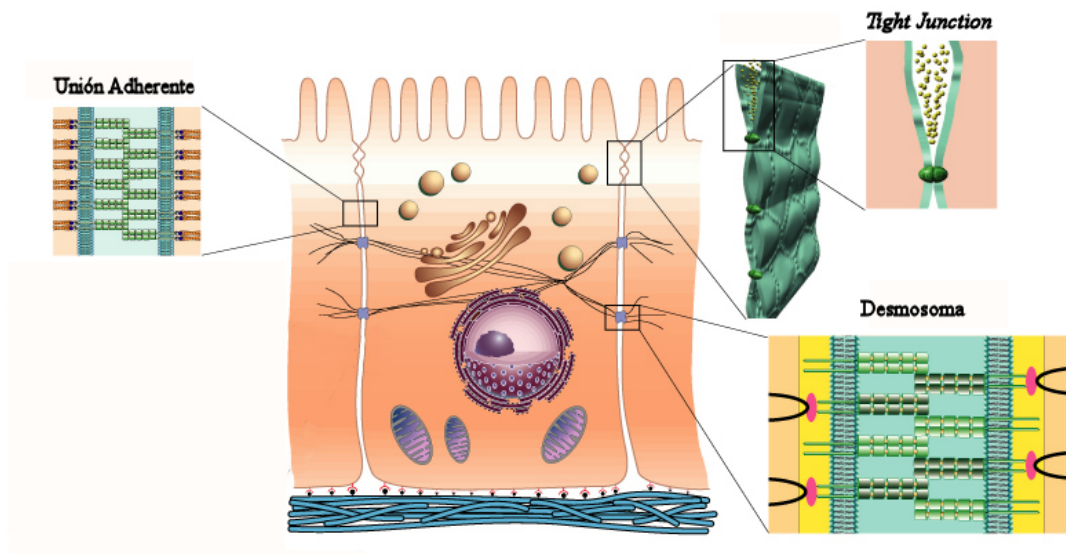


Figura 1. Representación de los tipos de uniones celulares en las células epiteliales.

Este tipo de unión está mediado por las cadherinas, proteínas transmembrana que forman interacciones homotípicas con cadherinas de células vecinas. Esta interacción tiene lugar entre los dominios extracelulares de las cadherinas y siempre en presencia de Ca^{2+} [6]. Existen muchos miembros de la superfamilia de las cadherinas pero la más estudiada es la E-cadherina, principal cadherina del tejido epitelial que

pertenece a la subfamilia de las cadherinas clásicas. Para la correcta funcionalidad de la E-cadherina ésta ha de interactuar con el citoesqueleto de actina (F-actina), pero esta interacción no es directa sino que está mediada por unas proteínas citosólicas denominadas cateninas: α , β [7]. De éstas, la α -catenina parece tener un papel más estructural siendo la encargada de unirse directamente a los filamentos de actina. El dominio citosólico de la E-cadherina no interactúa directamente con la α -catenina, sino que lo hace a través de la β -catenina. Así, β -catenina actúa como puente entre la E-cadherina y la α -catenina (ver **Figura 2**).

En condiciones en que se produce la pérdida de la funcionalidad de la E-cadherina y el desensamblaje de las uniones adherentes, se ha observado la fosforilación de la β -catenina en residuos tirosina, pero no de la α -catenina [8, 9]. La falta de β -catenina en embriones de ratón provoca su muerte prematura, justo tras la gastrulación [10].

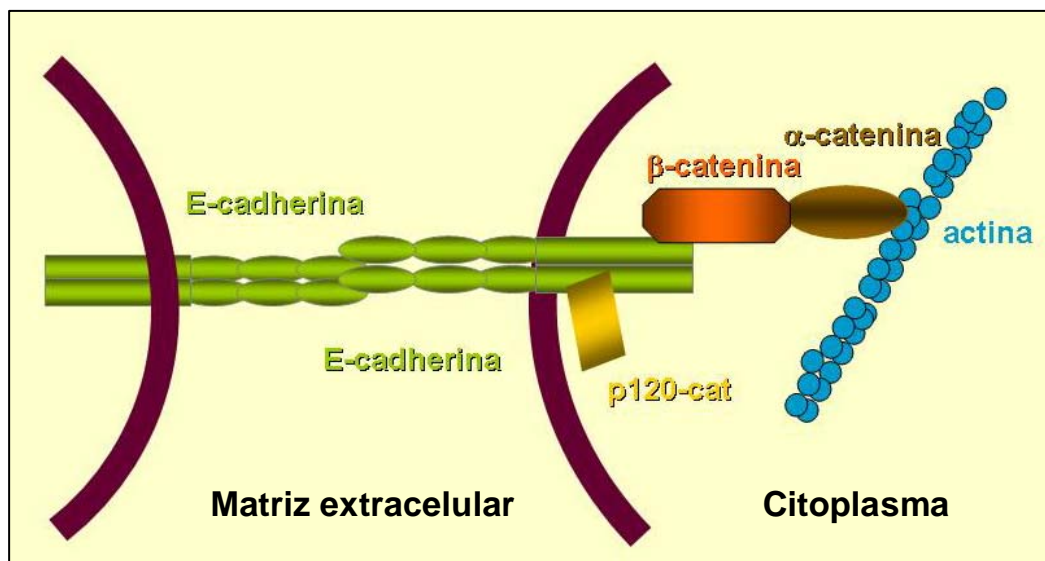


Figura 2. Esquema de las uniones adherentes.

El papel de la β -catenina como mediador entre la E-cadherina y la α -catenina puede ser ejercido por una proteína similar, denominada placoglobina (o γ -catenina), que también participa en otro tipo de uniones intercelulares, los desmosomas.

Existen otras proteínas asociadas a zonas diferentes del dominio citosólico de la E-cadherina, como la p120-catenina (revisado en [11]) implicada también en la regulación de las uniones adherentes [12]. Sin embargo la función exacta de la p120-

catenina en los complejos de adhesión no está del todo establecida. Se han sugerido efectos tanto negativos como positivos para la p120-catenina en la regulación de la adhesión celular [13]. Muy recientemente se ha descrito una interacción directa de Rho1 con p120-catenina y con α -catenina [14], implicando a esta GTPasa en la regulación de las uniones adherentes.

I.1. E-CADHERINA

I.1.1. Características generales

La E-cadherina, también denominada *uvomorulina*, fue descrita a principios de la década de los 80 por Jacob y colaboradores. Es la cadherina mejor caracterizada y fue la primera en describirse.

El gen de la E-cadherina (CDH1), localizado en el cromosoma 16q, codifica para una proteína de unos 120 kDa que se expresa muy temprano en células embrionarias, concretamente en la fase de mórula donde E-cadherina es indispensable para la compactación celular [15, 16]. También se expresa posteriormente durante el desarrollo embrionario [17], periodo en el que su expresión y función es esencial para la inducción y el mantenimiento de la polaridad celular [18].

La expresión y correcta funcionalidad de la E-cadherina es necesaria para que las células se mantengan unidas formando contactos y para la existencia de una arquitectura celular normal. Una pérdida de su expresión o de su función conduce a una pérdida de la adhesión celular y a un aumento de la capacidad invasiva de células tumorales *in vitro* [19]. Esta capacidad de la E-cadherina de mantener la adhesión entre las células es lo que le otorga la capacidad de actuar como un supresor de tumores [20, 21]. La importancia de su funcionalidad se pone de manifiesto en ratones *knockout* de E-cadherina. Estos ratones mueren en estadios muy tempranos del desarrollo embrionario [22], dificultando el estudio de la capacidad supresora de tumores de la E-cadherina.

I.1.2. Estructura

Estructuralmente la E-cadherina es una proteína transmembrana de tipo I formada por 883 aminoácidos. Posee un gran dominio extracelular formado por 5 subdominios de unión a Ca^{2+} . Estudios bioquímicos con la cadherina de *Xenopus* [23, 24] indican que la unidad funcional del dominio extracelular de la cadherina es el dímero lateral. La región responsable de esta dimerización homotípica se localiza en el extremo carboxilo terminal del primer dominio extracelular (EC1), que está formado por 40 aminoácidos (ver **Figura 3**). Así, en presencia de calcio extracelular, se establecen uniones homotípicas entre los extremos aminoterminales de los dímeros de cadherina de células vecinas, constituyendo una especie de cremallera entre células.

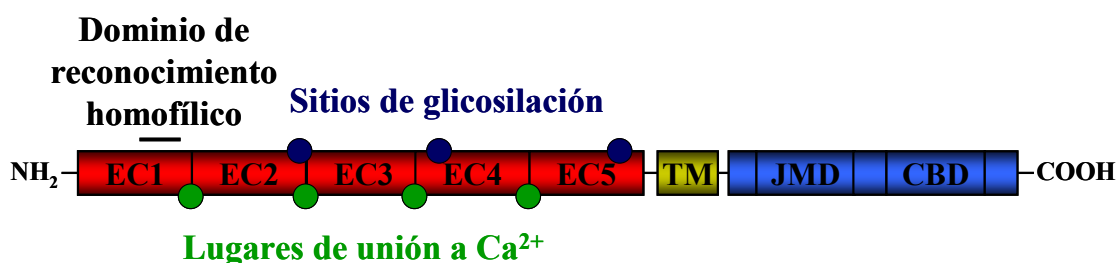


Figura 3. Diagrama de la E-cadherina.

El dominio citoplasmático, muy conservado y constituido por 150 aminoácidos, interacciona indirectamente con los filamentos de actina. Dentro de este dominio podemos diferenciar dos regiones:

- **Dominio de unión a las cateninas (CBD)**: (aa 628-723) por donde E-cadherina interacciona con β -catenina o placoglobina en proporción 1:1 y de manera mutuamente excluyente. La interacción de β -catenina con el dominio citoplasmático de la E-cadherina estabiliza dicho dominio, ya que en ausencia de β -catenina este dominio se encuentra desestructurado [25]. La fosforilación de serinas localizadas en esta región, por las quinasas CKII y GSK3 β , aumenta la afinidad entre la E-cadherina y β -catenina [26].

- **Dominio yuxtamembrana (JMD)**: (aa 604-615) región inmediatamente adyacente al dominio transmembrana. Es la región más conservada del dominio citoplasmático y por donde se une p120-catenina. Numerosos datos sugieren que este dominio contiene dos subregiones diferentes: una distal donde p120-catenina interactúa y otra proximal que estaría implicada en la dimerización de las cadherinas [13].

El dominio citoplasmático de la mayoría de las cadherinas, tanto de tipo I como II, contienen secuencias PEST. Son unas secuencias ricas en prolina, glutámico, serina y treonina, de una longitud que oscila entre 12 y 60 aminoácidos, además de ser motivos de degradación de proteínas vía ubiquitin/proteasoma [25]. Se extienden desde los aminoácidos 667 al 710 de la E-cadherina y se solapan con la zona de interacción de β -catenina [27]. Se ha hipotetizado que la interacción de β -catenina con E-cadherina secuestraría estas secuencias PEST haciéndolas inaccesibles para la maquinaria del proteasoma y evitando así la degradación de la E-cadherina [25].

I.2. β -CATENINA: UNA PROTEÍNA, DOS FUNCIONES

I.2.1. Características generales

El gen de β -catenina se localiza en el cromosoma 3p22, región del genoma humano que se encuentra alterado en una gran variedad de enfermedades [28]. Se trata de una proteína de 92 kDa que fue purificada de células epiteliales de *Xenopus* (A6) mediante coimmunoprecipitación con E-cadherina [29, 30]. Es una proteína que juega un papel central en numerosos procesos celulares además de ser miembro de la superfamilia “armadillo”. Este nombre deriva del homólogo de β -catenina en *Drosophila*, el gen de polaridad segmental armadillo, primer miembro descrito de esta familia [31]. Todas comparten un dominio central característico denominado dominio armadillo. A través de esta región central β -catenina forma complejos con numerosas moléculas. Cómo puede interactuar específicamente con cada una de las diferentes moléculas, qué dicta la abundancia relativa de β -catenina en cada complejo y cómo

estos complejos con β -catenina influyen en la adhesión, son preguntas importantes en los que centramos nuestro estudio.

I.2.2. Estructura

La estructura primaria de β -catenina (781 aminoácidos) consiste en tres dominios: un dominio N-terminal de unos 150 aminoácidos, un dominio armadillo central de 550 aminoácidos y un extremo C-terminal formado por unos 100 aminoácidos (ver **Figura 4**) [32].

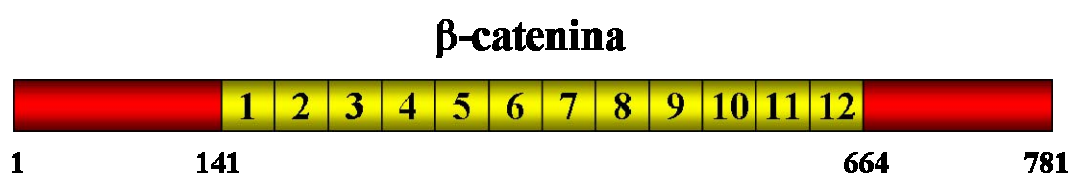


Figura 4. Representación esquemática de los dominios de β -catenina. En amarillo cada una de las repeticiones armadillo y en rojo los extremos terminales.

El extremo N-terminal contiene la zona de unión a α -catenina (aa 120-151) [33], así como sitios de fosforilación por la GSK3 β [34]. Por otro lado el extremo C-terminal es muy ácido y muchas proteínas de la maquinaria transcripcional interactúan en este dominio: la proteína de unión a la caja TATA (TBP) [35], la pontina [36], Teashirt [37], Sox 17 y 13 [38], SMAD4 [39] o la CREB [40, 41]. Además este dominio es esencial para la transcripción mediada por factores de transcripción de la familia Tcf/Lef [42, 43]. El extremo C-terminal de β -catenina, fusionado a Lef-1, es suficiente para promover transactivación de genes [44].

El dominio central o dominio armadillo, cristalizado en los últimos años por el grupo de Weis [45], comprende del aminoácido 141-664 (ver **Figura 5**). Se trata de una unidad muy estable y rígida formada por 12 repeticiones, imperfectas, de 42 aminoácidos cada una. La estructura cristalina revela que cada repetición consiste en tres pequeñas hélices α , denominadas H1, H2 y H3, excepto para la repetición 7, a la que le falta la hélice H1. Estas tres hélices forman con las hélices adyacentes una superhélice de hélices, cilíndrica y con un pronunciado giro de 50° entre las repeticiones 9 y 10. Esta superhélice forma un gran surco, 95 Å de largo y 20 Å de ancho, donde las cargas positivas de los residuos de las hélices H1 y H3 quedan expuestas hacia la

superficie de este surco (ver **Figura 6**). La profundidad de este surco aumenta entre las repeticiones 9 y 10 debido al giro entre estas dos regiones, lo que da lugar a un “bolsillo” cargado positivamente.

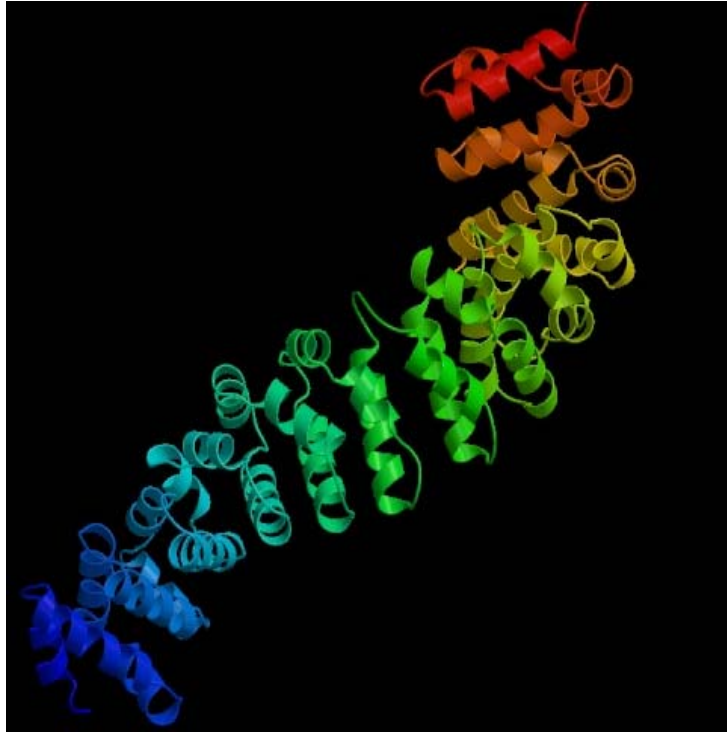


Figura 5. Estructura cristalográfica del dominio armadillo de β -catenina, Huber, 1997. La región cristalizada comprende los residuos 149 al 666.

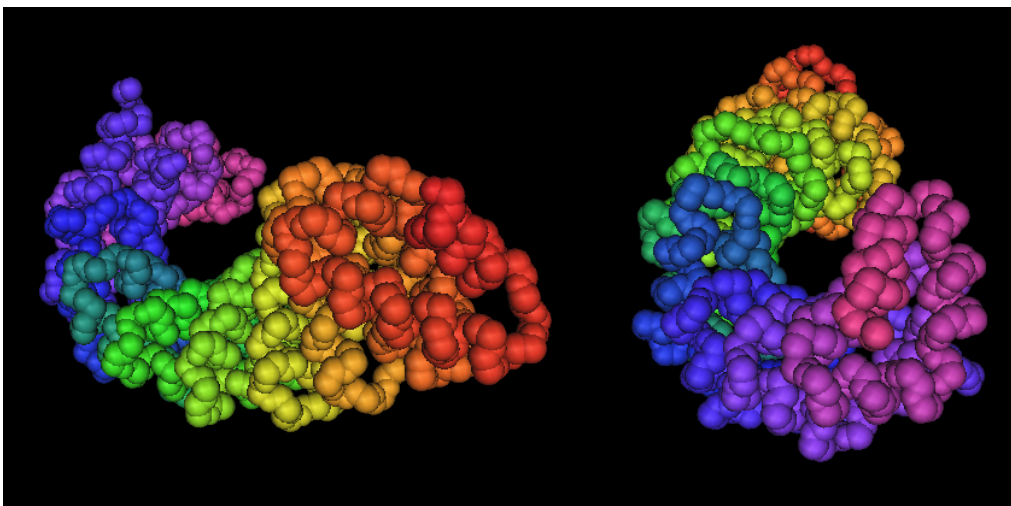


Figura 6. Modelo 3D de la estructura del dominio armadillo de β -catenina. Detalle del surco central. En la imagen de la izquierda se observa el dominio armadillo ligeramente lateralizado para apreciar el surco. La imagen de la derecha es una vista frontal del dominio armadillo.

Los dominios armadillo son dominios de interacción proteína-proteína y en el caso de β -catenina, de unión a múltiples ligandos tales como E-cadherina, Tcf/Lef, APC y axina, con los que forma complejos mutuamente excluyentes. Por lo tanto β -catenina utiliza la misma superficie para unirse a varios cofactores, pero sorprendentemente el dominio armadillo no sufre ningún cambio conformacional para adaptarse a los diferentes ligandos [46]. De estos resultados surgen diversas preguntas: ¿Cómo se regula la interacción de β -catenina con sus múltiples cofactores? ¿Qué es lo que le confiere la especificidad de unión hacia un cofactor u otro? Como ya se ha comentado β -catenina se estructura formando un gran surco positivo, mientras que los dominios de interacción de sus ligandos tienen una alta carga negativa [45]. Estos datos hicieron pensar que eran estas cargas positivas las que conferían a β -catenina la especificidad de unión a sus ligandos. Además, la mutación de residuos clave distribuidos a lo largo de dicho surco, ha desvelado la existencia de grupos de aminoácidos (*clusters*) que pueden afectar de manera diferente a la interacción de β -catenina con Tcf/Lef, APC, axina y E-cadherina [47, 48].

De manera interesante, mientras que estos estudios mutacionales parecen indicar que la interacción de β -catenina con sus ligandos depende de la interacción con unos residuos concretos, estudios tridimensionales de los complejos β -catenina/Tcf [48] o β -catenina/cyto-E-cadherina [27] parecen indicar otros mecanismos. Estos estudios indican que tanto la E-cadherina como el Tcf forman numerosas interacciones con β -catenina involucrando la práctica totalidad del dominio armadillo de β -catenina y en muchos casos utilizando los mismos residuos.

La interacción β -catenina/E-cadherina [27] se da en una amplia zona. Los cien residuos de la fracción citoplasmática de la cadherina rodean prácticamente la totalidad de las doce repeticiones del dominio armadillo de la catenina, estableciéndose cinco subregiones puntuales de mayor acercamiento entre ambas proteínas y de interacción casi-independiente (ver **Figura 7**). La gran extensión de esta interacción (6100 Å) permite explicar la gran afinidad de la interacción β -catenina/E-cadherina y porque esta interacción es resistente, en muchos casos, a cambios puntuales de aminoácidos de la zona de interacción (revisado en [46]).

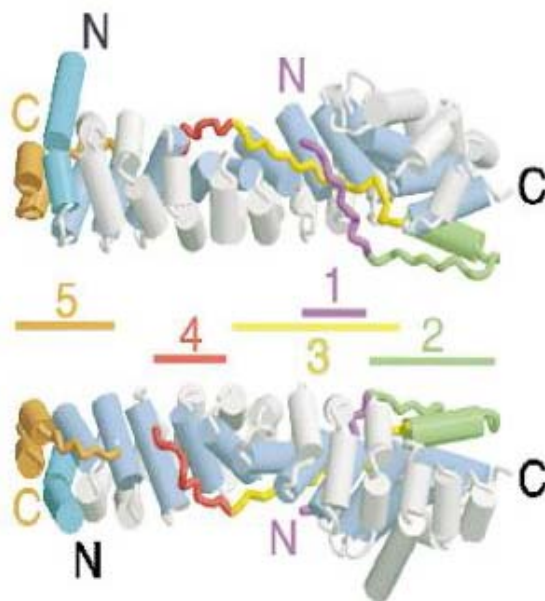


Figura 7. Estructura global del complejo cyto-E-cadherina/ β -catenina. β -catenina se representa con cilindros azules y blancos, mientras que el dominio citosólico de la E-cadherina se muestra como una cinta coloreada donde cada color marca una subregión distinta. La región IV, rica en serinas, ha de estar fosforilada para poderse detectar en el cristal, en caso no contrario no se observa en el cristal.

La región de interacción IV (aa 685-694) es una región rica en serinas que se encuentra conservada a lo largo de las cadherinas clásicas. Esta región es importante para la unión de β -catenina [46, 49] y en el cristal se encuentra desestructurada cuando no se fosforila. Esto es debido a que al fosforilar estos residuos serina aumenta la afinidad por la β -catenina y estabiliza dicha región [26].

Durante la realización de esta tesis también se ha obtenido la estructura cristalina de β -catenina unida a Tcf-3, otro factor de transcripción de la familia Tcf/Lef [48] (ver **Figura 8**).

De este estudio se desprende que la interacción del extremo amino terminal del Tcf-3 y el dominio central de β -catenina se da en una amplia zona. Los 60 aminoácidos del extremo N-terminal del factor de transcripción constituyen una elongada estructura que se extiende, antiparalelamente, a lo largo del surco cargado positivamente del dominio central armadillo de β -catenina. El análisis de los cristales obtenidos muestra que tres zonas de interacción del Tcf-3 (aa 7-15, aa 16-29 y aa 40-52), muy conservadas entre los miembros de la familia, se asocian a tres regiones principales de β -catenina (repeticiones armadillo 9-10, 5-8 y 3-4, respectivamente). Siendo los aminoácidos más

importantes para la interacción el Asp-16, Glu-24 y Leu-48 de Tcf-3 que se asocian con la Lys-435, Lys-312 y el bolsillo hidrofóbico creado por la Phe-253 y la Phe-293 de β -catenina, respectivamente. El estudio de esta asociación muestra que la región mínima de interacción del Tcf-3 con β -catenina corresponde a la comprendida entre los aminoácidos 16-29. Resultados de miembros de nuestro grupo que localizan la región de interacción con β -catenina en el extremo más terminal del Tcf-4 [50], concuerdan con estos estudios cristalográficos.

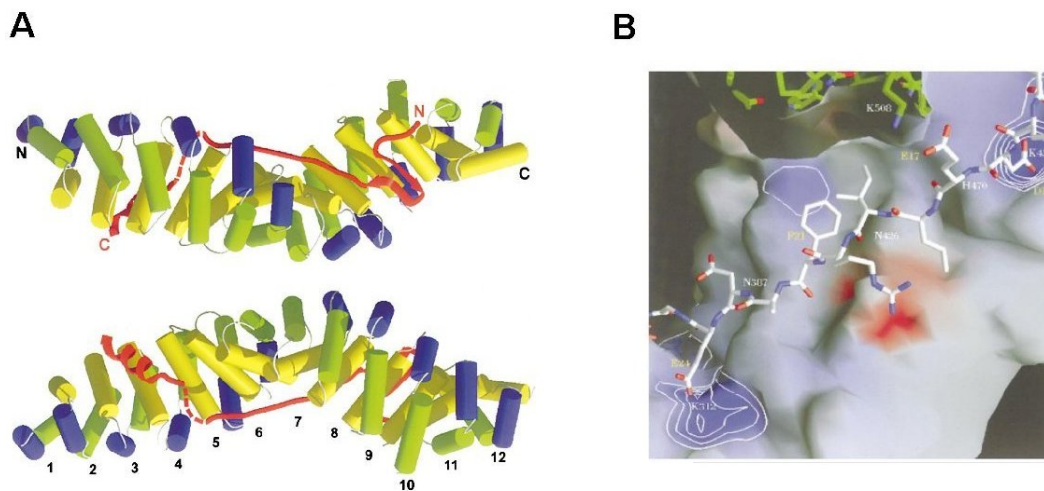


Figura 8. Estructura del complejo β -catenina/Tcf-3. (A) Estructura global del complejo visto desde dos ángulos distintos: β -catenina se representa con cilindros azules, verdes y amarillos, mientras que el extremo N-terminal del Tcf-3 se muestra como una cinta roja con los extremos N- y C- marcados. (B) Detalle de la región mínima de interacción donde se indican en blanco, los aminoácidos de β -catenina que establecen uniones con los residuos de Tcf-3 (amarillo). Se ha recortado la estructura de β -catenina (verde en la parte superior) para poder ver la interacción completa (adaptado de Graham et al. 2000).

Todos estos datos aportaban nuevas ideas pero no acababan de responder a todas las preguntas. De esta manera, al inicio de este trabajo, nuestra hipótesis de partida suponía que los extremos terminales (ácidos) podrían estar interaccionando con el dominio armadillo (básico) y limitar así la accesibilidad de los cofactores que se unen al dominio armadillo central. Modificaciones postraduccionales, por ejemplo fosforilaciones, alterarían la conformación de estos dominios terminales, lo que facilitaría o impediría (por repulsión electrostática) la interacción con los diversos ligandos de β -catenina.

I.2.3. Función

La función de β -catenina es crucial en dos importantes procesos del desarrollo: por un lado para el establecimiento y el mantenimiento de la adhesión celular en las uniones adherentes y por otro lado, en la regulación de la expresión génica a través de la ruta de Wnt. En cada una de estas dos funciones β -catenina debe de asociarse con múltiples proteínas para poder desarrollar correctamente su cometido.

➤ **β -catenina en las uniones adherentes**

La primera función atribuida a β -catenina fue la de proteína estructural constituyente de las uniones adherentes, actuando de puente entre la E-cadherina y la α -catenina. En este tipo de uniones el dominio citoplasmático de E-cadherina interacciona con la región central de repeticiones armadillo [51]. El dominio N-terminal de β -catenina (aa 120-151) interacciona a su vez con α -catenina. La zona de α -catenina suficiente para esta interacción se limita a los aminoácidos 117-143 [52].

La E-cadherina, después de su biosíntesis en el retículo endoplasmático, se asocia con la β -catenina y juntas se mueven hacia la superficie celular donde se asocian con la α -catenina [25, 53]. Cualquier fallo en la asociación de estas proteínas provocará que la E-cadherina quede retenida en el retículo y sea degradada.

➤ **β -catenina como coactivador transcripcional**

β -catenina tiene otro papel adicional en la célula. Así, cuando no está unida a la E-cadherina ni a la α -catenina, la β -catenina puede translocarse al núcleo, unirse a factores transcripcionales de la familia Tcf (Tcf-4 en el epitelio intestinal) e inducir la expresión de un amplio número de genes (ver **Tabla I**), muchos de ellos implicados en tumorigénesis (revisado en [54]); una lista completa de los genes activados por el complejo β -catenina/Tcf-4 se puede encontrar en la siguiente dirección: <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>. Contrariamente se ha determinado que la inhibición de la actividad transcripcional de este complejo produce parada del crecimiento o apoptosis, dependiendo del tipo celular y del resto de señales recibidas por la célula [55, 56].

El paso de β -catenina al núcleo está muy finamente regulado por la estabilidad de la β -catenina libre en el citosol (no unida a E-cadherina). Es en este paso en el que el producto del gen APC juega un papel clave, en el control de los niveles citosólicos de β -catenina, ya que es necesario para que la β -catenina libre pueda ser fosforilada en su extremo N-terminal y posteriormente degradada por el proteasoma.

La fosforilación de β -catenina ocurre en un complejo multiproteico formado por APC, la proteína acopladora axina que recluta la quinasa GSK3 β [57, 58] y la CKI α (ver **Figura 9**). Como resultado de la actividad de este complejo β -catenina es fosforilada inicialmente en la Ser 45 por la CKI α y secuencialmente por la GSK3 β en la Thr 41, Ser 37 y Ser 33 [59]. Como consecuencia de esta fosforilación β -catenina es poliubiquitinizada por la ubiquitina ligasa β -Trcp y posteriormente degradada por el proteasoma (revisado en [60]). La disminución de los niveles de CKI α inhibe la fosforilación y degradación de β -catenina y provoca una anormal embriogénesis asociada con una excesiva señalización Wnt/ β -catenina [59]. Existe un mecanismo de degradación de β -catenina diferente y 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 por GSK3 β y sin requerir la interacción de β -catenina con β -TrCP [61, 62].

Cuando este sistema de regulación se altera β -catenina no puede ser degradada y se transloca al núcleo por un mecanismo independiente a la acción de importinas/carioferinas [63]. Estas importinas son receptores nucleares de sustratos con secuencias de localización nuclear (NLS). Además, tienen dominios armadillo que interaccionan con las NLS, secuencias de las que β -catenina carece. Recientemente se han descrito dos proteínas que parecen ser necesarias para la localización nuclear de β -catenina; Legless (lgs; Bcl9-2 en humanos) y Pygopus (Pygo) [64]. Pygopus es constitutivamente nuclear y sirve de anclaje en el núcleo para β -catenina, mientras que Legless, que se mueve entre el citoplasma y el núcleo, introduce a β -catenina en el interior del núcleo (proporcionándole la NLS) [65].

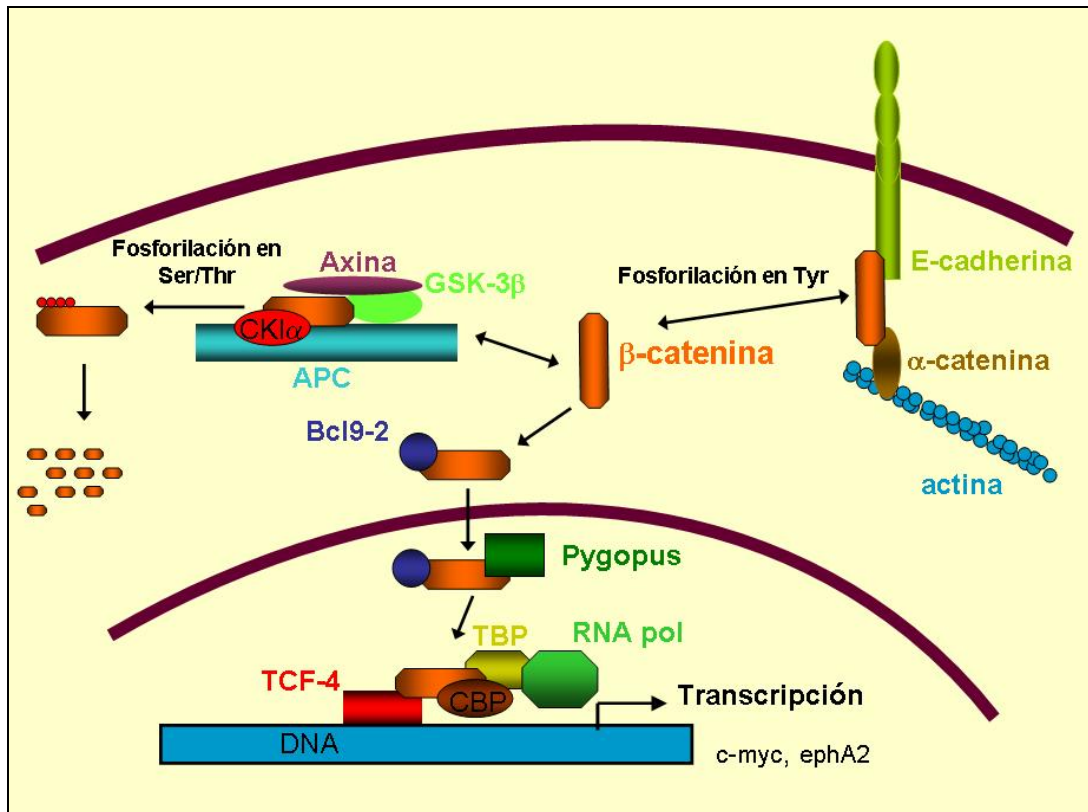


Figura 9. Representación de la ruta de degradación de β-catenina.

En el núcleo 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*) [42, 66, 67]. 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 [68]. Aunque por sí solos estos factores son capaces de unirse al DNA por sus dominios HMG, necesitan interactuar por su extremo amino terminal con la β-catenina para activar la transcripción de genes implicados en proliferación y diferenciación (ver **Tabla I**) (revisado en [54]). Uno de los papeles esenciales del complejo β-catenina/Tcf-4 consiste en reclutar coactivadores transcripcionales (p300/CBP) y complejos remodeladores de la cromatina (SWI/SNF, histonadeacetilasas) hacia los promotores de los genes sensibles a la activación de la ruta de señalización de Wnt. Un componente esencial de este complejo transcripcional es TBP, que interacciona con dos dominios distintos de β-catenina necesarios para la transactivación [35].

Gen	Función	Referencia
c-Myc	Proliferación	[69]
Ciclina D1	Proliferación	[70, 71]
Tcf-1	Diferenciación	[72]
PPARdelta	Proliferación/Diferenciación	[73]
c-jun	Diferenciación/Proliferación	[74]
fra-1	Diferenciación/Proliferación	[74]
uPAR	Adhesión/Migración/Invasión	[74]
matrilisina	Invasión/Migración	[75, 76]
Axina-2	Degradación de β -catenina	[77-79]
Nr-CAM	Adhesión/Proliferación	[80]
ITF-2	Proliferación/Diferenciación	[81]
Gastrina	Proliferación	[82]
CD44	Adhesión	[83]
EphB	Repulsión/Adhesión	[84]
BMP4	Diferenciación	[85]
claudina-1	Adhesión	[86]
VEGF	Proliferación	[87]

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.

Dada la naturaleza oncogénica de las diferentes dianas del complejo β -catenina/Tcf no es sorprendente que β -catenina sea considerada un oncogen [88, 89], mientras que axina y APC se consideran supresores de tumores [90]. Mutaciones en APC ocurren en más del 85% de los tumores colorectales, tanto esporádicos como heredados [91]. Adicionalmente, tumores con APC no mutada contienen mutaciones en otros componentes de la ruta Wnt, por ejemplo mutaciones en β -catenina que impiden que pueda ser fosforilada en serinas o treoninas y por lo tanto degradada [88, 92].

Entre los genes sensibles a β -catenina podemos destacar dos particularmente relevantes, la ciclina D1 y c-myc. Estos genes son responsables, respectivamente, de que las células tumorales proliferen más rápidamente y no sean susceptibles a procesos de diferenciación terminal [56, 71]. Otros genes sensibles a β -catenina parecen estar relacionados con estadios más avanzados dentro del proceso de tumorigénesis, como la proteasa matrilisina o CD44, que se han relacionado con procesos invasivos [76]. Esta acción pleiotrópica de β -catenina ha originado que la interferencia selectiva de su actividad transcripcional sea considerada como una diana prometedora para la acción de

compuestos con actividad antitumoral, posiblemente con alta eficacia y poca toxicidad [93, 94].

I.2.4. Vía de señalización Wnt

La vía de señalización Wnt interviene en el crecimiento celular, diferenciación, organogénesis y oncogénesis [60]. 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 α y GSK3 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 [95, 96].

Los factores Wnts son una familia de glicoproteínas (se han descrito 14 tipos 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 (CRD) por donde interaccionan con los factores Wnt y un extremo citoplasmático largo con dominios de interacción PDZ.

Como respuesta a Wnt se hiperfosforila dishevelled (Dsh), la cual 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 y por un mecanismo todavía desconocido, la quinasa GSK3 β se libera del complejo APC/axina/ β -catenina. En estas condiciones β -catenina no puede ser fosforilada en su extremo N-terminal dando lugar a la estabilización de este *pool* citoplasmático de β -catenina (revisado en [97]). Esta β -catenina libre se transloca a núcleo (ver **Figura 10**) promoviendo la transcripción de genes activados por el complejo β -catenina/Tcf-4.

Aunque el marco general de la ruta Wnt ya ha sido caracterizado siguen identificándose nuevos componentes que regulan la vía de señalización, tanto de forma positiva como negativa. Se ha identificado a LRP (LRP5/6), otro receptor transmembrana que puede asociarse con los receptores frizzled y que puede inactivar la GSK3 β [98].

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 [99]; la serina/treonina fosfatasa PP2A, que interacciona con la axina y APC e inhibe la vía a través de su subunidad reguladora B56 [100]; la quinasa CKII, un regulador positivo de la ruta que fosforila serinas/treoninas a dishevelled y β -catenina [101]. Recientemente se ha caracterizado Frodo, que mediante su asociación a dishevelled regula positivamente la señalización [102].

A nivel nuclear los correpresores 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) [103]; 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 [104].

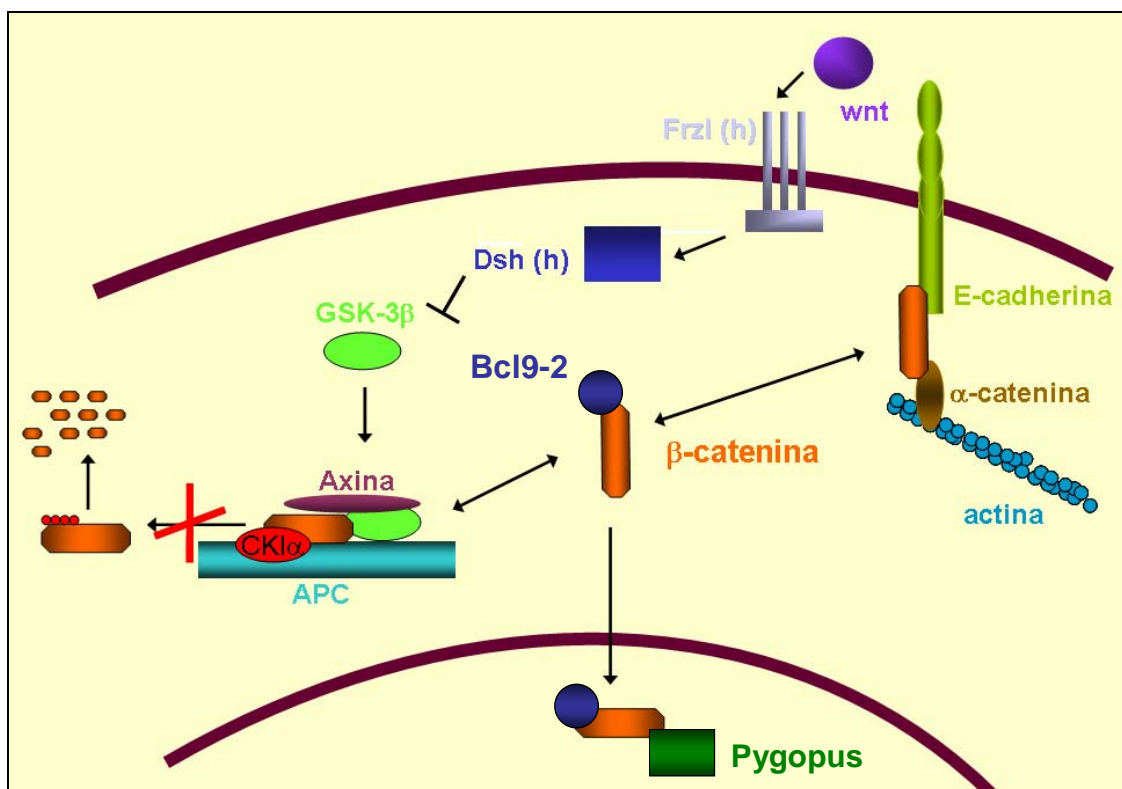


Figura 10. Esquema de la ruta Wnt.

I.3. p120-CATENINA: UN SUSTRATO DE SRC CONVERTIDO EN CATENINA

I.3.1. Características generales

La p120-catenina la describiré en detalle en la segunda parte de esta tesis doctoral. Comentaré aquí las características generales para poder entender mejor las uniones adherentes. La p120-catenina es una proteína estructuralmente similar a β -catenina y placoglobina que posee al igual que las anteriores, repeticiones de tipo armadillo. Identificada primero como sustrato de variantes oncogénicas de la tirosina-quinasa Src (v-Src) [105] y de varios receptores tirosina quinasa como los receptores de EGF, PDGF y CSF-1 [106], posteriormente se descubrió que formaba también parte del complejo cadherina-cateninas uniéndose a través de las repeticiones armadillo a la región citosólica de la E-cadherina en la zona más próxima a la membrana plasmática [107].

La p120-catenina es una proteína con diversas isoformas con un rango de peso molecular de 85 a 115 kDa. Estas isoformas derivan de un solo gen por procesamiento o *splicing* alternativo de dicho gen. 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.

La zona de unión de la p120-catenina al dominio citosólico de la E-cadherina se localiza en una zona mínima de unos 10 aminoácidos, adyacente a la membrana plasmática [108], sin competir con la unión de β -catenina, que interacciona con la cadherina más hacia el C-terminal de ésta. Recientemente también se ha encontrado que la p120-catenina interacciona con el complejo cadherina-cateninas de forma independiente de la E-cadherina. En *Drosophila* puede asociarse a la GTPasa Rho1, que a su vez interacciona con α -catenina en las uniones adherentes [14].

Existe una fuerte controversia sobre la funcionalidad de la p120-catenina en las uniones adherentes. Diversos autores sugieren que la p120-catenina podría jugar un papel en la regulación de la interacción y reagrupamiento lateral (*clustering*) de las cadherinas: 1-) Cadherinas delecionadas en el C-terminal, que no pueden unir β -

catenina ni establecer contactos con el citoesqueleto pero sí con p120-catenina, son capaces de inducir adhesión cuando se transfectan en células CHO [109]. 2-) La expresión en células de mutantes de E-cadherina que no pueden unir p120-catenina, provoca que no se puedan formar uniones tan sólidas como las que induce la expresión de E-cadherina salvaje en las mismas células [108]. Según estos datos las cadherinas primero se asociarían al citoesqueleto vía β - y α -catenina y posteriormente se agruparían y reforzarían su interacción vía p120-catenina. Por el contrario otros datos indican que también podría regular negativamente la función de E-cadherina; por ejemplo en células Colo205 (con el complejo cadherina-cateninas básicamente intacto) la hiperfosforilación de p120-catenina se correlaciona con la imposibilidad de formar uniones adherentes [110, 111], (revisado en [13]).

p120-catenina se ha localizado también en el núcleo [112] donde interacciona por su dominio armadillo al menos con Kaiso [113], un nuevo factor de transcripción del tipo BTB/POZ/ZF que ha sido descrito como represor transcripcional [114]. La interacción p120-catenina/Kaiso impide la unión de Kaiso al DNA [115].

I.4. α -CATENINA

I.4.1. Características generales

La α -catenina es una proteína citosólica de 102 kDa (5q21-q22) que contiene tres regiones de gran homología a vinculina (proteína que une F-actina). Tiene dos isoformas específicas de nervio y epitelio, denominadas N o E- α -catenina, generadas por *splicing* alternativo de su RNA [116]. Recientemente se ha caracterizado una tercera isoforma, la T- α -catenina, predominante en testículo y corazón [117].

I.4.2. Estructura

α -catenina se presenta como homodímero en solución y se disocia para unirse 1:1 por su extremo amino terminal con β -catenina o placoglobina [118]. La resolución de la estructura tridimensional del complejo constituido 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 [119]. 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 (ver **Figura 11**).

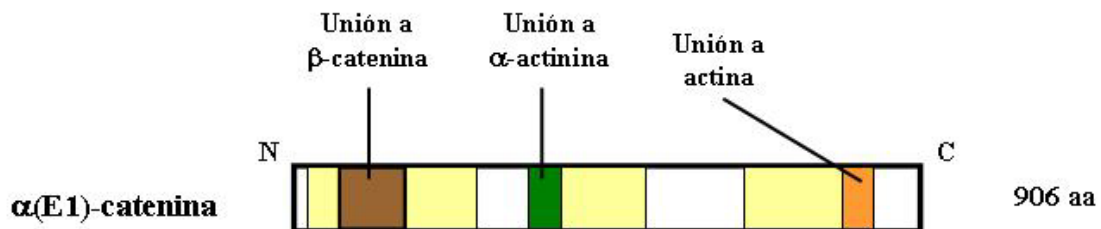


Figura 11. Esquema de α -catenina: *E* epitelial.

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, α -actinina, ZO-1 o ZO-2 [120, 121]. Las interacciones que α -catenina establece con el citoesqueleto varían específicamente según el tipo celular analizado.

I.4.3. Función

α -catenina es imprescindible para el correcto establecimiento de las uniones adherentes. Se ha descrito que la expresión de una forma de α -catenina delecionada, incapaz de unir β -catenina, comporta la imposibilidad de formar uniones adherentes correctas [122]. Del mismo modo condiciones que inducen la disociación de α -catenina de los complejos de adhesión provocan la pérdida de los contactos celulares [123]. 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 [124].

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 [125]. La sobreexpresión de α -catenina tiene efectos anti-proliferativos, inhibiendo básicamente la transcripción mediada por β -

catenina; el exceso de α -catenina parece unir la β -catenina libre e impedir que ésta interaccione en el núcleo con el factor de transcripción Tcf-4 [126]. La eliminación condicionada del gen de α -catenina induce hiperproliferación en células de la piel [127] y defectos en el gen de α -catenina, que conllevan importantes reducciones en la expresión de la proteína, se encuentran en varias líneas cancerosas [116, 128, 129] y tumores primarios [130]. En algunos tipos de cáncer, la pérdida de la expresión de α -catenina se correlaciona con el grado de infiltración y metástasis [131]. 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 [132].

I.5. REGULACIÓN LAS UNIONES ADHERENTES

Las interacciones entre las células y en concreto las uniones adherentes no son estáticas, sino que son muy dinámicas y están finamente reguladas tanto en el espacio como en el tiempo para permitir la correcta funcionalidad de los órganos y tejidos.

Las uniones adherentes se regulan a nivel transcripcional y también por cambios post-transcripcionales (fosforilaciones) que alteran la estabilidad de dichos complejos. Esta última se trata de una regulación más dinámica, que permitirá cambios rápidos en las interacciones celulares.

E-cadherina es considerada ampliamente como un supresor de tumores, ya que su expresión se encuentra frecuentemente disminuida o totalmente bloqueada en tumores como el carcinoma gástrico o el cáncer lobular de mama [20]. En tumores colorectales la parte central del tumor presenta E-cadherina unida a β -catenina, pero en el frente del tumor no se detecta E-cadherina [133]. La E-cadherina es la principal molécula de adhesión, por lo que su regulación es muy importante. Cambios en su expresión contribuyen a la progresión tumoral. La regulación principal de la E-cadherina ocurre a nivel de expresión génica que regula la cantidad y el tipo de cadherinas expresadas, determinando así la fuerza de la adhesión [134], también existe una regulación a nivel post-transcripcional. Recientemente se ha descrito que el dominio citosólico de E-cadherina puede fosforilarse en serinas por la CKII aumentando su afinidad por β -catenina [26].

Se ha demostrado que tanto β -catenina como p120-catenina se asocian y/o son sustrato de quinasas como Src, el receptor de EGF, HGF, PDGF y erbB2 [135-138] y que la estimulación de estas quinasas está implicada en la regulación negativa de las uniones adherentes [8, 139, 140]. De esta manera el aumento de fosforilación de la β -catenina en residuos tirosina se correlaciona con el desensamblaje de las uniones adherentes [141].

Concretamente, estudios previos de nuestro grupo han permitido evidenciar que la asociación de la E-cadherina con la β -catenina, y de ésta con la α -catenina, se regula por fosforilación de β -catenina en residuos específicos de tirosina. Hemos identificado que la tirosina 654 de β -catenina, localizada en la última repetición armadillo, es relevante para modular su interacción con E-cadherina [142-144]. La β -catenina fosforilada en la tirosina 654 presenta una afinidad muy baja por la E-cadherina, de modo que al no interactuar con el citoesqueleto de actina se produce el desensamblaje de las uniones. La fosforilación de este residuo está catalizada en células epiteliales y de melanoma por tirosina quinasas como el receptor EGF o erbB2 y menos eficientemente por Src. Estos mismos estudios nos permitieron observar que en el caso de p120-catenina, la fosforilación por la quinasa Src incrementa en este caso su afinidad a E-cadherina [142].

La zona de β -catenina que interviene en la interacción con α -catenina comprende los aminoácidos del 120 al 151 [33]. La tirosina 142 es la única tirosina de β -catenina situada en la zona de interacción con α -catenina, concretamente entre el final del dominio N-terminal y la primera repetición armadillo de β -catenina (ver **Figura 12**). Nuestro grupo se planteó estudiar si la unión de β -catenina con α -catenina estaba también regulada por fosforilación en tirosinas. Los resultados mostraron que efectivamente la fosforilación de este residuo regula la interacción entre β -catenina y α -catenina. Además, la cristalización del complejo de α -catenina/ β -catenina [119] muestra que la tirosina 142 de β -catenina es necesaria para estabilizar el complejo (ver **Figura 12B**). La fosforilación de este residuo por quinasas como Fyn o Fer bloquea la interacción α -catenina/ β -catenina. [145]; además hemos determinado que esta fosforilación ocurre en condiciones experimentales que comportan una pérdida de interacción α -catenina/ β -catenina (como en células epiteliales transformadas con K-ras) [145].

Existe una gran variedad de tirosina fosfatasas que se asocian al complejo de adhesión, muchas de las cuales se unen y defosforilan β -catenina (LAR, PTP κ , PTP λ) [146, 147]. Cada una de estas fosfatasas actúa en unos contextos temporales, espaciales y fisiológicos específicos, con el objetivo de mantener o restablecer la integridad de la adhesión mediada por cadherinas. Recientemente se ha descrito que la fosfatasa PTP-1B interacciona con las cadherinas en los complejos de adhesión. La unión de esta fosfatasa a las cadherinas depende de la fosforilación de la tirosina 152 de la fosfatasa, la quinasa encargada de fosforilar este residuo es Fer. La fosforilación de este residuo permite que la PTP-1B interaccione con el dominio citosólico de la E-cadherina, donde mantendrá a la tirosina 654 de β -catenina en un estado defosforilado [148].

Además de la fosforilación en tirosinas también existe una regulación a nivel de fosforilación en serinas y treoninas. El complejo cadherina/ β -catenina es estabilizado por la fosforilación de E-cadherina en las serinas 684, 686 y 692 (localizadas en las regiones de interacción E-cadherina/ β -catenina III y IV) [149]; datos estructurales revelan que estos residuos sólo interaccionan con β -catenina cuando están fosforilados [27]. También CKII fosforila el extremo N-terminal de β -catenina (Ser-29, Thr-102 y Thr-112) y facilita su degradación vía proteasoma actuando sinérgicamente con la GSK3 β [150].

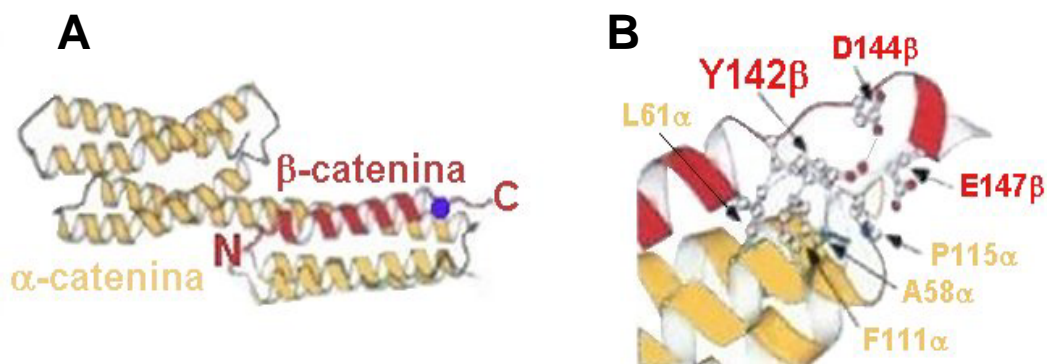


Figura 12. Estructura del complejo α -catenina/ β -catenina. (A) Representación esquemática de la interacción β -catenina/ α -catenina. En rojo se representa la β -catenina y el punto azul marca la tirosina 142. En amarillo se representa la región N-terminal de α -catenina. (B) Detalle de la zona de interacción entre α -catenina (en amarillo) y β -catenina (en rojo). Se muestran en color rojo los aminoácidos de β -catenina implicados en la interacción, y en amarillo los de α -catenina (adaptado de Pokutta y Weis, 2000).

Existe otro tipo de regulación de las uniones adherentes diferente a los descritos hasta ahora. Se trata del papel de las GTPasas en la funcionalidad de los complejos de adhesión. Hay estudios que indican que las GTPasas de la familia Rho (Rac, Rho y Cdc42) están implicadas en la adhesión mediada por las cadherinas [151]. En esta regulación tiene un papel relevante la p120-catenina. Existen trabajos que relacionan a p120-catenina como un modulador de la actividad de Rho [14], originando así otro mecanismo de regulación de las uniones adherentes. La segunda parte del estudio desarrollado en esta tesis se centró en estudiar el posible papel de RhoA y p120-catenina como reguladores de las uniones adherentes y que más adelante explicaré con mayor detalle. Además, Cdc42 y Rac1 regulan indirectamente la actividad de la E-cadherina [151]. 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 [152, 153].

ANTECEDENTES

Uno de los objetivos principales de nuestro grupo ha sido caracterizar la regulación de las uniones adherentes. En este sentido, en el momento de iniciar esta tesis doctoral, nuestro grupo había descrito que la interacción de E-cadherina con la β -catenina estaba regulada por fosforilación en tirosinas. En concreto, la fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina inhibía la interacción entre ellas.

β -catenina interacciona con múltiples proteínas a través de su dominio armadillo. Una de ellas, la TBP (proteína de unión a las cajas TATA) interacciona en la región de β -catenina donde se encuentra la tirosina 654 [35], pero en este caso la fosforilación de este residuo favorecía la interacción TBP/ β -catenina [143].

Estos resultados indicaban que la fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina tiene efectos opuestos sobre la interacción con E-cadherina y con TBP. Mientras que en un caso inhibe la interacción de β -catenina con E-cadherina, en el caso de la TBP potencia la unión.

Nos planteamos investigar las bases estructurales de estas diferencias. Como se ha comentado en la *Introducción*, en β -catenina se distinguen tres regiones principales. Estos dominios tienen una distribución de cargas distinta: los extremos N- y C-terminales, son ácidos, con un pI cercano a 4,5; mientras que el dominio central de repeticiones armadillo, es básico, con un pI de 8,3 [45]. Se hipotetizaba entonces, que el extremo C-terminal de β -catenina podría interactuar con el dominio armadillo [154].

Se realizaron en el grupo ensayos de interacción de β -catenina con TBP y E-cadherina utilizando la β -catenina *wild type* y una construcción de β -catenina que carecía de ambos extremos terminales, sólo tenía el dominio armadillo. El resultado fue que tanto en el caso de E-cadherina como de la TBP la ausencia de los extremos terminales facilitaba la interacción de estas proteínas con el dominio armadillo de β -catenina.

Estos resultados sugerían que los extremos terminales estaban dificultando la interacción de factores con el dominio armadillo. Así que empezamos a estudiar la interacción de los extremos terminales de β -catenina con el dominio armadillo y como estos extremos podían regular la interacción de β -catenina con diferentes proteínas.

OBJETIVOS

Los objetivos iniciales que nos planteamos al empezar este trabajo pueden resumirse en:

- 1) Estudiar y caracterizar la posible interacción de los extremos terminales de β -catenina con el dominio armadillo central de esta proteína.
- 2) Estudiar el posible papel modulador de los extremos terminales en la interacción de β -catenina con sus ligandos.
- 3) Analizar si existe algún tipo de interconexión entre los extremos terminales de β -catenina.

RESULTADOS

I.1. INTERACCIÓN DE LOS EXTREMOS TERMINALES DE β -CATENINA CON EL DOMINIO ARMADILLO

I.1.1. El extremo C-terminal interacciona con el dominio armadillo de β -catenina

El primer paso fue comprobar si realmente los extremos terminales de β -catenina interaccionaban con el dominio armadillo. Para ello se realizaron ensayos de interacción *in vitro* con proteínas recombinantes purificadas. Se incubó el dominio armadillo unido a GST para facilitar su purificación con Glutathion-Sepharosa, con el extremo C-terminal de β -catenina (696-end). Como se muestra en la **Figura 13** (carril 2) se observó, con un anticuerpo que reconoce un epítipo del extremo C-terminal de β -catenina, que este extremo interaccionaba con el dominio armadillo.

La fosforilación del dominio armadillo de β -catenina por la quinasa Src disminuyó la interacción entre el dominio C-terminal y el armadillo (ver **Figura 13**, carril 3). La única tirosina que Src fosforila en el dominio armadillo es la 654 y consecuentemente, el extremo C-terminal también interaccionó mejor con el dominio armadillo *wild type* que con el dominio armadillo con la mutación Tyr-654 a glutámico (**Figura 13**, carril 4).

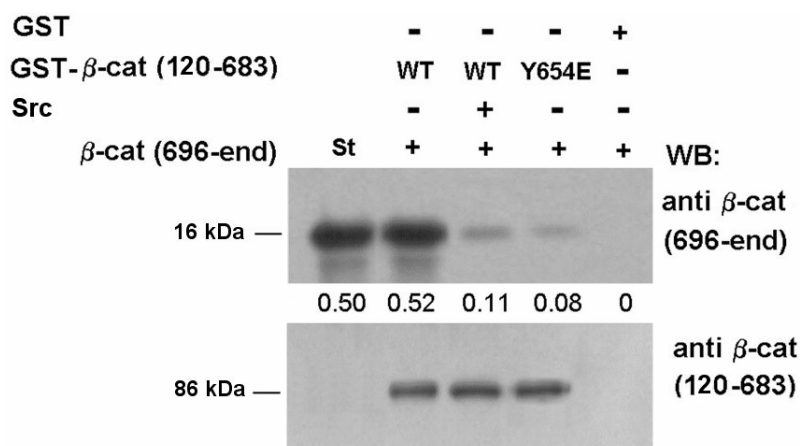


Figura 13. El extremo C-terminal interacciona con el dominio armadillo de β -catenina. 9 pmoles de proteínas de fusión con GST conteniendo las formas de β -catenina que se indican, fueron incubadas con 30 pmoles del dominio C-terminal (696-781) en las condiciones descritas en *Métodos*. Las muestras se procesaron y fueron analizadas mediante el uso de anticuerpos específicos. Los valores indicados debajo de la figura representan la cantidad de proteína unida; estos valores fueron calculados comparando los resultados con unas cantidades conocidas de proteína usadas como patrones internos (St), en este caso 0.5 pmoles de β -catenina (696-end).

I.1.2. Los último 20 residuos de β -catenina (aa 760-781) son suficientes para la interacción del extremo C-terminal con el dominio armadillo

En el transcurso de estos experimentos se publicó la estructura cristalina del complejo cyto-E-cadherina/dominio armadillo de β -catenina [27] (ver **Figura 14**). El análisis de los cristales obtenidos muestra que, tal como se había descrito previamente en el grupo [142], el residuo Tyr-654 es importante para esta interacción, ya que establece un par iónico con el Asp-655 de E-cadherina. Es lógico pensar que la fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina introduce una carga negativa que impide, por repulsión electrostática, la interacción con la E-cadherina.

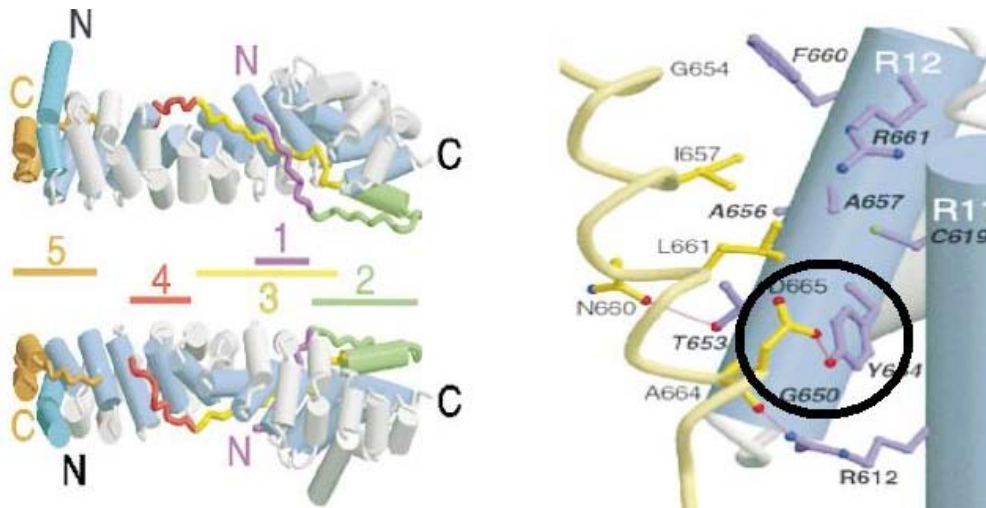


Figura 14. Esquema de β -catenina donde se muestran las zonas de interacción con E-cadherina. La E-cadherina interactúa con el dominio armadillo de β -catenina a través de cinco regiones. También se muestra el detalle de la región de interacción denominada II donde se indican en violeta los aminoácidos de β -catenina que establecen uniones con residuos de E-cadherina -en amarillo-. Se destaca la posición de la tirosina 654. Los puentes de hidrógeno y salinos se muestran como líneas rosadas. (Adaptado de Huber and Weis, 2001).

A partir de la estructura cristalográfica comprobamos que los residuos 655-677 de la E-cadherina se unen específicamente al dominio armadillo, de la repetición 12 a la 7 [27]. Concretamente los residuos Ile-657, Leu-661, Asp-665, Tyr-673, Asp-674, Ser-675 y Leu-677 de la E-cadherina, interactúan con los residuos Ala-656, Tyr-654, Arg-474, Lys-435, Arg-469 y Asn-426 del dominio armadillo, respectivamente. A partir de estos datos y por homología de secuencia vimos que estos aminoácidos de la E-cadherina, los cuales son relevantes para su interacción con el dominio armadillo de β -catenina, están conservados en los últimos 20 residuos β -catenina (aa 760-781) (ver **Tabla II**).

β -cat (760-end)	Q D L M D G L P P G D S N Q L A W - F D T D L
E-cadh (655-677)	N F I D E N L K A A D S D P T A P P Y D S L L - - - - -
	 A ₆₅₆ A ₆₅₆ Y ₆₅₄ K ₄₃₅ R ₄₇₄ R ₄₆₉ N ₄₂₆
Interacción con el dominio armadillo	

Tabla II. Analogía entre la secuencia de unión al dominio armadillo de E-cadherina y el extremo C-terminal de β -catenina.

Esta homología de secuencia nos llevó a pensar que quizás los últimos 20 aminoácidos de β -catenina (760-781) podrían interactuar con el dominio armadillo, de la misma manera que lo hace el fragmento 655-677 de E-cadherina. Para comprobar esta hipótesis se incubaron los diferentes fragmentos del extremo C-terminal con el dominio armadillo unido a GST.

Los resultados mostraron que la delección de los últimos 21 residuos de β -catenina, C-tail (696-750), disminuía notablemente la unión al dominio armadillo (**Figura 15A**, comparar carriles 6 y 3 del panel superior). Estos datos se vieron reforzados por experimentos en los que el péptido correspondiente a estos últimos 21 aminoácidos (760-781), era capaz de unirse por si solo al dominio armadillo (**Figura 15B**, carril 3) y competir con el extremo C-terminal (696-end) por la unión al dominio armadillo (**Figura 15C**, carril 4).

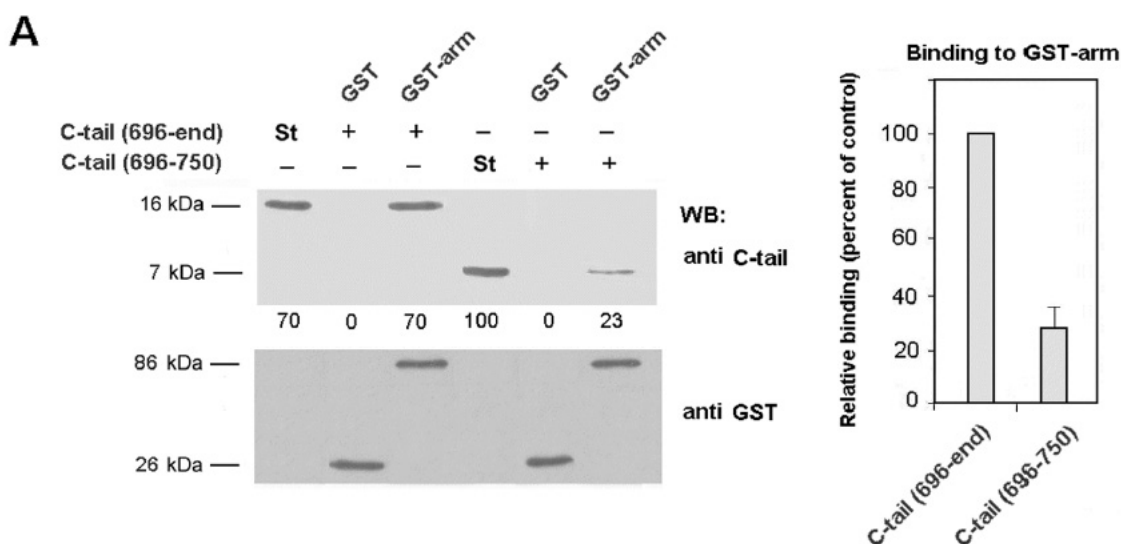
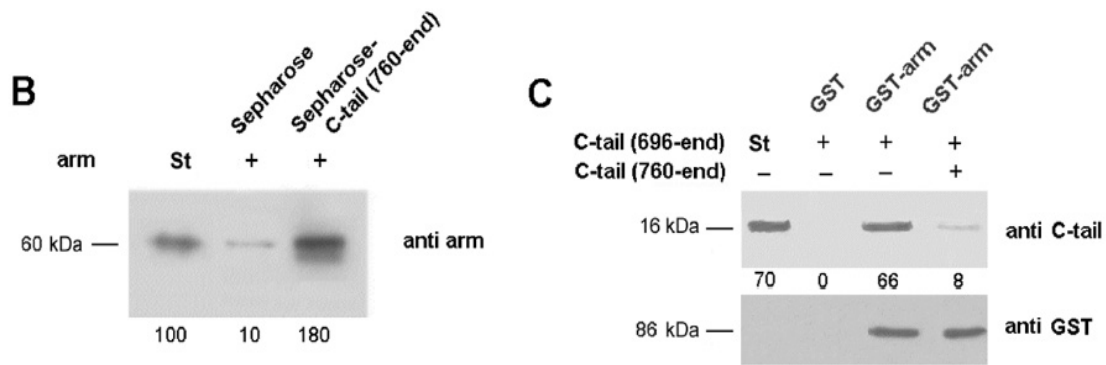


Figura 15. El extremo C-terminal interactúa con el dominio armadillo de β -catenina. (A) 83 pmoles de los fragmentos C-terminales fueron incubados con 3,5 pmoles de GST-arm o GST sola como control, tal como se describe en los *Materiales y Métodos*; (B) 8,3 pmoles del dominio armadillo fue incubado con 1 mg del extremo C-terminal (760-end) unido a Glutathion-Sepharosa o con la misma cantidad de Glutathion-Sepharosa sola; (C) Este ensayo se realizó en las mismas condiciones descritas en (A), pero con un exceso de 100 veces molar del extremo C-terminal (760-end) cuando se indica. Los valores indicados debajo de cada figura representan la cantidad de proteína unida en fmoles; estos valores fueron calculados comparando los resultados con unas cantidades conocidas de proteína usadas como patrones internos (St). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. La figura también muestra unos gráficos donde se muestra la desviación de la unión relativa encontrada en los tres experimentos.



I.1.3. La unión de E-cadherina a β -catenina facilita la digestión del extremo C-terminal con carboxipeptidasa Y

Estos resultados mostraban que los últimos aminoácidos del extremo C-terminal de β -catenina interaccionaban con el dominio armadillo, posiblemente en la misma región donde lo hacía la E-cadherina. ¿Competirían el extremo C-terminal y E-cadherina por su unión al dominio armadillo? En este caso se realizaron ensayos de digestión con carboxipeptidasa Y. Esta proteasa comienza a digerir por el extremo de C-terminal de la proteína, de modo que si la presencia de E-cadherina desplazase al extremo C-terminal de su unión al dominio armadillo, éste sería ahora más accesible a la proteasa y por lo tanto aumentaría la velocidad de digestión y también la desaparición del epítipo.

Se incubó β -catenina con E-cadherina (y α -catenina) o con cantidades equivalentes de una proteína irrelevante. Posteriormente se estudió la digestión mediante el uso de un anticuerpo específico para un epítipo localizado al final del extremo C-terminal de β -catenina (769-781). Como muestra la **Figura 16** la unión de E-cadherina a β -catenina (panel 2) claramente favorece la degradación de este epítipo por la carboxipeptidasa Y, evidenciando que el epítipo era más accesible a la proteasa. Este resultado indicaba que el extremo C-terminal y E-cadherina competían por su unión al dominio armadillo, siendo más eficiente la unión de E-cadherina. La unión de α -catenina también favorecía ligeramente la digestión por carboxipeptidasa Y (panel inferior).

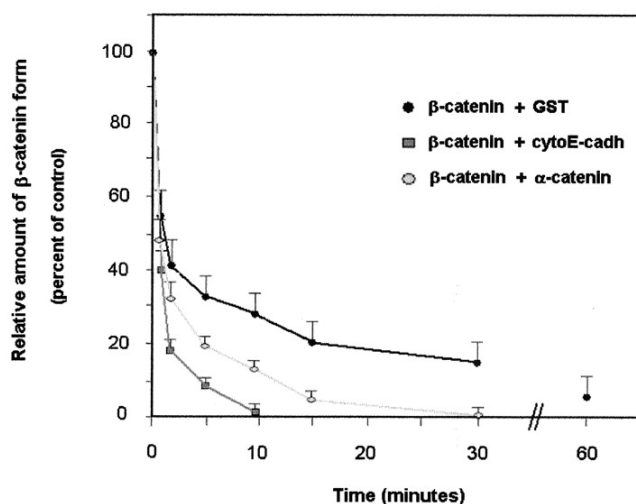
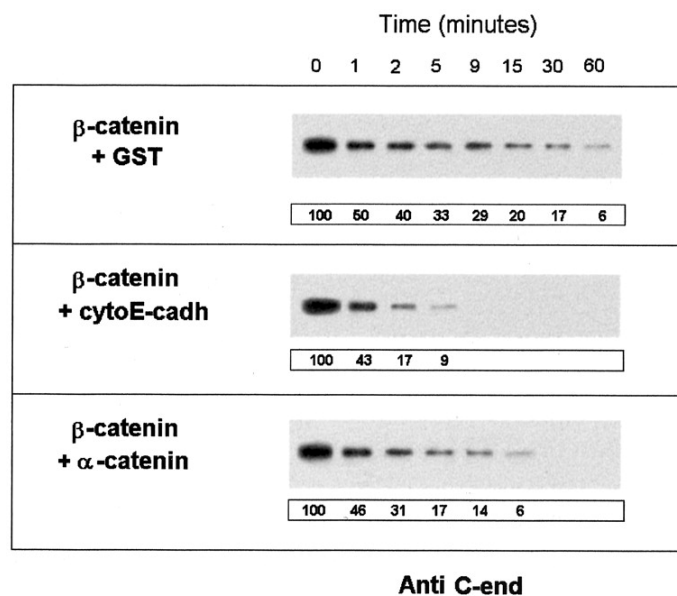


Figura 16. Digestión de β -catenina con carboxipeptidasa Y. 17 pmoles de β -catenina salvaje fueron incubados en presencia de 51 pmoles de GST, E-cadherina o α -catenina con 17,5 ng de carboxipeptidasa Y a 25 °C. Los valores indicados debajo de cada figura representan la cantidad en tanto por ciento del epítipo de β -catenina sin degradar después del tratamiento con carboxipeptidasa. Se representa también la desaparición del epítipo en función del tiempo.

I.1.4. El extremo N-terminal también interacciona con el dominio armadillo

Siguiendo con la misma idea de demostrar que son los extremos terminales los que regulan la interacción de β -catenina con sus cofactores y una vez demostrado que el extremo C-terminal interaccionaba con el dominio armadillo, el siguiente paso fue comprobar si el extremo N-terminal (1-106) también interaccionaba con el dominio

armadillo. Para ello se llevaron a cabo ensayos de interacción *in vitro* del extremo N-terminal (1-106) con el dominio armadillo (120-683) de β -catenina.

Se utilizó la misma metodología utilizada para el extremo C-terminal, pero en este caso el extremo N-terminal estaba unido a GST e incubamos con el dominio armadillo. Se detectó la interacción mediante un anticuerpo que reconoce específicamente el dominio armadillo. Los resultados indicaron que el extremo N-terminal también interaccionaba con el dominio armadillo (**Figura 17**, carril 2).

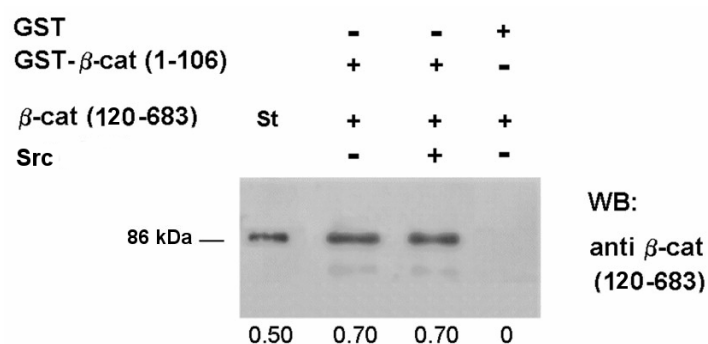


Figura 17. El extremo N-terminal interacciona con el dominio armadillo de β -catenina. 8 pmoles de GST- β -catenina (1-106) se incubó con 2 pmoles del dominio armadillo (120-683). Las muestras se procesaron y fueron analizadas mediante el uso de anticuerpos específicos. Los valores indicados debajo de la figura representan la cantidad de proteína unida; estos valores fueron calculados comparando los resultados con unas cantidades conocidas de proteína usadas como patrones internos (St), en este caso 0.5 pmoles de β -catenina (120-683). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Del mismo modo que con el extremo C-terminal, se determinó si la fosforilación de la tirosina 654 por Src, localizada en la última repetición del dominio armadillo, podía afectar la interacción con el extremo N-terminal (a pesar de interaccionar en una zona alejada de la fosforilación). Pero a diferencia del caso anterior no se pudo observar ningún efecto (**Figura 17**, carril 3).

I.1.5. La fosforilación en tirosinas del extremo N-terminal modifica la interacción de éste con el dominio armadillo

Como ya se ha mencionado Src fosforila, *in vitro*, las tirosinas 86 y 654 de β -catenina [142]. La fosforilación de la tirosina 654 no tiene ningún efecto sobre la interacción del extremo N-terminal y el dominio armadillo. Pero quisimos determinar la

relevancia de la fosforilación de la tirosina 86 en esta unión. Para ello se analizó la interacción del extremo N-terminal, *wild type* o el mutante puntual Y86E, con el dominio armadillo.

Como se muestra en la **Figura 18** el mutante puntual Y86E en el extremo N-terminal (1-106), tiene mayor afinidad por el dominio armadillo que la forma *wild type* del extremo N-terminal.

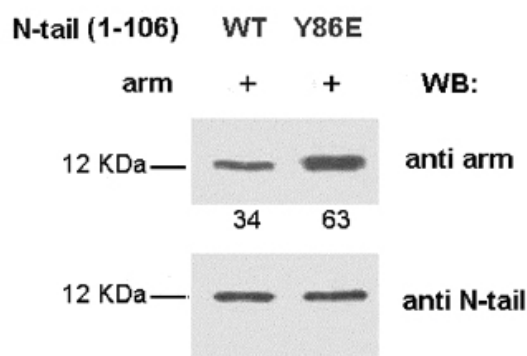


Figura 18. Interacción del extremo N-terminal con el dominio armadillo de β -catenina. 17 pmoles del extremo N-terminal se separaron por SDS-PAGE y fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La unión de las proteínas recombinantes fue determinada por ensayos *overlay* incubando la membrana con 0,3 nmol/mL del dominio armadillo. Los valores indicados debajo de la figura indican la cantidad de proteína unida en fmoles. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

I.2. LOS EXTREMOS TERMINALES DE β -CATENINA SON INTERDEPENDIENTES

Hasta este momento sabíamos que ambos extremos terminales interaccionaban con el dominio armadillo y quisimos averiguar si esta interacción era a su vez interdependiente y si los extremos terminales eran capaces de interaccionar entre ellos.

Para responder a estas cuestiones se llevaron a cabo unas construcciones de β -catenina que tenían delecionadas uno de los extremos terminales: Δ C β -catenina (1-683) para estudiar el comportamiento del extremo C-terminal y Δ N β -catenina (120-781) para el estudio del extremo N-terminal.

Con estos experimentos se pretendía averiguar si ambos extremos terminales de β -catenina podrían interactuar entre sí y de esta manera regular la funcionalidad de la β -catenina.

I.2.1. El extremo aminoterminal dificulta la unión del extremo carboxiterminal al dominio armadillo de β -catenina

Se realizaron ensayos de interacción del extremo C-terminal con el dominio armadillo (120-683) y con ΔC β -catenina (1-683). Como se puede observar en la **Figura 19**, comparando los carriles 3 y 4, el extremo C-terminal interactúa mejor con el dominio armadillo cuando no está presente el dominio N-terminal. Por lo tanto el extremo N-terminal está dificultando la unión del extremo C-terminal al dominio armadillo.

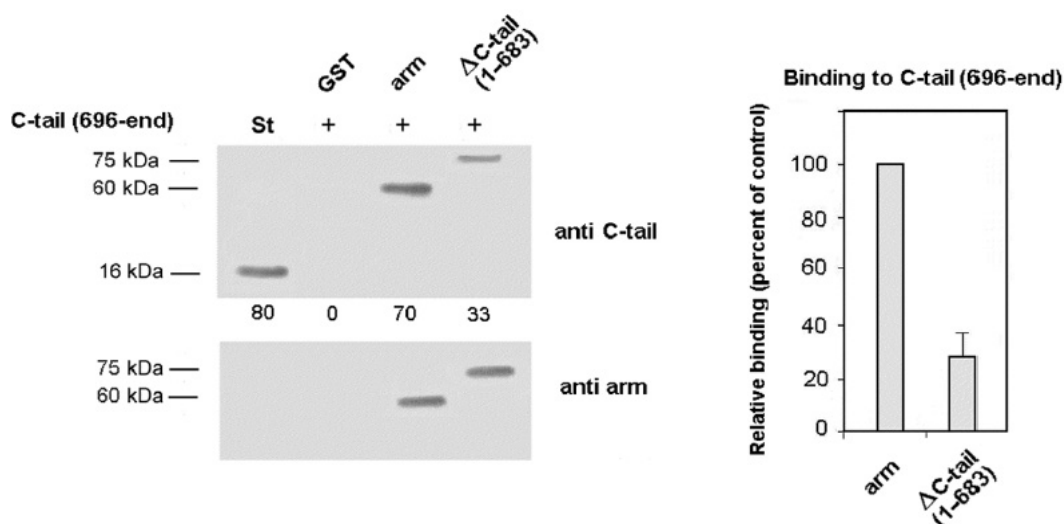


Figura 19. Interacción del extremo C-terminal con el dominio β -catenina armadillo y ΔC β -catenina. 8,3 pmoles de las proteínas que contenían los dominios indicados de β -catenina se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La unión de las proteínas recombinantes fue determinada por ensayos *overlay* tal como se describe en *Materiales y Métodos*, incubando las membranas con β -catenina C-terminal (0,52 pmol/mL). Esta unión se analizó con anticuerpos anti β -catenina C-terminal. Además, para verificar que habíamos corrido en el gel cantidades iguales de proteína, las membranas de estriparon y volvieron a incubar con anticuerpos específicos contra las proteínas corridas en el gel. Los valores indicados debajo de cada figura representan la cantidad de proteína unida en fmoles; estos valores fueron calculados comparando los resultados con unas cantidades conocidas de proteína usadas como patrones internos de C-tail (696-end) (St). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

I.2.2. El extremo C-terminal potencia la interacción del extremo N-terminal con el dominio armadillo

Del mismo modo que con el extremo C-terminal, se determinó la interacción del extremo N-terminal con el dominio armadillo (120-683) y con ΔN β -catenina (120-781). Los resultados mostraron que el extremo N-terminal interaccionaba mejor con ΔN β -catenina (120-781) que con el dominio armadillo solo (ver **Figura 20**, carriles 3 y 2), aunque no se pudo observar una interacción directa entre ambos extremos terminales (ver **Figura 20**, carril 6).

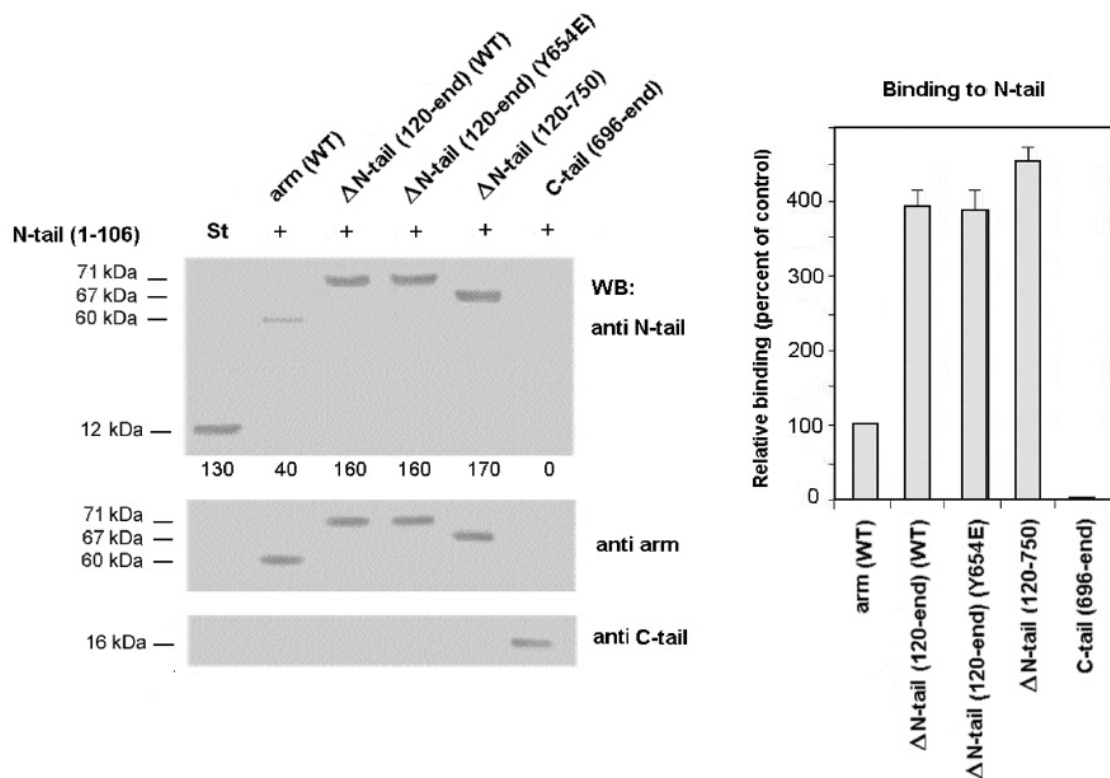


Figura 20. Interacción del extremo N-terminal con diferentes fragmentos de β -catenina. 17 pmoles de los dominios de β -catenina indicados se separaron por SDS-PAGE y fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La unión de las proteínas recombinantes fue determinada por ensayos *overlay*, incubando la membrana con 1,1 nmol/mL de β -catenina N-terminal (1-106). Los valores indicados debajo de cada figura representan la cantidad de proteína unida (en fmol); estos valores fueron calculados comparando los resultados con unas cantidades conocidas de proteína usadas como patrones internos (St). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Estos datos indicaban que ambos extremos necesitaban el dominio armadillo para poder interactuar, ya que el extremo C-terminal no es suficiente para la unión del extremo N-terminal (carril 6), pero sin embargo potenciaba la interacción del extremo N-terminal con el dominio armadillo (carril 3). En esta potenciación no parecían estar implicados los últimos 31 aminoácidos del extremo C-terminal (**Figura 20** carril 5), ya que su delección no afectaba a la interacción del extremo N-terminal.

Claramente ambos extremos terminales interactúan con el dominio armadillo central. La asociación del extremo N-terminal al dominio armadillo limita la interacción del extremo C-terminal al dominio armadillo, pero la unión del extremo N-terminal está potenciada por el extremo C-terminal, lo que sugiere que ambos extremos, en la proteína nativa, son interdependientes.

I.3. DIFERENTES PATRONES DE TRIPSINOLISIS DE β -CATENINA (WT, Y86E, Y654E), Δ N β -CATENINA Y Δ C β -CATENINA

Con el objetivo de reforzar los resultados obtenidos, decidimos abordar el estudio mediante digestión con proteasas del mismo modo que se había hecho ya anteriormente. De esta manera cambios conformacionales en la proteína, que afectaran a los extremos terminales, serían correlacionados por un retraso o una aceleración en el patrón de digestión de la proteína. En esta ocasión se utilizó tripsina y se analizaron los posibles cambios conformacionales de los extremos terminales mediante el uso de anticuerpos específicos para cada uno de estos dominios.

En primer lugar y como muestra la **Figura 21**, observamos que la desaparición del epítipo N-terminal (paneles de la izquierda) era mucho más rápida que la del epítipo C-terminal (paneles de la derecha), sugiriendo que el extremo C-terminal era mucho menos accesible a la proteasa, por lo tanto estaría interactuando con mayor afinidad con el dominio armadillo. Este dato es aún más evidente si se tiene en cuenta la diferente concentración de tripsina utilizada en cada uno de los ensayos (la digestión del extremo N-terminal requería una concentración de tripsina 300 veces menor, ver *Materiales y Métodos*)

La delección del extremo C-terminal, ΔC β -catenina (1-683), aumentaba la sensibilidad del extremo N-terminal a la tripsina (ver **Figura 21**, izquierda, panel inferior), indicando que el extremo N-terminal ya no estaba tan unido al dominio armadillo como lo estaba en la forma nativa de β -catenina. Estos resultados confirman la hipótesis obtenida mediante ensayos de interacción (ver **Figura 20**), de que la unión del extremo N-terminal requería del extremo C-terminal (ver **Figura 20**, carril 3).

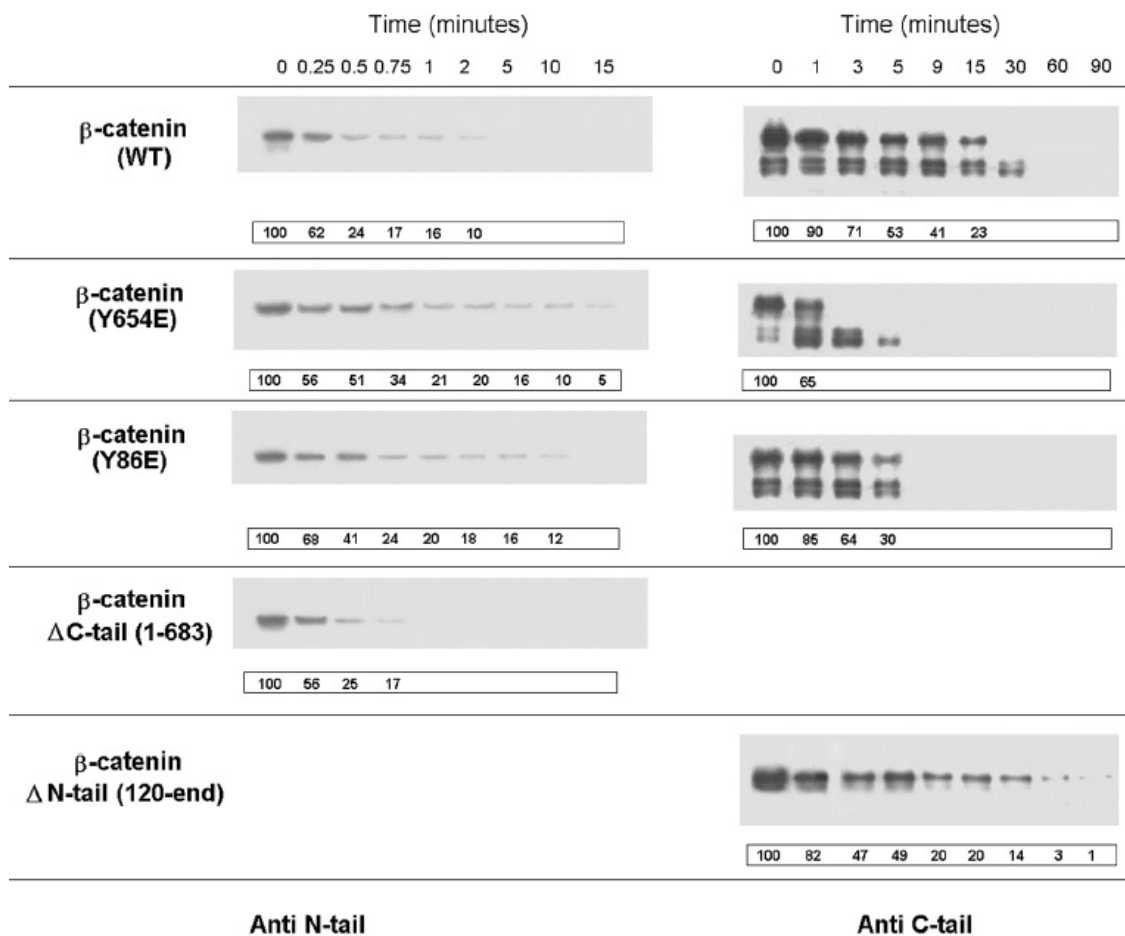


Figura 21. Tripsinólisis de β -catenina (WT, Y86E, Y654E), ΔN β -catenina, ΔC β -catenina. 5.5 pmoles de las diferentes proteínas recombinantes fueron incubadas con 30 ng (lado derecho) o 0.1 ng (lado izquierdo) de tripsina a 24 °C. Las muestras se analizaron por *Western blot* con anticuerpos específicos contra β -catenina C-terminal o N-terminal. Los valores indicados debajo de cada panel representan la cantidad en tanto por ciento del epítipo de β -catenina sin degradar después del tratamiento con tripsina.

En el caso del anticuerpo que reconocía el extremo C-terminal se obtuvo información complementaria. β -catenina salvaje y ΔN β -catenina presentaban un patrón de digestión muy similar, aunque se podía observar un pequeño retraso en ΔN β -catenina, sugiriendo que la falta del extremo N-terminal favorecía la interacción del extremo C-terminal con el dominio armadillo, haciéndolo de este modo más inaccesible a la tripsina (ver **Figura 21**, paneles superior e inferior)

Como ya habíamos determinado, la fosforilación de la tirosina 654 provocaba que el extremo C-terminal no pudiera interactuar con el dominio armadillo y este fenómeno quedaba reflejado en la digestión con tripsina. En la **Figura 21**, paneles derecha, se observa que en la β -catenina que tenía mutado el residuo Tyr-654 a Glu (para mimetizar la fosforilación) la desaparición del extremo C-terminal era muy rápida. Este resultado era esperable debido a que este extremo C-terminal era más accesible a la proteasa al no estar interactuando con el dominio armadillo. El efecto que tenía esta mutación en el extremo N-terminal era una demora en la desaparición del epítipo, indicando que aunque la unión del extremo N-terminal al dominio armadillo no se veía modificado (ver **Figura 17**, carril 3), su conformación si se veía alterada por la mutación (ver **Figura 21**, panel 2 izquierda). La mutación en la Tyr-86 que daba lugar a una mayor interacción con el dominio armadillo (ver **Figura 18**), como esperábamos protegía la degradación de este extremo N-terminal por tripsina (ver **Figura 21**, fila 3 izquierda).

En el caso de la β -catenina Y86E, esta mutación si aceleraba notablemente la digestión del extremo C-terminal comparado con β -catenina nativa, apoyando la conclusión de que ambos extremos están interconectados y sugiriendo que modificaciones en el extremo N-terminal de la proteína afectan la conformación del otro extremo C-terminal.

I.4. DIFERENTE INTERACCIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE β -CATENINA CON E-CADHERINA, α -CATENINA Y TBP.

Nuestros resultados indicaban que los dos extremos terminales interaccionaban y regulaban de forma diferente su asociación al dominio armadillo. Así, mientras que el extremo C-terminal es necesario para la asociación del N-terminal, el extremo N-terminal limita la interacción del C-terminal con el dominio armadillo. Además, sabíamos que ambos extremos están interconectados y que modificaciones en uno de ellos podían afectar al otro, a pesar de tratarse de dominios distantes.

Resultados previos del grupo [142] habían demostrado que E-cadherina interacciona mejor con el dominio armadillo de β -catenina que con la proteína entera y como vimos posteriormente, compete con el extremo C-terminal por su unión al dominio armadillo. La proteína TBP también interacciona mejor con el dominio armadillo de β -catenina que con la proteína entera [143].

Ya que habíamos visto que cambios en el extremo N-terminal provocaban modificaciones en el extremo C-terminal, pensamos que estos cambios podrían facilitar o dificultar la interacción de los diversos cofactores con el dominio armadillo, aunque éstos no interaccionaran directamente con los extremos terminales.

I.4.1. Los extremos terminales de β -catenina dificultan su unión con E-cadherina

Se realizaron ensayos de interacción de E-cadherina con los diferentes mutantes delecionados de β -catenina fusionados a GST, para así estudiar el efecto de cada extremo terminal por separado. Recordemos que la E-cadherina interacciona exclusivamente con el dominio armadillo.

En la **Figura 22** se puede observar que la deleción del extremo C-terminal (Δ C β -catenina) aumentaba notablemente la E-cadherina unida (comparar carriles 3 y 4), comparada con la β -catenina *wild type*. No había diferencias entre la forma Δ C β -catenina y el dominio armadillo (carriles 2 y 3). En cambio la Δ N β -catenina, que carece de los 120 primeros aminoácidos, inhibía la unión de E-cadherina (carril 5); este efecto

era revertido cuando el extremo C-terminal también era delecionado, es decir, tratábamos con el armadillo solo (ver **Figura 22**, carril 2).

Estos datos indicaban que en ausencia del extremo N-terminal, el extremo C-terminal adoptaba una conformación más unida al dominio armadillo que dificultaba la unión de E-cadherina a este dominio. Este resultado era esperable ya que esta construcción presentaba un patrón de digestión más lento que la proteína *wild type* (ver **Figura 21**, panel inferior derecha). Estos datos nos llevaron a la conclusión de que la represión creada por el C-terminal en la unión a la E-cadherina, estaba modulada por el extremo N-terminal y que ambos extremos restringían la interacción de E-cadherina con β -catenina.

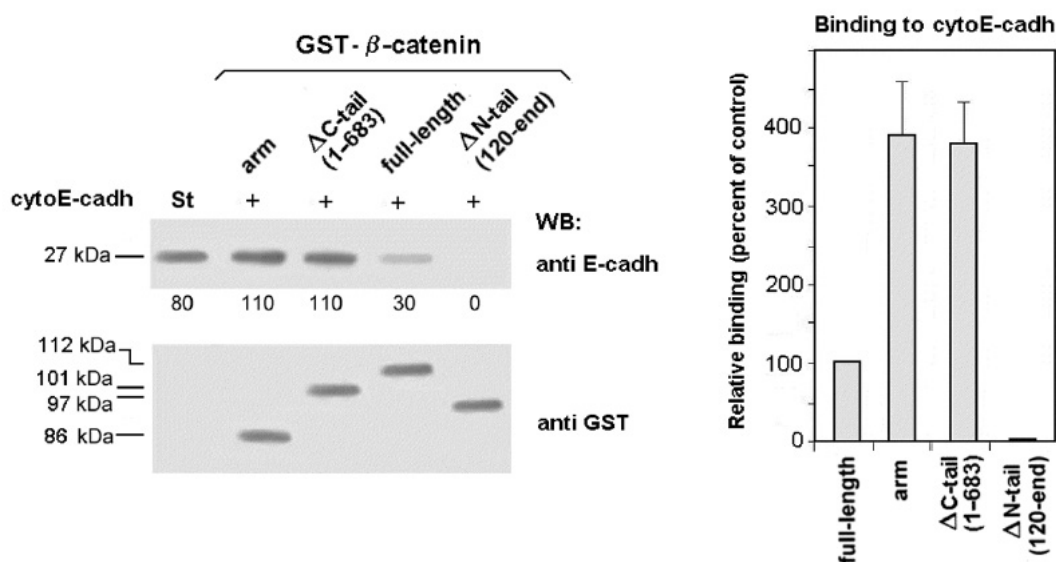


Figura 22. Interacción de los diferentes fragmentos de β -catenina con E-cadherina. 0,7 pmoles de los diferentes fragmentos de β -catenina unidos a GST fueron incubados con 2,8 pmoles de cyto-E-cadherina. Los complejos se purificaron con Glutathion-Sepharosa y fueron analizados por *Western blot* con anticuerpos anti E-cadherina. Los valores indicados debajo de cada figura representan la cantidad de proteína unida (en fmol); estos valores fueron calculados comparando los resultados con unas cantidades conocidas de proteína usadas como patrones internos de cyto-E-cadherina (St). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. La figura también muestra unos gráficos donde se muestra la desviación de la unión relativa encontrada en los tres experimentos.

I.4.2. El extremo N-terminal modula la interacción de β -catenina con α -catenina

Se analizó también la interacción de α -catenina con β -catenina. La región de β -catenina implicada en la unión a la α -catenina está localizada entre los aminoácidos 118-146 de β -catenina (final extremo N-terminal y primera repetición armadillo). La integridad de esta secuencia era necesaria ya que ni el dominio armadillo (120-683), ni la Δ N β -catenina (120-781) unían α -catenina (ver **Figura 24**, carriles 3 y 4), mientras que Δ C β -catenina interaccionaba ligeramente mejor con α -catenina que la β -catenina salvaje (ver **Figura 24**, comparar carriles 2 y 1). Este resultado también demostraba una interconexión entre ambos extremos terminales y sugería que una disminución de la interacción del extremo N-terminal con el dominio armadillo, causado por la delección del extremo C-terminal (carril 2), favorecía la unión de α -catenina.

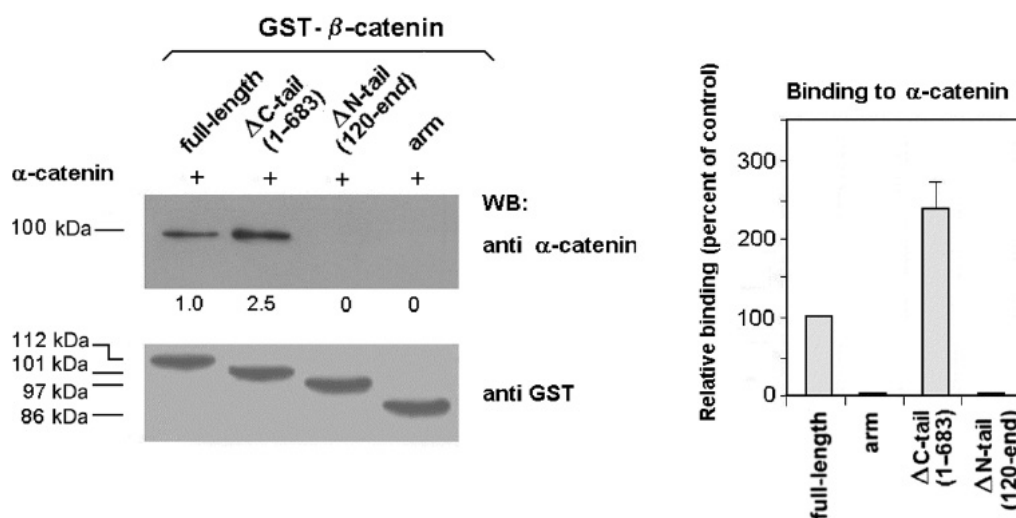


Figura 23. Interacción de los diferentes fragmentos de β -catenina con α -catenina. 6 pmoles de los diferentes fragmentos de β -catenina unidos a GST fueron incubados con 100 μ g de extractos celulares totales de células RWP-1. Los complejos fueron analizados por *Western blot* utilizando anticuerpos anti α -catenina. Los valores indicados debajo de cada figura representan la cantidad relativa de proteína unida comparado respecto a la β -catenina *wild type*. La figura también muestra unos gráficos donde se muestra la desviación de la unión relativa encontrada en los tres experimentos realizados.

I.4.3. TBP interacciona mejor con el dominio armadillo que con la proteína entera

Resultados similares se obtuvieron al analizar la unión de β -catenina a otro cofactor, la proteína de unión a la TATA-box (TBP). La TBP se une a diferentes secuencias de β -catenina aunque principalmente requiere las últimas repeticiones armadillo y el extremo C-terminal.

La delección de los extremos terminales de β -catenina favorecía la unión a la TBP (ver **Figura 24**, comparar carriles 1 y 2). Se llevaron a cabo ensayos de interacción de TBP con los mutantes delecionados de β -catenina a los que les faltaba uno u otro extremo. Se observó que la delección del extremo N-terminal potenciaba mucho esta interacción (ver **Figura 24**, carriles 1 y 4), lo que indicaba que este extremo N-terminal modulaba la unión de TBP en la parte C-terminal de la β -catenina.

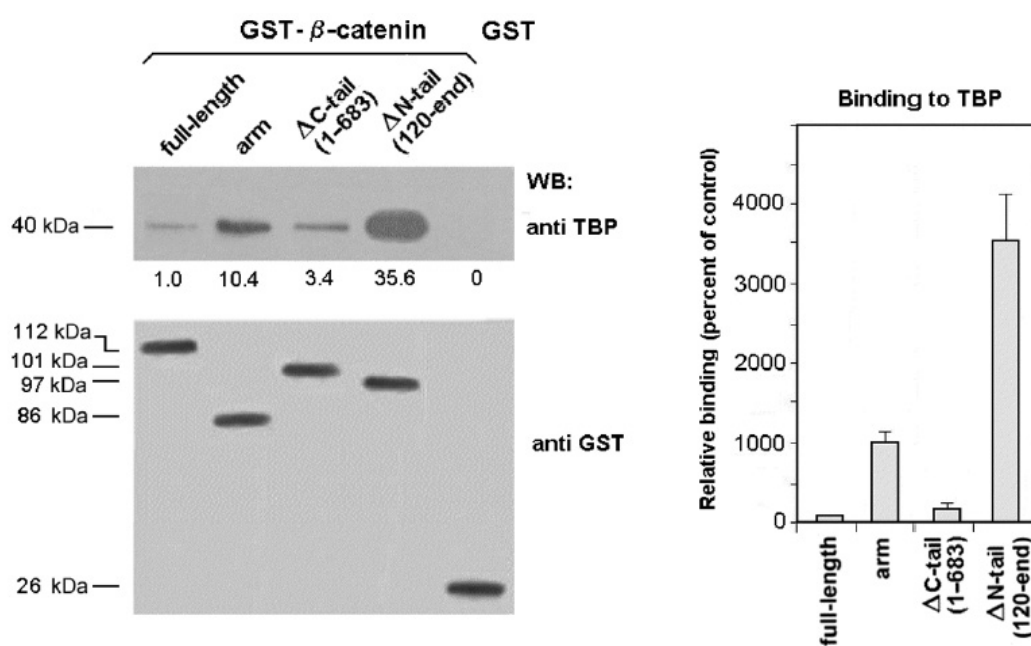
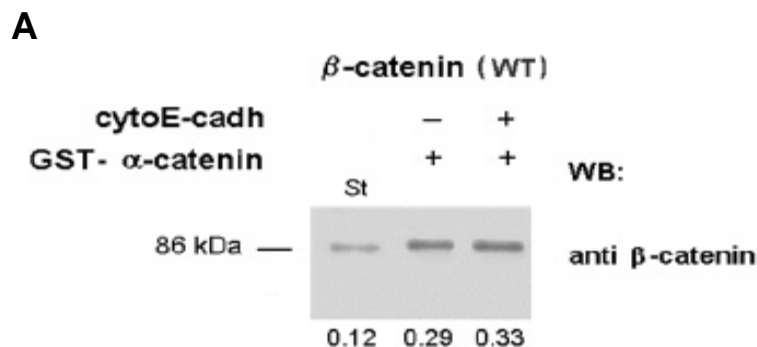


Figura 24. Interacción de los diferentes fragmentos de β -catenina con TBP. 6 pmoles de los diferentes fragmentos de β -catenina unidos a GST fueron incubados con 100 μ g de extractos celulares totales de células RWP-1. Los complejos fueron analizados por *Western blot* utilizando anticuerpo anti TBP. Los valores indicados debajo de cada figura representan la cantidad relativa de proteína unida comparado respecto a la β -catenina *wild type*. La figura también muestra unos gráficos donde se muestra la desviación de la unión relativa encontrada en los tres experimentos.

I.5. α -CATENINA FACILITA LA INTERACCIÓN DE β -CATENINA CON E-CADHERINA

Los resultados mostraban que ambos extremos terminales interaccionaban con el dominio armadillo y modulaban de manera coordinada la interacción de diferentes cofactores de β -catenina a la región armadillo, o al otro extremo de la molécula. Efectos de los extremos terminales se han podido detectar en la interacción de β -catenina con E-cadherina y α -catenina, dos proteínas que se pueden unir simultáneamente a β -catenina en las uniones adherentes. Examinamos la posibilidad de que la unión de uno de estos cofactores de β -catenina pudiera modificar la unión del otro ligando en otra zona de la molécula, a través de cambios conformacionales inducidos en los extremos terminales. Es decir, la unión de un cofactor provocaría un cambio conformacional en uno de los extremos terminales que a su vez modificaría la conformación del otro extremo facilitando por ejemplo, la unión de un segundo cofactor en otra zona de la molécula de β -catenina.

Los resultados mostraron que la unión previa de β -catenina con E-cadherina no modificaba la unión de α -catenina al complejo (ver **Figura 25A**). Sin embargo, la unión previa de β -catenina a α -catenina aumentaba la afinidad del dominio armadillo hacia la E-cadherina (ver **Figura 25B**, comparar carriles 2 y 3). Este efecto requería la presencia del extremo C terminal, ya que no veíamos efecto si se utilizaba la construcción a la que le faltaba el extremo C terminal (Δ C β -catenina) (ver **Figura 25B**, panel derecho).



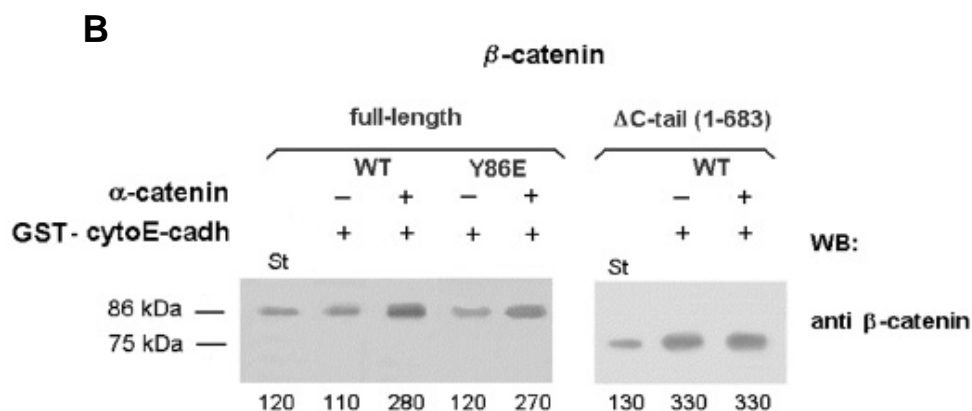


Figura 25. Unión cooperativa de E-cadherina y α -catenina con β -catenina y Δ C β -catenina. (A) 0,8 pmoles de GST- α -catenina fueron incubados con 1,4 pmoles de β -catenina *wt*. Cuando se indica las incubaciones fueron suplementadas con 20 pmoles de cyto-E-cadherina. (B) 1,3 pmoles de GST-cyto-E-cadherina fueron incubados con 0,7 pmoles de β -catenina (*wt* y Y86E) o Δ C β -catenina. Cuando se indica las incubaciones fueron suplementadas con 3,5 pmoles de α -catenina. Los valores indicados debajo de cada figura representan la cantidad de proteína unida (en fmol); estos valores fueron calculados comparando los resultados con unas cantidades conocidas de proteína usadas como patrones interno (St). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

I.6. TCF-4 FACILITA LA INTERACCIÓN DE β -CATENINA CON TBP

Cuando β -catenina se localiza en el núcleo, también ha de interactuar simultáneamente con factores de transcripción u otros factores implicados en la transcripción. Por ejemplo el Tcf-4, que interactúa en la región más amino terminal del dominio armadillo o la TBP, con la que interactúa por las últimas repeticiones armadillo. ¿Podría producirse un efecto de unión cooperativa a β -catenina entre el Tcf-4 y la TBP, del mismo modo que ocurría con α -catenina y E-cadherina?

Se realizaron ensayos de *Pull Down* y como muestra la **Figura 26** la unión previa de β -catenina con el Tcf-4 potenciaba notablemente su interacción con la TBP (comparar carriles 1 y 2). Este efecto era debido a que la interacción del Tcf-4 con β -catenina provocaba un cambio conformacional de los extremos terminales, que facilitaba la posterior interacción de la TBP con el dominio armadillo de β -catenina. Si observamos los carriles 3 y 4 podemos apreciar que este efecto se abolía cuando los

extremos terminales de β -catenina se eliminaban. Esto nos estaba indicando que realmente el efecto que habíamos visto previamente era debido a cambios conformacionales de los extremos terminales, inducidos por la interacción previa de un factor al dominio armadillo.

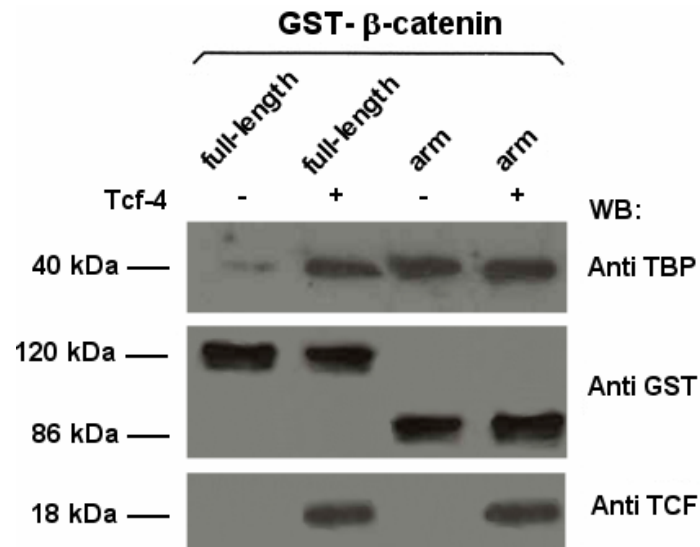


Figura 26. Unión cooperativa de Tcf-4 y TBP con β -catenina. 9 pmoles de los diferentes fragmentos de β -catenina unidos a GST fueron incubados, cuando se indica, con un exceso de Tcf-4 (52 pmoles). Posteriormente se añadieron 100 μ g de extractos celulares totales de células HT-29 M6. Los complejos se purificaron con Glutathion-Sepharosa y fueron analizados por *Western blot* con anticuerpo anti TBP. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

DISCUSIÓN

1. Implicaciones estructurales en β -catenina.

β -catenina es una proteína multifuncional involucrada en una gran variedad de procesos. Forma parte de las uniones adherentes y su presencia es indispensable para el mantenimiento de éstas. Placoglobina (γ -catenina) es una proteína con alta homología con β -catenina y puede reemplazarla en las uniones adherentes. Es también un componente de los desmosomas, pero en este caso β -catenina no puede sustituir a placoglobina. En ambos casos sus funciones celulares implican realizar interacciones con una gran variedad de factores.

En ambas, placoglobina y β -catenina, podemos distinguir tres dominios estructurales. El dominio central básico, donde existe la mayor homología (83%) [155] y dos extremos terminales ácidos donde la homología es menor (ver **Figura 27**).

La β -catenina interacciona con proteínas muy diversas en sus diferentes localizaciones celulares: con E-cadherina y α -catenina en los complejos de adhesión de la membrana, con APC, axina y GSK3 β en el citoplasma, con factores de transcripción de la familia Tcf/Lef o TBP en el núcleo, entre muchas otras [156]. Con la mayoría lo hace a través de la región central de repeticiones armadillo. Los diferentes ligandos reconocen regiones solapadas de la β -catenina a lo largo de sus repeticiones armadillo. Las secuencias de unión de estos cofactores no presentan mucha homología, pero tienen en común que son ácidas (pI 3.3-4.1) [45]. Estas cargas negativas interaccionan con las cargas positivas expuestas hacia la superficie del dominio armadillo.

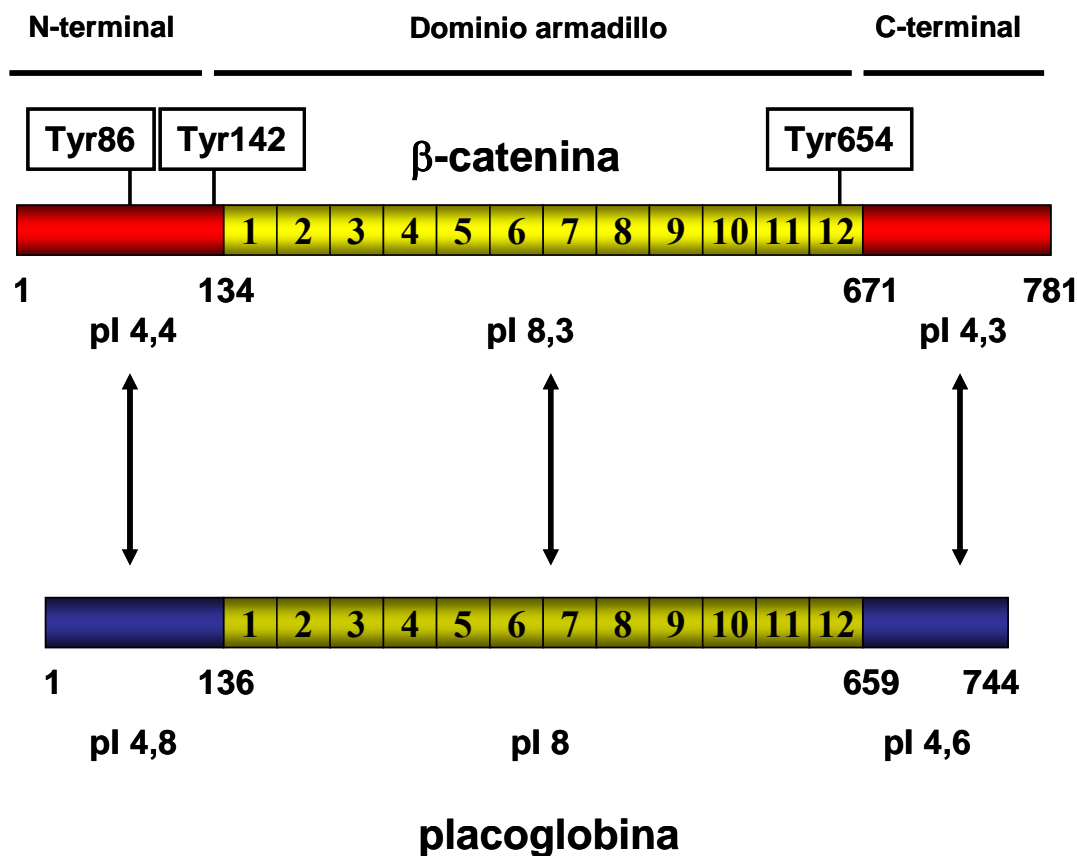


Figura 27. Diagrama de placoglobina y β -catenina.

Sólo ha sido posible determinar la estructura tridimensional del dominio central de la β -catenina -aminoácidos 149 al 666- [45] por difracción de rayos X. Este dominio forma una estructura muy rígida de repeticiones armadillo. De momento no ha sido posible cristalizar la molécula entera, o incluyendo alguno de los dominios terminales. La formación de complejos de Tcf o E-cadherina, unidos a β -catenina, permitió obtener cristales en los que se visualizaban los residuos 134-149, previamente desordenados en los cristales que únicamente contenían el dominio armadillo [27]. Sólo se ha podido visualizar una pequeña porción aislada del fragmento N-terminal –aminoácidos 118 al 149- [119]. Nos planteamos al iniciar este trabajo la posibilidad de que los extremos terminales de β -catenina (ácidos) pudieran estar interaccionando con el dominio armadillo (básico) y en el caso de que estas interacciones intramoleculares se produjeran, si estaban afectando de alguna forma a las interacciones que establece β -catenina con los diversos cofactores y si tales interacciones eran moduladas por la fosforilación de β -catenina.

Para resolver estas cuestiones procedimos a realizar ensayos de interacción utilizando diferentes fragmentos de β -catenina, el dominio central de repeticiones armadillo y los extremos N- y C-terminal de β -catenina. De estos ensayos *in vitro* se desprende que ambos extremos terminales interaccionan con el dominio armadillo (ver **Figura 13** y **Figura 17**) y que la modificación de la tirosina 654 -ya sea por mutación a glutámico o por la fosforilación del dominio armadillo con la tirosina quinasa Src o el receptor EGF- inhibe la asociación del extremo C-terminal con el dominio central. Resultados recientes de nuestro grupo [157] han demostrado que también los extremos terminales de placoglobina interaccionan con el dominio armadillo.

Además, el mutante de β -catenina Tyr-654→Glu es degradado más rápidamente por tripsina que la β -catenina nativa en ensayos de proteólisis limitada (ver **Figura 21**). Hay que recordar que la fosforilación de este residuo inhibe la interacción con E-cadherina [142]. Todo esto permite postular que en condiciones nativas β -catenina presenta una mayor compactación y está plegada con los extremos interaccionando con el dominio armadillo. La fosforilación de la tirosina 654 induce un cambio conformacional del extremo C-terminal permitiendo una estructura más abierta, facilitando de esta manera el acceso de los ligandos de β -catenina (por ejemplo E-cadherina), al dominio armadillo.

A partir de los datos de cristalización [27] se determinó la secuencia de la E-cadherina que interacciona con el dominio armadillo de β -catenina. Como muestra la **Tabla II** hemos observado que existía una analogía entre los aminoácidos 655-677 de la E-cadherina (región que interacciona con β -catenina) y los últimos aminoácidos de la propia β -catenina (aa 760-781). Pensamos que la interacción entre los últimos 20 aminoácidos del dominio C-terminal y el dominio armadillo de β -catenina, podía darse de forma análoga a como se da la unión entre el dominio citosólico de E-cadherina y el dominio armadillo de β -catenina. Se sintetizó el péptido correspondiente a estos aminoácidos y se observó que este péptido era capaz de unirse al dominio armadillo. De este modo E-cadherina y el extremo C-terminal de β -catenina compiten por unirse al dominio armadillo.

Los resultados de interacción *in vitro* junto con los resultados de sensibilidad a proteasas, muestran claramente que en condiciones nativas los extremos terminales de β -catenina se encuentran próximos el uno al otro. De los mismos deducimos que el extremo C-terminal es necesario para una eficiente interacción del extremo N-terminal

con el dominio armadillo, ya que en su ausencia, la afinidad el extremo N-terminal por el dominio armadillo disminuye notablemente. Sin embargo, no se ha detectado interacción directa entre ambos extremos, lo que indica que sólo interaccionan en presencia del dominio armadillo. La secuencia del extremo C-terminal responsable de este efecto sobre el extremo N-terminal debe de estar localizada entre los aminoácidos 683 y 750, ya que la construcción de β -catenina (120-750) une la misma cantidad de N-terminal que la construcción β -catenina (120-781). De este modo podemos diferenciar dos subdominios en el extremo C-terminal:

Segmento 683-750: segmento que potencia la interacción del extremo N-terminal con el dominio armadillo.

Segmento 760-781: involucrado en la unión directa al dominio armadillo.

El extremo N-terminal también ejerce un efecto sobre el extremo C-terminal, pero en sentido diferente. En ausencia del extremo N-terminal, el extremo C-terminal interacciona mejor con el dominio armadillo, como evidencia el hecho de que el extremo C-terminal de la construcción Δ N β -catenina (120-781) se digiere más lentamente en presencia de tripsina. Sugiriendo una mayor interacción con el dominio armadillo y por lo tanto más protección a ser degradado.

Todos estos resultados indican que los dos subdominios del extremo C-terminal interaccionan el uno con el otro de forma negativa, es decir, una buena interacción del segmento 683-750 con el extremo N-terminal, supone una menor interacción del subdominio 750-781 con el dominio armadillo.

En el caso de la placoglobina, el grupo ha observado que los extremos terminales también interaccionan con el dominio armadillo, pero en este caso no se detectan diferencias de interacción de los extremos terminales en presencia o ausencia del otro extremo terminal (como ocurre en β -catenina) [157]. Esto nos lleva a pensar que aunque los extremos terminales interaccionan con el dominio armadillo, la interconexión entre ellos no es la misma que ocurre en el caso de β -catenina y estas diferencias son causadas por diferentes propiedades en sus extremos C-terminales.

2. Interacción de β -catenina con sus cofactores

Una consecuencia de esta mutua asociación entre los extremos terminales y el dominio armadillo, es que la unión de β -catenina (o placoglobina) a cofactores puede verse afectada por uno de los extremos terminales, aunque este cofactor interactúe con regiones alejadas de este extremo terminal. Para demostrar esta hipótesis utilizamos tres proteínas que interactúan con diferentes regiones de β -catenina: E-cadherina, α -catenina y TBP. La unión de todas ellas se ve afectada por la delección del extremo más lejano a la zona de interacción (ver **Figura 22**, **Figura 23** y **Figura 24**). Se concluye de nuestros resultados que son los extremos terminales los que confieren la especificidad de unión a factores, aunque éstos se unan al dominio armadillo.

Del mismo modo que ocurre con β -catenina, los extremos terminales de placoglobina son lo que regulan la especificidad de unión de los diferentes cofactores al dominio armadillo [157]. En todos los casos estudiados, tanto para cofactores de los complejos de adhesión como nucleares, la delección de uno de los extremos terminales de placoglobina se traducía en alteraciones en la unión de factores al dominio armadillo.

Además, resultados del grupo han mostrado que, en el caso de β -catenina y placoglobina, el intercambio de los dominios armadillo no provoca cambios significativos en la especificidad de unión a Tcf-4, TBP, α -catenina o E-cadherina. Estos datos confirman de nuevo que son los extremos terminales los que confieren especificidad de unión y al intercambiar los dominios armadillo estas proteínas pierden su “personalidad” y se comportan como son sus extremos terminales. Por lo tanto, son estos extremos terminales los responsables de discernir entre la unión de factores al dominio armadillo.

El modelo postulado por nuestro grupo no sólo se puede aplicar a β -catenina, sino que también se puede hacer extensible al menos a otra proteína con dominios armadillo, la placoglobina. Es posible que otras proteínas que contienen este dominio de interacción proteína-proteína, como p120-catenina y APC, se regulen de una manera similar a como sucede con β -catenina y placoglobina.

3. Unión cooperativa de factores

Otra posible consecuencia de este modelo es que dos proteínas que interaccionasen con β -catenina (o placoglobina), aunque fuera en regiones distantes, podrían hacerlo de forma interdependiente, así la unión de un primer cofactor modularía la interacción de un segundo cofactor a través de cambios conformacionales inducidos en los extremos terminales. En este trabajo se analizó esta posibilidad estudiando la unión de la E-cadherina y la α -catenina (o el Tcf-4 y la TBP) a la β -catenina, ya que estas proteínas se encuentran en el mismo complejo con β -catenina. Como ya se ha mencionado anteriormente, la E-cadherina compite con el extremo C-terminal por su unión al dominio armadillo, sin embargo cuando se eliminan los últimos aminoácidos del extremo C-terminal y por tanto se limita la unión del extremo C-terminal al dominio armadillo (ver **Figura 15**), no se produce una mejor asociación de la α -catenina en el otro extremo de la molécula (aa 118-146). Es posible que la interacción del subdominio 683-750 del extremo C-terminal con el armadillo o con el extremo N-terminal, no se vea modificada después de la asociación con E-cadherina. Una posible explicación podría ser que la secuencia 655-677 de la E-cadherina sustituyera perfectamente a los aminoácidos 760-781 del extremo C-terminal en la estructura del complejo. Así, la unión de la E-cadherina produciría un desplegamiento de los últimos aminoácidos de β -catenina (760-781) sin afectar los aminoácidos 683-750 ni tampoco la conformación del extremo N-terminal. Un punto a tener en cuenta es que la delección total del extremo C-terminal sí produce un cambio conformacional en el extremo N-terminal que permite una mayor unión de α -catenina (ver **Figura 23**).

También examinamos la posible influencia de la α -catenina sobre la unión de la E-cadherina a la β -catenina. De estos estudios pudimos observar que la preasociación de la α -catenina incrementaba la afinidad de la β -catenina por la E-cadherina (ver **Figura 25**). Este efecto no se pudo observar con la construcción Δ C β -catenina, por lo tanto es necesaria la presencia del extremo C-terminal. Este dato se ve apoyado por el hecho de que la unión de α -catenina acelera la degradación del extremo C-terminal por la carboxipeptidasa Y (ver panel inferior **Figura 16**). Estos mismos experimentos fueron realizados con placoglobina, pero en este caso los resultados fueron inversos a los obtenidos con β -catenina [158].

En resumen, cambios en el extremo N-terminal, inducidos por la unión de diversos cofactores, se traducen en alteraciones en la estructura del extremo C-terminal. Un punto destacable es el hecho de que la delección del extremo C-terminal incrementa 2.5 veces la unión de α -catenina (ver **Figura 23**), mientras que la delección del extremo N-terminal prácticamente bloquea la unión de la E-cadherina (ver **Figura 22**). En este sentido la E-cadherina es mucho más sensible a los cambios que se produzcan en el extremo C-terminal, que la α -catenina a los producidos en el N-terminal. A pesar de todo, no podemos excluir la posibilidad de que existan otros cofactores interaccionando con el extremo N-terminal y que sean mucho más sensibles que α -catenina a los cambios conformacionales producidos en este dominio.

En este estudio hemos intentado explicar el mecanismo molecular por el cual β -catenina interacciona con E-cadherina y α -catenina en la célula. Está descrito que β -catenina después de su síntesis interacciona con E-cadherina y este complejo migra hacia las uniones adherentes donde interaccionan con α -catenina [159]. El hecho de que la afinidad de β -catenina por α -catenina no se vea afectada por la unión de la E-cadherina, podría explicar el porque este complejo no se asocia prematuramente. Además, una vez se ha formado el complejo, la fosforilación de la Tyr-654 de β -catenina, que disminuye la afinidad de la E-cadherina por el dominio armadillo, produciría el desensamblaje de las uniones adherentes pero sin afectar a la interacción de la β -catenina/ α -catenina [142] (ver **Figura 29**).

Según nuestros resultados, cuando α -catenina interacciona con β -catenina defosforilada, ésta presenta una mayor afinidad por la E-cadherina, dando lugar a una rápida formación del complejo de las uniones adherentes. Es decir, no se encontraría β -catenina asociada a E-cadherina sin estar unida a α -catenina. Esta rápida formación y desensamblaje de las uniones adherentes es necesaria para que las células epiteliales puedan moverse adecuadamente en sus tejidos de origen. Cuando α -catenina no está unida a β -catenina la unión de la E-cadherina no debe de ser tan rápida, facilitando que en algunas circunstancias β -catenina migre al núcleo. Este modelo de interacción cooperativa se esquematiza en la **Figura 28** y **Figura 29**. Se ha demostrado que bloqueando el desensamblaje del complejo con una proteína de fusión E-cadherina/ α -catenina/ β -catenina, se bloquea el movimiento normal de las células epiteliales [160].

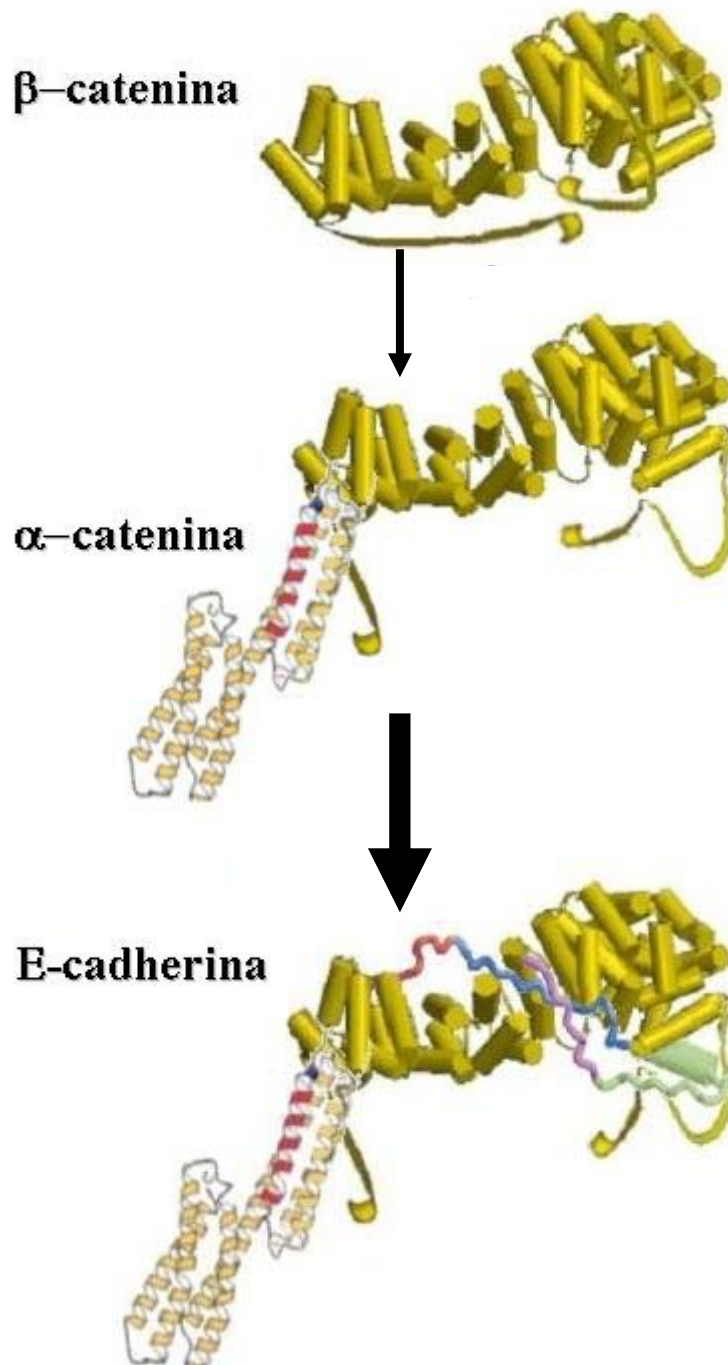


Figura 28. Modelo de la regulación de los extremos terminales de β -catenina en la unión de factores. Los cilindros corresponden al dominio armadillo de β -catenina. La cinta de colores representa la E-cadherina. La interacción de α -catenina con β -catenina ayuda al desplegamiento de la proteína facilitando así la interacción de E-cadherina con β -catenina.

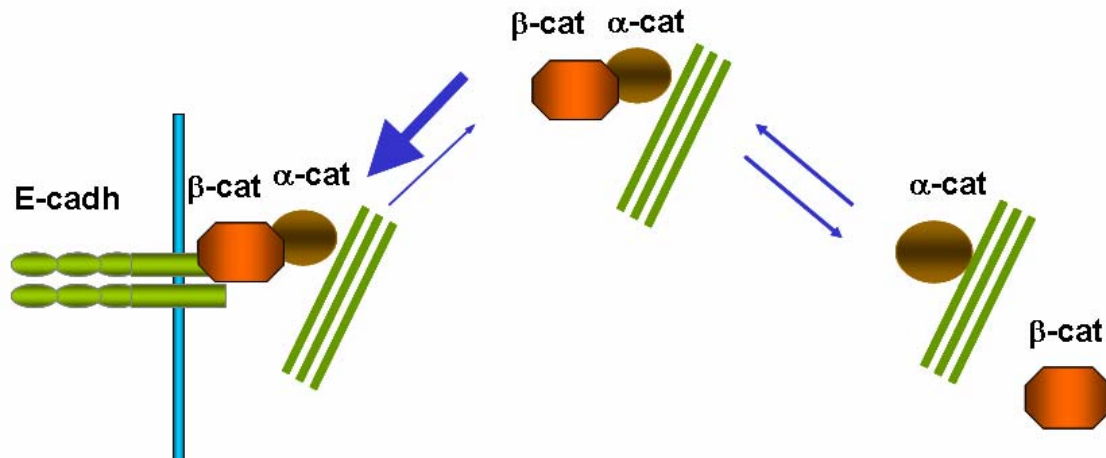


Figura 29. Regulación de la interacción de β-catenina con E-cadherina y α-catenina. La β-catenina en primer lugar se asociaría a α-catenina lo que facilitaría la unión de β-catenina a E-cadherina, formándose así el complejo de adhesión.

Estos resultados sugieren que la unión coordinada de cofactores a β-catenina pueda ocurrir también con otros factores que interaccionan con β-catenina. Es posible que algunos de los cofactores que interaccionan con β-catenina, especialmente aquellos que interaccionan con el extremo N-terminal o con las primeras repeticiones armadillo, puedan ayudar al desplegamiento de la proteína y así facilitar la asociación de otros cofactores en el extremo C-terminal o en el dominio armadillo. Pensamos que este mecanismo de unión cooperativa podía extenderse a factores implicados en la actividad transcripcional de la β-catenina. Posterior a la publicación de estos resultados quisimos validar esta idea. Realizamos ensayos con dos proteínas implicadas en la transcripción de genes, el Tcf-4 y la TBP. Como muestra la **Figura 26** observamos que la previa interacción de β-catenina con el Tcf-4 facilitaba la unión de la TBP al dominio armadillo. Este resultado refuerza nuestro modelo de unión cooperativa de factores, previamente observado con la E-cadherina y la α-catenina.

CONCLUSIONES

- 1) Los extremos terminales de β -catenina interaccionan con el dominio armadillo central.
- 2) Hemos demostrado un papel modulador de los extremos terminales de β -catenina. Los extremos terminales dificultan la unión de factores al dominio armadillo.
- 3) Los dos extremos son interdependientes ya que:
 - A. El extremo C-terminal es necesario para la unión del N-terminal al dominio armadillo. Además el extremo N-terminal limita la interacción del extremo C-terminal a este dominio central.
 - B. La eliminación de cualquiera de los dos extremos tiene consecuencias para la unión de factores en otra región de la proteína:
 1. La eliminación del extremo C-terminal, aumenta la afinidad por α -catenina.
 2. La eliminación del extremo N-terminal, bloquea la unión de la E-cadherina al dominio armadillo.
- 4) Como consecuencia de que los extremos estén interconectados, la unión de factores a β -catenina es a su vez interdependiente o coordinada: la unión de α -catenina induce un cambio conformacional en los extremos que facilita la unión de la E-cadherina al dominio armadillo.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

II.1. LA FAMILIA DE LAS RHO-GTPASAS

II.1.1. Características generales

Las Rho-GTPasas son unas proteínas monoméricas de unos 200 aminoácidos, 20-30 kDa y representan la mayor rama de la superfamilia de las Ras-GTPasas. El primer miembro fue descrito en 1985 y en la actualidad se conocen en mamíferos diez Rho-GTPasas, algunas con múltiples isoformas: Rho (isoformas A, B y C), Rac (isoformas 1, 2 y 3), Cdc42 (isoformas Cdc42Hs y G25K), Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/RhoE, RhoD, RhoG, TC10 y TTF [161]. Los más estudiados han sido: Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), Cdc42 (*cell division cycle 42*) y RhoA (*Ras homologous member A*).

Estas proteínas participan en diferentes procesos celulares tales como: la polarización celular, la adhesión célula-célula y célula-matriz, el tráfico de membranas, la regulación del citoesqueleto y la proliferación celular [162, 163].

Todos los miembros de esta familia tienen en común (ver **Figura 30**):

- Una secuencia consenso de unión a GDP/GTP (*Switch I y II*). Al igual que las proteínas Ras, la familia de proteínas Rho tienen una gran afinidad por nucleótidos de guanosina (GDP y GTP). La forma activa (unida a GTP) es capaz de unirse a un efector y así iniciar una respuesta celular adecuada, mientras la actividad GTPasa intrínseca devuelve a las proteínas a su estado unido a GDP (inactivo) para así completar el ciclo y terminar la señal de transducción.
- La secuencia aminoacídica de todos los miembros termina con la secuencia CAAX (C = Cys, A = aa alifático, X = aa terminal). La secuencia CAAX es una señal de modificación post-transcripcional. Esta modificación aumenta la naturaleza hidrofóbica de la proteína, hecho que facilita su anclaje en la membrana.

- Un dominio efector implicado en la interacción con los efectores.
- Existe una pequeña secuencia, “*insert loop*”, que no está presente en la familia de Ras. Se trata de una pequeña hélice entre los aminoácidos 123 y 137 involucrada en la interacción con el efector.

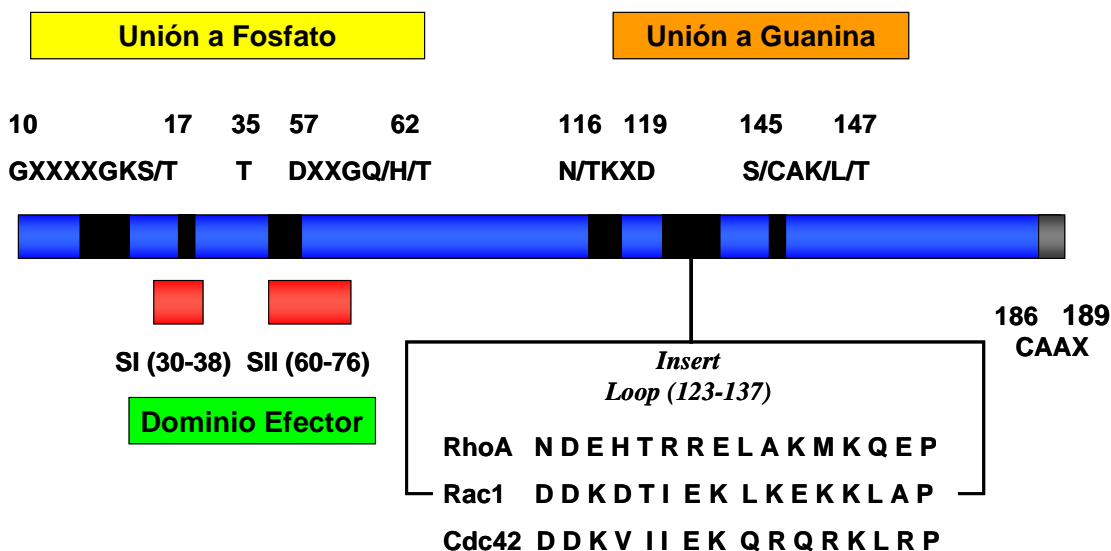


Figura 30. Diagrama de la estructura de las Rho GTPasas. Se indican, de manera general, los aminoácidos correspondientes a cada dominio. Los dominios SI (*Switch I*) y SII (*Switch II*) son regiones importantes en la unión e hidrólisis del GTP.

II.1.2.Regulación

La alternancia entre la forma unida a GDP y GTP está finamente regulada por diversas proteínas (ver **Figura 31**). El estado activo, unido a GTP, es promovido por unos reguladores positivos llamados GEF (*GDP/GTP exchange factors*, se conocen unos 30 distintos) que cambian la localización subcelular de Rho y facilitan el cambio de GDP por GTP (ver **Figura 31**). Como consecuencia se produce un cambio conformacional de Rho que la vuelve activa. Esta conformación permite realizar interacciones de alta afinidad con sus efectores y promover así la señalización correspondiente. Todas las proteínas GEF poseen un dominio DH (*Dbl-homology*) con función catalítica [164] y un dominio PH (*pleckstrin homology*) que se encarga de la correcta localización de la proteína en la membrana mediante el anclaje lipídico [165].

Por supuesto, la forma activa unida a GTP es contrarrestada por un modulador negativo. Estos moduladores negativos se denominan GAP (*GTPase activating*

proteins), que aumentan la actividad intrínseca de la GTPasa de producir la hidrólisis del GTP a GDP. Como consecuencia la unión al efector se ve bloqueada y por lo tanto la vía de señalización.

En la forma inactiva las Rho-GTPasas se encuentran asociadas con unos moduladores negativos denominados GDI (*Rho GDP dissociation inhibitors*), los cuales estabilizan la forma unida a GDP. Estas proteínas inhiben la disociación espontánea del GDP, proporcionando a la célula una reserva de proteínas Rho inactivas. A diferencia de las proteínas GEF y GAP, en mamíferos sólo existen tres RhoGDI: rhoGDI1 es el más abundante y es capaz de inhibir a un gran número de miembros de la familia de Rho; por contra, rhoGDI2 se encuentra principalmente en células hematopoyéticas y es específico de la subfamilia de Rac1. El tercer miembro es el rhoGDI3, es el menos abundante e *in vitro* interacciona con un gran número de Rho GTPasas [166]. Las RhoGDI no sólo estabilizan la forma GDP de la GTPasa sino que también liberan y extraen proteínas Rho de la membrana, inhibiéndolas y localizándolas en el citoplasma.

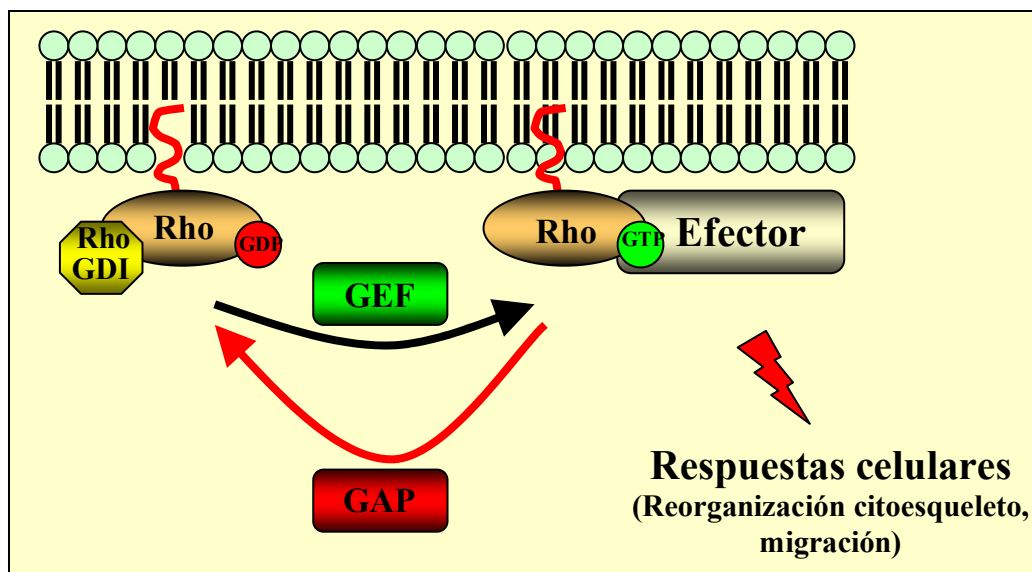


Figura 31. Ciclo de activación/desactivación de las GTPasas.

Existen diversos mutantes que, por un lado son constitutivamente activos (deficientes en la actividad GTPasa) o inactivos (deficientes en el intercambio de nucleótidos). Estos mutantes han sido de gran utilidad para estudiar los efectos de las GTPasas. Estudios bioquímicos y de inmunofluorescencia en fibroblastos Swiss 3T3 y en células neuronales N1E-115, indican que las Rho-GTPasas alternan su localización

entre el citoplasma y sitios específicos en la membrana después de una estimulación extracelular [167].

Otro mecanismo de regulación de las Rho-GTPasas y que en la actualidad ha despertado un gran interés es la regulación por p120-catenina, modelo que explicaré con mayor detenimiento más adelante.

II.1.3.Las proteínas Rho: RhoA

Todos los organismos eucariotas poseen al menos una Rho-GTPasa. Durante el proceso evolutivo este número va aumentando, desde 5 en las levaduras hasta unas 20 en mamíferos, lo que inmediatamente hace que nos preguntemos, ¿Por qué los vertebrados superiores necesitamos tantas Rho-GTPasas? ¿Tienen funciones redundantes, o por el contrario cada una de ellas realiza una función única en la célula?

Los miembros mejor estudiados de la familia de Rho han sido RhoA, Rac1 y Cdc42. En este trabajo nos hemos centrado en RhoA, ya que ha sido descrito que su homólogo en *Drosophila* (Rho1) interacciona con p120-catenina y con α -catenina [14].

RhoA no es una proteína única, sino una isoforma de las 3 que existen en vertebrados superiores: RhoA, RhoB y RhoC. Éstas comparten un 85% de homología en su secuencia aminoacídica pero a pesar de ello existen algunas diferencias entre ellas. Por un lado presentan distintos patrones de expresión y además desarrollan funciones muy diferentes, aunque todas ellas están implicadas en la reorganización del citoesqueleto y la movilidad celular. La mejor estudiada y caracterizada ha sido RhoA.

Las diferencias en la estructura primaria de estas tres isoformas se concentran sobretudo en el extremo C-terminal, región necesaria para la correcta localización de las proteínas. Esta elevada divergencia del extremo C-terminal sugiere una diferente localización subcelular. Tanto RhoA, como RhoB y RhoC son modificadas post-transcripcionalmente mediante una prenilación de una cisteína (ver **Figura 32**) muy conservada del extremo C-terminal, seguido de una metilación y eliminación proteolítica de los últimos tres aminoácidos. El grupo prenilo ancla la GTPasa en la membrana y esta modificación es esencial tanto para el crecimiento celular como para la reorganización del citoesqueleto. La longitud del grupo prenilo varía de una proteína a otra; RhoB puede ser prenilada con un grupo farnesilo de 15 carbonos o con un grupo geranylgeranil de 20 carbonos, mientras que RhoA y RhoC únicamente son

geranilgeranilados. Esta diferencia se ve reflejada en su localización: RhoB se localiza principalmente en los endosomas tardíos y lisosomas, mientras que RhoA y C se localizan en el citoplasma o en la membrana plasmática (revisado en [168]).

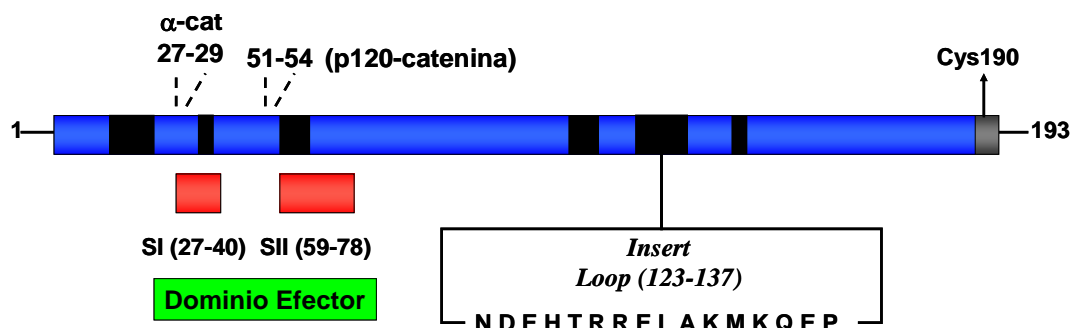


Figura 32. Diagrama de la estructura de RhoA. Se indican los aminoácidos correspondientes a cada dominio, así como la región de interacción con p120-catenina y α -catenina.

En el extremo N-terminal de las Rho-GTPasas encontramos la gran mayoría de aminoácidos implicados en la unión y la hidrólisis del GTP y las regiones *Switch I* y *II* que cambian de conformación entre el estado unido a GTP y el unido a GDP [169].

La estructura cristalina de RhoA indica que está formada por 8 hélices α (A1, A2, A3, A4, A5, H1, H2 Y H3) y 6 láminas β (B1, B2, B3, B4, B5 y B6) [153] (ver **Figura 33**). Las regiones *Switch I* y *II* se localizan en las hojas B2 y B3, el *loop insert* (aa 123-137, importante para la interacción con el efector) forma una pequeña hélice α (A3') que se localiza entre la hoja B5 y la hélice A4.

Se han identificado residuos esenciales para la función de la proteína, los cuales están conservados en las tres isoformas: Gly-14, Thr-19, Phe-30 y Gln-63 (estos dos últimos localizados en el *Switch I* y *II* respectivamente) (ver **Figura 32**) y están implicados en la unión, estabilización y regulación de la hidrólisis del GTP (revisado en [168]).

El Mg^{2+} es esencial para la unión del GTP y del GDP, así como para la actividad GTPasa intrínseca. Este ión establece uniones con la Thr-37 (localizada en el *Switch I*) y la Thr-19. Las regiones *Switch I* y *Switch II* modifican su conformación según su estado unido a GTP o unido a GDP (ver **Figura 34**). La región *Switch I* abraza el GTP (o GDP) entre esta región y el resto de la proteína. Las cadenas laterales de los residuos Tyr-34 y Pro-36, localizados en dicha región, estabilizan el nucleótido mediante un movimiento

sobre los grupos fosfato. El *Switch II* contiene el Gln-63, un residuo esencial para la actividad GTPasa de RhoA. Estudios cristalográficos indican que las proteínas GEF inducen el intercambio de GTP por GDP mediante el desplazamiento del Mg^{2+} [170].

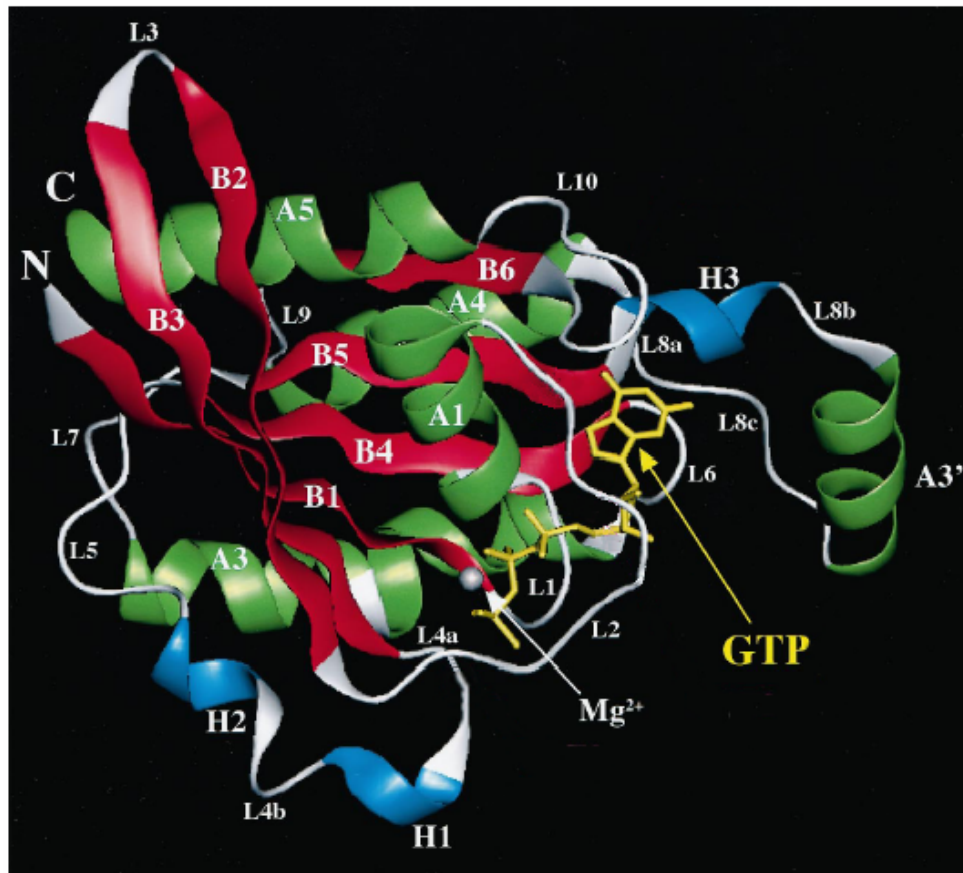


Figura 33. Estructura tridimensional de RhoA unida a GTP. En color rojo se indican las hojas β y en color verde y azul las hélices α . Se indica también la molécula de GTP y el lugar de unión del Mg^{2+} , adaptado de Ihara K et al., 1998.

Los estudios cristalográficos también han permitido conocer como las proteínas GDI interaccionan con las GTPasas [171, 172]. Estos resultados indican que el extremo N-terminal de las RhoGDI se encuentra desestructurado y adquiere su conformación una vez interacciona con la RhoGTPasa. El extremo C-terminal contiene un “bolsillo” (*pocket*) por donde interacciona con el extremo C-terminal prenilado de Rho y reconoce la región *Switch II*, mientras que el extremo N-terminal se estructura parcialmente formando un *loop* que se une al *Switch II* y en una región hélice-*loop*-hélice que reconoce el *Switch I*. El extremo N-terminal es el que ejerce el efecto GDI a través de la región hélice-*loop*-hélice, la cual estabiliza una conformación inusual de la región

Switch I, lo que provoca que la Thr-37 (localizada en esta región) deje de interactuar con el Mg^{2+} y forme un puente de hidrógeno con un residuo aspártico conservado del RhoGDI (revisado en [166]).

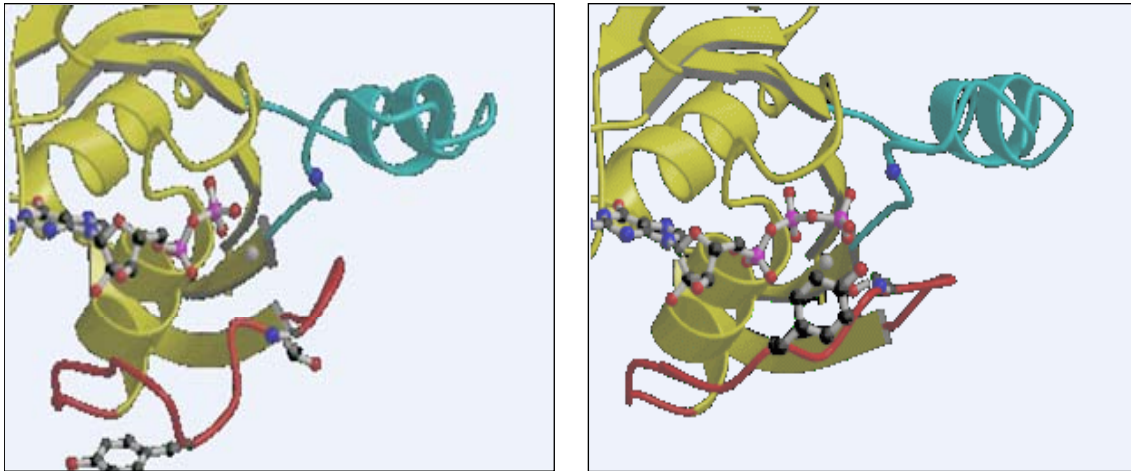


Figura 34. Detalle del cambio conformacional que sufren las regiones SI y SII al unirse a GTP o GDP. La región *Switch* I se muestra en rojo y la *Switch* II en azul. A la izquierda se muestra la conformación unida a GDP y a la derecha unida a GTP.

Las proteínas Rho son diana de muchas toxinas bacterianas que modifican estos residuos conservados dificultando así su correcta funcionalidad (revisado en [173]). Muchos de estos factores de virulencia producen modificaciones covalentes sobre las proteínas Rho. Estas modificaciones alteran directa o indirectamente el transporte citoplasma/membrana de la GTPasa que realizan las proteínas RhoGDI. La C3 transferasa de *Clostridium botulinum* provoca la desorganización del citoesqueleto de actina impidiendo así la fagocitosis de la bacteria. Esta toxina produce una ADP-ribosilación en el Asn-41 de RhoA, RhoB y RhoC. Esta modificación de RhoA incrementa la estabilidad del complejo Rho/RhoGDI, manteniendo a RhoA en estado inactivo en el citoplasma [174]. Otras toxinas como la toxina A y B de *Clostridium difficile* producen la monoglucosilación de la Thr-37/35 de RhoA, Rac1 y Cdc42. Este hecho previene la interacción de la GTPasa con su RhoGDI, como resultado se acumula en la membrana pero la modificación introducida le impide interactuar con sus efectores [175]. *Yersinia enterocolitica* contiene una cistein proteasa, YopT, que digiere el grupo prenilo impidiendo la interacción con las RhoGDI en el citoplasma. Como consecuencia la GTPasa se acumula en el citoplasma, aunque sin interactuar con la

proteína GDI, y se produce una alteración de las estructuras de actina necesarias para la fagocitosis [176].

II.1.4.Función

Las proteínas Rho juegan un papel muy relevante en distintos procesos celulares como la regulación de la forma de la célula, la polaridad y la movilidad, todo ello a través de sus efectos sobre la polimerización de actina, la adhesión celular y la dinámica de microtúbulos, aunque la función principal es regular el ensamblaje y la organización del citoesqueleto de actina [162]. Cada miembro de la familia de Rho (Rac, Rho y Cdc42) puede activar múltiples vías de señalización para inducir sus procesos biológicos (ver **Tabla III**). Las proteínas Rho son principalmente citoplasmáticas y se translocan a la membrana una vez estimuladas por su ligando; la localización dependerá del ligando que ha estimulado la GTPasa [177].

	Actina	Ciclo Celular	Contactos celulares	Polaridad	Transformación
Rho	+	+	+	-	+
Rac	+	+	+	-	+
Cdc42	+	+	+	+	+

Tabla III. Procesos en los que participan las GTPasas.

Rho participa en la contracción de actomiosina y además en la formación de las fibras de estrés, primer efecto descrito para esta proteína. La activación de Rac da lugar a la formación de largas protusiones ricas en actina polimerizada [169]. Estas protusiones ya sean en la periferia celular (lamelipodios) o en la parte delantera (*ruffles*), son importantes para la migración celular ya que son necesarias para realizar el movimiento hacia delante de la célula. Por último Cdc42 activo induce la formación de filopodios [169] y regula la polaridad de la migración. RhoA es necesaria para generar la fuerza contráctil que provoca que la célula adquiera forma redonda. Se cree que Rho actúa en la parte trasera de la célula, mientras que Rac actúa en la parte delantera. Sin embargo, se ha localizado Rac activo tanto en la parte delantera como en la trasera de la célula y la localización de Rho es difusa [178]. Cuando estas proteínas se expresan en su

forma activa en células epiteliales, se induce la formación de estas estructuras necesarias para que las células migren en ciertas condiciones.

La familia de las Rho-GTPasas regula la dinámica del citoesqueleto pero además, numerosas líneas de investigación otorgan a las Rho-GTPasas una función en el establecimiento y mantenimiento de las uniones adherentes. Por ejemplo, la microinyección en queratinocitos de la forma dominante negativa de Rac1 o de la toxina C3 botulínica (que inhibe RhoA), inhibe la acumulación de cadherinas en los lugares de contacto célula-célula [179]. Sin embargo los efectos de Rac1 y RhoA sobre la localización de las cadherinas depende del tipo celular y del grado de maduración de las uniones [180].

Estos y otros estudios indicaban que Rac1, Cdc42 y RhoA podían regular la adhesión mediada por cadherinas. Sin embargo, ¿esta regulación es directa, afectando al complejo de adhesión, o por el contrario un efecto indirecto sobre elementos del citoesqueleto? IQGAP, un efector de Rac1 y Cdc42, regula negativamente la adhesión mediada por E-cadherina a través de la interacción con β -catenina. Dicha interacción provoca la disociación de α -catenina del complejo de adhesión y por lo tanto la pérdida de las uniones [153]. Las formas activas de Rac1 y Cdc42 inhiben la interacción de IQGAP con β -catenina, lo que se traduce en un aumento de la adhesión [181]. Se puede hipotetizar entonces que E-cadherina coexiste en equilibrio entre dos complejos: E-cadherina/ β -catenina/ α -catenina y E-cadherina/ β -catenina/IQGAP1. La relación entre una forma u otra determinará la fuerza de la adhesión. Así cuando las cantidades de Rac1 y Cdc42 activas aumenten, se producirá una inhibición de IQGAP1 que se traducirá en una disminución de los complejos E-cadherina/ β -catenina/IQGAP1 y por lo tanto en un aumento de la adhesión.

Un trabajo reciente [182] postula que una vez formados los complejos de adhesión, es decir la unión cadherina-cateninas y posterior reagrupamiento lateral de moléculas de E-cadherina, se produciría la activación de las GTPasas. Éstas podrían unirse entonces a efectores específicos (ver **Tabla IV**) y activar vías de transducción (ver **Figura 35**).

De manera similar a lo que ocurre con las proteínas GEF y GAP, los efectores se unen a las GTPasas mediante la interacción con las regiones *Switch I* y *II* pero los residuos concretos aún no han podido ser identificados [183]. Estos efectores participarían en procesos que aumentarían la estabilidad de la adhesión (la

polimerización de actina y el remodelaje del citoesqueleto), o jugarían un papel en el desarrollo del fenotipo epitelial (compactación, polimerización, expresión de genes epitelio-específicos). De esta manera la adhesión mediada por cadherinas produciría la activación de Rac1 y Cdc42 que a su vez estabilizarían el complejo cadherina-cateninas. Sin embargo el papel de RhoA en este proceso no está claro.

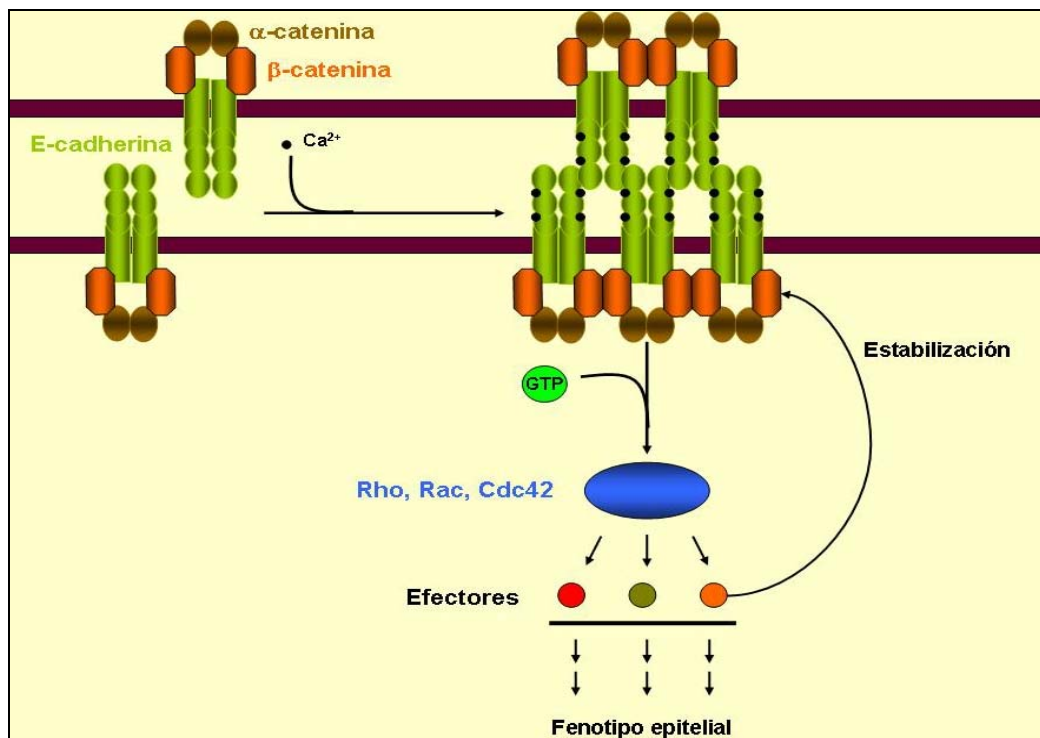


Figura 35. Modelo de regulación de las uniones adherentes por las GTPasas. Adaptado de Braga, 2002.

Rho	Rac	Cdc42
ROCK (función desconocida)	PAK (expresión génica y actina)	WASP (actina y filopodios)
PKN (expresión génica)	IQGAP-1 (adhesión celular)	Ack (transporte vesículas)
mDia (actina)	POSH (expresión génica)	MRCK (filopodios)

Tabla IV. Efectores de las Rho-GTPasas

Existen otros mecanismos indirectos por los cuales las Rho-GTPasas podrían regular la adhesión célula-célula:

➤ **Reciclaje de las cadherinas**

Al igual que ocurre con otras proteínas transmembrana, un *pool* de E-cadherina es constantemente endocitado (probablemente vía clatrina) y de vuelta reciclado a la membrana. La cantidad de E-cadherina endocitada dependerá tanto de la confluencia como de señales extracelulares [184].

Es conocido el papel de las Rho-GTPasas en la regulación del transporte endocítico [185]. Se sabe que las formas constitutivamente activas tanto de Rac1 como de RhoA inhiben, en fibroblastos, la endocitosis dependiente de clatrina. Esto sugiere que quizás las Rho-GTPasas podrían regular la adhesión mediante el control del transporte de cadherinas [186], aunque el mecanismo es totalmente desconocido.

➤ **Digestión de E-cadherina por metaloproteasas**

Se ha propuesto que el ectodominio de muchas proteínas transmembrana de tipo I, como la E-cadherina, es procesado proteolíticamente durante el desarrollo así como en la migración tumoral. Rac1 y Cdc42 tienen un efecto activador sobre determinadas metaloproteasas (Rac1 activa la MMP-2) y de esta manera podrían influir en el procesamiento de la E-cadherina y como consecuencia en la adhesión celular [187]. Sin embargo, esta teoría ha sido discutida recientemente dado la falta de reproducibilidad en la detección del ectodominio de la E-cadherina.

II.2. p120-CATENINA

II.2.1. Características generales

p120-catenina es una catenina implicada en la adhesión celular mediada por cadherinas. Interacciona directamente con el dominio yuxtamembrana de la E-cadherina [188].

Aunque originalmente fue identificada como un sustrato de la tirosina quinasa Src [105], p120-catenina también es fosforilada en tirosinas por una gran variedad de receptores tirosina quinasas [106, 107, 136], lo que le otorga un papel importante en la transducción de señales y la transformación celular. Sin embargo, a diferencia de otros sustratos de tirosina quinasas, no contiene motivos estructurales tipo SH2 o SH3. p120-catenina también contiene un dominio armadillo central que comparte un 22% de similitud con el dominio armadillo de β -catenina [32, 189]. Es a través del dominio armadillo (aa 347-820), concretamente por las repeticiones 1 a la 7, por donde interacciona con el dominio yuxtamembrana de E-cadherina [107], (revisado en [11]).

Muchas observaciones sugieren que la función de p120-catenina en los complejos de adhesión es diferente a la función estructural que ejercen β -catenina o placoglobina en las uniones adherentes:

- Mientras que β -catenina y placoglobina interaccionan de forma mutuamente excluyente con E-cadherina [43, 51, 190], p120-catenina puede unirse a E-cadherina independientemente de β -catenina o placoglobina [107, 188, 190].
- p120-catenina no interacciona con α -catenina ni APC [191].
- La sobreexpresión de p120-catenina, pero no la de β -catenina, provoca un cambio fenotípico en fibroblastos denominado *branching*, para el que se requiere gran parte del dominio armadillo de p120-catenina [12] y que recientemente ha sido atribuido a una potente inhibición de RhoA [192, 193] y/o activación de Rac1 [193, 194].

De este modo p120-catenina aporta unas propiedades únicas al complejo de adhesión, que junto con β -catenina y placoglobina regulan la adhesión celular, el desarrollo y procesos cancerígenos.

II.2.2. Estructura y nomenclatura

p120-catenina se agrupa dentro de la familia p120. Todos los miembros de esta familia comparten las características estructurales del dominio armadillo y poseen 10 repeticiones armadillo con interrupciones en las repeticiones 4, 6 y 9. Podemos diferenciar dos grupos en base al grado de similitud con p120-catenina y a su localización subcelular. El primer grupo comparte un 45% de homología con p120-

catenina en sus dominios armadillo y encontramos por ejemplo ARVCF, δ -catenina y p0071 [195]. El segundo grupo solo comparte un 30% de similitud y engloba proteínas que se localizan en los desmosomas [196]: las plakofilinas. Todas estas proteínas también se pueden encontrar en el núcleo.

Su estructura (ver esquema **Figura 36**) consiste en un dominio central armadillo flanqueado por dos extremos terminales. El extremo N-terminal presenta funciones reguladoras, contiene un dominio *coiled coil* (aa 1-45) implicado en interacciones proteína-proteína y un dominio regulador con un gran número de residuos serina, treonina y tirosina. En el extremo C-terminal, cuya función es todavía desconocida, se localiza un dominio PDZ.

Originalmente se la designó p120CAS (*cadherin-associated Src substrate*) pero esta nomenclatura condujo a errores, ya que diferentes sustratos de Src fueron denominados simultáneamente con el término CAS. De esta manera para evitar confusiones se pasó a llamar p120-catenina.

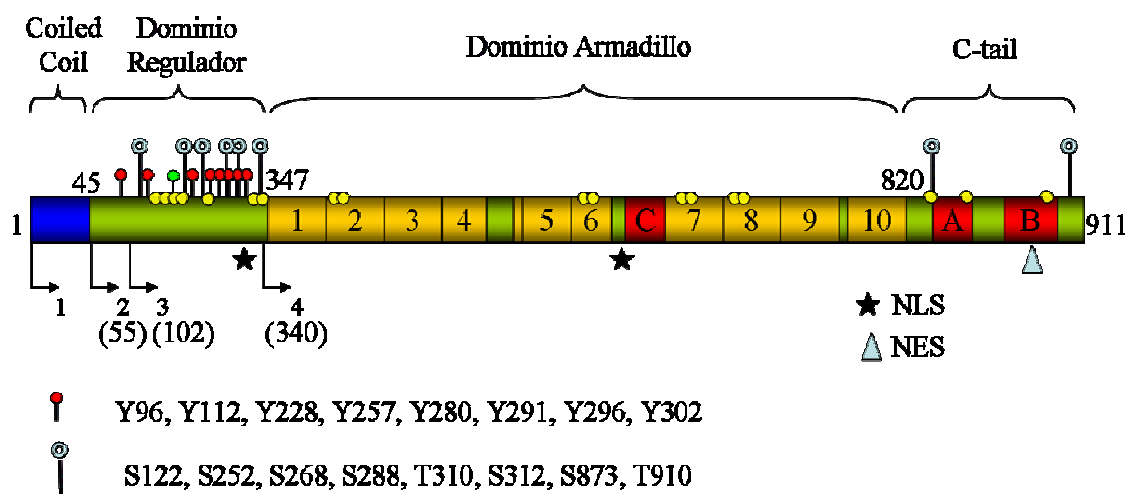


Figura 36. Esquema de la estructura de p120-catenina. Adaptado de Reynolds y Ferguson, 2004. Las isoformas 2,3 y 4 comienzan respectivamente en los aminoácidos 55, 102 y 340.

La nomenclatura es complicada debido a la existencia de numerosas isoformas de p120-catenina. Las isoformas humanas de p120-catenina derivan del *splicing* alternativo de un mismo gen [197, 198]. En el extremo N-terminal existen cuatro inicios de transcripción diferentes que dan lugar a la expresión de las isoformas 1, 2 (aminoácido 55), 3 (aa 102) o 4 (aa 340) de p120-catenina según el ATG utilizado

[197]. Además existe un *splicing* alternativo en el extremo C-terminal que lleva a la utilización del exón A, el exón B, ambos exones o a ninguno de ellos. El significado funcional del exón A no se conoce, pero el exón B codifica para una secuencia de localización nuclear (NES). En raras ocasiones p120-catenina contiene una región codificada por un exón adicional (exón C), el cual se inserta en medio de la repetición armadillo número 6. Todas estas combinaciones de *splicing* tanto en el extremo N- como en el C-terminal, generan una compleja mezcla de isoformas que se expresan en función de la línea celular. Esta expresión tejido específica denota diferencias funcionales entre las distintas isoformas de p120-catenina. Por ejemplo, macrófagos y fibroblastos preferencialmente expresan isoformas largas (p120-catenina-1A), mientras que células epiteliales, menos móviles, expresan mayoritariamente la isoforma p120-catenina-3A (aa 102). La isoforma 4 (aa 340), a la que le falta la totalidad del dominio regulador y el *coiled coil*, se expresa raramente por lo que no debe de ser relevante en la célula, pero cuando lo hace aumenta la estabilidad y la adhesión celular no puede ser regulada [110, 199]. Las isoformas cortas, como son la 2, 3 y 4, no tienen el dominio *coiled coil* de interacción proteína-proteína. Por lo tanto este dominio N-terminal debe tener funciones muy concretas, presumiblemente reclutando proteínas. Así por ejemplo, la quinasa FER se asocia específicamente con la isoforma 1 pero no con las isoformas más cortas [136, 145]. Se ha propuesto que esto aumenta la concentración efectiva de esta quinasa en los complejos de adhesión (recordar que Fer fosforila la Tyr-142 de β -catenina, lo que inhibe la interacción β -catenina/ α -catenina [145]).

A pesar de todos estos procesos de *splicing*, el dominio armadillo permanece intacto y libre para interactuar con las cadherinas.

II.2.3.Función

Indudablemente la fosforilación de p120-catenina regula su función. p120-catenina es un gran sustrato de Src, tanto *in vivo* como *in vitro*, pero además p120-catenina es fosforilada en tirosinas en respuesta a numerosos factores, por ejemplo EGF, PDGF, CSF-1, VEGF y NGF [106, 200]. Se desconoce si esta fosforilación es directa o a través del reclutamiento de otras tirosina quinasas como por ejemplo Src. En muchas células p120-catenina también es fosforilada en serinas (y en menor grado en treoninas) [106].

Aunque de momento no se ha conseguido correlacionar una función con una fosforilación individual, la gran mayoría de las tirosinas, así como serinas y treoninas, se localizan en el dominio regulador N-terminal [201, 202], el cual modula muchas de las actividades de p120-catenina (ver **Figura 36**). Por ejemplo, las isoformas 1 y 3 pero no la 4 de p120-catenina producen *branching* [12], fenotipo asociado a la regulación de las RhoGTPasas. Pensamos en la posibilidad de que este dominio N-terminal (regulador) estuviera implicado en el acoplamiento físico y funcional de p120-catenina con la RhoGTPasa.

➤ **p120-catenina en las uniones adherentes**

La fosforilación en tirosinas de p120-catenina aumenta su afinidad por las cadherinas [142, 203, 204], pero para que p120-catenina sea fosforilada, tanto en tirosinas como en serina o treoninas, ha de ser reclutada hacia la membrana a través de su interacción con las cadherinas [108, 190]. Esto implica que cuando p120-catenina se localiza en el citoplasma (como ocurre en células metastásicas que han perdido la expresión de cadherinas) estaría virtualmente no fosforilada y probablemente sería incapaz de recibir señales [111].

Experimentos con lisados celulares determinaron que solo un 5-20% de p120-catenina se encontraba asociada a las cadherinas [205]. Por el contrario, experimentos de inmunofluorescencia otorgaban una colocación precisa entre p120-catenina y las cadherinas [108]. Estudios recientes apoyan esta última teoría. Se ha visto que en células deficientes en E-cadherina, por ejemplo células L, p120-catenina se encuentra en el citoplasma, mientras que si se reestablece la expresión de E-cadherina se produce un reclutamiento de p120-catenina a las uniones adherentes. De este modo se puede afirmar que las cadherinas son suficientes y necesarias para reclutar p120-catenina a la membrana y que además, la estequiometría de p120-catenina en los complejos de E-cadherina es similar a la de β -catenina [206].

Juntas, estas cateninas regulan la dinámica de las uniones celulares modulando procesos como son el reagrupamiento lateral de cadherinas y la fuerza de unión entre moléculas de cadherina. Pero es en este punto donde hay más controversia, ya que mientras unos autores otorgan un papel negativo de p120-catenina en la regulación de los contactos celulares [111] (revisado en [13]), otros le otorgan un papel positivo [108].

Aunque probablemente p120-catenina participa en todas estas acciones, estudios recientes sugieren que otra función adicional de p120-catenina en el complejo de adhesión sería regular el *turnover* de cadherinas [199, 207]. En condiciones normales el *turnover* de las cadherinas ocurre constitutivamente mediante un mecanismo de endocitosis. Estos autores describen que p120-catenina interaccionaría directamente con E-cadherina evitando su internalización en los lisosomas y aumentando así la vida media de la E-cadherina; todo ello sin afectar los niveles de mRNA de E-cadherina. Así, p120-catenina influye directa y positivamente en la fuerza de adhesión, controlando la cantidad de E-cadherina disponible en la superficie de la membrana. Un ejemplo concreto lo encontramos en las células de carcinoma SW48 (deficientes en la expresión de p120-catenina). Estas células presentan escasa adhesión pero restableciendo la expresión de p120-catenina se rescata el fenotipo epitelial mediante la estabilización de E-cadherina [199].

➤ **p120-catenina como regulador de las Rho-GTPasas**

Diversos grupos de investigación otorgan a p120-catenina un papel regulador en la función de las Rho-GTPasas. La sobreexpresión de p120-catenina en fibroblastos induce un drástico cambio fenotípico (*branching*, **Figura 37**) como consecuencia de una fuerte inactivación de RhoA [148] y/o activación de Rac1 [193, 194]. Experimentos *in vitro* con proteínas purificadas indican que p120-catenina no tiene actividad GEF ni GAP, es decir, que no tiene una actividad capaz de favorecer el intercambio de GDP por GTP o viceversa. Pero a pesar de ello p120-catenina es capaz de inhibir a RhoA de forma similar a como lo haría un GDI (*Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor*) [148], estabilizando la forma inactiva de RhoA. Esta idea implica una interacción directa entre p120-catenina y Rho, interacción que ha sido demostrada en *Drosophila* mediante ensayos de *Pull-Down* y por coimmunoprecipitación a partir de lisados celulares [14]. En estos ensayos p120-catenina interacciona mejor con la forma inactiva de Rho1, es decir la unida a GDP, dato que apoyaría la hipótesis de que p120-catenina actuaría como un GDI, secuestrando la forma inactiva de Rho1 e impidiendo su activación. Sin embargo estos datos en *Drosophila* tienen que ser tomados con precaución: la p120-catenina de *Drosophila* difiere bastante de la de mamíferos (ver **Tabla V**) y su delección no desestabiliza la E-cadherina, a diferencia de lo que ocurre en células humanas [32].

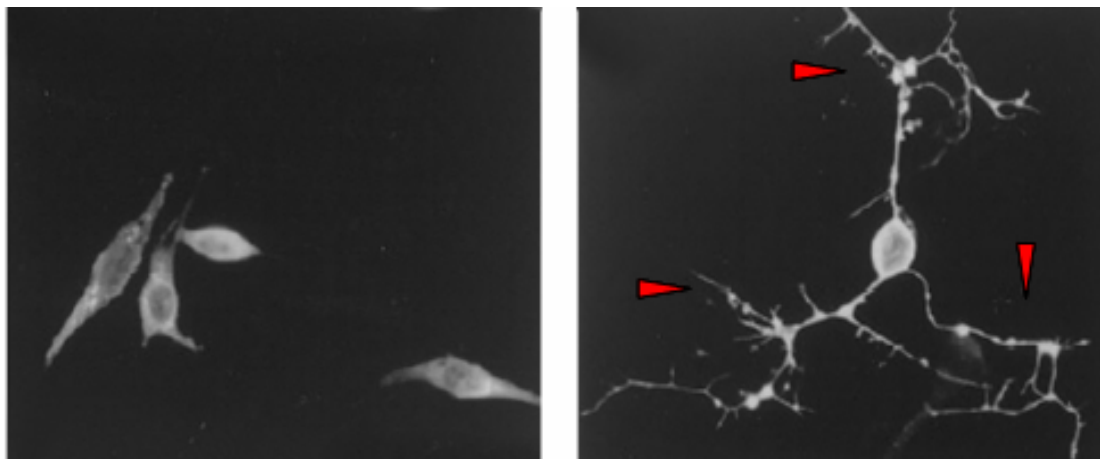


Figura 37. Fenotipo *branching* en fibroblastos NIH3T3, de Reynolds et al., 1996. En la foto de la izquierda se muestran células NIH3T3 normales, en la derecha se pueden observar las arborizaciones típicas de este fenotipo (flechas rojas).

p120_humana	MDDSEVESTASILASVKEQEAQFEKLTRALEEERRHVSAQLERVRVSPQDANPLMANGTL	60
p120_murina	MDDSEVESTASILASVKEQEAQFEKLTRALEEERRHVSAQLERVRVSPQDANSLMANGTL	60
p120_Drosophila	-----MEARSLKHSLIGLNMNSTHINMDLS-LTHEPANMQSQFG----	38
	: .::: .*: : *:. :*. : .* : :. .:	
p120_humana	TRRHQNGRFVGDADLERQKFSDLKLNQPDHSHLLYSTIPRMQEPGQIVETYTEEDPEGA	120
p120_murina	TRRHQNGRFVGDADLERQKFSDLKLNQPDHSHLLYSTIPRMQEPGQIVETYTEEDPEGA	120
p120_Drosophila	-----SFQNYDQFSAAG-----YSSTPLYITKPTGVGAIKTVAPHCS	75
	. *::: . . * *:: * * : * : * . :	
p120_humana	MSVVSVETSDDGTTRRTETTvkKVVKTvTTRTVQPvAMGPDGLPVDASSVSNNYIQTLGR	180
p120_murina	MSVVSVETDDGTTRRTETTvkKVVKTMTTRTVQPvPMGPDGLPVDASAVSNNYIQTLGR	180
p120_Drosophila	QNKIETNSTDNSIPDIENHPLATTvRYVQAG-----QYE	109
	. : .::: * . . : : . . * : : :	
p120_humana	DFRKNNGGPGPYVQAGTATLPRNFHYPPDGYSRHYEDGYPGGSNDYGSLSRVTRIEER	240
p120_murina	DFRKNNGGPGPYVQAGTATLPRNFHYPPDGGRHYEDGYPGGSNDYGSLSRVTRIEER	240
p120_Drosophila	DTSEYGVAGLTCGIDSEYTAAEVVPCYTSAN-----YTGIQNTTSSIKPFS--GRP	160
	* : * . * : . . * * : * . * . * . * . : . . :	
p120_humana	YRPSMEGYRAPSQRQDVYGPQPQVRVGGSSVDLHRFHPEPYGLEDDQRSMGYDDL DYGMMS	300
p120_murina	YRPSMEGYRAPSQRQDVYGPQPQVRVGGSSVDLHRFHPEPYGLEDDQRSMGYDDL DYGMMS	300
p120_Drosophila	FNDNINGAEAVADSQRCTFKSSAEFKLPQFAMSSINTVPQRLEEKD-----	206
	: . : : * . * : : . : : . . . : : . * * : . :	
p120_humana	DYGTARRTGTPSDPRRRLRSYEDMIGEEVPSDQYYWAPLAQHERGLASL	350
p120_murina	DYGTARRTGTPSDPRRRLRSYEDMIGEEVPPDQYYWAPLA-----	340
p120_Drosophila	DYIEGSENDICSTMRWRDPNLSEV-----	230
	** * * * . . : :	

Tabla V. Homología de secuencia entre diferentes p120-catenina. Se muestra la homología existente entre la secuencia del extremo N-terminal de p120-catenina humana, murina y de *Drosophila*. En rojo se muestra la tirosina 96, conservada en las tres especies, mientras que las tirosinas 112, 217 y 228 que no se conservan en *Drosophila*, se muestran en azul.

Otros estudios han puesto de manifiesto que la unión de p120-catenina a RhoA es mutuamente excluyente con E-cadherina [192], lo que sugiere que quizás p120-catenina podría reclutar la forma inactiva de Rho desde el citoplasma y translocarla a la membrana, donde Rho podría ser activada (por algún RhoGEF) para promover el ensamblaje o desensamblaje de las uniones adherentes. Este mecanismo permitiría asegurar que la GTPasa fuera activada en el lugar y en el momento adecuado. Una vez en la membrana p120-catenina también podría ser fosforilada por diferentes quinasas.

Algunos trabajos sugieren un papel importante para las interacciones entre p120-catenina y Rho en el citoplasma. La mejor caracterizada y que consiste en la capacidad de p120-catenina de producir *branching* cuando se sobreexpresa y el incremento de la movilidad celular [193, 208], es claramente independiente de la función de las cadherinas ya que ocurre en células que no expresan estas moléculas. Además, la coexpresión de p120-catenina con una forma dominante negativa de la cadherina (cadherina que interacciona con p120-catenina pero no puede formar uniones adherentes) bloquea el *branching* debido a un secuestro de p120-catenina [11]. Esto no indica que p120-catenina no pueda interaccionar con ambas proteínas a la vez, sino que la cadherina secuestra a p120-catenina en la membrana lejos de donde podría interaccionar con Rho, en el citoplasma. Además, niveles bajos de sobreexpresión de p120-catenina causan un incremento de la movilidad en fibroblastos, asociado a una activación de Rac [193, 194]. Todos estos datos conducen a la hipótesis de que el *pool* de p120-catenina citoplasmática pueda estar involucrado en la regulación de la movilidad en células deficientes en E-cadherina.

Otro mecanismo adicional de regulación de las GTPasas por parte de p120-catenina sería indirecto. p120-catenina interacciona con Vav2 (un GEF tanto para Rac1, Cdc42 como para RhoA) e inhibe el fenotipo inducido por p120-catenina en fibroblastos. De esta manera Vav2 secuestraría a p120-catenina que ya no podría interaccionar con RhoA y por lo tanto no podría inhibirla [193].

➤ **p120-catenina en el núcleo**

p120-catenina también tiene un papel en el núcleo. El factor de transcripción Kaiso se une directamente al dominio armadillo de p120-catenina [113]. Kaiso pertenece a la superfamilia BTP/POZ (*Pox virus and zinc finger*) de factores de transcripción cuyos miembros (BCL6, PLZF) se caracterizan por tener un extremo N-

terminal hidrofóbico de unos 120 aminoácidos (dominio POZ) y un extremo C-terminal con motivos de dedos de zinc. La mayoría de las proteínas BTP/POZ son represores transcripcionales que actúan reclutando a los promotores de los genes diana, macrocomplejos de histonas deacetilasas y correpresores [209, 210]. El dominio POZ es el encargado de la homo- y heterodimerización, mientras que el extremo C-terminal se une a secuencias específicas del DNA.

Kaiso es un represor de genes activados por β -catenina/Tcf-4 y tiene sitios de unión en estos promotores, junto con las secuencias de unión a Tcf [211]. Recientemente se ha descrito que Kaiso reprime la expresión de diferentes genes de la vía Wnt (Siamois, c-Fos, Ciclina-D1 y c-Myc) en asociación con Tcf-4. Kaiso promueve un estado de represión impidiendo, ya sea de forma directa o indirecta, la interacción β -catenina/Tcf. La interacción de p120-catenina con Kaiso provoca una desrepresión del promotor de Siamosis [210], al impedir p120-catenina la interacción de Kaiso con el DNA.

ANTECEDENTES

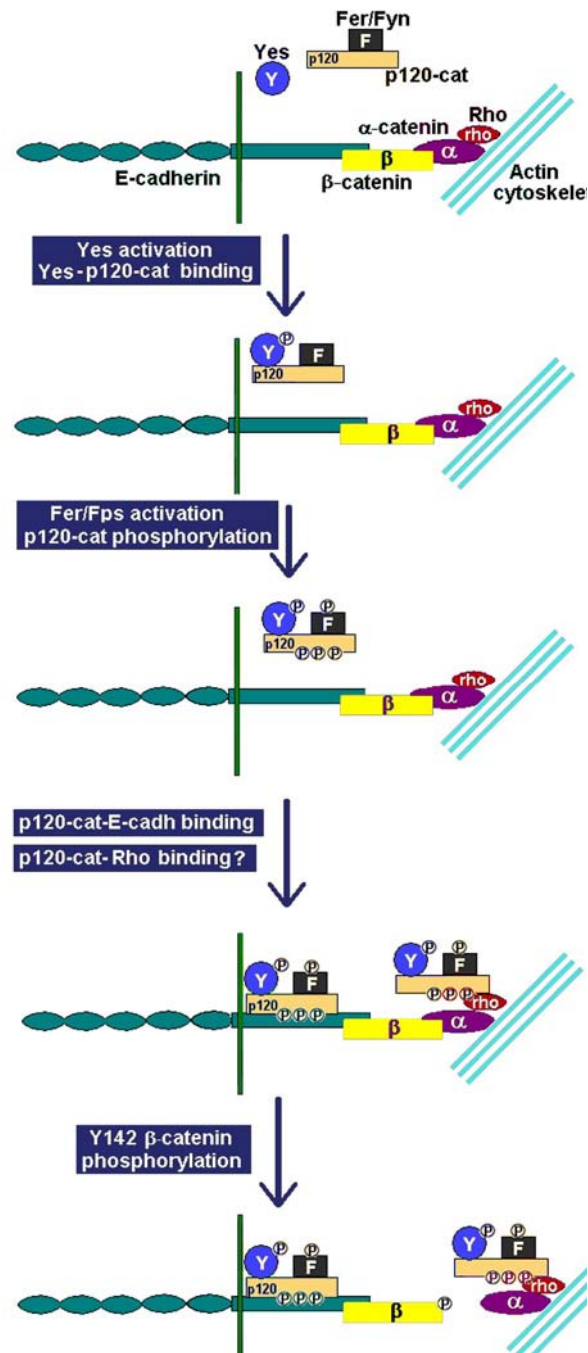
Datos previos del grupo indican que p120-catenina interacciona constitutivamente con diferentes tirosina quinasas, tales como Fer y Fyn. p120-catenina también interacciona con Yes pero solo cuando ésta se encuentra activada [145]. Estos resultados sugieren que p120-catenina desarrolla un papel como acoplador de quinasas, es decir, facilita su reclutamiento a los complejos de adhesión. Estas quinasas son importantes para la regulación de la funcionalidad de las uniones adherentes.

La alteración de la adhesión celular está asociada a una falta de interacción entre β -catenina y E-cadherina [147]. El desensamblaje de estos complejos de adhesión va acompañado por un incremento en la fosforilación en tirosinas de β -catenina. Trabajos previos de nuestro grupo han evidenciado que la fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina inhibe la interacción entre β -catenina y E-cadherina, tanto *in vivo* como *in vitro* [142, 144] mientras que la fosforilación de la tirosina 142 regula la interacción entre β -catenina y α -catenina [145]. Cualquiera de estas fosforilaciones produciría el desensamblaje de las uniones adherentes, pero es necesaria la fosforilación de ambos residuos para que β -catenina pueda desprenderse de las uniones adherentes y así migrar al núcleo y activar la transcripción de genes. Nuestro grupo ha descrito dos tirosina quinasas que fosforilan específicamente el residuo Tyr-142: Fer y Fyn.

La interacción de p120-catenina con la E-cadherina está regulada por fosforilación en tirosinas. En este caso la fosforilación en tirosinas de p120-catenina aumenta su afinidad por E-cadherina [142], lo que facilita la aproximación de las quinasas Fer y Fyn al complejo de adhesión y la consiguiente fosforilación de la tirosina 142 de β -catenina [145] (ver **Figura 38**). Para que esto suceda tanto p120-catenina como β -catenina han de estar interaccionando con E-cadherina. Datos recientes en *Drosophila melanogaster* sugieren que p120-catenina puede interaccionar indirectamente con α -catenina a través de la asociación de ambas proteínas a la GTPasa Rho1 [14]. De esta forma, la p120-catenina y sus quinasas asociadas podrían interaccionar con el complejo de adhesión de manera independiente a E-cadherina y

promover la disociación entre α -catenina y β -catenina, aunque β -catenina no estuviera unida a E-cadherina.

Figura 38. Modelo de regulación de la interacción β -catenina- α -catenina propuesto por el grupo. En las uniones adherentes, E-cadherina se asocia al citoesqueleto de actina a través de β -catenina y α -catenina. p120-catenina está asociada a Fer y/o Fyn y normalmente no se encuentra unida a los complejos de E-cadherina. Cuando se produce el estímulo del desensamblaje, Yes se une al complejo p120-Fer/Fyn y activa a estas quinasas. Es entonces cuando Yes, Fer/Fyn o ambas quinasas fosforilan a p120-catenina en residuos de tirosina aumentando su interacción con E-cadherina. Paralelamente, el complejo Fer/Fyn/Yes-p120-catenina se une a α -catenina a través de la asociación con Rho. La presencia de las quinasas Fer/Fyn en el complejo de adhesión promueven la fosforilación de β -catenina en la Tyr-142 y la consiguiente pérdida de la asociación α -catenina- β -catenina. No se han dibujado Fer, Fyn, Yes y Rho asociadas a la membrana, donde probablemente se localizan, para no añadir complejidad al modelo, Piedra et al., (2003).



Este modelo supone un papel de Rho como regulador y acoplador de tirosina quinasas a las uniones adherentes. Por ello nos interesó caracterizar como interaccionan Rho y p120-catenina y si la fosforilación de p120-catenina juega un papel en este proceso. También nos interesó determinar la relevancia de esta interacción en la regulación de la actividad de Rho.

OBJETIVOS

Los objetivos iniciales que nos planteamos al empezar esta parte del trabajo pueden resumirse en:

- 1) Caracterizar los requerimientos estructurales de la interacción de Rho con p120-catenina.
- 2) Determinar si la fosforilación de p120-catenina por diferentes tirosina quinasas afecta su capacidad de interaccionar con Rho.
- 3) En caso de confirmar que esta interacción estuviera regulada por fosforilación de tirosinas de p120-catenina, identificar los residuos implicados.
- 4) Determinar si p120-catenina es capaz de actuar como una proteína GDI para Rho.
- 5) Determinar la relevancia de la interacción p120-catenina/Rho *in vivo* en la regulación de los contactos celulares.

RESULTADOS

II.1. p120-CATENINA-1 (1-911) SE FOSFORILA POR LA QUINASAS SRC, FER, YES Y FYN

p120-catenina-1 era fosforilada por tirosina quinasas como Src, Fer, Yes y Fyn. Como se muestra en la **Figura 39** todas las quinasas fosforilaban p120-catenina-1 y una forma más corta de p120-catenina (aa 234-911), aunque ésta última en menor grado. Este resultado indicaba que todas las quinasas (Src, Fer, Yes y Fyn) fosforilan principalmente residuos tirosina localizados en los primeros 234 aminoácidos, pero también otros situados más C-terminal de p120-catenina.

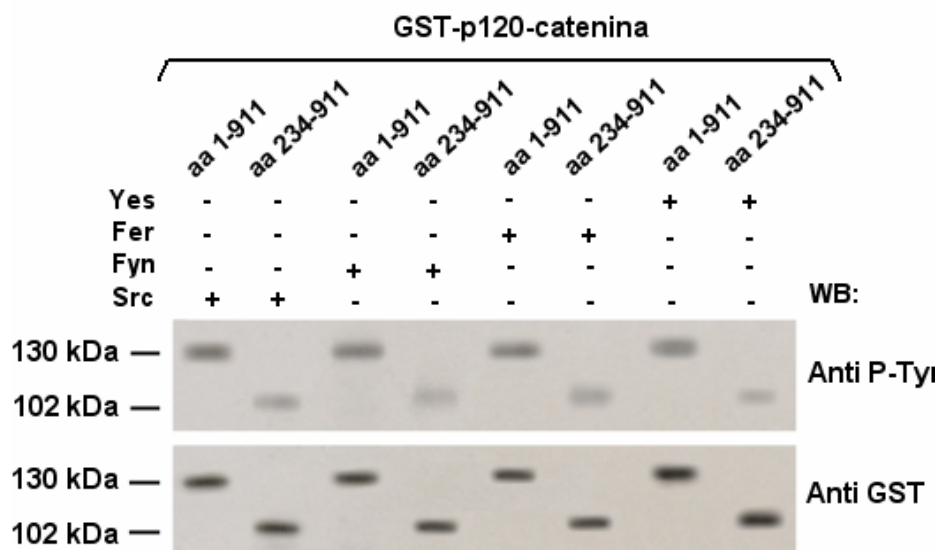


Figura 39. p120-catenina-1 y p120-catenina (234-911) se fosforilan por las quinasas Src, Fer, Fyn y Yes. 1,5 pmoles de las diferentes formas de GST-p120-catenina se fosforilaron con las quinasas Src, Fyn, Fer y Yes. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y *Western blot* mediante el uso de anticuerpos anti fosfotirosina.

II.2. EL EXTREMO N-TERMINAL DE p120-CATENINA REGULA LA INTERACCIÓN E-CADHERINA/p120-CATENINA

Miembros del grupo habían descrito que la fosforilación de p120-catenina por la quinasa Src aumentaba su afinidad por el dominio citosólico de la E-cadherina [142]. Recordemos que E-cadherina interacciona en el dominio armadillo de p120-catenina, concretamente entre las repeticiones 1-7 [199]. Determinamos si el extremo N-terminal podía regular la interacción con E-cadherina en otro dominio distante.

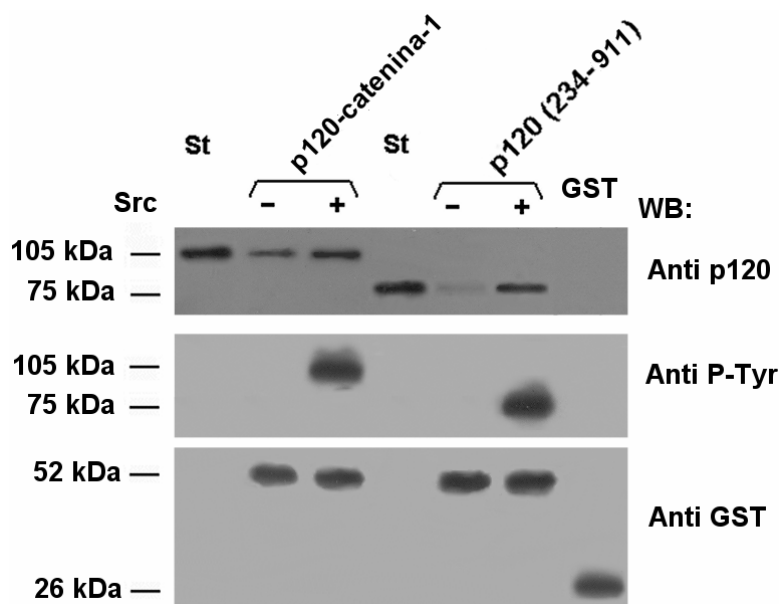


Figura 40. El extremo N-terminal de p120-catenina regula su interacción con E-cadherina. 0.64 pmoles de las diferentes formas de p120-catenina fueron incubadas con 1.2 pmoles de GST-cyto-Ecad o GST en un volumen final de 200 μ l, cuando se indica las muestras fueron fosforiladas por Src. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y *Western blot* mediante el uso de anticuerpos anti p120-catenina. La cantidad de proteína unida se determinó comparando los resultados con cantidades conocidas de p120-catenina (St, 0,08 pmol). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Se realizaron ensayos de interacción *in vitro* de GST-cyto-E-cadherina con la forma p120-catenina-1 y la forma delecionada p120-catenina (234-911). En la **Figura 40** se observa que la deleción de los primeros 234 aminoácidos de p120-catenina reducía notablemente la interacción con E-cadherina (comparar carriles 2 y 5), a pesar

de que la E-cadherina no interacciona en esta zona de p120-catenina. La fosforilación por Src de p120-catenina (234-911) aumentaba la interacción con la E-cadherina (carril 6), del mismo modo que ocurría con p120-catenina-1 (carril 3).

II.3. INTERACCIÓN DE p120-CATENINA CON RHOA

II.3.1. RhoA interacciona en el extremo N-terminal de p120-catenina

Con el objetivo de caracterizar la interacción entre ambas proteínas, se llevaron a cabo ensayos de interacción *in vitro* con diferentes mutantes delecionados de p120-catenina expresados como proteínas de fusión.

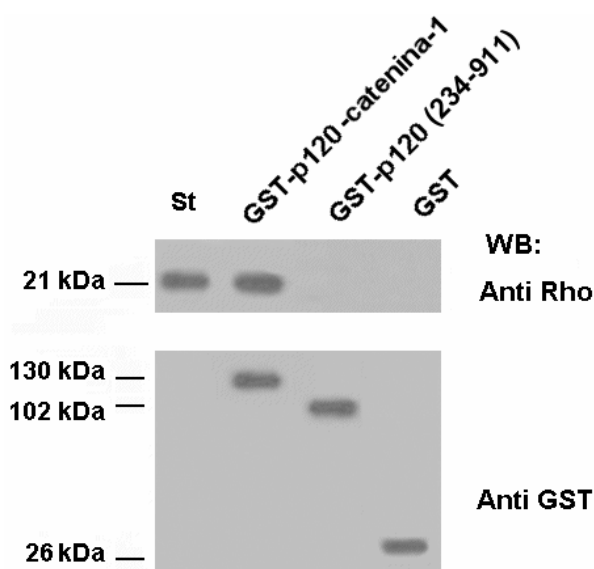


Figura 41. Interacción de RhoA con diferentes construcciones de p120-catenina. 1,5 pmoles de las formas de p120-catenina fusionadas con GST fueron incubadas con 5 pmoles de RhoA en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*. Los complejos se purificaron con Glutathion-Sepharosa y fueron analizados por *Western blot* con anticuerpos específicos contra Rho y GST. La cantidad de proteína unida se determinó comparando los resultados con cantidades conocidas de Rho (St, 0,8 pmol). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Como muestra la **Figura 41** RhoA interaccionaba con la forma 1 de p120-catenina (aa 1-911), mientras que no lo hacía con la forma más corta (aa 234-911). Este resultado indicaba que la interacción con RhoA tenía lugar a través de los 234 primeros aminoácidos de p120-catenina.

II.3.2. La región 96-234 de p120-catenina es la responsable de la interacción con RhoA

En un intento de caracterizar mejor el dominio de interacción de RhoA en p120-catenina, se expresaron otros mutantes delecionados de p120-catenina. Uno que contenía los primeros 234 aminoácidos de p120-catenina y otro más corto que sólo tenía los 95 primeros aminoácidos de p120-catenina. Los ensayos de interacción indicaron que la unión tenía lugar concretamente entre los residuos 96-234 (ver **Figura 42**, carriles 5 y 6). Hay que recordar que en esta región de p120-catenina (dominio regulador, ver esquema **Figura 36**) se localizan un gran número de residuos tirosina, serina y treonina, cuya fosforilación podría regular la función de p120-catenina y quizás su interacción con RhoA.

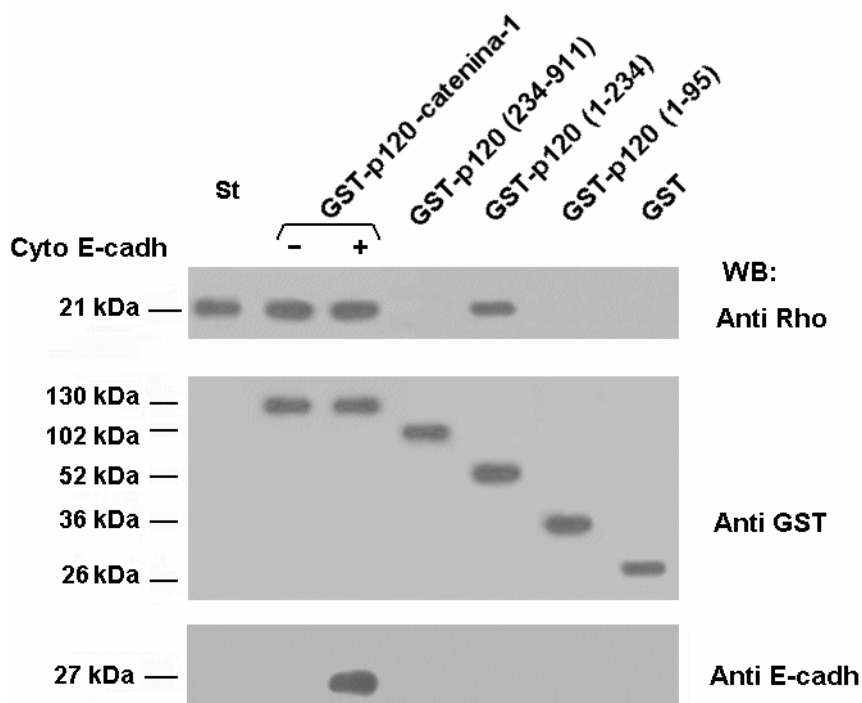


Figura 42. La región 96-234 de p120-catenina es la responsable de la interacción con RhoA. 1,5 pmoles de los diferentes fragmentos de p120-catenina unidos a GST fueron incubados con 5 pmoles de RhoA. Los complejos se

purificaron con Glutathion-Sepharosa y fueron analizados por *Western blot* con anticuerpo específico anti Rho y anti GST. La cantidad de proteína unida se determinó comparando los resultados con cantidades conocidas de Rho (St, 0,8 pmol). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

II.4. INTERACCIÓN DE p120-CATENINA CON LAS TIROSINA QUINASAS YES, FYN Y SRC

p120-catenina interaccionaba con las quinasas Fyn, Fer y Yes, pero no se sabía en que zona de p120-catenina tenía lugar esta interacción. Así que se realizaron ensayos de interacción con diversos mutantes delecionados de p120-catenina, al igual que en el caso de RhoA, para acotar la zona de interacción.

II.4.1. Fyn y Yes interaccionan en el dominio N-terminal de p120-catenina

Ensayos de *Pull-Down* de Fyn y Yes de células RWP-1, utilizando la isoforma 1 de p120-catenina y la construcción p120-catenina (234-911) unidas a GST, desvelaron que Fyn interaccionaba únicamente con la forma más larga de p120-catenina (ver **Figura 43**, 2º panel).

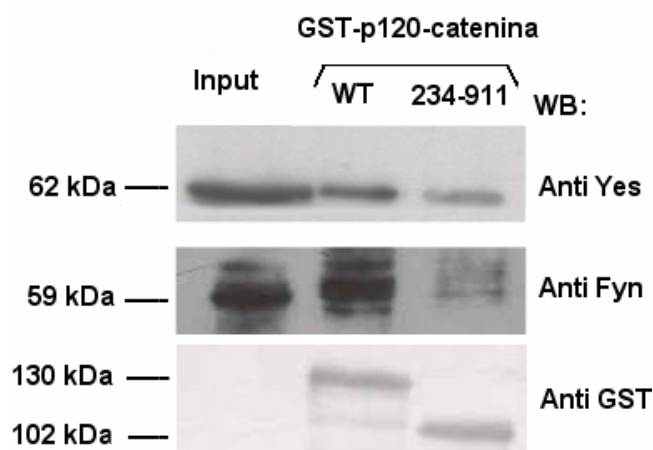


Figura 43. Fyn y Yes interaccionan con el dominio N-terminal de p120-catenina. 6 pmoles de los diferentes fragmentos de p120-catenina unidos a GST fueron incubados con 300 µg de extractos celulares totales de células IEC K-ras. Los complejos fueron analizados por *Western blot* utilizando anticuerpos anti Yes y anti Fyn. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Input: 10% de la cantidad de extractos utilizados en este ensayo.

Este resultado indicaba que la zona de interacción de Fyn también se localizaba en el dominio N-terminal de p120-catenina, del mismo modo que RhoA. La quinasa Yes interaccionaba con ambas construcciones (1^{er} panel), aunque lo hacía con mayor afinidad con la isoforma más larga. En el caso de la quinasa Src no se detectó interacción directa con p120-catenina.

II.4.2. La fosforilación de p120-catenina por la serina/treonina quinasa CKI dificulta su interacción con Fyn y Yes

La quinasa CKI (serina/treonina quinasa) fue descrita originariamente por su habilidad para fosforilar sustratos ácidos como la caseína [212]. Se ha localizado en muchas células eucariotas tanto unida a la membrana, como en el citoplasma o incluso en el núcleo. La CKI fosforila residuos serina localizados en la secuencia consenso: Ser/Thr(P)-X₂₋₃-Ser/Thr [213]. El extremo N-terminal de p120-catenina tiene un gran número de residuos serina y treonina, algunos de los cuales cumplen la secuencia consenso. Se realizaron ensayos de fosforilación con ATP [γ -³²P] y la quinasa CKI. En estos ensayos 0.1 pmoles de GST-p120-catenina-1 y GST-p120-catenina (234-911) se incubaron con 10 miliunidades de quinasa CKI y 0,1 mM de ATP [γ -³²P] (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 p120-catenina (234-911) por la quinasa CKI, en cambio sí se detectó fosforilación en p120-catenina-1 *wild type* (Figura 44).

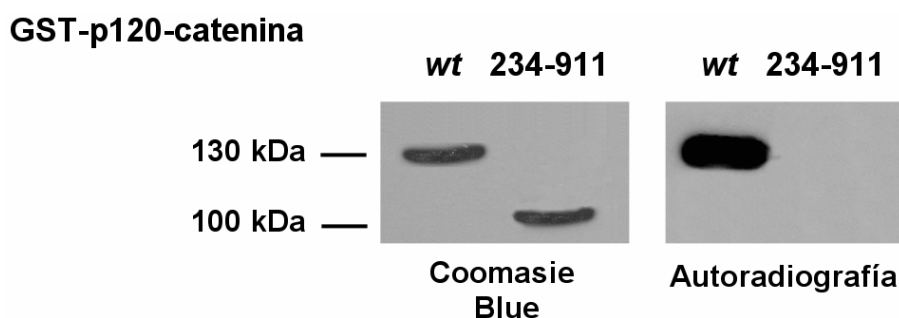


Figura 44. Fosforilación de las diferentes construcciones de p120-catenina. 0.1 pmoles de GST-p120-catenina-1 wt o GST-p120-catenina (234-911) fueron fosforilados en presencia de ATP [γ -³²P] por 10 miliunidades de CKI. Tinción del gel con *Coomassie Blue* (izquierda) y autorradiografía expuesta 12 horas a -80°C (derecha).

Esto indicaba que la quinasa CKI fosforilaba residuos serina y treonina localizados en los primeros 234 aminoácidos, región donde interaccionaban RhoA y las quinasas Fer, Yes y Fyn. De este modo estudiamos si esta fosforilación podía afectar a la interacción de p120-catenina con las quinasas Yes y Fyn.

A partir de estos resultados se realizaron ensayos de *Pull-Down* en los que GST-p120-catenina 1, cuando se indica, había sido previamente fosforilada por CKI. Como se muestra en la **Figura 45** la fosforilación de p120-catenina en serinas y treoninas, dificultaba notablemente su interacción con las quinasas Yes y Fyn.

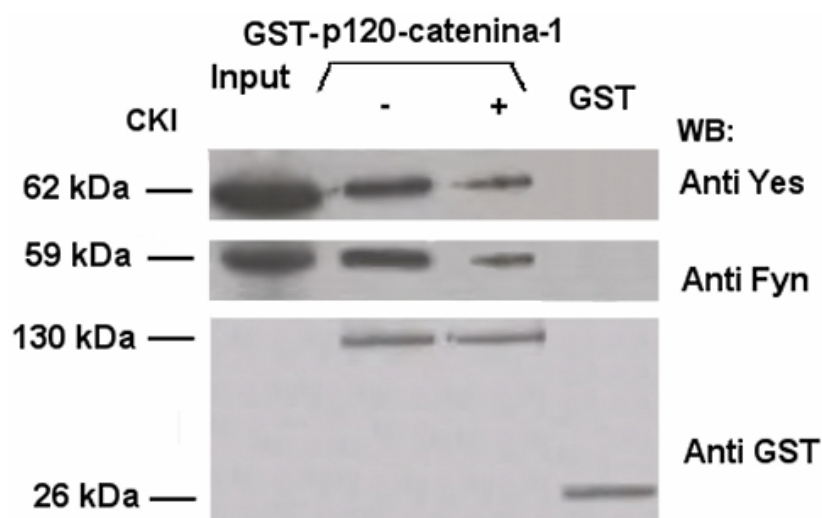


Figura 45. CKI dificulta la interacción de p120-catenina con las quinasas Fyn y Yes. 6 pmoles de GST-p120-catenina, fosforilados o no por CKI, fueron incubados con 300 μ g de extractos celulares totales de células IEC K-ras. Los complejos fueron analizado por *Western blot* utilizando anticuerpos anti Yes y anti Fyn. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Input: 10% de la cantidad de extractos utilizados en este ensayo.

II.4.3. RhoA potencia la interacción de Fyn con p120-catenina

Fyn y Yes interaccionaban en la misma región de p120-catenina donde lo hacía RhoA (dominio regulador). Una posibilidad que nos planteamos era que la unión de RhoA a p120-catenina afectara a la interacción de p120-catenina con las quinasas. Para ello se realizaron ensayos de *Pull-Down* en condiciones en las que previamente se había incubado, o no, p120-catenina con RhoA.

La presencia de RhoA facilitaba la interacción de p120-catenina con las quinasas Fyn y Yes (ver **Figura 46**), sugiriendo que quizás Rho esté afectando la conformación de p120-catenina.

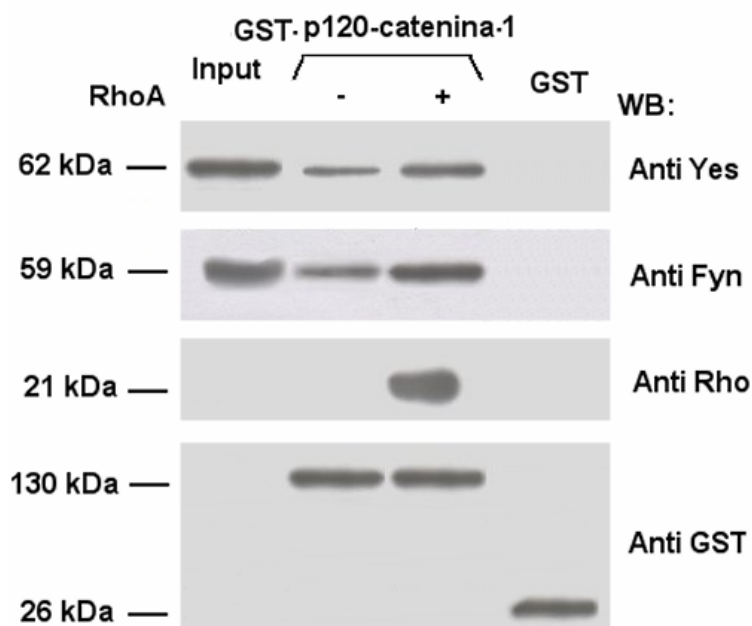


Figura 46. RhoA potencia la interacción de Fyn con p120-catenina. 6 pmoles de GST-p120-catenina-1 fueron incubados, cuando se indica, con RhoA. Se añadieron 300 μ g de extractos celulares totales de células IEC K-ras. Los complejos formados fueron purificados con Glutathion-Sepharosa y analizados por SDS-PAGE y *Western blot* con anticuerpos contra Yes y Fyn. Input: 10% de la cantidad de extractos utilizados en este ensayo.

II.5. REGULACIÓN DE LA INTERACCIÓN p120-CATENINA/RHOA POR FOSFORILACIÓN EN TIROSINAS

II.5.1. La fosforilación de p120-catenina por Src y Fyn tiene efectos opuestos en la interacción p120-catenina/RhoA

Estos resultados junto con datos previos del grupo [145] donde se había visto que estas quinasas fosforilaban p120-catenina, sugerían que quizás Fyn y Yes podrían regular la interacción p120-catenina/RhoA mediante fosforilación de residuos tirosina, presentes en el mismo extremo N-terminal de p120-catenina. Para comprobar si la

interacción entre p120-catenina y RhoA estaba regulada por fosforilación en tirosinas, se realizaron ensayos de interacción *in vitro* con GST-p120-catenina-1 previamente fosforilada, cuando se indica, con la tirosina quinasa correspondiente. De estos estudios se obtuvieron dos resultados opuestos. Mientras la fosforilación de p120-catenina por la quinasa Fyn tenía un efecto negativo en la interacción con RhoA, la fosforilación por Fer o Src tenía un efecto positivo (**Figura 47**, comparar carriles 3 con 4 y 5).

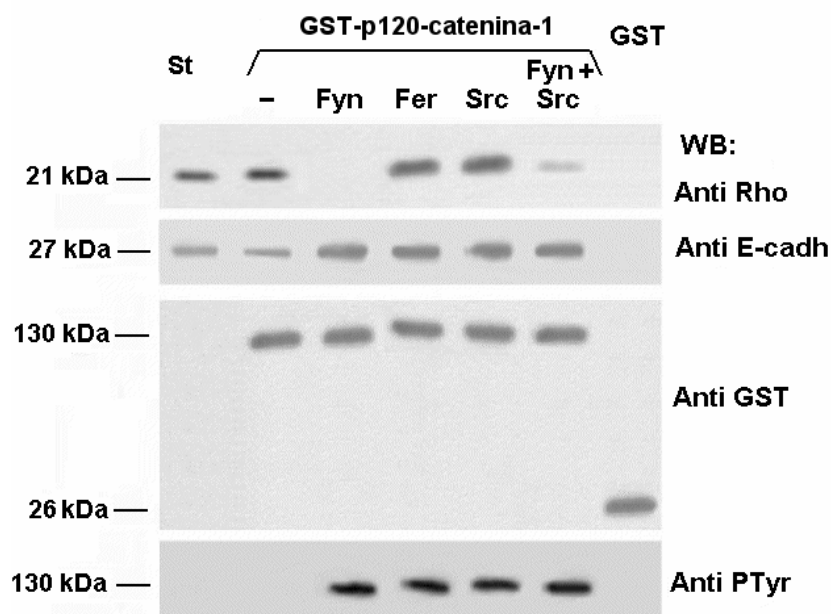


Figura 47. La fosforilación de p120-catenina afecta a su interacción con RhoA. 1,5 pmoles de GST-p120-catenina se fosforilaron con la quinasa Fyn, Src y Fer (ésta última purificada a partir de células RWP1 transfectadas), en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*. Posteriormente se incubaron con 5 pmoles de RhoA y los complejos formados se purificaron con Glutathion-Sepharosa y se analizaron por SDS-PAGE y *Western blot*. La cantidad de proteína unida se determinó comparando los resultados con cantidades conocidas de Rho (St, 0,8 pmol). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Como consecuencia de estos resultados nos planteamos cual era el efecto predominante en el caso que ambas quinasas fosforilasen a la vez p120-catenina. ¿Aumentaba o disminuía la interacción p120-catenina/RhoA? p120-catenina fue fosforilada simultáneamente con ambas quinasas y se observó (ver **Figura 47**, carril 6) que la interacción de p120-catenina con RhoA se inhibía y por lo tanto el efecto de la fosforilación por Fyn predominaba sobre el de Src. También observamos que la fosforilación de p120-catenina por cualquiera de las quinasas aumentaba su interacción con E-cadherina (ver **Figura 47**, 2° panel).

II.5.2. Las tirosinas implicadas en la regulación de la interacción p120-catenina/RhoA se localizan en el extremo N-terminal de p120-catenina

Para saber si realmente las tirosinas que buscábamos estaban localizadas en el extremo N-terminal de p120-catenina se repitió el experimento anterior, pero en este caso con la construcción p120-catenina (1-234). Si las tirosinas estaban localizadas en este dominio N-terminal, cuando fosforiláramos esperaríamos ver el mismo efecto que con la proteína entera. Como muestra la **Figura 48** al fosforilar el extremo N-terminal se observó el mismo comportamiento que con la proteína entera, es decir, al fosforilar con Fyn disminuía la afinidad por RhoA y al fosforilar por Src aumentaba dicha afinidad. Este resultado indicaba que las tirosinas modificadas se localizaban en el extremo N-terminal de p120-catenina, el dominio de unión de RhoA.

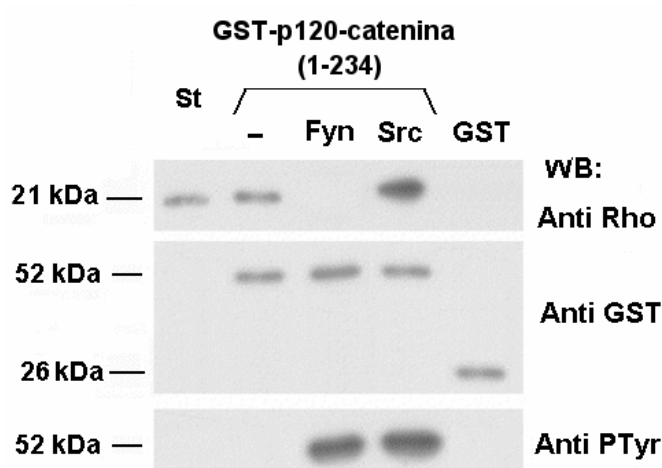


Figura 48. Las tirosinas implicadas en la regulación de la interacción p120-catenina/RhoA se localizan en el extremo N-terminal de p120-catenina. 1,5 pmoles de GST-p120-catenina (1-234) se fosforilaron con la quinasa Fyn y Src, en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*. Posteriormente se incubaron con 5 pmoles de RhoA y los complejos formados se purificaron con Glutathion-Sepharosa y se analizaron por SDS-PAGE y *Western blot*. La cantidad de proteína unida se determinó comparando los resultados con cantidades conocidas de Rho (St, 0,8 pmol). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

II.5.3. Las tirosinas 96 y 228 son fosforiladas tanto por Src como por Fyn

Nos propusimos identificar las tirosinas de p120-catenina implicadas en la regulación de la interacción con RhoA. Se había descrito que en el extremo terminal (aa 1-234) p120-catenina, Src fosforilaba las tirosinas 96, 112, 217 y 228 [201, 214].

Empezamos a buscar posibles candidatos para los efectos opuestos que veíamos sobre la interacción con RhoA. En principio pensábamos encontrar una (o más) tirosinas fosforiladas por Src y que tuviesen un efecto positivo en la interacción con RhoA y por otro lado, que Fyn fosforilase otra u otras tirosinas, cuyo efecto sería negativo.

Aprovechando que en el laboratorio disponíamos de anticuerpos de p120-catenina que reconocían específicamente los residuos Tyr-96 y Tyr-228 fosforilados, analizamos si la fosforilación por Src y Fyn modificaba estos residuos.

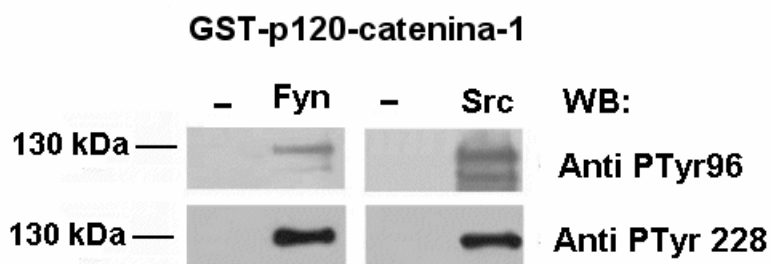


Figura 49. Src y Fyn fosforilan las tirosinas 96 y 228. 1,5 pmoles de GST-p120-catenina se fosforilaron con la quinasa Fyn y Src. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y *Western blot* mediante el uso de anticuerpos específicos de los residuos 96 y 228 fosforilados.

Ambas quinasas fosforilaban ambos residuos (ver **Figura 49**), así que en principio éstas no parecían ser las tirosinas que buscábamos, ya que esperábamos encontrar que la tirosina fosforilada por Src fuese distinta a la fosforilada por Fyn.

II.5.4. La fosforilación de la tirosina 112 inhibe la interacción p120-catenina/RhoA

Todavía quedaban dos tirosinas fosforiladas por Src y que podían regular la interacción p120-catenina/RhoA: la Tyr-112 y la Tyr-217. La utilización de un programa de predicción de sitios de fosforilación indicó que la tirosina 112 era una buena candidata para ser fosforilada por Fyn. Decidimos realizar el mutante puntual de la tirosina 112 a glutámico, para mimetizar la fosforilación en esta posición y ver si afectaba a la interacción con RhoA.

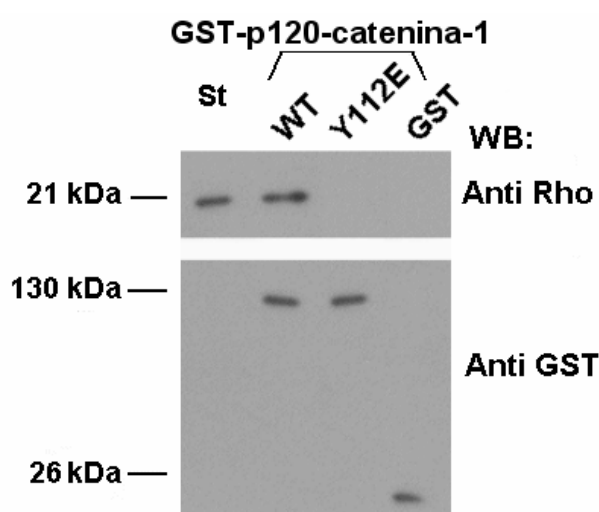


Figura 50. La fosforilación de la tirosina 112 tiene efectos negativos en la interacción p120-catenina/RhoA. 1,5 pmoles de p120-catenina-1 *wild type* y p120-catenina-1 Y112E unidos a GST, fueron incubados con 5 pmoles de RhoA. Las muestras se procesaron y fueron analizadas con anticuerpos específicos contra Rho. La cantidad de proteína unida se determinó comparando los resultados con cantidades conocidas de Rho (St, 0,8 pmol). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Como muestra la **Figura 50** (comparar carril 2 y 3) la mutación de este residuo bloqueaba totalmente la interacción de p120-catenina con RhoA. Por lo tanto se había identificado el residuo que afecta negativamente la interacción p120-catenina/RhoA *in vitro*. Sin embargo estos datos no implicaban que Fyn fosforilara este residuo *in vivo* y que por lo tanto fuera el responsable del efecto visto anteriormente.

II.5.5. La fosforilación de la tirosina 217 potencia la interacción p120-catenina/RhoA

Con anterioridad a la realización de estos experimentos se publicó un artículo sobre estudios de agregación en células L [214]. Estas células no expresan E-cadherina por lo que tienen una reducida adhesión y agregación, pero al recuperar su expresión conseguían ver agregación. Dicha agregación era bloqueada de nuevo mediante la transfección de una forma activa de la quinasa Src. Diversos experimentos les llevaron a postular que la fosforilación de p120-catenina por v-Src, concretamente el residuo tirosina 217, estaba implicado en este hecho. Así, a pesar de que este residuo no estaba descrito en el trabajo Reynolds que fuera fosforilado por Src, decidimos probar si pudiera ser relevante para el efecto que estábamos buscando.

Del mismo modo que con la tirosina 112, se construyó el mutante puntual a glutámico y se analizó la interacción con RhoA. El resultado fue que al mutar este residuo la interacción p120-catenina/RhoA aumentaba notablemente (ver **Figura 50**, comparar carriles 2 y 3). Pero al igual que en el caso anterior, estos resultados no aseguraban que Src fosforilase este residuo y por lo tanto que fuera la tirosina responsable de potenciar la interacción p120-catenina/RhoA.

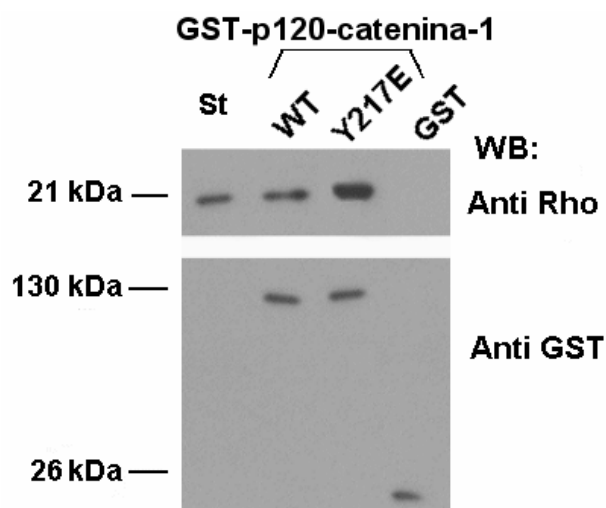


Figura 51. La fosforilación de la tirosina 217 potencia la interacción p120-catenina/RhoA. 1,5 pmoles de p120-catenina-1 *wild type* y p120-catenina-1 Y217E unidos a GST, fueron incubados con 5 pmoles de RhoA. Las muestras se procesaron y fueron analizadas con anticuerpos específicos contra Rho. La cantidad de proteína unida se determinó comparando los resultados con cantidades conocidas de Rho (St, 0,8 pmol). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

II.5.6. Las quinasas Src y Fyn fosforilan con mayor eficiencia la Tyr-217 y 112, respectivamente

Aún quedaba por demostrar que tanto Src como Fyn fosforilaban preferentemente una tirosina determinada, la Tyr-112 en el caso de Fyn y la Tyr-217 en el de Src. De todas las tirosinas descritas por Reynolds y Ozawa como fosforiladas por Src y localizadas en p120-catenina (1-234), fragmento de p120-catenina que habíamos visto que se comportaba igual que la p120-catenina-1, eran: Tyr-96, Tyr-112, Tyr-217 y Tyr-228. Por experimentos anteriores ya sabíamos que tanto Fyn como Src fosforilaban las tirosinas 96 y 228. Se construyeron el doble mutante p120-catenina (1-234) 96F, 228F, los triples mutantes p120-catenina (1-234) 96F, 112F, 228F, p120-catenina (1-234) 96F, 217F, 228F y el cuádruple mutante p120-catenina (1-234) 96F, 112F, 217F, 228F y se fosforilaron por la quinasa Src y por Fyn.

Como muestra la **Figura 52** el mutante cuádruple de p120-catenina no se fosforiló ni por Src, ni por Fyn (paneles A y B, carril 2). Si se compara el primer y el segundo carril (panel A), la mutación de la tirosina 217 a fenilalanina impedía que Src pudiera fosforilar el extremo N-terminal de p120-catenina, indicando que ésta era la tirosina que Src fosforilaba con mayor eficiencia. En el caso de Fyn (panel B) la construcción que tenía mutada la tirosina 112 no podía ser fosforilada, indicando que la Tyr-112 era fosforilada muy eficientemente por Fyn.

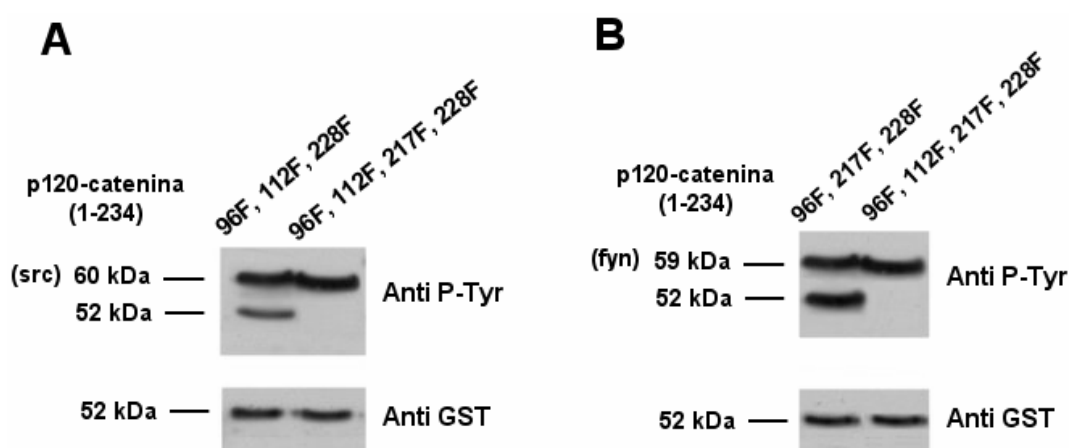


Figura 52. Fosforilación por Src y Fyn de los mutantes del extremo N-terminal de p120-catenina. 1 pmol de las formas GST-p120-catenina (1-234) que se indican, fueron fosforiladas por Src (panel A) y Fyn (panel B). Las muestras fueron analizadas por *Western blot* con anticuerpos anti P-Tyr.

II.5.7. Src fosforila la Tyr-112 con menor afinidad que Fyn.

Nuestros resultados indicaban que Src fosforilaba preferentemente la Tyr-217 y Fyn la Tyr-112 de p120-catenina. Para comprobar si Src podía fosforilar la tirosina 112, tal y como estaba descrito [201], se llevaron a cabo ensayos de interacción con el mutante puntual de p120-catenina-1 Y217F, fosforilado o no por Src. Como muestra la **Figura 53** la fosforilación del mutante Y217F disminuyó la interacción con RhoA, pero no tanto como lo hacía el mutante Y112E. Esto nos estaba indicando que en nuestras condiciones Src fosforilaba con mayor eficiencia la tirosina 217 que la 112. Sin embargo, cuando la Tyr-217 no estaba disponible para ser fosforilada, Src fosforilaba con poca eficiencia la 112 y como consecuencia disminuía la interacción p120-catenina/RhoA.

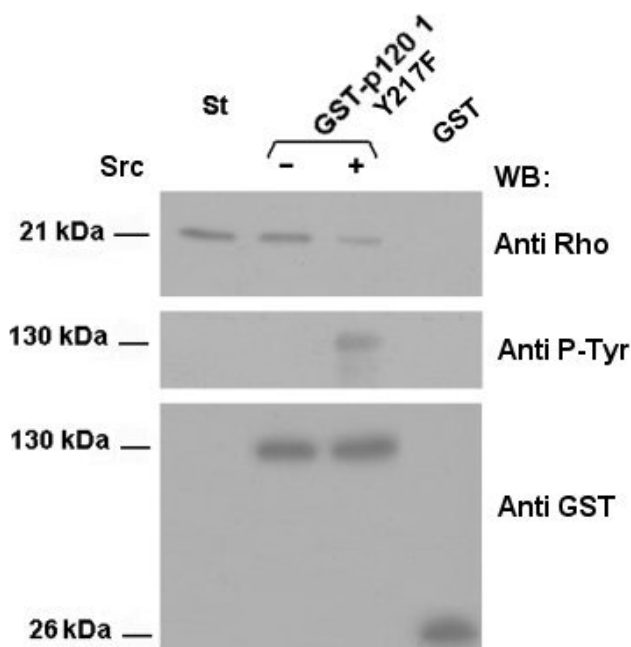


Figura 53. La fosforilación de la Tyr-217 de p120-catenina aumenta la interacción p120-catenina/RhoA. 1,5 pmoles de GST-p120-catenina-1 Y217E se fosforilaron con la quinasa Src como se describe en *Materiales y Métodos*. Posteriormente se incubaron con 5 pmoles de RhoA y los complejos formados se analizaron por SDS-PAGE y *Western blot*. La cantidad de proteína unida se determinó comparando los resultados con cantidades conocidas de Rho (St, 0,8 pmol). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

II.6. LA FOSFORILACION DE LAS TIROSINAS 112 Y 217 DE p120-CATENINA POTENCIA SU INTERACCIÓN CON E-CADHERINA.

La fosforilación de las tirosinas 112 y 217 tenía efectos contrarios en la interacción p120-catenina/RhoA. Quisimos estudiar si la fosforilación de estos residuos también afectaba a la interacción de p120-catenina con E-cadherina y como lo hacía.

Se realizaron ensayos de *Pull Down* con los mutantes puntuales p120-catenina-1 Y112E y p120-catenina-1 Y217E unidos a GST. En la **Figura 54** podemos observar que la mutación de dichos residuos (que mimetizaba la forma fosforilada) provocaba un ligero aumento de la interacción p120-catenina/E-cadherina.

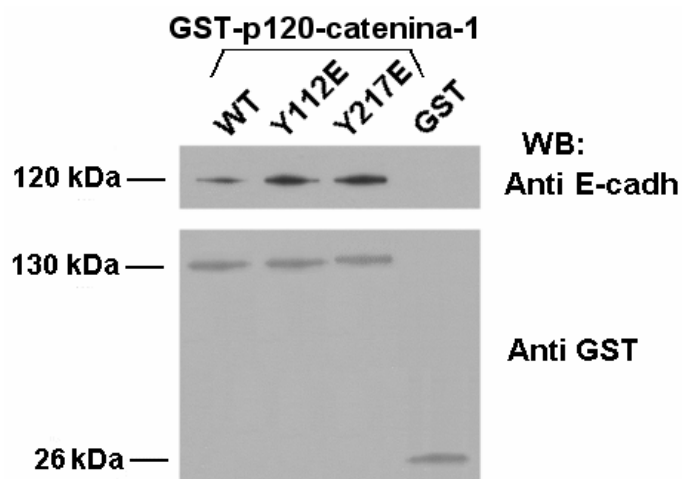


Figura 54. La fosforilación de las tirosinas 112 y 217 de p120-catenina potencia su interacción con E-cadherina. 6 pmoles de p120-catenina unidos a GST fueron incubados con 300 μ g de extractos celulares totales de células RWP1. Los complejos fueron analizado por *Western blot* utilizando anticuerpos anti E-cadherina.

II.7. RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN p120-CATENINA/RHOA

En este momento del trabajo sabíamos que p120-catenina y RhoA interaccionaban de manera directa por el extremo N-terminal de p120-catenina; que esta interacción estaba regulada por fosforilación en tirosinas y habíamos localizado los residuos implicados en esta regulación. Pero no sabíamos si estas fosforilaciones tenían lugar *in vivo*, ni tampoco cual era la implicación funcional. Para responder estas cuestiones utilizamos diferentes aproximaciones:

Observación del fenotipo originado por la represión de Rho. Se había descrito que la interacción de p120-catenina con RhoA provoca una fuerte inhibición de esta última y como consecuencia un importante cambio fenotípico en fibroblastos NIH3T3 (*branching*) [148]. De acuerdo con estos datos quisimos comprobar si nuestros resultados tenían alguna repercusión en este papel inhibitorio de p120-catenina sobre la actividad de RhoA. Las fosforilaciones de p120-catenina por Src o Fyn, si ocurrieran *in vivo*, deberían afectar a este fenotipo al tener efectos opuestos en su interacción con RhoA. Src al aumentar la interacción de p120-catenina con RhoA, inhibiría la forma activa de RhoA, induciendo el fenotipo *branching*. En el caso de Fyn esperábamos poder demostrar el efecto opuesto.

Determinación de la cantidad de Rho activa: si la fosforilación de un residuo tirosina específico de p120-catenina bloquea la interacción con RhoA (según nuestros resultados la tirosina 112), querrá decir que p120-catenina ya no podrá inhibir a Rho y esperamos encontrar mayores niveles de proteína activa, unida a GTP. Los niveles de Rho activa son fácilmente detectables en ensayos de *Pull-Down* utilizando como cebo GST-Rhotekina, proteína que sólo une la forma activa de Rho. El caso contrario sucederá si la fosforilación tiene un efecto positivo en la interacción p120-catenina/RhoA.

II.7.1. La fosforilación de la tirosina 112 de p120-catenina tiene lugar *in vivo*

Sabíamos que tanto el mutante de la tirosina 112 a glutámico como la fosforilación de p120-catenina por Fyn bloqueaban la interacción con RhoA, pero no teníamos la certeza de que esta fosforilación tuviera lugar *in vivo*, ni tampoco que Fyn fuera la responsable de dicha fosforilación *in vivo*.

Con el objetivo de aclarar estos puntos se transfectaron células RWP-1 con la forma *wild type* de p120-catenina-1 y con los mutantes puntuales Y112E, Y112F de p120-catenina-1, unidos a la proteína GFP. Además, cuando se indica, se cotransfectó con la forma activa de la quinasa Fyn. Posteriormente se inmunoprecipitó p120-catenina con un anticuerpo anti GFP y por tanto únicamente la p120-catenina de las células que habían sido transfectadas. A continuación se detectó la Rho total unida a estos complejos.

Los resultados indicaban que la p120-catenina-1 *wild type* interactuaba con Rho (ver **Figura 55**), mientras que en el carril en el que se cotransfectó con Fyn esta interacción se veía anulada (comparar carriles 1 y 2), indicando que esta fosforilación también ocurría *in vivo*. Tal como esperábamos, el mutante p120-catenina-1 Y112E no interactuaba con Rho (carril 3). Finalmente con el mutante p120-catenina-1 Y112F no se observó ningún cambio en la interacción p120-catenina/Rho, sin embargo al cotransfectar con Fyn activa observamos un aumento en la interacción con Rho (ver **Figura 55**, comparar carril 4 y 5). De estos resultados se concluye que la fosforilación de la tirosina 112 por Fyn ocurre *in vivo* e inhibe la unión p120-catenina/Rho. Además Fyn también fosforila otras tirosinas, seguramente con menor actividad, de modo que al fosforilar el mutante p120-catenina-1 Y112F posiblemente fosforile la tirosina 217, provocando entonces un efecto positivo en la interacción p120-catenina/Rho.

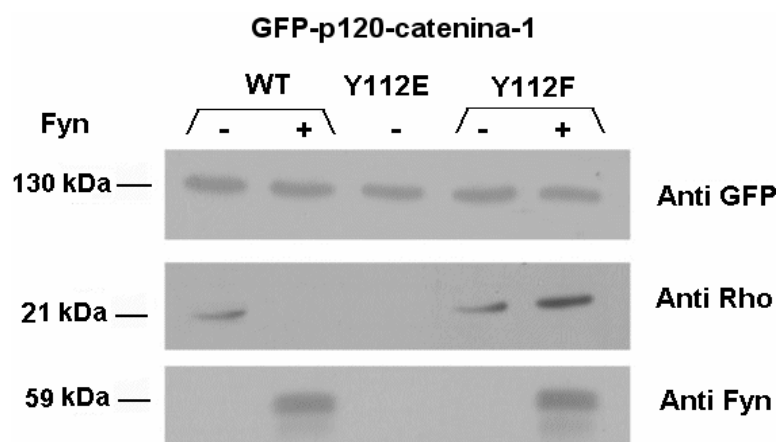


Figura 55. La fosforilación de la tirosina 112 de p120-catenina tiene lugar *in vivo*. Células RWP1 fueron transfectadas con las diferentes construcciones de GFP-p120-catenina- que se indican y con pEF-BOS Fyn cuando se indica. Tras 48 horas se prepararon extractos celulares y 300 μ g fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-GFP. Los inmunocomplejos fueron analizados con mAb anti Rho, anti Fyn y anti GFP.

II.7.2.La fosforilación de p120-catenina por Src inactiva Rho

Células ADH-Rho que expresaban establemente Rho, se transfectaron con las formas activas de las quinasas Src y Fyn, o con el vector vacío, y se realizaron ensayos de *Pull-Down* con Rhotekina-GST para detectar la cantidad de Rho activa, unida a GTP.

En concordancia con nuestra hipótesis, al transfectar con Src e inducir la fosforilación de p120-catenina en la tirosina 217 observábamos menos cantidad de Rho activa (ver **Figura 56**, carril 5), ya que en esta situación la interacción de p120-catenina con Rho se encuentra facilitada. En el mismo sentido, al transfectar con Fyn la cantidad de Rho activa detectada era mayor, ya que en este caso p120-catenina no podía interaccionar con Rho y por tanto tampoco podía inhibirla (carril 6).

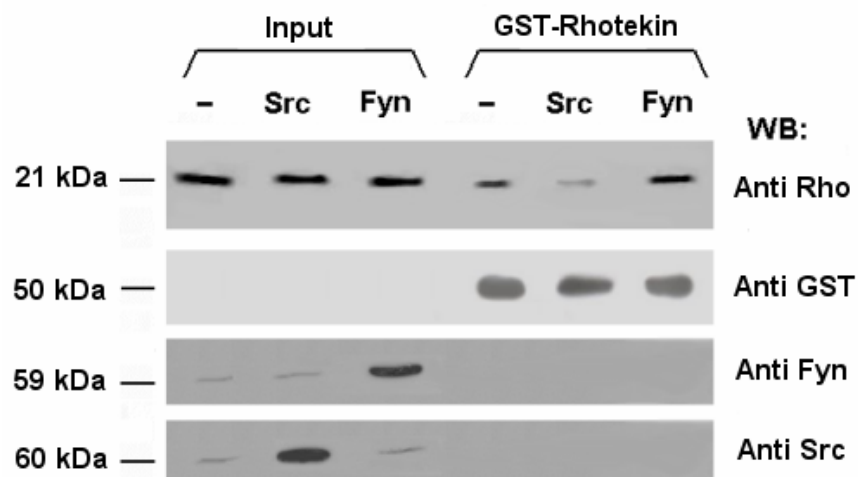


Figura 56. Src provoca la inactivación de Rho, mientras que Fyn la activa. Células ADH-Rho *wild type* fueron transfectadas con las formas activas de las quinasas Src y Fyn (pEF-BOS Fyn, pEF-BOS v-src). Tras 48 horas se prepararon extractos celulares y se les añadió 10 μ l de una suspensión de GST-Rhotekina/Glutathion-Sepharosa. La cantidad de Rho activa, retenida por los complejos, fue analizada por SDS-PAGE y el uso de anticuerpos específicos. Input: 10% de la cantidad de extractos utilizados en este ensayo.

II.7.3. La mutación a glutámico de la tirosina 112 previene de la represión de Rho por p120-catenina

En este caso se transfectaron células ADH-Rho con la forma *wild type* y la mutada Y112E de p120-catenina-1 para analizar los niveles de Rho-GTP. Como se puede comprobar, la transfección de p120-catenina-1 *wt* inhibe la activación de Rho mientras que la transfección de p120-catenina-1 Y112E no es capaz de hacerlo (ver **Figura 57**, comparar carriles 5 y 6) y se detectan unos niveles de Rho-GTP similares al control sin transfectar. Este resultado era el esperado, ya que al no interactuar p120-catenina con Rho no la podía inhibir, dando lugar a un incremento en los niveles de Rho-GTP.

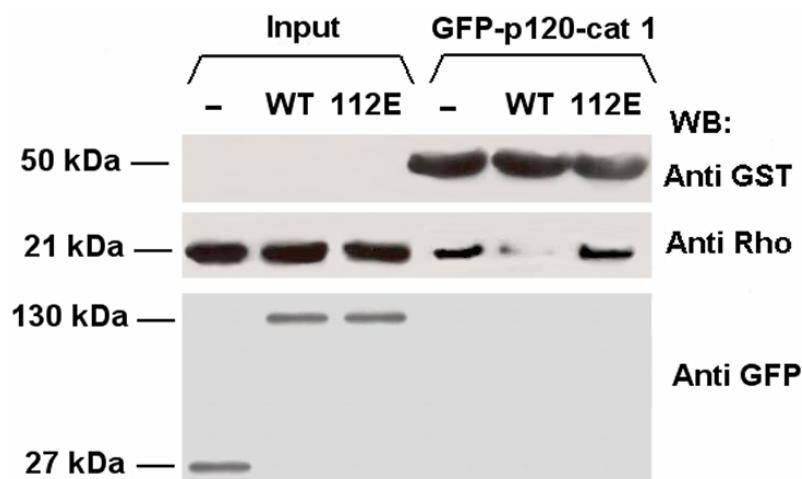


Figura 57. p120-catenina Y112E induce la activación de Rho. Células ADH-Rho *wild type* fueron transfectadas con GFP-p120-catenina y GFP-p120-catenina-1 Y112E. Tras 48 horas se prepararon extractos celulares y se les añadió 10 μ l de una suspensión de GST-Rhotekina/Glutathion-Sepharosa. La cantidad de Rho activa, retenida por los complejos, fue analizada por SDS-PAGE y el uso de anticuerpos específicos. Input: 10% de la cantidad de extractos utilizados en este ensayo.

II.7.4. La fosforilación de la tirosina 217 promueve el *branching*, mientras que la fosforilación de la tirosina 112 lo bloquea

Se transfectaron fibroblastos NIH3T3 con p120-catenina-1 *wild type* o con diferentes mutantes delecionados y puntuales: p120-catenina (234-911), p120-catenina-1 Y112E y p120-catenina-1 Y217E, todos ellos unidos a GFP. Al sobreexpresar p120-catenina observábamos la formación de este fenotipo tan característico, con la formación de prolongaciones (*spikes*) y protusiones en la membrana (filopodios y lamelipodios) (ver **Figura 58**, panel B, flechas rojas). La forma p120-catenina (234-911) que no interaccionaba con Rho (ver **Figura 41**), no produjo cambio fenotípico alguno (ver **Figura 58**, panel E), al igual que ocurrió con p120-catenina-1 Y112E (panel D).

La fosforilación de la tirosina 112 de p120-catenina inhibe la interacción con Rho, facilitando la forma activa de Rho que no induce la formación de lamelipodios. En cambio, como era de esperar el mutante p120-catenina-1 Y217E que aumentaba la afinidad por Rho y por lo tanto inhibía su activación, produjo el esperado cambio fenotípico y se pudo apreciar la aparición de lamelipodios (panel C, flechas rojas).

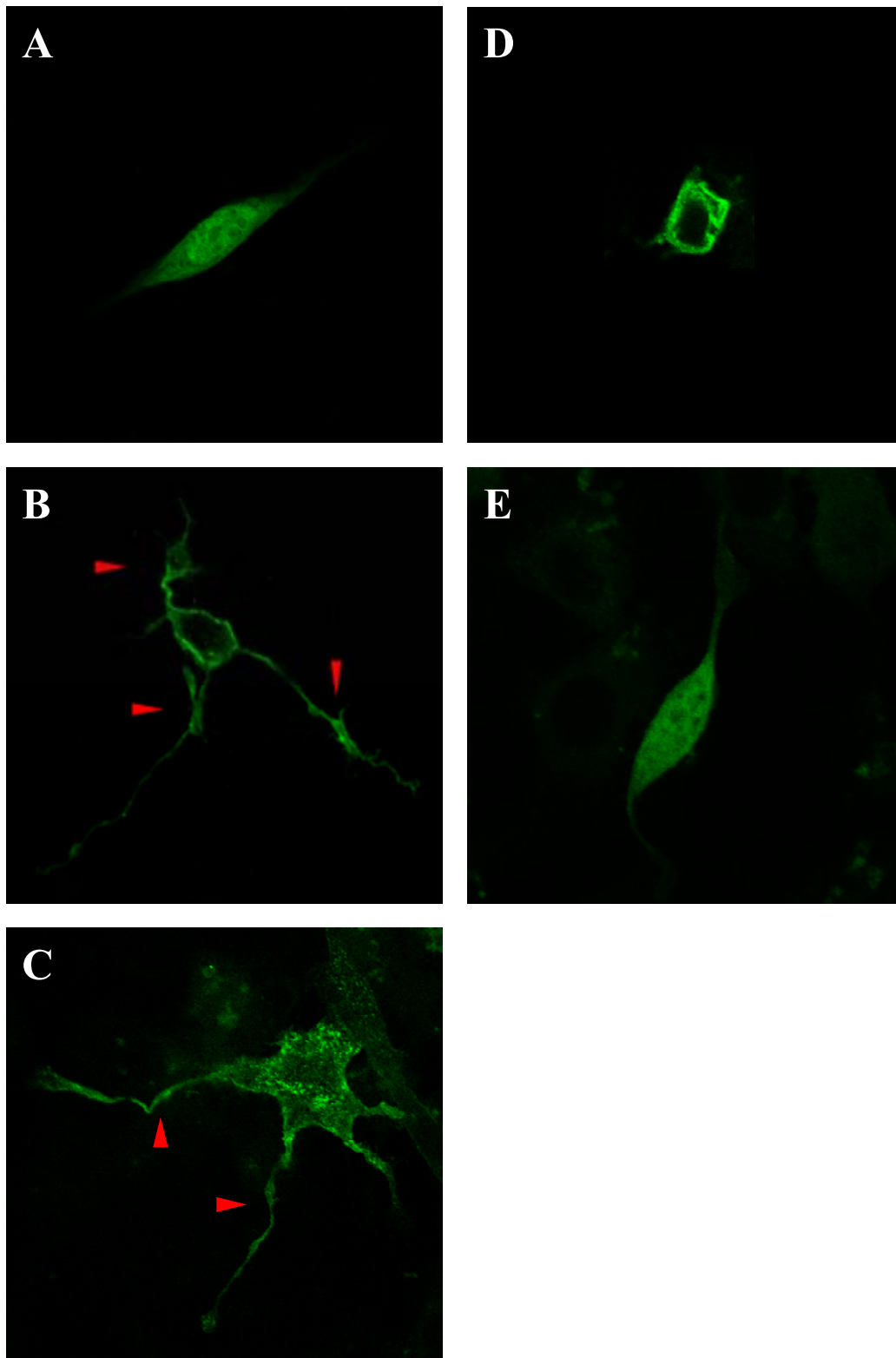


Figura 58. La fosforilación de la tirosina 217 promueve el *branching*. Células NIH3T3 fueron transfectadas con diferentes isoformas y mutantes puntuales de p120-catenina: (A) vector vacío, (B) GFP-p120-catenina-1 *wild type*, (C) GFP-p120-catenina-1 Y217E, (D) GFP-p120-catenina-1 Y112E, (E) GFP-p120-catenina (234-911) 24 horas después las células se fijaron.

Este conjunto de resultados permitió concluir que las fosforilaciones de las Tyr-112 y Tyr-217 de p120-catenina-1 ocurrían *in vivo* y tenían un efecto opuesto tanto sobre la interacción como sobre la activación de Rho. Así, mientras la fosforilación de la tirosina 112 por Fyn bloqueaba la interacción entre p120-catenina/Rho, facilitando la activación de RhoA; la fosforilación de la tirosina 217 por Src aumentaba esta interacción y la forma de Rho unida a GDP. Sin embargo, en condiciones en las que estas quinasas no podían fosforilar sus residuos “preferentes” por estar mutados a fenilalanina, las quinasas podían modificar otros aunque con menor eficiencia y como consecuencia producir un efecto diferente al observado.

II.8. p120-CATENINA-1 ACTÚA COMO UN GDI DE RHOA

Estaba descrito que la aparición del fenotipo de *branching* era debido a una inhibición de la actividad de RhoA por parte de p120-catenina. Pero se desconocía si esta inhibición era consecuencia directa de la interacción o por el contrario era efecto indirecto a través de algún otro factor.

Se realizaron ensayos utilizando [³H]-GDP. La técnica consistió en cargar la proteína RhoA con [³H]-GDP durante 10 minutos y medir la cantidad de [³H]-GDP unido a RhoA. Pasado este tiempo, en las muestras que se indica, la proteína RhoA se incubó durante otros 10 minutos con p120-catenina-1, en presencia o no del dominio citosólico de E-cadherina y también con diferentes construcciones de p120-catenina. Transcurrido este tiempo se volvió a cuantificar la cantidad de [³H]-GDP retenido, siendo similar para todas las muestras. Finalmente se añadió a todas ellas GTP y se incubó durante 10 minutos más, pasados los cuales se determinó la cantidad de GDP tritiado que aún permanecía retenido en el filtro. Si p120-catenina actuara como un GDI para RhoA, deberíamos observar que en su presencia RhoA no realizaría el intercambio de GDP por GTP, detectando así más GDP-H3 retenido.

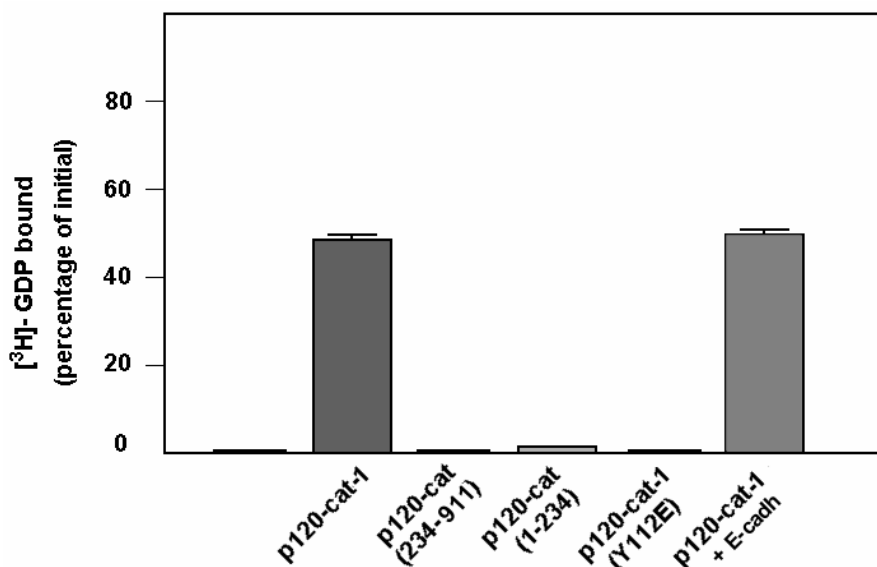


Figura 59. Valores en % de la cantidad de GDP-H3 retenido en el filtro, respecto a la inicial.

Como muestra la **Figura 59** la presencia de p120-catenina-1 *wt* impedía de manera notable el intercambio GDP/GTP. p120-catenina (1-234) a pesar de interaccionar con RhoA era incapaz de evitar el intercambio GDP/GTP. El resto de los mutantes, tanto delecionados como puntuales que no interaccionaban con RhoA, no podían impedir la descarga de RhoA. Por lo tanto el efecto inhibitor que ejerce p120-catenina sobre RhoA era directo a través de su interacción con ella, del mismo modo que lo haría una proteína GDI. Además, el dominio de interacción con RhoA y el de inhibición de su actividad, están localizados en regiones distintas de p120-catenina ya que la construcción p120-catenina (1-234) que interacciona con RhoA, no es capaz de inhibir la actividad de RhoA. La presencia de E-cadherina en el complejo no impedía que p120-catenina inhibiese el intercambio GDP/GTP.

II.9. INTERACCIÓN p120-CATENINA/E-CADHERINA

II.9.1. E-cadherina no compete con RhoA por unirse a p120-catenina

Los mismos autores que describieron el papel de p120-catenina como inhibidor de RhoA [192], afirmaban que p120-catenina no podía realizar su efecto inhibitor mientras p120-catenina estuviese interaccionando con la E-cadherina. Sugerían que la E-cadherina secuestraría a p120-catenina en las uniones adherentes, alejándola de Rho en el citoplasma y por tanto no pudiendo interaccionar con ella.

Para determinar si RhoA y E-cadherina competían por su unión a p120-catenina, se llevaron a cabo ensayos de interacción *in vitro* en los que p120-catenina era preincubada o no con E-cadherina y posteriormente se determinaba su interacción con RhoA. No se observó ninguna competición entre ambas proteínas, es decir, p120-catenina podía interaccionar al mismo tiempo tanto con E-cadherina como con RhoA (ver **Figura 60**).

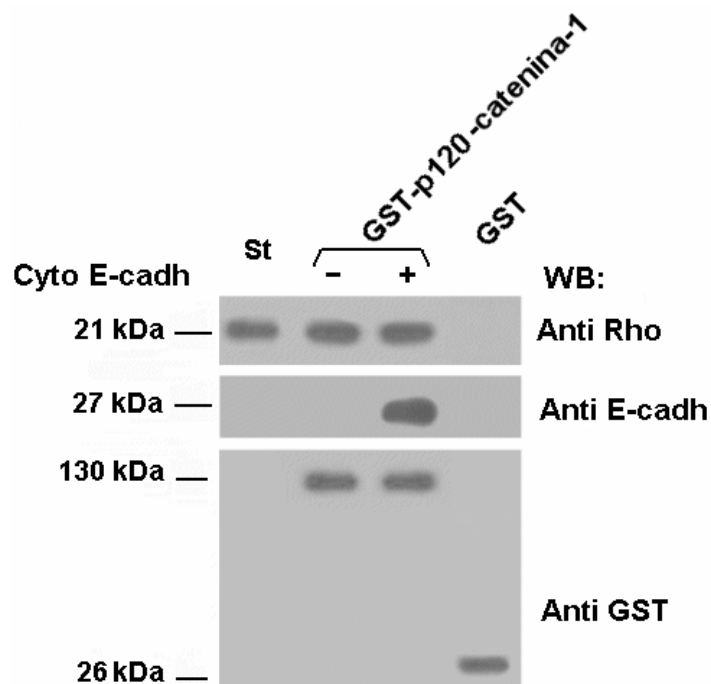


Figura 60. E-cadherina y RhoA pueden interaccionar simultáneamente con p120-catenina. 1,5 pmoles de GST-p120-catenina fueron incubados con 5 pmoles de RhoA. Cuando se indica, 6 pmoles del dominio citoplasmático de E-cadherina fueron añadidos a las incubaciones. La cantidad de RhoA asociada se determinó con anticuerpos específicos contra esta proteína. La cantidad de proteína unida se determinó comparando los resultados con cantidades conocidas de Rho (St, 0,8 pmol). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Ya que el dominio de unión de RhoA en p120-catenina y el dominio de actividad GDI estaban situados en regiones distintas de p120-catenina, nos planteamos estudiar si en condiciones en las que p120-catenina estaba unida a E-cadherina podría seguir actuando como un GDI. Y como se describe en el punto anterior, los ensayos de intercambio GDP/GTP indicaron que la presencia de E-cadherina no bloqueaba la actividad GDI de p120-catenina (ver **Figura 59**). Dato que contradecía los resultados obtenidos por Anastasiadis y colaboradores (2000) [192].

II.9.2. RhoA facilita la interacción de p120-catenina con E-cadherina

RhoA facilitaba la interacción de p120-catenina con las quinasas Fyn y Yes (ver **Figura 46**), quisimos ver si RhoA podría también facilitar la interacción de p120-catenina con E-cadherina, a pesar de que RhoA y E-cadherina interaccionan en regiones diferentes y alejadas de p120-catenina.

Como se muestra en la **Figura 61**, la preincubación de p120-catenina con RhoA facilitaba ligeramente la asociación de p120-catenina con E-cadherina, posiblemente induciendo un cambio conformacional del extremo N-terminal de p120-catenina que facilitaba la accesibilidad de la E-cadherina al dominio armadillo de p120-catenina.

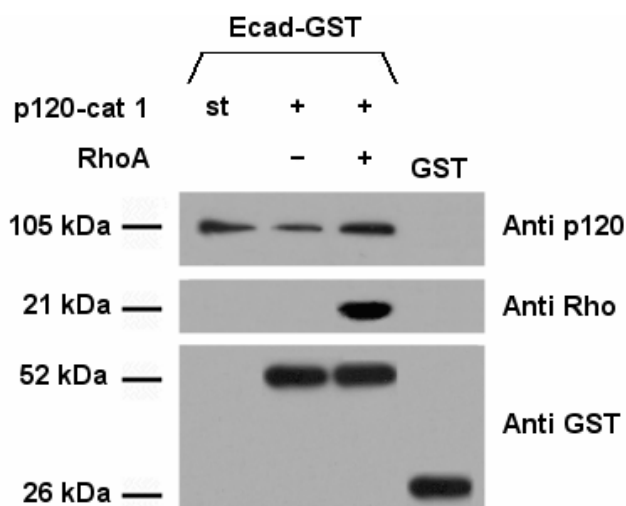


Figura 61. RhoA facilita la interacción de p120-catenina con E-cadherina. 1,2 pmoles de GST-cyto-Ecad fueron incubados con 0,64 pmoles de p120-catenina 1. Cuando se indica, 9 pmoles de RhoA fueron añadidos a las incubaciones. La cantidad de p120-catenina asociada se determinó con anticuerpos específicos contra esta proteína. La cantidad de proteína unida se determinó comparando los resultados con cantidades conocidas de p120-catenina (St, 0,08 pmol). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

II.10.LA INTERACCIÓN p120-CATENINA/RHOA EN CÉLULAS EPITELIALES

Se disponía en el laboratorio de una línea celular de células epiteliales intestinales (IEC control), caracterizadas por la formación de uniones y otras (IEC-Kras) transformadas de forma estable con el oncogén Kras, donde se observa una pérdida de estos contactos y el desensamblaje de las uniones celulares consecuencia de un aumento del estado de fosforilación en tirosinas de β -catenina [145]. Quisimos analizar en estas el estado de activación de Rho y su unión a p120-catenina.

II.10.1.p120-catenina interacciona mejor con RhoA en células IEC-Kras

En resultados previos del grupo [145] se observó que en las células IEC-Kras existe un aumento de la fosforilación de p120-catenina (ver **Figura 62**, 1^{er} panel), que como era de esperar provocaba un aumento de la interacción con E-cadherina (2^o panel).

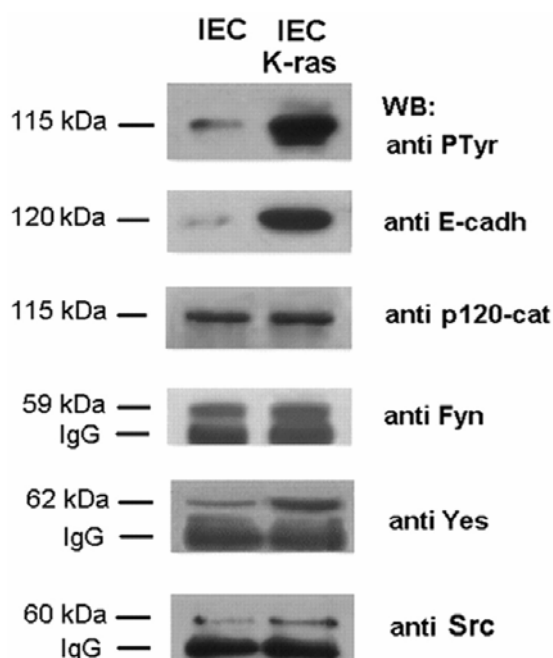


Figura 62. p120-catenina se fosforila en las células IEC-Kras. 300 μ g de extractos celulares totales de IEC control e IEC-Kras se inmunoprecipitaron con anti p120-catenina, seguido de SDS-PAGE, *Western blot* e inmunodetección con los anticuerpos indicados en cada caso.

Se inmunoprecipitó la p120-catenina endógena de células IEC e IEC-Kras y se analizó la interacción con Rho. Como muestra la **Figura 63** la interacción de p120-catenina con Rho era mayor en las IEC-Kras. Este resultado apoyaba nuestros datos de que tanto Rho como E-cadherina podían interactuar a la vez con p120-catenina.

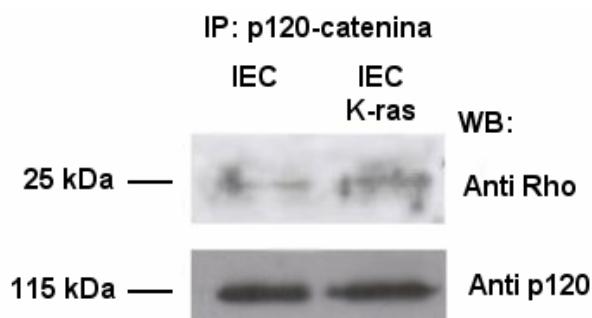


Figura 63. Rho interacciona con p120-catenina en las células IEC-Kras. Inmunoprecipitación de 300 µg de extractos totales de IEC control e IEC-Kras con anti p120-catenina, seguida de SDS-PAGE, *Western blot* e inmunodetección con anti Rho.

II.10.2. Rho se inactiva en las células IEC-Kras

Quisimos estudiar el estado de activación de Rho en estas células. Ensayos de *Pull-Down* con Rhotekina-GST mostraron más Rho activo en las células IEC control, por lo tanto Rho se inactivaba en las Kras (ver **Figura 64**, comparar carriles 2 y 4).

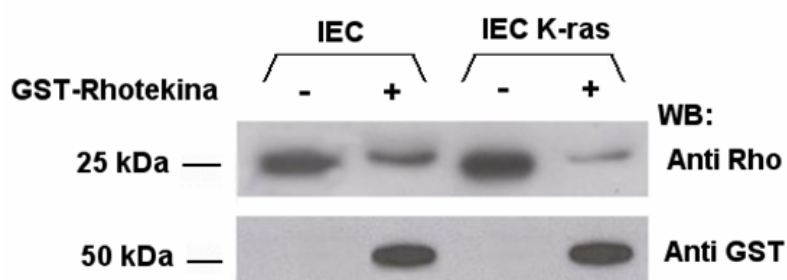


Figura 64. Rho se inactiva en las células IEC K-ras. 300 µg extractos de células IEC control e IEC K-ras se incubaron con 10 µl una suspensión de GST-Rhotekina/Glutathion-Sepharosa. La cantidad de Rho activa, retenida por los complejos, fue analizada por SDS-PAGE y por *Western blot* con anticuerpos específicos. Input (carriles 1 y 3): 10% de la cantidad de extractos utilizados en este ensayo.

Estos resultados indicaban que en las células IEC-Kras p120-catenina interaccionaba con mayor afinidad con la forma inactiva de Rho, predominante en estas células. Además en estas células, p120-catenina interacciona con E-cadherina con mayor afinidad (ver **Figura 62**, 2º panel).

Para corroborar que realmente p120-catenina presentaba mayor afinidad por la forma inactiva de Rho, se transfectaron células IEC control con la forma *wild type* o la forma activa de Rho, ambas con el epítipo *myc*. Se inmunoprecipitaron ambas con un anticuerpo contra el epítipo *myc* y se detectó su interacción con p120-catenina. En la **Figura 65** se puede observar que prácticamente no existía interacción entre p120-catenina y la forma activa de Rho, siendo la afinidad mucho más alta por la forma *wild type* de RhoA.

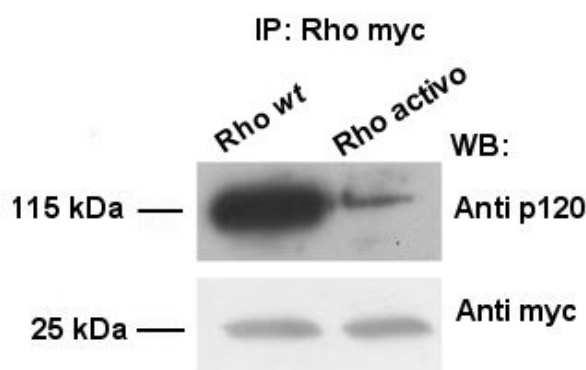


Figura 65. p120-catenina interacciona con mayor afinidad con la forma inactiva de Rho. Células IEC control fueron transfectadas con las formas *wild type* y activa de RhoA (pEXV). Tras 48 horas se prepararon extractos celulares totales y 300 µg fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-*myc*. Los inmunocomplejos fueron analizados con mAb anti p120-catenina.

El conjunto de estos resultados indica que p120-catenina interaccionaba con mayor afinidad con Rho en células IEC-Kras, en las que Rho está predominantemente inactiva. En estas células p120-catenina está fosforilada en tirosinas e interaccionando con mayor afinidad con E-cadherina. Por lo tanto p120-catenina también puede interaccionar simultáneamente con ambas proteínas e inhibir la actividad de Rho, de la misma manera que indicaban nuestros datos de intercambio de [³H]-GDP.

II.11.RELEVANCIA DE LA FOSFORILACIÓN DE p120-CATENINA EN LAS UNIONES ADHERENTES Y EN LA FUNCIONALIDAD DE RHO

La fosforilación en tirosinas de p120-catenina aumenta su afinidad por E-cadherina [142], lo que facilita la aproximación de las quinasas Fer y Fyn al complejo de adhesión y la consiguiente fosforilación de la tirosina 142 de β -catenina [145] (ver **Figura 38**). Tanto p120-catenina como α -catenina interactúan con RhoA. De esta forma, a través de RhoA, la p120-catenina y las tirosina quinasas asociadas podrían interactuar con el complejo de adhesión de manera independiente a E-cadherina y promover la disociación entre α -catenina y β -catenina, aunque β -catenina no estuviera unida a E-cadherina.

Para comprobar esta hipótesis cotransfectamos células IEC Kras con GST- β -catenina Y654E, la cual no interactúa con E-cadherina y sólo puede ser fosforilada en la tirosina 142, y con la forma *wt* de p120-catenina-1 o la p120-catenina-1 Y112E. De este modo, p120-catenina-1 *wt* al interactuar con RhoA podría facilitar la aproximación de las tirosina quinasas a β -catenina (ver **Figura 38**) y la fosforilación del residuo Tyr-142, dando lugar a una disminución de la interacción con α -catenina. En cambio p120-catenina-1 Y112E, que no interactúa con RhoA, no permitiría el acoplamiento y por lo tanto β -catenina no podría ser fosforilada manteniendo la interacción con α -catenina.

Como muestra la **Figura 66** cuando se transfectaba p120-catenina-1 Y112E se detectaba más cantidad de α -catenina unida a β -catenina (panel 1, comparar carriles 3 y 4) y como era de esperar, menor fosforilación en tirosinas de β -catenina (panel 2, carriles 3 y 4).

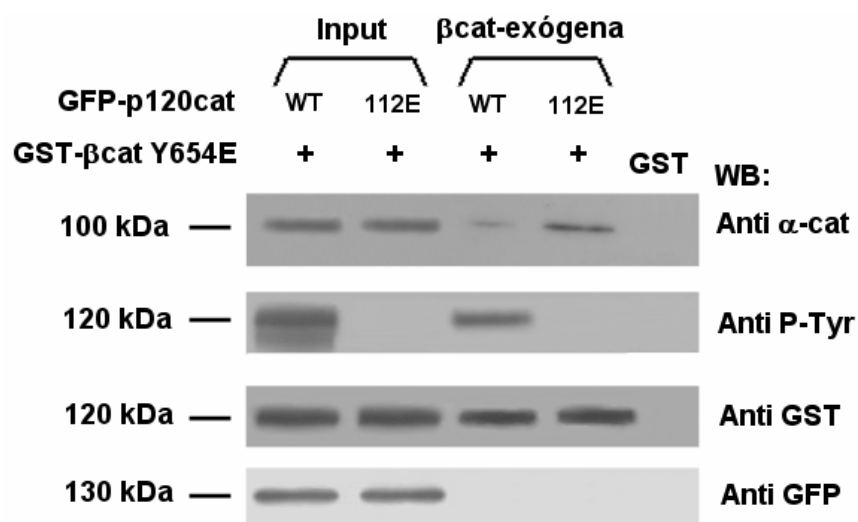


Figura 66. p120-catenina Y112E impide la fosforilación de β -catenina en la tirosina 142. Células IEC Kras fueron transfectadas con GST- β cat Y654E y GFP-p120-catenina *wt* o GFP-p120-catenina Y112E. Tras 48 horas se prepararon extractos celulares totales y 300 μ g fueron incubados con Glutathion-Sepharosa. Los complejos formados fueron analizados con anticuerpos específicos. Input: 10% de la cantidad de extractos utilizados en este ensayo.

II.12.INTERACCIÓN DE p120-CATENINA CON RAC1 Y CDC42

II.12.1.p120-catenina interacciona con Rac1 y Cdc42

Ensayamos si otras GTPasas de la misma familia, como Rac1 y Cdc42, también podían interactuar con p120-catenina. Se realizaron ensayos de interacción *in vitro* utilizando dos formas de p120-catenina: p120-catenina-1 y p120-catenina (234-911). Como se puede observar en la **Figura 67** ambas GTPasas eran capaces de unirse a p120-catenina. Rac1 interaccionaba de manera similar con ambas construcciones (comparar carriles 2 y 6), evidenciando que los 234 primeros aminoácidos no eran importantes para la interacción de Rac1 con p120-catenina. Rac1 debe de interaccionar cerca de los dominios armadillo o con ellos; sin embargo, no apreciamos competición entre Rac1 y E-cadherina por unirse a p120-catenina (carril 3).

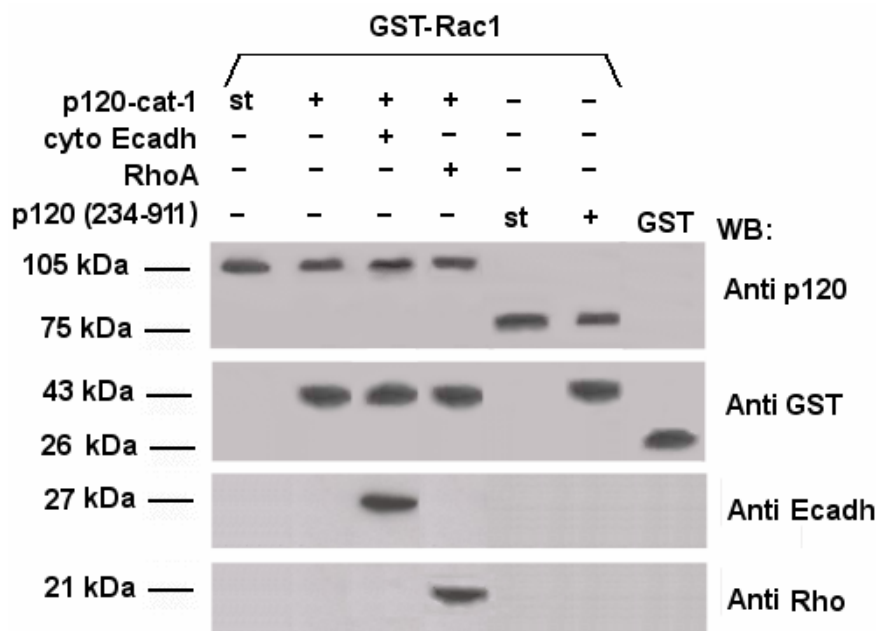


Figura 67. Rac1 interacciona con p120-catenina. 1 pmol de las isoformas de p120-catenina que se indican, fueron incubadas con 2,2 pmoles de Rac1 como proteínas de fusión con GST en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*. Las muestras se procesaron y fueron analizadas mediante el uso de anticuerpos específicos contra p120-catenina. La cantidad de proteína unida se determinó comparando los resultados con cantidades conocidas de p120-catenina (St, 0,2 pmol). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

En cambio, la delección de estos aminoácidos disminuía la interacción p120-catenina/Cdc42 (ver **Figura 68**, comparar carriles 2 y 5). Aprovechando que disponíamos de otros mutantes deleccionados de p120-catenina en el extremo N-terminal, intentamos acotar más la zona de interacción de Cdc42 en p120-catenina. Se puede observar que la construcción p120-catenina (1-234) interaccionaba con Cdc42 aunque con menor eficiencia que p120-catenina-1 *wt* (comparar carriles 2 y 7), indicando que posiblemente el sitio de unión abarque la región de p120-catenina alrededor del aminoácido 234. Esta región es por donde también interacciona RhoA, sin embargo no existía competición entre Cdc42 y RhoA por unirse a p120-catenina (comparar carriles 2 y 3).

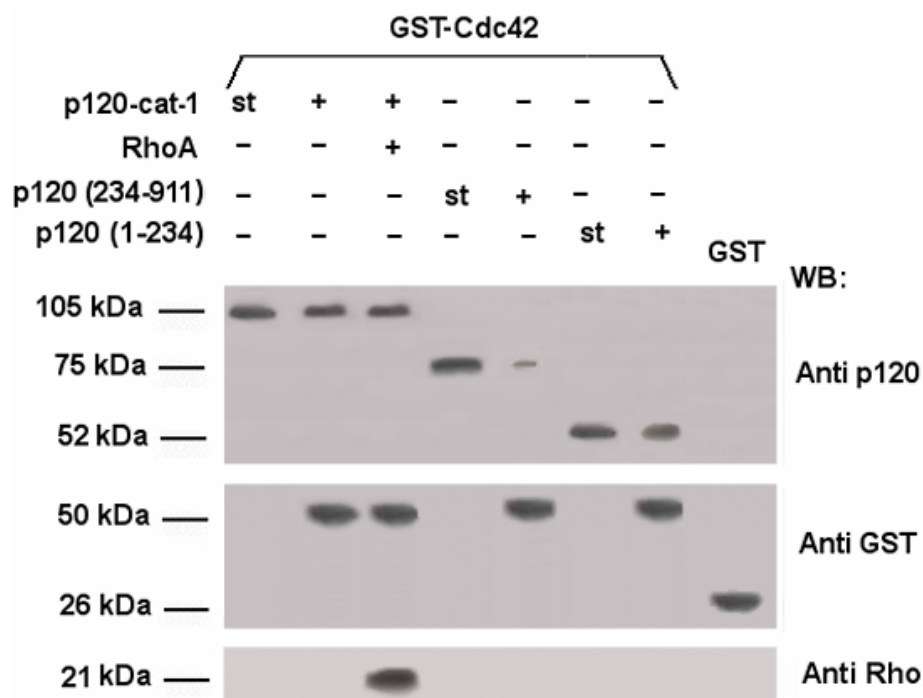


Figura 68. Cdc42 interacta con p120-catenina. 1 pmol de las formas de p120-catenina que se indican, fueron incubadas con 2 pmoles de GST-Cdc42 o GST como control en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*. Cuando se indica las muestras fueron preincubadas con 6 pmoles de RhoA. Las muestras se procesaron y fueron analizadas con anticuerpos específicos contra p120-catenina. La cantidad de proteína unida se determinó comparando los resultados con cantidades conocidas de p120-catenina (St, 0,2 pmol). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

II.12.2. La fosforilación en tirosinas de p120-catenina afecta a su interacción con Rac1 y Cdc42

Quisimos valorar si la fosforilación de p120-catenina por Src y por Fyn también regulaba a su interacción con Rac1 y Cdc42.

Se realizaron ensayos de interacción *in vitro* con GST-p120-catenina-1 previamente fosforilada, cuando se indica, con la tirosina quinasa correspondiente. Al fosforilar p120-catenina por Fyn observamos una disminución de la interacción con ambas GTPasas, al igual que ocurría con RhoA. Sin embargo, al fosforilar por Src se produjo una disminución de la interacción con Cdc42, mientras que la interacción con Rac1 no se vio afectada.

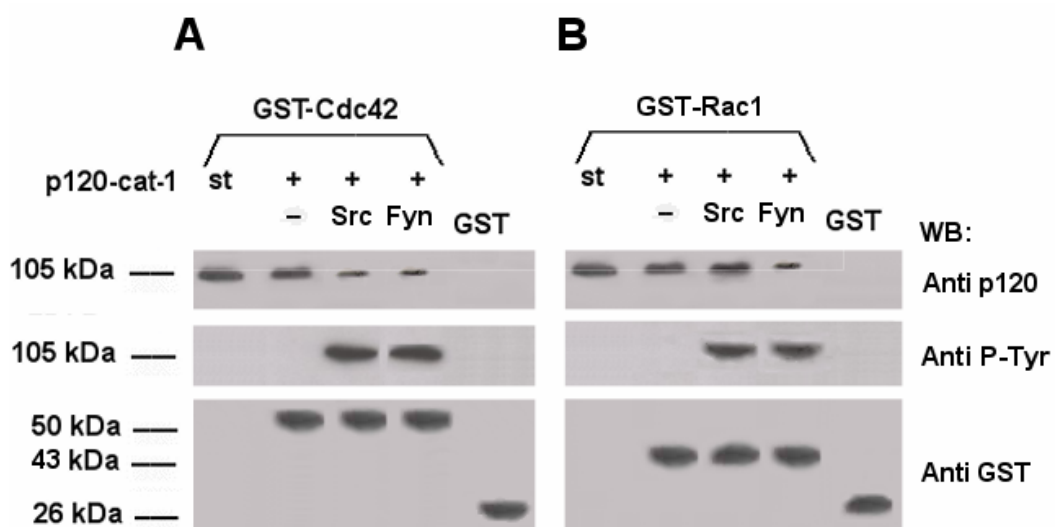


Figura 69. La fosforilación de p120-catenina disminuye su afinidad por Cdc42. 1 pmol de p120-catenina 1, fosforilada o no, fue incubado con 2 pmoles de Cdc42 (panel A) y Rac1 (panel B) como proteínas de fusión con GST en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*. Las muestras se procesaron y fueron analizadas mediante el uso de anticuerpos específicos contra p120-catenina. La cantidad de proteína unida se determinó comparando los resultados con cantidades conocidas de p120-catenina (St, 0,2 pmol). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

DISCUSIÓN

1. p120 es una fosfoproteína

Como se muestra en la **Figura 70** p120-catenina contiene 30 residuos tirosina (círculos rojos, verdes y amarillos), 11 de ellos localizados en posición C-terminal de la primera repetición armadillo. Según el grupo de Reynolds ninguno de éstos 11 residuos es fosforilado por Src [201], lo que indica que el dominio armadillo no tiene tirosinas modificadas por esta quinasa. Los otros 19 residuos tirosina están situados en el extremo N-terminal de p120-catenina. De éstos, nueve de ellos son fosforilados por Src (ocho descritos por Reynolds [201] y el otro por Okhubo [214]) y se sitúan en una región relativamente corta entre los aminoácidos 96 y 302, lo que constituiría un dominio de fosforilación.

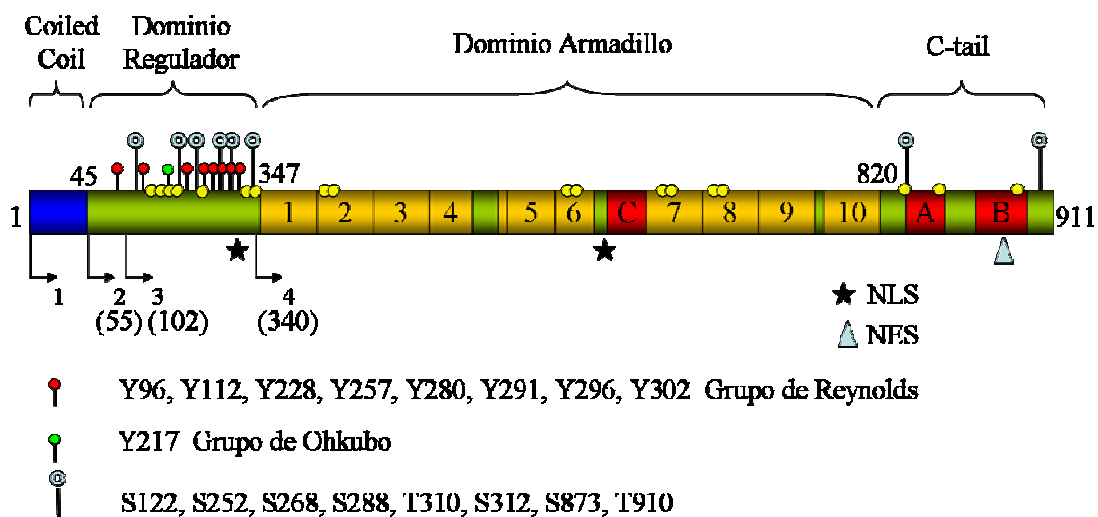


Figura 70. Representación esquemática de p120-catenina donde se indican los residuos tirosina. Los círculos de color rojo son las tirosinas fosforiladas por Src descritas por Reynolds, el círculo de color verde es la tirosina sustrato de Src descrita por el grupo Okhubo y en amarillo se muestran otras tirosinas de p120-catenina. Adaptado de Reynolds et al., 2004. Entre paréntesis se muestran los aminoácidos donde comienzan cada una de las isoformas de p120-catenina.

p120-catenina fue descrita originalmente como una fosfoproteína en fibroblastos de embriones de pollo transformados con el oncogen v-Src [105], donde una gran variedad de sustratos eran fosforilados por la quinasa Src. Numerosas líneas de investigación indican que la fosforilación en tirosinas de p120-catenina aumenta su afinidad por las cadherinas [142, 204]. Existen además evidencias de una fosforilación transitoria en tirosinas de p120-catenina en lugares donde se están formando nuevas uniones [13, 215], indicando que la fosforilación de p120-catenina sería necesaria para la formación y maduración de nuevas uniones [204].

La fosforilación en tirosinas de p120-catenina se ve inhibida en queratinocitos *knock out* para la quinasa Fyn (Fyn $-/-$) [204]. Además tanto Fyn como la quinasa citoplasmática Fer, interaccionan y fosforilan a p120-catenina [136, 145]. Para que p120-catenina pueda ser fosforilada en tirosinas depende de su asociación con los complejos de adhesión, su localización en membrana y su posterior interacción con la E-cadherina [214]. Estos datos sugieren que la asociación de p120-catenina con E-cadherina provocaría un cambio conformacional en p120-catenina que facilitaría su fosforilación.

p120-catenina también es fosforilada en respuesta a EGF, PDGF, VGF, NGF [200, 216] aunque no está claro si los receptores de estos factores fosforilan directamente p120-catenina o es a través del reclutamiento de otras quinasas como Src. Recientemente ha sido descrito que señales que activan EGFR fosforilan la tirosina 228 de p120-catenina [217], tirosina que Reynolds y colaboradores también describieron como sustrato de Src (ver **Figura 70**). Esta forma fosforilada de p120-catenina se localiza en las uniones adherentes y lamelipodios, además de en diversas líneas celulares cancerosas. Es posible que EGFR fosforile p120-catenina directamente, ya que EGFR se localiza en las uniones adherentes e interacciona directamente con β -catenina [218].

Nuestros resultados indican que la fosforilación en tirosinas de p120-catenina por Src también regula la interacción p120-catenina/RhoA (ver **Figura 47**). Observamos que Src fosforila la p120-catenina y provoca un aumento de su afinidad por RhoA. La fosforilación por Fyn en cambio, inhibe su interacción con RhoA.

En muchas células p120-catenina está altamente fosforilada en residuos serina (y en menor grado en treoninas); de hecho la estimulación por EGF produce un aumento de la fosforilación en serinas de p120-catenina [13]. Se ha propuesto que esta fosforilación provoca que las diferentes isoformas de p120-catenina migren de forma

difusa en un gel de poliacrilamida [108]. Se ha observado que la fosforilación de estos residuos de serina y treonina de p120-catenina está implicada en la regulación de la adhesión mediada por cadherinas [110, 214], provocando una pérdida de la adhesión con E-cadherina.

Recientemente se han descrito e identificado ocho residuos serina y treonina de p120-catenina fosforilados *in vitro* por GSK3 β [202]. La mayoría de estos residuos también se localizan en el extremo N-terminal, al igual que ocurre con los residuos tirosina. Adicionalmente existen dos residuos, un residuo serina y otro treonina, que se sitúan en el extremo C-terminal de p120-catenina sugiriendo un nuevo dominio de regulación. Una de estas serinas, la S73, es fosforilada por la PKC [202].

Nuestros datos indican que la isoforma 1 de p120-catenina (1-911) también es fosforilada por la serina/treonina quinasa CKI (ver **Figura 44**), en cambio la p120-catenina (234-911) no se fosforila por esta quinasa. Esto evidencia que CKI es también capaz de fosforilar residuos en el extremo N-terminal.

2. p120 como acoplador de tirosina quinasa y fosfatasa

La fosforilación de la p120-catenina en tirosinas genera sitios de interacción para proteínas que contengan dominios de unión a fosfotirosinas (por ejemplo SH2 y PTB) [219]. En este sentido, fosfopéptidos específicos en p120-catenina pueden generar sitios de unión para el reclutamiento de moléculas que regulen la adhesión. En nuestro grupo se había descrito que p120-catenina interacciona constitutivamente con tirosina quinasa como Fer y Fyn; también lo hace con la quinasa Yes pero sólo cuando ésta se encuentra activa [145]. De esta manera p120-catenina facilita el reclutamiento de quinasa a los complejos de adhesión, quinasa importantes para la regulación de la funcionalidad de las uniones adherentes. Posteriormente, y como se muestra en los resultados (ver **Figura 43**), hemos observado que las quinasa Fer, Fyn y Yes interaccionan en el dominio N-terminal de p120-catenina (aminoácidos 1-234), región rica tanto en residuos tirosina como serina, susceptibles de regular la funcionalidad de p120-catenina. En esta línea, hemos observado que la fosforilación previa de p120-catenina por la quinasa CKI inhibe la interacción de ésta con las quinasa Fyn y Yes (ver **Figura 45**), inhibición que correlaciona con una disminución de la fosforilación en tirosinas de

p120-catenina. Paradójicamente no hemos detectado interacción directa entre p120-catenina y la quinasa Src, teniendo en cuenta que p120-catenina fue inicialmente descrita como un sustrato de Src.

p120-catenina localiza la quinasa Fer hacia las uniones adherentes donde fosforila y recluta a la tirosina fosfatasa PTP-1B. Esta fosfatasa defosforila la tirosina 654 de β -catenina, permitiendo la interacción de β -catenina con E-cadherina [148]. Las fosfatasas DEP-1 [220], PTP μ [221] y SHP-1 [222] también interaccionan con p120-catenina a través de dominios SH2 que interaccionan con fosfotirosinas del dominio regulador de p120-catenina.

Así, pensamos que p120-catenina actúa como una proteína acopladora de quinastas y fosfatasas, aumentando la concentración local de dichas proteínas en los complejos de adhesión donde realizan su función. Nuestros resultados indican que en esta función también intervendría la GTPasa Rho. Como muestra la **Figura 66** cuando p120-catenina no interacciona con Rho (p120-catenina-1 Y112E) no se produce la fosforilación de la tirosina 142 de β -catenina, ya que las quinastas no se localizan cerca de β -catenina. Por lo tanto, es a través de la interacción p120-catenina/Rho como Fer y Fyn pueden fosforilar a β -catenina. Es decir, p120-catenina acopla las quinastas y Rho facilita su correcta localización en los complejos de adhesión.

3. Interacción p120-catenina/E-cadherina

Cambios en la adhesión y en la interacción entre las cadherinas y el citoesqueleto de actina permite a las células llevar a cabo procesos tales como la remodelación del citoesqueleto de actina y de la arquitectura tisular. Los mecanismos por los cuales se regula la adhesión no están totalmente resueltos. Un candidato para intervenir en este proceso es p120-catenina. Como ya se ha comentado p120-catenina fue descrita como sustrato de la quinasa Src y la activación de dicha quinasa provoca importantes cambios en la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular.

Existen numerosas evidencias indirectas de la participación de p120-catenina en la regulación de la adhesión [109, 205]. La primera evidencia directa de la participación fue publicada por Ireton y colaboradores en 2002 [199]. Estos autores encontraron una línea celular tumoral (SW48) que no presentaba niveles detectables de p120-catenina.

Estas células no formaban colonias y tenían unos niveles muy bajos de E-cadherina. Reestableciendo la expresión de p120-catenina se provocaba un aumento de los niveles de E-cadherina, así como un aumento de la adhesión. Se trataba de un mecanismo post-traducciona l ya que requería una interacción directa entre p120-catenina y E-cadherina, y consiste en un aumento de la vida media de la E-cadherina sin afectar a los niveles de mRNA. Estos datos indicaban que p120-catenina era esencial para la estabilidad de las cadherinas.

Las cadherinas recién sintetizadas son transportadas desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática [223], para lo cual necesitan interactuar con β -catenina [224]. Una vez en la membrana las cadherinas sufren un proceso de endocitosis a través del cual son devueltas a la membrana [184] o por el contrario son degradadas vía lisosomas [225]. Sorprendentemente p120-catenina no es necesaria para el tráfico de las nuevas cadherinas hacia la membrana [207] y, al menos en células MDCK, no se produce asociación entre p120-catenina y E-cadherina hasta que ésta última no llega a membrana [226]. Sin embargo una vez en la membrana, p120-catenina interactúa con E-cadherina estabilizándola y evitando su endocitosis [207]. Las cadherinas también pueden ser estabilizadas por otros miembros de la familia p120-catenina como ARVCF, δ -catenina y p0071.

p120-catenina regula la endocitosis de E-cadherina pero, ¿qué regula este proceso?

- Según una primera hipótesis, seguramente se regula a través de modificaciones que impliquen el dominio regulador de p120-catenina (por ejemplo fosforilaciones). Una posibilidad es que estos eventos reguladores modifiquen la afinidad del complejo p120-catenina/E-cadherina. El reagrupamiento de cadherinas estimula la activación de quinasas de la familia de Src [227] y p120-catenina puede ser fosforilada por diversas tirosina quinasas [145], fosforilaciones que aumentan su afinidad hacia la E-cadherina [142]. El balance entre señales de fosforilación y señales de activación de fosfatasa s conducirán hacia un aumento o una disminución de la afinidad p120-catenina/E-cadherina. Nuestros resultados indican que al menos la fosforilación de las tirosinas 112 y 217 favorece la interacción con E-cadherina (ver **Figura 55**). De este modo cualquier señalización que provoque la fosforilación de estos residuos, conducirá

a una mayor interacción p120-catenina/E-cadherina con la consiguiente estabilización de la cadherina.

- p120-catenina compete con otras proteínas por unirse al dominio yuxtamembrana de la E-cadherina. Src induce la fosforilación de residuos tirosina del dominio yuxtamembrana de la E-cadherina. Esta fosforilación provoca el reclutamiento de una proteína, Hakai, que poliubiquitina la cadherina para su posterior degradación [228].

4. Interacción RhoA/p120-catenina

Entre la gran variedad de sustratos que Src fosforila, además de p120-catenina, encontramos la Tensina, FAK, p130CAS (las tres localizadas en las uniones focales) o la cortactina. Todas ellas tienen en común la habilidad de regular el citoesqueleto de actina, sugiriendo una función global de Src en la regulación de la movilidad celular y la adhesión. Dichos sustratos de Src realizan su función sobre el citoesqueleto regulando la actividad de las Rho GTPasas. Estas proteínas son importantes reguladoras de la funcionalidad celular, especialmente de la organización del citoesqueleto de actina y de la contractibilidad de actomiosina [162].

En células deficientes en E-cadherina toda la p120-catenina está localizada en el citoplasma y promueve la movilidad celular y la invasión mediante su efecto sobre las Rho-GTPasas. Dentro de estas acciones encontramos la formación de lamelipodios, filopodios e inhibición de los contactos focales, fenómenos que dan lugar al aumento de la movilidad y de la invasión. Estos cambios morfológicos varían según el tipo celular y el nivel de expresión de p120-catenina. En fibroblastos, altos niveles de expresión provocan una extrema arborización celular denominada *branching* [12]. Este fenotipo también aparece cuando sobreexpresamos p120-catenina en células deficientes en cadherinas [192], lo que indica que este fenómeno debe de ser causado por la p120-catenina citoplasmática y que además es independiente de la presencia de cadherinas.

Recientemente se ha descrito que la formación de este fenotipo es debido a una fuerte inhibición de RhoA [192] y/o activación de Rac1 [194]. Experimentos *in vitro* han desvelado que p120-catenina no tiene actividad GEF, ni GAP, por lo tanto p120-catenina debería inhibir a RhoA de manera similar a como lo haría una proteína GDI

[192], uniendo y estabilizando la forma inactiva de la GTPasa. Este hecho implicaría una interacción directa entre ambas proteínas, interacción que recientemente ha sido demostrada en *Drosophila* [14].

Nuestros resultados indican que p120-catenina interacciona con RhoA y lo hace concretamente entre los residuos 96 y 234 del extremo N-terminal de p120-catenina. Recordemos que en esta región se localiza el dominio regulador (dominio de fosforilación) y del mismo modo que sucede con E-cadherina, modificaciones de este dominio afectan a la interacción p120-catenina/RhoA. La fosforilación por las quinasas Src y Fer produce un aumento de la afinidad por RhoA, mientras que la fosforilación por Fyn bloquea totalmente esta interacción.

En esta regulación están implicadas las tirosinas 112 y 217. La tirosina 112 es fosforilada por Fyn e inhibe la interacción de p120-catenina con RhoA, mientras que la tirosina 217, que favorece la interacción, es fosforilada por Src. El trabajo de Reynolds en el que se describen ocho tirosinas de p120-catenina fosforiladas por Src, no identifica la tirosina 217 como sustrato de esta quinasa [201]. En cambio, otro trabajo con células L identifica la tirosina 217 como sustrato de Src [214]. Nuestros datos corroboran que Src fosforila el residuo 217. Sin embargo esto no quiere decir que Src no fosforile otras tirosinas. Así, en nuestras condiciones Src fosforila también las tirosinas 96, 228 y 112 (ver **Figura 49**), aunque ésta última con menor eficiencia. Como se observa en la **Figura 53**, la fosforilación por Src del mutante p120-catenina-1 Y217F disminuye la interacción entre p120-catenina y RhoA. En estas condiciones Src no puede fosforilar la tirosina 217 y la disminución que se observa es debida a que Src fosforila la tirosina 112. Esta disminución en la interacción no es tan acusada como al fosforilar con Fyn, por lo tanto pensamos que Src fosforila este residuo pero con menor eficiencia que Fyn.

Otro dato derivado de nuestros experimentos es que Fyn fosforila, además de la tirosina 112, el residuo 96 (ver **Figura 49**). Posiblemente también fosforile otros residuos tirosina pero no hemos podido comprobarlo. Por lo tanto, Src y Fyn fosforilan diversos residuos tirosina en p120-catenina y algunos de ellos se fosforilan por ambas quinasas. Estos datos hacen plantearnos la hipótesis de que el aumento de interacción entre p120-catenina y RhoA no sea debido únicamente a la fosforilación del residuo 217, sino que también podrían estar implicados otros residuos. Sólo cuando se produjera la fosforilación de la tirosina 112 (por la quinasa Fyn) se produciría una inhibición de la interacción con RhoA. Observamos en la **Figura 47**, como la fosforilación por ambas quinasas a la vez, produce una disminución de la interacción con RhoA, aunque esta

inhibición no es tan drástica como cuando únicamente fosforila Fyn. Este resultado apoya la idea de que puedan existir varios residuos cuya fosforilación regule positivamente la interacción RhoA/p120-catenina y que puedan ser fosforilados por ambas quinasas (posiblemente con un efecto aditivo); pero cuando Fyn fosforila la tirosina 112 disminuye la afinidad de p120-catenina por RhoA. Otro resultado que apoya esta hipótesis es que el mutante p120-catenina-1 Y112F fosforilado por Fyn (ver **Figura 55**, comparar carriles 4 y 5) interacciona mejor con Rho que la forma no fosforilada, indicando que Fyn en esta ocasión, en la que no puede fosforilar el residuo 112, fosforila otros residuos tirosina (por ejemplo 217) que favorecen la interacción con RhoA. Esta hipótesis habría que corroborarla con otros mutantes puntuales en que las tirosinas son substituidas por glutámicos y analizar su efecto sobre la interacción p120-catenina/RhoA.

5. p120-catenina inhibe a RhoA

p120-catenina inhibe a RhoA y esto se traduce en la aparición del fenotipo *branching* [192]. Mediante ensayos de *Pull Down* con Rhotekina-GST comprobamos que en células donde había una mayor interacción de p120-catenina con RhoA se acompañaba de una inactivación de ésta última. En la **Figura 57** se observa como las células que han sido transfectadas con la forma *wild type* de p120-catenina presentan menor cantidad de Rho activo respecto a las no transfectadas. Esta inhibición puede ser explicada por la interacción entre p120-catenina y RhoA. En cambio, el mutante puntual p120-catenina-1 Y112E que no puede interaccionar con RhoA, no induce la inactivación de la GTPasa.

Cuando se induce, mediante la transfección en estas células de la quinasa Src, la fosforilación de la tirosina 217 (que aumenta la interacción p120-catenina/RhoA) también observamos una inactivación de Rho (ver **Figura 56**). El efecto inverso se obtiene cuando la quinasa que se transfecta es Fyn. Estos resultados indican que realmente p120-catenina inhibe la GTPasa Rho y que los mecanismos de regulación ocurren tanto *in vitro* como *in vivo*. Existe una hipótesis alternativa en la cual la activación de quinasas de la familia de Src fosforilan y activan una proteína denominada p190GAP. Esta proteína es una RhoGAP y se localiza en las zonas de adhesión celular.

Su activación promueve la hidrólisis del GTP lo que conduce a una inhibición de RhoA que produce una disminución de la tensión y contractibilidad dando lugar a la formación de las uniones adherentes [227].

La inducción del fenotipo *branching* también sirvió para confirmar nuestros resultados. La transfección de la isoforma p120-catenina-1, que interacciona con RhoA, produjo el esperado cambio fenotípico (ver **Figura 58** panel B). El mutante p120-catenina-1 Y217E que interacciona con mayor afinidad con RhoA, también provocaba la arborización de las células. En cambio, en concordancia con nuestros datos, la forma de p120-catenina (234-911) no produce ningún cambio fenotípico, ya que al no interaccionar con RhoA (ver **Figura 41**) no puede inhibirla. Igual ocurre con el mutante puntual p120-catenina-1 Y112E.

Sin embargo existen en la bibliografía algunos resultados contradictorios [208]. En este trabajo la sobreexpresión en células epiteliales de p120-catenina provoca la activación de RhoA y afirman que el dominio N-terminal de p120-catenina es necesario para la activación de RhoA. Una posible diferencia puede ser que en las células epiteliales, donde se realizaron estos experimentos, existe una mayor densidad de uniones celulares. Esta mayor densidad provocaría un reclutamiento del exceso de p120-catenina hacia las uniones que podría afectar la compartimentalización de RhoA [14], haciéndola más accesible a RhoGEF y a sus efectores. Otros autores [194] encuentran que p120-catenina activa a Rac1 y Cdc42 pero no observan ningún efecto sobre RhoA. Estos resultados sugieren que la regulación de p120-catenina sobre las Rho GTPasas es dependiente del contexto celular y muy posiblemente de la fosforilación de p120-catenina.

6. p120-catenina es un GDI para RhoA

¿Cómo puede p120-catenina inducir el fenotipo *branching*? Una explicación es que p120-catenina tuviera actividad RhoGAP activando la hidrólisis del GTP y conduciendo a la inactivación de la GTPasa; o por el contrario, que p120-catenina inhibiese el intercambio de GDP por GTP, estabilizando la forma inactiva. La primera posibilidad hay que descartarla ya que se ha demostrado que p120-catenina no tiene actividad Rho-GAP [192]. En cambio resultados nuestros y de otros grupos [192]

indican que p120-catenina reduce notablemente el intercambio de GDP por GTP (ver **Figura 59**). Este efecto parece ser específico ya que p120-catenina no es capaz de evitar el intercambio de Rac1 [192]. Los hasta ahora conocidos RhoGDI comparten una alta homología de secuencia [166], no compartida por p120-catenina, lo que sugiere que p120-catenina no debe de pertenecer a dicha familia de proteínas.

Noren y colaboradores sugieren un mecanismo diferente [193]. Muestran que p120-catenina interacciona directamente con Vav2, una proteína RhoGEF, la cual puede activar Rac y Cdc42. Rac y Cdc42 pueden inhibir a RhoA en muchos tipos celulares [229], de este modo sería posible que p120-catenina inhibiera indirectamente a RhoA a través de la activación de Rac y Cdc42. Sin embargo nuestros resultados *in vitro* con proteínas recombinantes y sin la presencia de otros factores (por ejemplo Vav2), indican que esta inhibición puede ser directa. Además, la sobreexpresión de Vav2 no produce el mismo efecto que la sobreexpresión de p120-catenina [230]. Posiblemente sea otro mecanismo más de regulación que se complemente.

El significado biológico de estas proteínas GDI radica en unirse a RhoA y mantenerla en un *pool* inactivo, secuestrada lejos de los GEF. Las proteínas RhoGEF no pueden provocar la disociación del GDI y RhoA. De esta manera los complejos RhoA-RhoGDI han de ser reclutados hacia la membrana donde existen proteínas, por ejemplo CD44 [166], que producirán la disociación del GDI y la consiguiente activación de RhoA por las RhoGEF [231]. De este modo p120-catenina formaría un complejo inhibitorio con RhoA (GDI) y la localizaría en membrana, donde su actividad es requerida para promover el ensamblaje o desensamblaje de las uniones adherentes.

ARVCF, el miembro más cercano a p120-catenina, no induce *branching* cuando se sobreexpresa en células NIH3T3 [232]. Ambas proteínas se diferencian en una región básica situada entre las hélices 2 y 3 de la repetición armadillo número 6 [13]. La delección de esta región (aminoácidos 622-628) de p120-catenina previene su capacidad de provocar *branching* y de inhibir el intercambio de GDP [192]. Este dato indica que estos aminoácidos son importantes para que p120-catenina pueda ejercer su función. En esta región también se localiza el exón C, que en raras ocasiones se expresa. Nuestros datos de intercambio de GDP también sugieren que la región armadillo es importante para que p120-catenina pueda inhibir a RhoA, ya que la construcción p120-catenina (1-234) no puede evitar el intercambio de GDP (ver **Figura 59**), a pesar de interactuar con RhoA (ver **Figura 42**). Pensamos que al interactuar RhoA con el extremo N-terminal de p120-catenina, el dominio armadillo estabilizaría la unión de GDP a RhoA.

p120-catenina interacciona con E-cadherina a través de su dominio armadillo, concretamente en las repeticiones 1 a la 7. En la repetición 6 es donde radica la capacidad de p120-catenina de inhibir a RhoA. ¿Podría la interacción de p120-catenina con E-cadherina afectar esta capacidad de inhibir a RhoA? A partir de nuestros experimentos de interacción *in vitro* no observamos competición entre E-cadherina y RhoA por unirse a p120-catenina (ver **Figura 60**), e identificamos el dominio de unión de RhoA en p120-catenina (96-234); una región distinta al dominio armadillo donde se une E-cadherina. Para algunos autores, la coexpresión de p120-catenina con el dominio citoplasmático de la E-cadherina (de forma soluble) bloquea el *branching* [192]. Por el contrario, en nuestros experimentos de intercambio de GDP la presencia de E-cadherina no inhibe la actividad GDI de p120-catenina. Esta inhibición de la actividad GDI de p120-catenina que observan estos autores, podría ser debida a una deslocalización (o fosforilación) de p120-catenina que impide que se encuentre con RhoA y la pueda inhibir. En cambio en nuestro sistema estas proteínas, RhoA, p120-catenina y E-cadherina, pueden interaccionar entre ellas simultáneamente.

Adicionalmente, en células IEC-Kras detectamos p120-catenina unida a E-cadherina y además Rho se encuentra inhibida (ver **Figura 64**), dato que corrobora nuestra conclusión de que p120-catenina puede interaccionar simultáneamente con E-cadherina y Rho y seguir ejerciendo su función inhibidora sobre Rho. β -catenina y p120-catenina están fosforiladas en tirosinas en dichas células (ver **Figura 62**). Pensamos que en estas células la Tyr-217 de p120-catenina se encuentra fosforilada, ya que Rho se encuentra inactivo e interacciona con p120-catenina (la fosforilación de la tirosina 112 produciría el efecto inverso). También es posible que la fosforilación de β -catenina, p120-catenina o incluso E-cadherina facilite el reclutamiento de GEFs (como Vav2), o GAPs a través de la interacción de dominios SH2 y así module la actividad de las Rho-GTPasas. Además estas fosforilaciones hemos visto que regulan la unión entre p120-catenina y RhoA o p120-catenina/E-cadherina.

Otro factor a tener en cuenta es la isoforma de p120-catenina mayoritaria en el tipo celular sometido a estudio, ya que isoformas cortas de p120-catenina no podrán interaccionar con RhoA y por lo tanto no podrán inhibirla.

7. Efectos de RhoA sobre p120-catenina

Relevancia estructural

Además del efecto ejercido por p120-catenina sobre RhoA hay que valorar el efecto que RhoA ejerce sobre p120-catenina, es decir, qué cambios induce en p120-catenina la interacción con RhoA. Si examinamos los resultados expuestos en la primera parte de esta tesis, recordaremos que β -catenina es una proteína que también tiene un dominio armadillo flanqueado por dos extremos terminales. El dominio armadillo tiene mucha afinidad, pero baja especificidad por la unión de factores. Son los extremos terminales que confieren a β -catenina especificidad de unión a otras proteínas, es decir limitan o facilitan la interacción de factores con el dominio armadillo central. Miembros de nuestro grupo comprobaron que los extremos terminales de placoglobina desempeñan una función similar [157]. Esto permite pensar que quizás este tipo de regulación intramolecular podía extenderse a otras proteínas con dominios armadillo, tales como APC y la misma p120-catenina.

Al igual que ocurre en β -catenina y placoglobina, el dominio armadillo de p120-catenina es básico. Su extremo N-terminal es ácido, mientras que el C-terminal en este caso tiene un punto isoelectrico neutro. Pensamos que el extremo N-terminal podría interaccionar con el dominio armadillo y que la fosforilación de los residuos localizados en esta región podrían provocar un cambio conformacional de este extremo. Dicho cambio conformacional supondría una mayor accesibilidad para cofactores de p120-catenina que se unan al dominio armadillo.

Una proteína que interacciona en el dominio armadillo es la E-cadherina, así que nos planteamos si el extremo N-terminal podía afectar la interacción de p120-catenina con E-cadherina. La fosforilación de p120-catenina por Src aumenta su afinidad hacia la E-cadherina, muy posiblemente por un cambio conformacional en el extremo N-terminal. Como se observa en la **Figura 40**, tanto la fosforilación de la p120-catenina-1 como la de p120-catenina (234-911) aumentan la afinidad por la E-cadherina. Sin embargo, la forma más corta tiene menor afinidad por la E-cadherina. Creemos que puede ser debido a que el resto de aminoácidos que componen el extremo N-terminal (aa 234-347) adopta una conformación que dificulta la interacción de E-cadherina con el dominio armadillo de p120-catenina.

En este mismo sentido, la interacción de RhoA con p120-catenina en la región N-terminal debe de producir un cambio conformacional de dicho extremo terminal que, por un lado facilite la interacción de p120-catenina con E-cadherina (ver **Figura 61**) y por otro lado favorezca la interacción con las quinasas Yes y Fyn (ver **Figura 46**).

Relevancia funcional

La interacción simultánea de p120-catenina con Rho y E-cadherina hizo que nos preguntáramos si la interacción de α -catenina con E-cadherina a través de Rho, sin necesidad de β -catenina, sería posible. De ser así supondría un nuevo mecanismo para la formación de las uniones adherentes y susceptible de una nueva regulación. E-cadherina no interacciona directamente con α -catenina, sino que lo hace a través de β -catenina. Realizamos ensayos *in vitro* para determinar si α -catenina podía interaccionar con GST-cyto-E-cadherina a través de la interacción p120-catenina/RhoA/ α -catenina. Como muestra la **Figura 71** E-cadherina no interacciona directamente con α -catenina (carril 2), es la presencia de β -catenina lo que permite detectar α -catenina en el complejo (carril 3). En el carril 4 se observa como α -catenina puede interaccionar con E-cadherina mediante su asociación a RhoA y p120-catenina. Sin embargo, esta interacción es de menor afinidad. Este dato sugiere que la interacción de α -catenina con E-cadherina sería mayoritariamente a través de β -catenina y que en determinadas circunstancias podría darse la interacción a través de p120-catenina y RhoA.

Por otra parte, como ya se ha dicho en repetidas ocasiones, p120-catenina puede actuar como un elemento acoplador de tirosina quinasas. Nuestro grupo había identificado que la fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina por el receptor EGF inhibe la interacción E-cadherina/ β -catenina [142]. Este hecho comporta una pérdida de la interacción de E-cadherina con el citoesqueleto de actina y por lo tanto el desensamblaje de las uniones adherentes. También había descrito que la fosforilación de la tirosina 142 de β -catenina por las quinasas Fyn/Fer, inhibe la interacción α -catenina/ β -catenina [145]. Cualquiera de estas dos fosforilaciones provoca la pérdida de los contactos celulares, pero es necesaria la fosforilación de ambas tirosinas de β -catenina, Tyr-142 y Tyr-654, para liberar β -catenina de los complejos de adhesión y

facilitar su translocación al núcleo, donde actuará como coactivador transcripcional de genes involucrados en la proliferación.

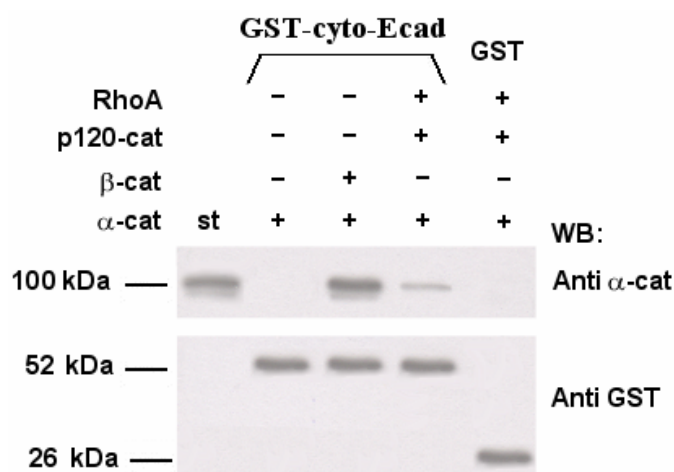


Figura 71. α -catenina interacciona con E-cadherina a través de p120-catenina y RhoA. 1,5 pmoles de GST-cyto-Ecad o GST como control fueron incubados con 1 pmol de α -catenina y, cuando se indica, con 1 pmol de β -catenina, p120-catenina y RhoA. La cantidad de α -catenina asociada se determinó con anticuerpos específicos contra esta proteína. La cantidad de proteína unida se determinó comparando los resultados con cantidades conocidas de α -catenina (St, 0,4 pmol). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Estas fosforilaciones son reversibles por fosfatasas como LAR, PTP κ , PTP λ [146, 147], para permitir que las células puedan formar y deshacer de manera dinámica las uniones con las células vecinas. Se ha descrito que la sobreexpresión de algunas fosfatasas aumenta la fuerza y la estabilidad de las uniones adherentes (PTP-LMW) [233], o que la ausencia de algunas provoca un aumento en la fosforilación de β -catenina (PTP-1B) [234].

Resultados preliminares de David Casagolda, miembro de nuestro grupo, sugieren que la fosforilación de la tirosina 654 sería dinámica y la fosforilación y defosforilación estarían en equilibrio, permitiendo una rápida formación y desensamblaje de las uniones adherentes como se ilustra en la **Figura 72**. Sin embargo, la fosforilación de la tirosina 142 de β -catenina sería más lenta e irreversible y sería esta fosforilación el factor limitante para que β -catenina pudiera translocar al núcleo.

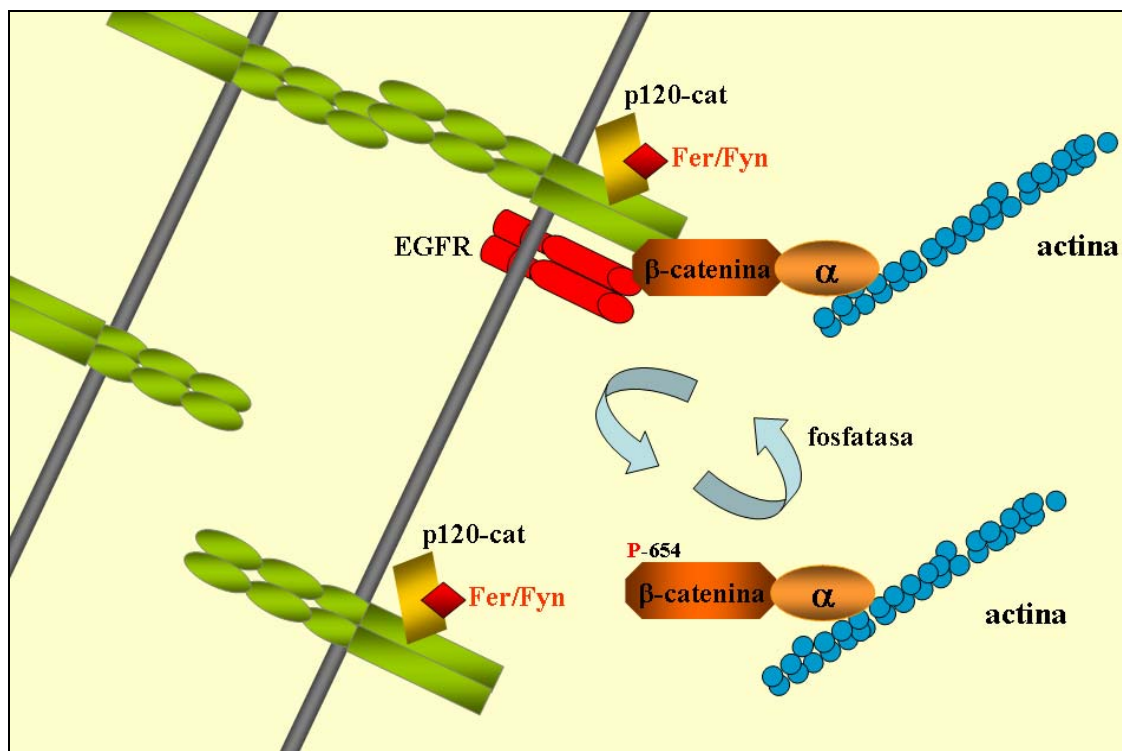


Figura 72. Modelo de regulación de las uniones adherentes mediante la fosforilación de la tirosina 654 de β -catenina. Para que las uniones adherentes sean funcionales, E-cadherina tiene que interactuar con el citoesqueleto de actina. EGFR interactúa con β -catenina y fosforila la tirosina 654, como consecuencia se inhibe la interacción de β -catenina con E-cadherina produciéndose el desensamblaje de las uniones adherentes. El proceso es revertido por diversas tirosina fosfatasas, como por ejemplo LAR, PTP-LMW o PTP-1B.

Como se había descrito en el grupo, la interacción de p120-catenina con E-cadherina facilita la aproximación de las quinasas Fer y Fyn al complejo de adhesión y la consiguiente fosforilación de la tirosina 142 de β -catenina [145] (ver **Figura 34**). El hecho de que la unión de RhoA a p120-catenina aumente la afinidad de esta proteína por E-cadherina y por las quinasas Yes y Fyn, nos hizo pensar que una función de Rho podría ser facilitar el acoplamiento y reclutamiento de las quinasas en las uniones adherentes a través de su interacción con p120-catenina. Como se observa en la **Figura 66** la p120-catenina-1 Y112E, que no interacciona con Rho, no permite el acoplamiento y reclutamiento de las quinasas hacia β -catenina y por lo tanto Fer y Fyn no pueden fosforilar la tirosina 142 de β -catenina. En cambio cuando p120-catenina interacciona con Rho se produce el acoplamiento y la tirosina 142 de β -catenina puede ser fosforilada. Este modelo de acoplamiento de tirosina quinasas a través de Rho se ilustra en la **Figura 73 (B)**. Nuestro modelo sugiere que el estado de activación de RhoA

estaría controlando la capacidad de las quinasas de unirse al complejo de adhesión, permitiendo la fosforilación de la Tyr-142 de β -catenina y facilitando su paso al núcleo.

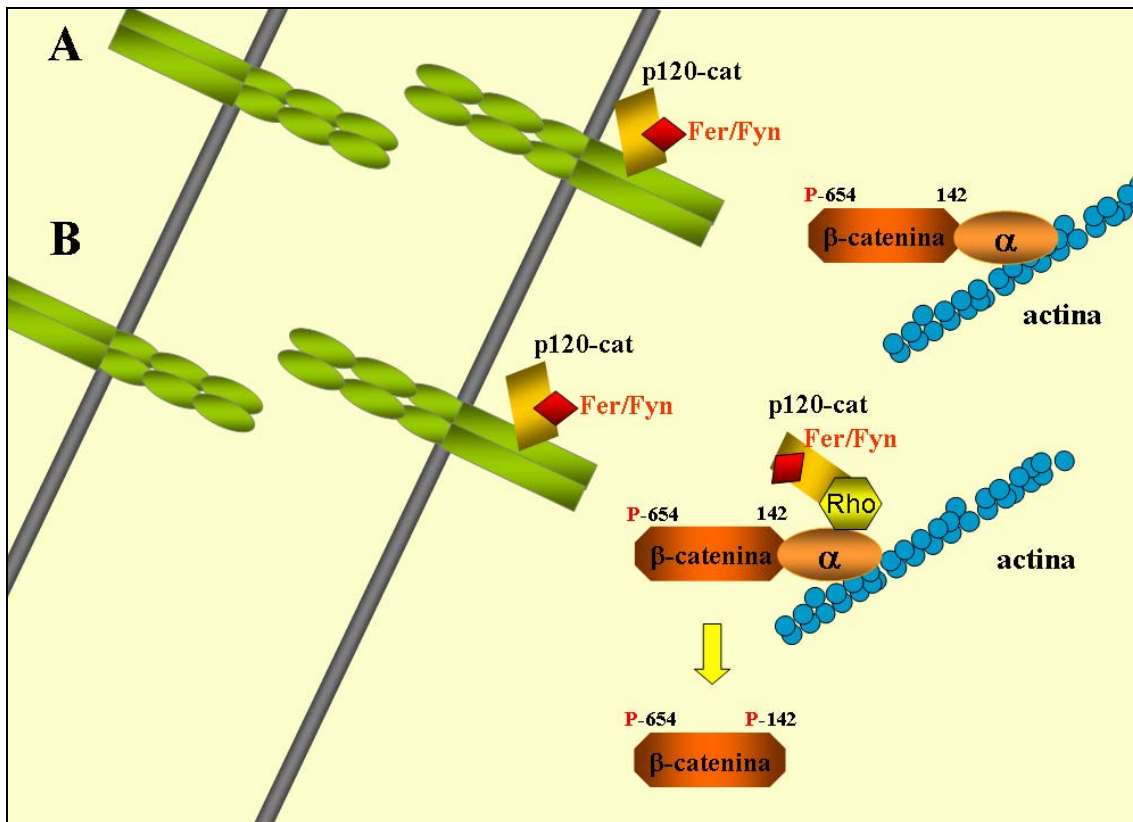


Figura 73. Modelo del acoplamiento de quinasas al complejo de adhesión a través de RhoA. (A) β -catenina fosforilada en la Tyr-654 no puede interactuar con E-cadherina, lo que impide que las quinasas Fer y Fyn puedan fosforilar la Tyr-142. **(B)** La interacción de Rho con p120-catenina y α -catenina permite el acoplamiento de las tirosina quinasas cerca de β -catenina. Como resultado, β -catenina podría ser fosforilada en la tirosina 142, liberada de los complejos de adhesión y translocada al núcleo.

CONCLUSIONES

- 1) Se ha detectado interacción entre p120-catenina y RhoA. Dicha interacción ocurre entre los aminoácidos 96 y 234 de p120-catenina

- 2) La interacción entre p120-catenina y RhoA está regulada por fosforilación en tirosinas.
 - A. La fosforilación de la quinasa Src aumenta su afinidad por RhoA
 - B. La fosforilación por la quinasa Fyn inhibe la interacción entre ambas proteínas.
 - C. La tirosina 112 es la responsable de la inhibición de la interacción entre p120-catenina y RhoA, mientras que la tirosina 217 tiene un efecto positivo en la interacción.

- 3) p120-catenina inhibe la actividad de RhoA evitando el intercambio de nucleótidos, igual a como lo haría una proteína RhoGDI.

- 4) En nuestro sistema celular (IEC Kras) p120-catenina interacciona con RhoA y la inhibe, independientemente de su interacción con E-cadherina.

ANEXOS

1. TÉCNICAS RELACIONADAS CON LA MANIPULACIÓN DEL DNA

1.1. Preparación de bacterias competentes y transformación

La cepa utilizada durante la realización de este trabajo ha sido la XL1-Blue de *Escherichia coli*. Esta cepa se caracteriza por ser deficiente en endonucleasas (*endA*), hecho que aumenta el rendimiento de la minipreparación de DNA y por ser también deficientes en recombinación (*recA*), lo que aumenta la estabilidad de nuestro inserto.

➤ Preparación de células competentes

- Se inocula una única colonia de una placa (LB-agar) en la que se ha crecido una estría de *E. coli* en 5 ml de LB, dejándolo crecer a 37°C durante 8 horas.
- Se diluye 1/50 en SOB recién preparado y se crece a 18°C hasta que alcanza una $OD_{600} = 0.6$.
- Se deja 10 minutos en hielo y seguidamente se centrifuga suavemente (2500 g, 10 min., 4°C).
- Se decanta el medio y el pellet se resuspende en 80 ml de TB frío.
- Se vuelve a centrifugar (2500 g, 10 min., 4°C) y el sedimento se resuspende en 20 ml de TB frío.
- Se añade DMSO a una concentración final del 7%.
- Se mantienen en hielo durante 10 minutos, se dividen en alícuotas y se congelan con N₂ líquido.

➤ Transformación

- Se añaden 100 μ l de XL1-Blue competentes (recién preparadas o descongeladas lentamente a 4°C) al DNA y se mezcla agitando suavemente.
- Se incuba la mezcla DNA-células en hielo durante 30 min.
- A continuación la mezcla se incuba durante 90 segundos a 42°C, seguido de 2 minutos a 4°C.
- Se añaden 0.9 ml de LB y se incuba a 37°C con agitación durante 1 hora. Este paso se realiza sin ampicilina para permitir que las bacterias transformadas puedan desarrollar la resistencia al antibiótico codificado en el vector.
- Se extiende la mezcla sobre una placa de LB-agar con ampicilina y se incuba durante 16 horas a 37°C.

1.2. Aislamiento del DNA plasmídico

Se ha realizado a partir de 5 ml de cultivo de *E. coli* con el *kit* comercial de *minipreps* de Promega, siguiendo el protocolo del manual de instrucciones basado en el método de la lisis alcalina.

1.3. Análisis del DNA en geles de agarosa

El análisis, la identificación y la separación de fragmentos de DNA se han realizado mediante electroforesis convencional en geles de agarosa en condiciones no desnaturalizantes. El porcentaje de los geles utilizados variaba (0.8%-2%) dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA analizados. Se ha utilizado TAE 1X como tampón de electroforesis y la detección del DNA se ha realizado mediante tinción con bromuro de etidio (BrEt), incluyendo éste en el gel (0.25-0.5 μ g/ml). La estimación del tamaño de los fragmentos de DNA analizados se realizó por comparación con marcadores de pesos moleculares conocidos. Para la purificación de fragmentos de DNA en geles de agarosa (ver apartado 1.4.1 de Materiales y Métodos), el gel se tiñe posteriormente con una solución de BrEt (0.5 μ g/ml).

1.4. Construcción de plásmidos

1.4.1. Subclonaje de fragmentos

Muchas de las construcciones utilizadas en este trabajo se han generado mediante el subclonaje de un fragmento de DNA en un vector plasmídico.

✓ Preparación del vector

Digestión con enzimas de restricción

Se digieren 2-3 μg de DNA en un volumen final de 20-50 μl . La cantidad de enzima, el tampón utilizado, la temperatura y el tiempo de la reacción fueron los específicos para cada enzima. Los enzimas fueron suministrados por New England Biolabs.

Defosforilación del vector

Se añade al DNA 0.5 unidades de fosfatasa/ μg de DNA y se incuba durante 1 hora a 37°C. Se trata de una fosfatasa alcalina de intestino de vaca (Biolabs, New England). Posteriormente la fosfatasa se inactiva incubando 15 minutos a 70-75°C. El DNA se aísla utilizando el kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham), siguiendo el protocolo del fabricante y se resuspende en TE.

✓ Preparación del inserto

A. Mediante enzimas de restricción

Digestión con enzimas de restricción

Se siguen los mismos pasos que la digestión del vector, pero en este caso se digieren 2-5 μg de DNA en un volumen final de 20-50 μl . Los productos de digestión se resuelven en un gel de agarosa para ser purificados posteriormente.

Generación de extremos romos: relleno con la polimerasa *Klenow*

El DNA procedente de la digestión (2-5 μg) es tratado con 2 unidades/ μg DNA y 25 μM de dNTPs a 37°C durante 1 hora en un volumen final de 50 μl . Finalmente el DNA se purifica utilizando el kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham).

Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

La banda correspondiente al fragmento de interés se recorta del gel de agarosa y es aislada siguiendo las instrucciones del kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham).

B. Mediante amplificación por PCR

Las reacciones de PCR se realizaban generalmente en un volumen final de 50 μl . Se mezclaron 10-50 ng de DNA molde en tampón de reacción 1X con 1 mM MgCl_2 , 10 mM de la mezcla de dNTPs (Invitrogen), 0.3 μM de cada uno de los oligonucleótidos, 1-2.5 unidades de la polimerasa *Pfx* (Invitrogen) y agua autoclavada hasta los 50 μl .

Las condiciones de la reacción fueron:

1. 95°C durante 3 minutos
2. 95°C durante 15 segundos.
3. 38-60°C (según la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos) durante 30 segundos.
4. 68°C, pero en este caso el tiempo depende de la longitud del fragmento a amplificar, a razón de 1 Kb/min. Los pasos 1, 2 y 3 se repitieron durante 20-25 ciclos.
5. Ciclo de extensión final a 68°C durante 2 minutos.

✓ Ligación

Una vez purificados vector e inserto, éstos se ligaban en una relación molar vector: inserto de 1:3 (si los extremos generados por los enzimas de restricción eran cohesivos) o 1:10 (si los extremos eran romos). La reacción se llevaba a cabo

generalmente en un volumen de 10 μ l, añadiendo 1 U de T4 DNA ligasa (Roche), a 16°C durante toda la noche o a T^a ambiente (20-25°C) durante 1-2 horas.

1.4.2. Mutagénesis dirigida

Otros plásmidos utilizados en este estudio se han generado por mutagénesis dirigida con el fin de generar mutantes puntuales de un aminoácido, usando el kit comercial *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) y siguiendo exactamente el manual de instrucciones del kit. Todos los mutantes obtenidos con este método se han comprobado por secuenciación.

En la siguiente tabla (**Tabla VI**) se muestran los mutantes puntuales que han sido utilizados para realizar este trabajo, así como los oligonucleótidos que se han empleado.

Mutación	Oligonucleótidos utilizados (5'-3')
β -catenina Tyr-86→Glu	GCTGATATTGACGGGCAGGAAGCAATGACTAGG
β -catenina Tyr-654→Glu	GGCGTGGCAACAGAAGCAGCTGCTGCTGTCC
p120-catenina Tyr-96→Glu	AACCACCTTCTGGAAAGCACTATCCCC
p120-catenina Tyr-96→Phe	AACCACCTTCTGTTTAGCACTATCCCC
p120-catenina Tyr-112→Glu	ATTGTGGAAACCGAAACCGAGGAGGAC
p120-catenina Tyr-112→Phe	ATTGTGGAAACCTTTACCGAGGAGGAC
p120-catenina Tyr-217→Glu	GGGTATGGCCGACACGAAGAAGATGGTTATCC
p120-catenina Tyr-217→Phe	GGGTATGGCCGACACTTTGAAGATGGTTATCC
p120-catenina Tyr-228→Glu	TGGCAGTGACAACGAAGGCAGTCTGTCC
p120-catenina Tyr-228→Phe	TGGCAGTGACAACCTTTGGCAGTCTGTCC

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

1.5. Secuenciación del DNA

Se utilizó el *dRhodamine terminador Cycle Sequencing Kit* (Perkin Elmer), utilizando unos oligonucleótidos próximos a la mutación a analizar (máximo 500 bp de distancia).

2. TÉCNICAS RELACIONADAS CON LA MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

2.1. Extracción o purificación de proteínas

2.1.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *E. coli*

Para la expresión y purificación de proteínas de fusión en *E. coli*, utilizamos un vector de expresión que nos permite obtener nuestra proteína unida a *glutathion-S-transferasa* (GST). Para ello utilizamos unos vectores de expresión denominados pGEX (Amersham, ver **Figura 74**), los cuales permiten generar fusiones carboxiterminales de la proteína de interés a la proteína GST (ver apartado “plásmidos”) y además contienen un promotor inducible por isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG).

Una vez generadas estas construcciones se transformaron en células competentes XL1-Blue y se procedió a la preparación del cultivo celular. Un pequeño volumen de este cultivo se creció hasta saturación, posteriormente se diluyó en 50% de glicerol y se guardó a -80°C . La purificación se realizó mediante una cromatografía de afinidad en resina *Glutathione-SepharoseTM 4B* (Amersham).

A lo largo de este trabajo se han expresado y purificado diversas proteínas de fusión a GST. Para todas ellas se ha seguido básicamente el mismo protocolo variando únicamente, en algunos casos, las temperaturas y tiempos de inducción dependiendo de la solubilidad y la tendencia a la degradación de las distintas proteínas de fusión; así como los volúmenes de cultivo bacteriano utilizado, en función de los niveles de expresión y el rendimiento de la purificación de cada proteína y en función de las cantidades requeridas para cada experimento. La unión,

los lavados y la elución de la proteína de fusión (cuando era necesario) de la resina se han realizado siguiendo un método en *batch*.

➤ **Cultivo y preparación del extracto celular**

- Una pequeña alícuota del stock de -80°C se crece durante toda la noche a 37°C con agitación (220 rpm) en 20 ml de LB-ampicilina (125 mg/l).
- Se diluye 1:10 en LB-ampicilina y se mantiene en agitación a 37°C hasta alcanzar una $OD_{600} = 0.6-0.8$ (aproximadamente 1-1.5 horas).
- Se añade IPTG (concentración final 0.1 mM) y se mantienen las condiciones de crecimiento durante 2 horas más.
- Se recogen las células por centrifugación (8000 rpm, 10 min., 4°C) y se decanta el medio.
- Las células se resuspenden en 10 ml de PBS y se lisan sometiendo la mezcla a pulsos cortos (15 segundos) de sonicación pequeñas alícuotas.
- Se añade Triton X-100 (Sigma) a una concentración final del 1% para ayudar a solubilizar las proteínas de fusión.
- Se centrifuga (10000 rpm, 10 min., 4°C) y se recoge el sobrenadante.

➤ **Unión de la proteína de fusión a Glutathion-Sepharosa**

- Se cogen 250 µl (200 µl de resina efectiva) de la mezcla de Glutathion-Sepharosa (suministrada por la casa Amersham al 80% en etanol) y se centrifuga (600 g, 5 min., T^a ambiente), eliminando el sobrenadante.
- La resina se lava por centrifugación 3 veces con PBS y se resuspende finalmente en 200 µl de PBS.
- Se añaden a la resina los 10 ml del extracto soluble bacteriano y se incuba durante 1 hora a T^a ambiente en un agitador orbital.
- Se centrifuga (600 g, 5 min., T^a ambiente) y se descarta el sobrenadante. La resina, que lleva unida nuestra proteína de interés, se lava 3 veces con PBS.

➤ **Aislamiento de la proteína**

A. Mediante elución de la proteína unida a GST

- Se incuba la resina con 10 mM de glutathion reducido (GEB) (Sigma) durante 20 minutos a T^a ambiente.
- Se centrifuga (600 g, 5 min., T^a ambiente) y recuperamos el sobrenadante.
- La proteína obtenida es diluida en 50% glicerol, dividida en alícuotas y conservada a -20°C.

B. Mediante corte entre la GST y la proteína recombinante

- La proteína unida a la resina se incuba con tampón de diálisis y se añade 1 unidad de *PreScission* (PS) por cada 100 µg de proteína de fusión.
- Se deja incubar a 4°C durante 4-16 horas en agitación.
- Se centrifuga (600 g, 5 min., T^a ambiente) y el sobrenadante se guarda a -20°C en 50% de glicerol.

En el caso concreto de la proteína de fusión **GST-Rhotekina**, el protocolo es un poco diferente al descrito arriba:

- Una pequeña alícuota del stock de -80°C se crece durante todo el día a 37°C con agitación (200 rpm) en 20 ml LB-ampicilina (125 mg/l).
- Se diluye 1:10 en LB-ampicilina y se mantiene en agitación a 37°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 0.6 (aproximadamente 2-3 horas).
- Se añade IPTG (concentración final 0.2 mM) y se deja en agitación durante toda la noche a T^a ambiente.
- Se centrifuga (8000 rpm, 10 min., 4°C) y el pellet se resuspende en 10 ml de la solución 1 (ver Reactivos).
- Se sonica toda la suspensión de células durante 10 segundos (3 veces).
- Se centrifuga (14000-16000 rpm, 30 min., 4°C), mientras tanto 300 µl de la Glutathion-Sepharosa se lava dos veces con solución 1.

- Se mezcla el sobrenadante con la resina y se incuba a 4°C durante 1 hora en agitación.
- La resina se lava tres veces con la solución 2 (ver Reactivos) y otras tres veces con la solución 3 (ver Reactivos).
- La proteína no se eluye de la resina, sino que se conserva en 500 µl de la solución 3 (unida a la resina) a 4°C. Esta preparación es estable durante dos semanas.

El rendimiento de la purificación se comprueba analizando en un gel SDS-PAGE alícuotas de la proteína purificada, así como alícuotas equivalentes separadas a lo largo del proceso de purificación de la proteína (inducción, solubilización). La visualización de la proteína se realiza mediante la tinción del gel con azul de *Coomassie* (20 minutos en solución de tinte y varias horas en solución para desteñir, *destainer*) y la determinación de la cantidad de proteína obtenida se estima a partir de una curva de concentraciones de BSA, analizada en paralelo con la proteína de interés en el mismo gel.

En las condiciones descritas y para un volumen inicial de cultivo de 200 ml se obtiene un rendimiento que oscila entre 0.5 y 2 µg de proteína/ml de cultivo.

2.1.2. Extracción de proteínas a partir de cultivos celulares

Las células cultivadas en el laboratorio se someten a un proceso de lisis para la obtención de las proteínas celulares que servirán para posteriores experimentos. El método empleado en la lisis es explicado en el apartado 3 de Materiales y Métodos.

2.2. Técnicas electroforéticas para el análisis de proteínas

2.2.1. Electroforesis SDS-PAGE (Método de Laemmli)

En este trabajo se han utilizado los sistemas *Mini-Protean II* y *Mini-Protean III* (BioRad) para la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se han utilizado 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 a resolver. En cambio en el gel concentrador la concentración de acrilamida era del 4%. En todos los casos se mantuvo una relación acrilamida: bisacrilamida de 37.5-1.

La preparación de las muestras se ha realizado mediante la adición de tampón de carga Lammeli 5X e hirviendo durante 4 minutos.

Los geles se han corrido a un voltaje constante durante 1-2 horas. Como ya se ha explicado la visualización de las muestras se realizó mediante tinción con *Coomassie*.

2.2.2. Electrotransferencia de proteínas. *Western blot*.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.45 μ m Potran, Schelicher & Schuell) mediante electrotransferencia en un sistema húmedo, utilizando el sistema *Mini Trans-blot* (BioRad).

Generalmente la transferencia se ha realizado en frío y con agitación a un amperaje constante de 400 mA durante 90 minutos. Una vez finalizada la transferencia, para comprobar que las proteínas habían sido transferidas, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau (1-2 minutos) y lavaron con H₂O para eliminar el exceso de colorante.

2.2.3. Inmunodetección

La detección de las proteínas de interés se ha llevado a cabo mediante la hibridación secuencial de la membrana con un anticuerpo primario específico para la proteína (ver **Tabla VIII**) y posteriormente con un anticuerpo secundario conjugado con HRP (peroxidasa de rábano):

- Se bloquea la membrana en TBS-T con 1% BSA (o 5% leche en polvo) durante 1 hora a T^a ambiente o durante 16 horas a 4°C.
- La membrana de nitrocelulosa se incuba, con la dilución adecuada del anticuerpo primario en TBS-T +0.1% BSA (o 5% leche en polvo), durante 1-4 horas a T^a ambiente y con agitación.
- Se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo.

- Se incuba con el anticuerpo secundario, anti IgG, diluido en TBS-T +0.1% BSA (o 5% leche en polvo) durante 1-1.5 horas en agitación y a T^a ambiente.
- Se vuelve a lavar la membrana para eliminar el exceso de anticuerpo secundario.
- El anticuerpo se detecta mediante un sistema quimioluminiscente, utilizando el kit comercial: *SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate* (Pierce) y películas fotográficas Kodak X-Omat (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En determinados casos, una vez revelada, la membrana de nitrocelulosa se estripó sumergiéndola en *Stripping buffer* durante 45 minutos a 55°C. Posteriormente se volvió a bloquear y a incubar con otros anticuerpos.

Anticuerpo 1 ^{ro}	Organismo	Epítipo	Casa comercial
α -catenina, clon 5	ratón	729-906(final)	BD Transduction Labs
β -catenina, clon 14	ratón	571-781(final)	BD Transduction Labs
β -catenina, clon 9G10	ratón	armadillo	Alexis Biochemcials
β -catenina, clon 10H8	ratón	769-781(final)	Calbiochem
β -catenina, clon 7D11	ratón	N-tail (exón 2)	Alexis Biochemcials
Cdc42, clon 44	ratón	1-191	BD Transduction Labs
E-cadherina, clon 36	ratón	735-883(final)	BD Transduction Labs
Fyn, clon 25	ratón	1-132	BD Transduction Labs
Fosfotirosina PY20/PY54	ratón	Tyr-P	BD Transduction Labs
GFP	ratón		Clontech
GST, 27-4577	cabra	no caracterizado	Amersham Pharmacia
Myc, clon 9E10	ratón	C-tail c-myc	líquido ascítico
p120-catenina, clon 98	ratón	790-911(final)	BD Transduction Labs
p120-catenina pY96, clon 25a	ratón	p120 Tyr-96-P	BD Transduction Labs
p120-catenina pY228, clon 21a	ratón	p120 Tyr-228-P	BD Transduction Labs
Rho, clon 55	ratón	1-155	BD Transduction Labs
Src, clon GD11	ratón	no caracterizado	Upstate biotechnology
TBP, clon 17	ratón	no caracterizado	BD Transduction Labs

Anticuerpo 1 ^{rio}	Organismo	Epítipo	Casa comercial
Tcf-4, clon N-20	cabra	N-terminal	Santa Cruz biotech.
Yes, clon 1	ratón	10-193	BD Transduction Labs
Anticuerpo 2 ^{rio}	Organismo		Casa comercial
Goat Anti-Mouse	cabra		Pierce
Rabbit Anti-Goat	conejo		Dako

Tabla VII. Detalle de los anticuerpos usados en la realización de esta tesis

2.3. Ensayos de interacción proteína-proteína

A lo largo de este trabajo se han realizado diferentes ensayos de interacción entre proteínas que podemos clasificar en cuatro grupos principales:

Interacción directa: unión de proteínas recombinantes con purificación por cromatografía de afinidad.

Overlay: unión de proteínas recombinantes en nitrocelulosa.

Pull-Down: incubación de una proteína con extractos celulares totales.

Coinmunoprecipitación: purificación selectiva de una proteína endógena de un extracto celular para analizar su asociación a diversas proteínas celulares de interés.

2.3.1. Interacción directa de proteínas recombinantes purificadas

Esta técnica se basa en la capacidad de generar proteínas en *E. coli* fusionadas o no a GST y la afinidad de la Glutathion-Sepharosa para unir específicamente los productos con GST. El protocolo a seguir es descrito a continuación con el siguiente ejemplo.

- Los distintos ensayos de unión de diferentes formas deleccionadas de la β -catenina con el dominio citoplasmático de la E-cadherina se llevaron a cabo incubando las cantidades indicadas de β -catenina con una cantidad fija de E-cadherina unida a GST (o GST sola como control de una posible interacción inespecífica entre la β -catenina y la GST) en un volumen final de 200 μ l en tampón de *binding*, durante 20-25 minutos a T^a ambiente y con agitación.

- Los complejos β -catenina/GST-cyto-E-cadherina formados se aislaron añadiendo 20 μ l de Glutathion-Sepharosa e incubando 25 minutos a T^a ambiente y en agitación.
- Seguidamente se lavó la resina cuatro veces con 500 μ l de tampón de binding para eliminar la β -catenina libre, no unida a GST-cyto-E-cadherina.
- Los complejos retenidos se solubilizaron (añadiendo tampón de carga de electroforesis 5X e hirviendo las muestras 4 minutos) y analizaron por *Western blot*.

Para cuantificar la cantidad de proteína unida los resultados obtenidos se comparan con cantidades conocidas de cada proteína presentes en el mismo *Western blot*, para posteriormente las películas fotográficas ser analizadas en un densitómetro G-700 (BioRad).

2.3.2. Ensayos de *Overlay*

- Las proteínas recombinantes son separadas por SDS-PAGE y posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa
- Se bloquea la membrana y se incuba con 5-10 mg/ml de la proteína recombinante en TBS-T con 0.1% BSA durante 90 minutos a T^a ambiente.
- Se hacen 3 lavados de 10 minutos con TBS-T para eliminar la proteína no unida.
- La membrana se incuba con los anticuerpos correspondientes.

2.3.3. Ensayos de *Pull-Down*

Estos ensayos son una aproximación más fisiológica al estudio de las interacciones que una proteína establece con el resto de proteínas celulares, donde una proteína recombinante que dispone de una modificación o *tag* fusionada, es incubada con extractos celulares para posteriormente ser purificada y de este modo 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.

- Se incuban entre 6-12 picomoles de la proteína de interés unida a GST con 50-200 µg de extractos celulares totales en un volumen final de 200 µl de tampón de binding, durante 40-45 minutos, a T^a ambiente y agitación.
- Los complejos formados son purificados de la misma forma descrita en el apartado Interacción directa de proteínas recombinantes purificadas de Materiales y Métodos.

En los *Pull-Down* con **GST-Rhotekina** existen unas pequeñas variaciones:

- Los extractos celulares han de ser recién hechos (apartado 3 de Materiales y Métodos).
- Como la proteína ya está unida a la resina, los extractos celulares se añaden a 5-10 µl de la suspensión de GST-Rhotekina/Glutathion-Sepharosa en un volumen final de 200 µl en tampón de binding suplementado con MgCl₂, durante 30 minutos a T^a ambiente. Aquí es muy importante la rapidez para evitar la hidrólisis del GTP.
- Se lava la resina tres veces con el tampón de binding y las muestras se analizan por *Western blot*.

2.3.4. Ensayos de purificación con níquel-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 níquel-NTA-agarosa® de unir polihistidinas, los complejos formados fueron retenidos. La realización de lavados en condiciones poco restrictivas (baja concentración imidazol y sales), permitió aislar los complejos formados por las proteínas fusionadas a histidinas con el resto de proteínas celulares.

2.3.5. Coinmunoprecipitación

- Se incuban 200-400 μg de extractos totales (preparados como se describe en el apartado de Materiales y Métodos) con 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del anticuerpo correspondiente durante 16 horas a 4°C y en agitación.
- Se centrifuga brevemente a 12000 rpm para eliminar el material insoluble.
- El sobrenadante se incuba a 4°C durante 90 minutos con 60 μl (de una solución al 50% peso/volumen) de proteína A-agarosa (Sigma).
- Se lava dos veces con 500 μl de tampón de lisis (apartado de Materiales y Métodos).
- Los complejos proteicos se eluyen con tampón de carga de electroforesis y se analizan por *Western blot*.

2.4. Ensayos de sensibilidad a proteasas

➤ Digestión con tripsina

- Se lleva a cabo en un volumen final de 100 μl de buffer tripsina. Se mezclan 500 ng de β -catenina con 30 ng de tripsina (cuando se analiza el extremo C-terminal de la β -catenina) o 0.1 ng de tripsina (cuando se analiza el extremo N-terminal de la β -catenina).
- Se deja actuar la tripsina durante 15 minutos (extremo N-terminal) o una hora y media en el caso del extremo C-terminal, a 24°C.

➤ Digestión con carboxypeptidasa Y (Boehringer)

- Se incuban 17 picomoles de β -catenina con 51 picomoles de cyto-E-cadherina, α -catenina o GST (como control) en un volumen final de 50 μl de tampón de corte para la carboxypeptidasa Y (empieza a digerir por el extremo C-terminal de la proteína).
- Se añaden 17.5 ng de carboxypeptidasa Y y se deja incubando a 25°C durante el tiempo indicado en cada experimento.

En ambos experimentos de digestión, las reacciones fueron detenidas a los tiempos indicados mediante la adición de tampón de carga de electroforesis 5X e hirviendo las muestras durante 4 minutos. La digestión fue determinada por *Western blot*, mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra los extremos terminales de β -catenina (ver **Tabla VII**). Posteriormente las películas fueron densitometradas y se representó la cantidad de proteína en cada tiempo de forma relativa al tiempo inicial.

2.5. Ensayos de fosforilación

Quinasa	Obtención	Condiciones
Src	recombinante, Upstate Biotechnology	1-4 horas a 22°C
Fyn	recombinante, Upstate Biotechnology	1 hora a 30°C
CKI	recombinante, Sigma	1 hora a 30°C
Fer	clonada en pcDNA3-His, expresada en células como proteína con poli-histidina y purificada con níquel-agarosa	1 hora a 30°C

Tabla VIII. Quinasa utilizadas en la tesis

2.5.1. Tirosina quinasas

Los ensayos de fosforilación se llevan a cabo en tampón de fosforilar y 0,1 mM de ATP en un volumen final de 50 μ l. La quinasa empleada, los tiempos y temperaturas de reacción varían según el caso (ver **Tabla VIII**). Las muestras son analizadas por *Western blot* con anti fosfotirosina (ver **Tabla VII**).

2.5.2. Serina/Treonina quinasas

La fosforilación de p120-catenina por la caseína quinasa I (CKI) (ver **Tabla VIII**) se llevó a cabo en tampón TEST y 0,1 mM de ATP o [γ - 32 P]-ATP (1000 cpm/pmol) en un volumen final de 25 μ l. Se incubaron 0.1 pmoles de p120-catenina con 5 μ l de CKI (actividad 2 U/ml) a 30°C durante 1 hora. En determinados casos, tras la fosforilación las muestras se analizaron por electroforesis de SDS-poliacrilamida. Los geles se tiñeron con *Coomassie Blue*, 40% metanol y 10% ácido acético, se secaron y se expusieron a una película sensible a rayos X durante 12 h a -

80°C. La cantidad de fosfato incorporado por pmol de p120-catenina se determinó cortando la banda radioactiva del gel y cuantificando la radioactividad con el contador de centelleo líquido.

2.6. Ensayos de intercambio de GTP/GDP

20 pmoles de RhoA son preincubados, 10 minutos a 30°C, con tampón de incubación en un volumen final de 100 µl. En el tampón había GDP frío a una concentración de 1.5 µM y GDP marcado, con una actividad específica de 1000 cpm/pmol.

Pasados estos diez minutos se añaden cantidades equimolares de las diferentes proteínas (p120-catenina) y se incuban durante 10 minutos a 30°C. En el caso de no incubarse con p120-catenina, se añade el tampón solo. Posteriormente se añade GTP a una concentración de 10 µM y se incuba otros diez minutos. La reacción se detiene añadiendo tampón frío y filtrando las muestras. Una vez secos los filtros se determina la cantidad de GDP marcado retenido en la membrana.

3. CULTIVOS CELULARES

3.1. Líneas celulares utilizadas

Línea celular	Origen	Características
ADH Rho-wt	SW480	SW480 transfectadas establemente con la forma <i>wild type</i> de Rho. Cedidas por A. Muñoz
HT-29 M6	Epitelio humano (HT-29)	En estado proliferativo se parecen a las células prediferenciadas de la cripta colónica i en una vez en confluencia se diferencian a células mucosecretoras. Uniones intercelulares definidas
IEC-18	Epitelio intestinal rata	línea inmortalizada, no tumorigénica
IEC-18 K-ras	Epitelio intestinal rata	IEC-18 transfectadas de forma estable con el mutante Val-12 del encogen humano K-ras. Presentan pérdida de contactos celulares.
NIH-3T3	Fibroblastos embrionarios de ratón	No expresan E-cadherina

Línea celular	Origen	Características
RWP1	Carcinoma pancreático humano	Uniones adherentes bien definidas
SW480	Adenocarcinoma 1° de colon	Presenta contactos celulares poco definidos y deficiente expresión de E-cadherina. Hay poca β -catenina retenida en la membrana y alta actividad transcripcional mediada por el complejo β -catenina/Tcf-4

Tabla IX. Líneas celulares utilizadas

3.2. Condiciones de cultivo

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 además se añade piruvato sódico, L-glutamina y penicilina/estreptavidina (Life Technologies, Inc.) creciendo a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron la confluencia fueron tratadas con Tripsina (Life Technologies, Inc.) y resembradas.

3.3. 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.

3.4. Congelación y almacenaje

Para conservar durante largo tiempo las líneas celulares, entre 4 y 8 millones de células se resuspendieron en 900 μ L de DMEM/10% FCS y fueron pasadas a un criotubo con 100 μ 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.

3.5. Transfecciones

Todas las transfecciones se han realizado de forma transitoria. Se siembran 2-5 $\cdot 10^4$ células/cm² en placas de distinto tamaño y se incuban durante 16-24 horas hasta alcanzar un 50-75% de confluencia.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se mezclan 0.2 μg de DNA/cm², 2-5 μl de *Lipofectamine*TM y *Plus*TM por μg de DNA en *Opti-MEM*[®] (Life Technologies). La mezcla se añade a las células y se incuba 5-6 horas. Una vez transfectadas, las células se incuban con DMEM 10% FCS durante unas 40-48 horas para permitir la expresión de los productos de interés. Transcurrido este tiempo las células son lisadas para la obtención de extractos celulares.

3.6. Preparación de extractos celulares

- Las células se lavan (dos veces) con PBS frío para eliminar el medio de cultivo, se añade 1 ml de PBS frío sobre la monocapa de células y éstas se levantan de la placa de forma mecánica con la ayuda de un raspador.
- La suspensión de células en PBS se centrifuga (2500 g, 5 min., 4°C) y elimina el sobrenadante
- El pellet de células se resuspende en tampón de lisis y se deja en hielo durante 30 minutos.
- Se centrifuga (12000 rpm, 15 min., 4°C) y se descarta el precipitado.
- El sobrenadante se cuantifica por Bradford (BioRad) y se almacena a -20°C para su uso posterior.

3.7. Preparación de las células para fluorescencia

Cuando queremos hacer fluorescencia las células no se siembran en placas de 100 mm, sino que se siembran sobre cubres. El protocolo a seguir en este caso es el siguiente:

➤ **Preparación de los cubres** (estos pasos se han de realizar en la campana)

- Se esterilizan los cubres sumergiéndolos 10 minutos en etanol 70%.
- Se lavan los cubres con PBS durante 5 minutos. Pasado este tiempo se ponen sobre una gasa estéril para secarlo.
- Se coge una placa de 60 mm y se ponen 5 ml de DMEM.
- Se sumergen 3-4 cubres en la placa de 60 mm con la ayuda de una punta estéril.
- Se siembran 106 células por placa. Al día siguiente las células se transfectan mediante el protocolo de la lipofectamina

➤ **Fijación de los cubres**

- Se sumergen los cubres durante 5 minutos en PBS pH= 7.4 (este pH evita que las células se desenganchen).
- Los cubres ya lavados se ponen 20 minutos en PFA 4% (paraformaldehído).
- Se lavan los cubres con PBS pH= 7.4 durante 5 minutos
- Finalmente los cubres se lavan con agua destilada durante 3 minutos.
- Una vez secos, se coloca una pequeña gota de moviol (medio de montaje) sobre el portaobjetos y se coloca encima el cubre.
- Se deja secar aproximadamente durante 20 minutos. Las muestras ya fijadas se pueden guardar a 4°C durante 15 días.

4. REACTIVOS Y TAMPONES UTILIZADOS

Agarosa

Type I-A; Low EEO (Sigma)

Bromuro de etidio

BrEt 10 mg/ml en H₂O (Sigma)

Coomassie Blue

40 % Metanol (v/v)

10 Ácido acético (v/v)

0.1 % (p/v) Brilliant Blue R (Sigma) en H₂O

Destainer

40 % Metanol (v/v)

10 Ácido acético (v/v) en H₂O

Glutathion reducido (GEB)

50 mM Tris pH 8

20 mM glutathion reducido

IPTG

IPTG 100 mM en H₂O (Sigma)

LB

10 gr/l triptona

5 gr/l levadura

5 gr NaCl

Se ajusta a pH 7 con NaOH

Marcador de peso molecular DNA

1 Kb *DNA ladder* (Biolabs)

Marcador de peso molecular proteínas

Kaleidoscope (BioRad)

PBS 10X

1.4 M NaCl

27 mM KCl

100 mM Na₂HPO₄

18 mM KH₂PO₄

pH 7.3

Placas LB-Agar

LB

Agar 1.5 % (w/v)

Ampicilina (125 mg/ml)

Pounceau

0.5 % (p/v) Pounceau S (Sigma)

1 % ácido acético en H₂O

SOB

2 % (w/v) triptona

0.5 % (w/v) levadura

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

Solución 1 Rhotekina

Solución 2 + 1mM EDTA

Solución 2 Rhotekina

Solución 3 + 0.1 % Tritón X-100

Solución 3 Rhotekina

25 ml PBS
1 mM PMSF
10 mg/ml leupeptina y aprotinina

Stripping buffer

2 % (p/v) SDS
62.5 mM Tris
100 mM β -mercaptoetanol

t10

25 mM Tris pH 7.6
10 mM NaCl
1 mM EGTA

TAE 50X

250 mM Tris pH 8.5
50 mM acetato
100 mM EDTA

Tampón de carga de electroforesis DNA 5X

0.25 % Bromofenol Blue (p/v)
40 % glicerol en agua

Tampón de carga de electroforesis de proteínas (Lammeli) 5X

20 % glicerol (v/v)
10 % SDS (v/v)
500 mM Tris pH 6.8
0.32 % (v/v) de β -mercaptoetanol
20 mg Bromofenol Blue

Tampón de diálisis

50mM Tris pH 7.8
120 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM DTT

Tampón de electroforesis

25 mM Tris pH 8.3
192 mM glicina
0.1 % SDS (p/v)

Tampón de fosforilar (tirosina quinasas)

25 mM Tris-HCl pH 6.8
25 mM MgCl₂
5 mM MnCl₂
0.5 mM EGTA
1mM DTT
0.25 mM ortovanadato sódico (Na₃VaO₄)
0.1 mM ATP

Tampón de fosforilar TEST (serina/treonina quinasas)

0.5 mM EGTA
9 mM MgCl₂
0.55 mM EDTA
1 mM DTT
27.8 mM β-glicerolfosfato pH 7.0
0.1 mM ATP o [γ-³²P]-ATP (1000 cpm/pmol)

Tampón de interacción *in vitro* de proteínas (*Binding buffer*)

3 mM MgCl₂
50 mM Tris
1 mM EDTA y DDT
150 mM NaCl
0.1 % (p/v) Tritón X-100

Tampón de lisis (extractos celulares)

t10

200 mM NaCl

0.1 % (v/v) Nonidet P-40

5 mM MgCl₂

1 mM DTT

0.2 mM Na₃VaO₄

10 mM NaF

10 mg/ml aprotinina

10 mg/ml leupeptina

1 mM PMSF

Tampón de transferencia

20 mM Tris pH 8

150 mM glicina

20 % Metanol (v/v)

Tampón tripsina 5X

0.45 M Tris-HCl pH 8.5

10 mM CaCl₂

20 mM DTT

Tampón GDP (incubación)

25mM Tris pH 7.8

120 mM NaCl

1 mM EDTA

3 mM Mg(AcO)₂**Tampón GDP (lavados)**

25mM Tris pH 7.8

120 mM NaCl

5 mM β-mercaptoetanol

1 mM Mg(AcO)₂

TB

10 mM Pipes
55 mM MnCl₂
15 mM CaCl₂
250 mM KCl
pH 6.7-7 antes de añadir el MgCl₂

TBS

25 mM Tris-HCl pH 7.5
136 mM NaCl
4 mM KCl

TBS-T

TBS + 0.2 % (p/v) Tritón X-100

5. PLÁSMIDOS

En este apartado se indican todos los plásmidos utilizados a lo largo de este trabajo y se describe, brevemente, la estrategia de clonaje de aquellos que se han generado en nuestro laboratorio.

5.1. Vectores de expresión en procariontas

Como vehículo de expresión de los productos a clonar se utilizaron los vectores pGEX-6P (Amersham-Pharmacia). Este tipo de vector permite expresar cualquier producto clonado como proteína de fusión con GST (Glutathion-S-transferasa). Las características principales de estos vectores son:

- Gen de resistencia a ampicilina (Amp^r)
- El gen codificante para la GST está controlado por el promotor Tac (resultado de la fusión del promotor lac y Trp), que permite una alta expresión de forma inducible por IPTG.

- Secuencia con múltiples sitios de corte único para enzimas de restricción (MCS) situado en el extremo C-terminal de la GST.
- Presencia de una secuencia específica entre la GST y nuestra proteína, para la proteasa PreScission (PS) (Amersham-Pharmacia) y así poder separar la proteína de la GST.

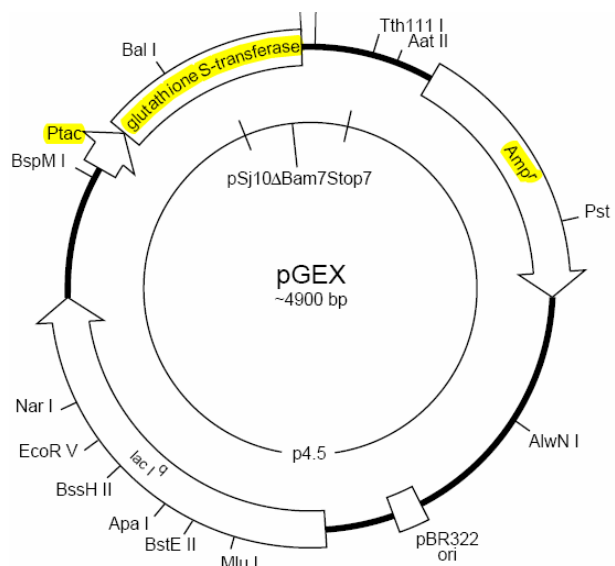


Figura 74. Vector de expresión procariota

Nombre construcción	Origen/ obtención del inserto	Insertado en
A. β-catenina (aa 1-781)	cDNA cedido por Dr.R.Kemler, digerido BamHI	pGEX-6P-3 abierto con BamHI
B. β-catenina Y86E	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
C. β-catenina Y654E	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
D. ΔN β-catenina (aa 120-781)	Digestión de A con SacI + NotI y aislamiento de la banda de ≈660 bp	pGEX-6P-3 arm (120-683) cortado con SacI + NotI
E. β-catenina ΔN (aa 120-end) Y654E	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
F. ΔC β-catenina (aa 1-683)	Digestión de A con BamHI + SacI y aislamiento de la banda de ≈1,75 kbp	pGEX-6P-3 arm (120-683) cortado con BamHI + SacI

Nombre construcción	Origen/ obtención del inserto	Insertado en
G. β -catenina (aa 120-750)	Por PCR a partir de A . Los cebadores contienen dianas BamHI + XhoI	pGEX-6P-3 abierto BamHI y XhoI
H. β -catenina armadillo (aa 120-683)	Por PCR a partir de A . Los cebadores contienen dianas BamHI + SmaI	pGEX-6P-1 abierto BamHI y SmaI
I. β -catenina armadillo (aa 120-683)Y654E	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
J. β -catenina C-end (aa 696-781)	Digestión de A con BglII + SmaI y aislamiento de la banda de ≈ 270 bp	Relleno con <i>Klenow</i> -polimerasa e insertado en pGEX-6P-2 abierto con SmaI
K. β catenina C-end (aa 696-750)	Por PCR a partir de A . Los cebadores contienen dianas BamHI + XhoI	pGEX-6P-3 abierto BamHI y XhoI
L. β catenina N-tail (aa 1-106)	Digestión de A con SphI + NotI	Relleno con <i>Klenow</i> -polimerasa y religado
M. β -catenina N-tail (1-106)Y86E	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
N.- p120-catenina-1 (aa 1-911)	Digestión de pcDNA-p120-catenina (1-911)con EcoRI + NotI	pGEX-6P-3 abierto EcoRI y NotI
Ñ. p120-catenina (aa 8-911)	Digestión de pcDNA-p120-catenina (1-911) con Sall + NotI	pGEX-6P-2 abierto Sall y NotI
O. p120-catenina (8-911) Y96F	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
P. p120-catenina (8-911) Y112E	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
Q. p120-catenina (8-911) Y112F	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
R. p120-catenina (8-911) Y217E	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
S. p120-catenina (8-911) Y217F	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
T. p120-catenina (aa 234-911)	Digestión de pcDNA-p120-catenina (1-911) con SmaI + NotI	pGEX-6P-1 abierto SmaI y NotI

Nombre construcción	Origen/ obtención del inserto	Insertado en
U. p120-catenina (8-96)	Digestión de Ñ con NotI, relleno con la <i>Klenow</i> y digestión con BsrG1	Digestión de Ñ con NotI, relleno con la <i>Klenow</i> y digestión con BsrG1
V. p120-catenina (1-234)	Por PCR a partir de pcDNA-p120-catenina (1-911). Los cebadores contienen las dianas EcoRI y BamHI	pGEX-6P-2 abierto EcoRI y BamHI
W. p120-catenina (8-234) Y96F	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
X. p120-catenina (8-234) Y112E	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
Y. p120-catenina (8-234) Y112F	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
Z. p120-catenina (8-234) Y217E	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
AA. p120-catenina (8-234) Y96F, Y112F	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
AB. p120-catenina (8-234) Y96F, Y228F	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
AC. p120-catenina (8-234) Y96F, Y112F, Y228F	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
AD. p120-catenina (8-234) Y96F, Y112F, Y217F	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
AE. p120-catenina (8-234) Y96F, Y112F, Y217F, Y228F	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
AF. cyto-E-cadherina (aa 732-883)	Por PCR a partir de cDNA murino total. Los cebadores contienen dianas BamHI y EcoRI	pGEX-6P-3 abierto BamHI y EcoRI
AG. α -catenina (aa 1-472) "Dominio N-ter"	Por RT-PCR a partir de RNA total. Los cebadores contienen dianas EcoRI y SalI	pGEX-6P-3 abierto EcoRI y Sal I
AH. α -catenina (H/R) (aa 1-906)	α -cat(<i>mouse</i>)-pBKS cedida por Dr.R.Kemler, digerida NotI + XhoI y aislamiento de la banda	AG digerido con NotI + XhoI, (banda aislada de 5400 pb).
AI. pGEX-4T3-RhoA	Cedida por X.R. Bustelo. Clonada con BamHI y EcoRI	

Nombre construcción	Origen/ obtención del inserto	Insertado en
AJ. RhoA	Digestión de AI con EcoRI y BamHI	pGEX-6P-3 abierto EcoRI y BamHI
AK. pGEX-4T3-Cdc42	Cedida por X. Bustelo. Clonada con BamHI y EcoRI	
AL. pGEX-4T3-Rac1	Cedida por X. Bustelo. Clonada con BamHI y EcoRI	
AM. Rhotekina	Cedida	

Tabla X. Detalle de las construcciones realizadas

5.2. Vectores de expresión en eucariotas

➤ pcDNA 3.1 His/pcDNA 3.1 His-Myc (Invitrogen)

Estos vectores se han utilizado para producir diferentes proteínas (tanto nativas como mutantes puntuales) en células eucariotas. Sus principales características son:

- Alto nivel de expresión (promotor CMV).
- Permiten generar proteínas de fusión con diferentes *tags* (localizados en el extremo N-terminal de nuestra proteína): una cola de histidina, el epítipo *XpressTM* o el epítipo Myc.
- La cola de histidinas es útil para purificar luego la proteína (mediante columnas de níquel, ión con afinidad por la histidina). Además, tanto el epítipo *XpressTM* como el Myc son fácilmente detectables por anticuerpos.

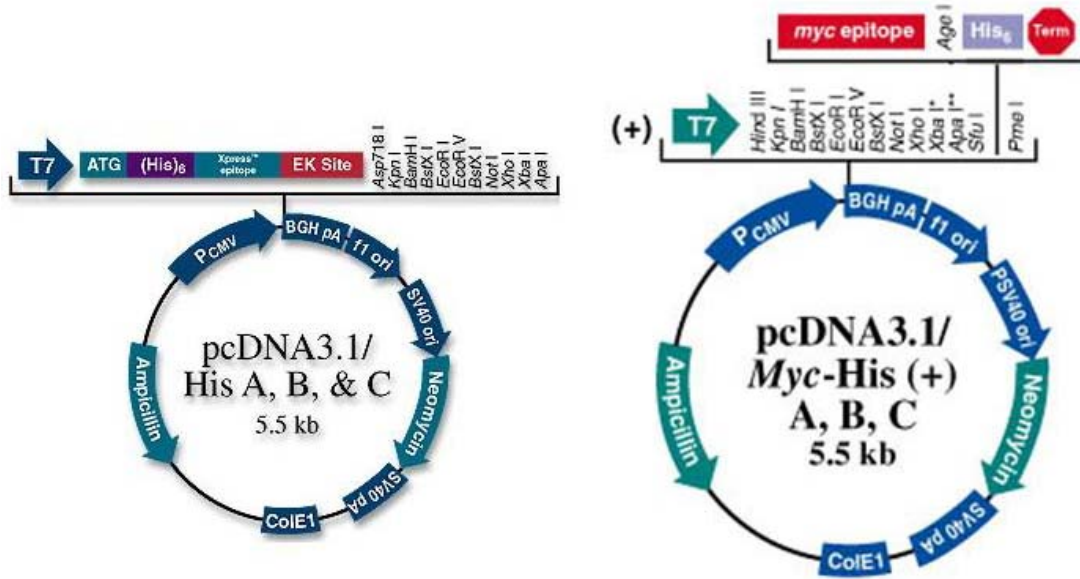


Figura 75. Vectores de expresión en eucariotas

Nombre construcción	Obtención del inserto	Clonaje
p120-catenina-1 (aa 1-911)	CAS-1-pcDNA cedido por Dr.A.Reynolds, digerido EcoRI + KpnI	relleno con <i>Klenow</i> -polimerasa e insertado en pcDNA3.1/His abierto EcoRV
p120 –catenina-1 (1-911) Y96E	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
p120-catenina-1 (1-911) Y96F	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
p120 –catenina-1 (1-911) Y217E	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
120-catenina-1 (1-911) Y217F	Por PCR con oligonucleótidos que contenían la mutación	
β -catenina (aa 1-781)	Digestión de pGEX- β -catenina con <i>Bam</i> HI	pcDNA3.1/His(C) abierto con <i>Bam</i> HI

Tabla XI. Relación de construcciones en pcDNA

➤ **phrGFP**

Estos vectores permiten obtener una proteína de fusión con GFP y así visualizar la localización de nuestra proteína mediante la utilización de un microscopio confocal.

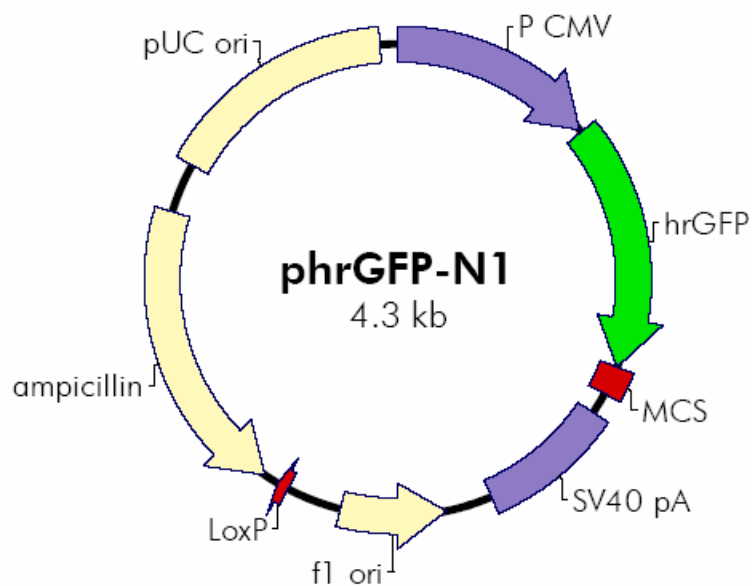


Figura 76. Vector de fluorescencia

Nombre construcción	Obtención del inserto	Clonaje
p120-catenina (8-911)	Por PCR a partir de pGEX-p120-catenina-1 (8-911). Los cebadores llevaban las dianas EcoRI y SacII	phrGFP digerido con EcoRI y SacII
p120-catenina (234-911)	Por PCR a partir de pGEX-p120-catenina (234-911). Los cebadores llevaban las dianas EcoRI y SacII	phrGFP digerido con EcoRI y SacII
p120-catenina (8-911) Y112E	Por PCR a partir de pGEX-p120-catenina-1 (8-911) 112E. Los cebadores llevaban las dianas EcoRI y SacII	phrGFP digerido con EcoRI y SacII
p120-catenina (8-911) Y112F	Por PCR a partir de pGEX-p120-catenina (8-911) 112F. Los cebadores llevaban las dianas EcoRI y SacII	phrGFP digerido con EcoRI y SacII

Nombre construcción	Obtención del inserto	Clonaje
p120-catenina (8-911) Y217E	Por PCR a partir de pGEX-p120-catenina (8-911) 217E. Los cebadores llevaban las dianas EcoRI y SacII	phrGFP digerido con EcoRI y SacII

Tabla XII. Construcciones en GFP

➤ **Otros**

Nombre construcción	Obtención
pEXV-RhoA <i>wt</i>	Cedida
pEXV-RhoA V14	Cedida
pEF-BOS v-src	Cedida
pEF-BOS Fyn	Cedida
pEBG-2T β -cat Y654E	Vector híbrido, cedido

Tabla XIII. Construcciones varias

Un importante grupo de proteínas con actividad tirosina-quinasa no son receptores integrados en la membrana celular, sino que están localizadas en el citoplasma, generalmente asociadas al lado interno de la membrana. La activación de estas proteínas depende precisamente de su unión a la membrana, que tiene lugar mediante un lípido, el ácido mirístico (un ácido graso de 14 carbonos) que se une al segundo aminoácido de la cadena tras la eliminación de la metionina inicial. En algunos casos, la falta de regulación de su actividad causa la transformación oncogénica, siendo el oncogén Src el prototipo de este grupo de oncogenes.

Tras su descubrimiento como el primer oncogén, Joan S. Brugge y Ray L. Erickson identificaron por primera vez la proteína codificada por el gen **src** en 1977, y un año más tarde el grupo del propio Erickson describió su actividad quinasa. En 1979, fue el laboratorio de Tony Hunter el que descubrió que la proteína Src era capaz de fosforilar residuos de tirosina de otras proteínas, convirtiéndose en la primera tirosina-quinasa conocida. No pudieron entonces imaginar la importancia que la fosforilación de aminoácidos, que representan menos del 0,1 % del total en la célula, tiene para la fisiología y crecimiento celular, y en especial en los procesos de transformación cancerosa. Como relata el propio Hunter, este descubrimiento fue en gran parte accidental: la observación de que el resultado de la acción de Src era la fosforilación de residuos de tirosina se debió al uso de una solución tampón envejecida, cuyo pH había disminuido de 1,9 a 1,7. Ello hizo que las fosfotirosinas se separaran de las fosfoserinas y fosfotreoninas durante el análisis de fosfoaminoácidos de aquellas proteínas que eran fosforiladas por Src.

Hoy se conocen otros oncogenes cuyos productos son tirosina quinasas homólogas a Src, como v-Yes y v-Fgr, y otros genes también muy relacionados y con igual actividad pero sin capacidad oncogénica conocida (**lck**, **fyn**, **lyn**, **hck**, **blk**, **yrk**) que intervienen en la transmisión de distintas señales desde la membrana al interior celular.

Todas estas quinasas tienen un peso molecular de unos 60 kDa y una estructura muy similar (ver **Figura 77**). Presentan un dominio quinasa SH1 localizado en el extremo C-terminal. El centro de la proteína contiene dos dominios SH que median las interacciones proteína-proteína. Un dominio SH2 que se une a residuos fosfotirosina y un dominio SH3 que reconoce secuencias ricas en prolina. En el extremo N-terminal existe una región SH4 que contiene el motivo “Met-Gly-Cys”, necesario para el anclaje en la membrana de la quinasa. Además cada familia de quinasas Src contiene una región única entre los dominios SH3 y SH4.

La actividad de la proteína normal producto del proto-oncogén Src está regulada por el estado de fosforilación de dos residuos de tirosina. Cuando la tirosina 527, cercana al extremo carboxiterminal, está fosforilada como resultado de la acción de otra quinasa llamada Csk, la proteína Src es inactiva. Ello se debe a que el dominio SH2 de Src se une a dicha tirosina 527, provocando una conformación que es incompatible con la actividad quinasa.

La activación de Src tiene lugar cuando los receptores de factores de crecimiento, como por ejemplo el de PDGF, son auto- o transfosforilados. Entonces, el dominio SH2 de Src cambia su unión a la tirosina 527 por su unión a residuos específicos de tirosina fosforilados en dichos receptores, lo que conlleva un cambio conformacional y la desrepresión de su actividad tirosín-quinasa. Una vez desreprimida, Src se autofosforila en el residuo tirosina 416, lo que la capacita para fosforilar otros sustratos. La proteína oncogénica v-Src del virus del sarcoma de Rous está activa permanentemente debido a una delección de 19 aminoácidos en su extremo carboxiterminal que incluye a la tirosina 527, lo que hace que no requiera la presencia en su entorno de residuos de fosfotirosina en receptores de factores de crecimiento.

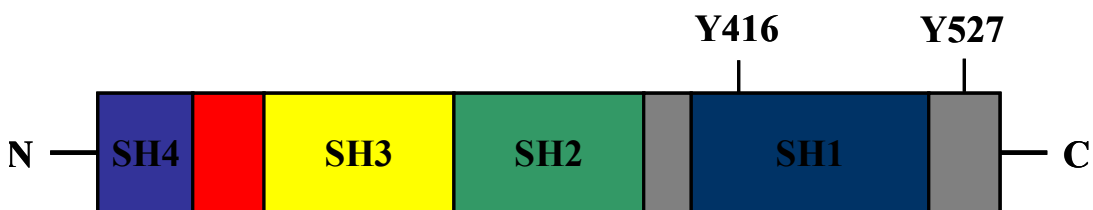


Figura 77. Esquema de los dominios de las tirosina quinasas Src.

1. A.P. Kowalczyk, M. Hatzfeld, E.A. Bornslaeger, D.S. Kopp, J.E. Borgwardt, C.M. Corcoran, A. Settler and K.J. Green: **The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. Implications for cutaneous disease.** *J Biol Chem* 1999, **274**:18145-8.
2. C.L. Adams, W.J. Nelson and S.J. Smith: **Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion.** *J Cell Biol* 1996, **135**:1899-911.
3. B. Gumbiner, B. Stevenson and A. Grimaldi: **The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex.** *J Cell Biol* 1988, **107**:1575-87.
4. B.M. Gumbiner: **Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis.** *Cell* 1996, **84**:345-57.
5. M. Conacci-Sorrell, J. Zhurinsky and A. Ben-Ze'ev: **The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer.** *J Clin Invest* 2002, **109**:987-91.
6. L. Shapiro, A.M. Fannon, P.D. Kwong, A. Thompson, M.S. Lehmann, G. Grubel, J.F. Legrand, J. Als-Nielsen, D.R. Colman and W.A. Hendrickson: **Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins.** *Nature* 1995, **374**:327-37.
7. P. Cowin and B. Burke: **Cytoskeleton-membrane interactions.** *Curr Opin Cell Biol* 1996, **8**:56-65.
8. J. Behrens, L. Vakaet, R. Friis, E. Winterhager, F. Van Roy, M.M. Mareel and W. Birchmeier: **Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene.** *J Cell Biol* 1993, **120**:757-66.
9. B.M. Gumbiner: **Regulation of cadherin adhesive activity.** *J Cell Biol* 2000, **148**:399-404.

10. H. Haegel, L. Larue, M. Ohsugi, L. Fedorov, K. Herrenknecht and R. Kemler: **Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation.** *Development* 1995, **121**:3529-37.
11. A.B. Reynolds and A. Roczniak-Ferguson: **Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer.** *Oncogene* 2004, **23**:7947-56.
12. A.B. Reynolds, J.M. Daniel, Y.Y. Mo, J. Wu and Z. Zhang: **The novel catenin p120cas binds classical cadherins and induces an unusual morphological phenotype in NIH3T3 fibroblasts.** *Exp Cell Res* 1996, **225**:328-37.
13. P.Z. Anastasiadis and A.B. Reynolds: **The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer.** *J Cell Sci* 2000, **113 (Pt 8)**:1319-34.
14. C.R. Magie, D. Pinto-Santini and S.M. Parkhurst: **Rho1 interacts with p120ctn and alpha-catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in Drosophila.** *Development* 2002, **129**:3771-82.
15. F. Hyafil, D. Morello, C. Babinet and F. Jacob: **A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos.** *Cell* 1980, **21**:927-34.
16. D. Vestweber, A. Gossler, K. Boller and R. Kemler: **Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos.** *Dev Biol* 1987, **124**:451-6.
17. O. Huber, C. Bierkamp and R. Kemler: **Cadherins and catenins in development.** *Curr Opin Cell Biol* 1996, **8**:685-91.
18. T. Uemura, H. Oda, R. Kraut, S. Hayashi, Y. Kotaoka and M. Takeichi: **Zygotic Drosophila E-cadherin expression is required for processes of dynamic epithelial cell rearrangement in the Drosophila embryo.** *Genes Dev* 1996, **10**:659-71.
19. J.P. Thiery: **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:442-54.
20. W. Birchmeier and J. Behrens: **Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness.** *Biochim Biophys Acta* 1994, **1198**:11-26.
21. M. Takeichi: **Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis.** *Curr Opin Cell Biol* 1993, **5**:806-11.

22. L. Larue, M. Ohsugi, J. Hirchenhain and R. Kemler: **E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:8263-7.
23. W.M. Briehner, A.S. Yap and B.M. Gumbiner: **Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin.** *J Cell Biol* 1996, **135**:487-96.
24. S. Troyanovsky: **Cadherin dimers in cell-cell adhesion.** *Eur J Cell Biol* 2005, **84**:225-33.
25. A.H. Huber, D.B. Stewart, D.V. Laurents, W.J. Nelson and W.I. Weis: **The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover.** *J Biol Chem* 2001, **276**:12301-9.
26. H. Lickert, A. Bauer, R. Kemler and J. Stappert: **Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion.** *J Biol Chem* 2000, **275**:5090-5.
27. A.H. Huber and W.I. Weis: **The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin.** *Cell* 2001, **105**:391-402.
28. J.M. Trent, R. Wiltshire, L.K. Su, N.C. Nicolaides, B. Vogelstein and K.W. Kinzler: **The gene for the APC-binding protein beta-catenin (CTNNB1) maps to chromosome 3p22, a region frequently altered in human malignancies.** *Cytogenet Cell Genet* 1995, **71**:343-4.
29. H. Aberle, H. Schwartz and R. Kemler: **Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function.** *J Cell Biochem* 1996, **61**:514-23.
30. P.D. McCrea, C.W. Turck and B. Gumbiner: **A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin.** *Science* 1991, **254**:1359-61.
31. B. Riggleman, E. Wieschaus and P. Schedl: **Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a Drosophila segment polarity gene.** *Genes Dev* 1989, **3**:96-113.
32. D.T. Fox, C.C. Homem, S.H. Myster, F. Wang, E.E. Bain and M. Peifer: **Rho1 regulates Drosophila adherens junctions independently of p120ctn.** *Development* 2005, **132**:4819-31.

33. H. Aberle, S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler and H. Hoschuetzky: **Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins.** *J Cell Sci* 1994, **107 (Pt 12)**:3655-63.
34. C. Yost, M. Torres, J.R. Miller, E. Huang, D. Kimelman and R.T. Moon: **The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3.** *Genes Dev* 1996, **10**:1443-54.
35. A. Hecht, C.M. Litterst, O. Huber and R. Kemler: **Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro.** *J Biol Chem* 1999, **274**:18017-25.
36. A. Bauer, O. Huber and R. Kemler: **Pontin52, an interaction partner of beta-catenin, binds to the TATA box binding protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:14787-92.
37. A. Gallet, C. Angelats, A. Erkner, B. Charroux, L. Fasano and S. Kerridge: **The C-terminal domain of armadillo binds to hypophosphorylated teashirt to modulate wingless signalling in Drosophila.** *Embo J* 1999, **18**:2208-17.
38. A.M. Zorn, G.D. Barish, B.O. Williams, P. Lavender, M.W. Klymkowsky and H.E. Varmus: **Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin.** *Mol Cell* 1999, **4**:487-98.
39. M. Nishita, M.K. Hashimoto, S. Ogata, M.N. Laurent, N. Ueno, H. Shibuya and K.W. Cho: **Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer.** *Nature* 2000, **403**:781-5.
40. K.I. Takemaru and R.T. Moon: **The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression.** *J Cell Biol* 2000, **149**:249-54.
41. M. Miyagishi, R. Fujii, M. Hatta, E. Yoshida, N. Araya, A. Nagafuchi, S. Ishihara, T. Nakajima and A. Fukamizu: **Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating beta-catenin with CBP/p300.** *J Biol Chem* 2000, **275**:35170-5.
42. J. Behrens, J.P. von Kries, M. Kuhl, L. Bruhn, D. Wedlich, R. Grosschedl and W. Birchmeier: **Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1.** *Nature* 1996, **382**:638-42.

43. B. Rubinfeld, B. Souza, I. Albert, S. Munemitsu and P. Polakis: **The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin.** *J Biol Chem* 1995, **270**:5549-55.
44. S.C. Hsu, J. Galceran and R. Grosschedl: **Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**:4807-18.
45. A.H. Huber, W.J. Nelson and W.I. Weis: **Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin.** *Cell* 1997, **90**:871-82.
46. C.J. Gottardi and B.M. Gumbiner: **Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners.** *Curr Biol* 2001, **11**:R792-4.
47. J.P. von Kries, G. Winbeck, C. Asbrand, T. Schwarz-Romond, N. Sochnikova, A. Dell'Oro, J. Behrens and W. Birchmeier: **Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC.** *Nat Struct Biol* 2000, **7**:800-7.
48. T.A. Graham, C. Weaver, F. Mao, D. Kimelman and W. Xu: **Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex.** *Cell* 2000, **103**:885-96.
49. J. Stappert and R. Kemler: **A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated.** *Cell Adhes Commun* 1994, **2**:319-27.
50. S. Miravet, J. Piedra, F. Miro, E. Itarte, A. Garcia de Herreros and M. Dunach: **The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin.** *J Biol Chem* 2002, **277**:1884-91.
51. J. Hulsken, W. Birchmeier and J. Behrens: **E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton.** *J Cell Biol* 1994, **127**:2061-9.
52. O. Huber, M. Krohn and R. Kemler: **A specific domain in alpha-catenin mediates binding to beta-catenin or plakoglobin.** *J Cell Sci* 1997, **110** (Pt 15):1759-65.
53. L. Hinck, I.S. Nathke, J. Papkoff and W.J. Nelson: **Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly.** *J Cell Biol* 1994, **125**:1327-40.
54. M. Bienz and H. Clevers: **Linking colorectal cancer to Wnt signaling.** *Cell* 2000, **103**:311-20.

55. S. Chen, D.C. Guttridge, Z. You, Z. Zhang, A. Fribley, M.W. Mayo, J. Kitajewski and C.Y. Wang: **Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription.** *J Cell Biol* 2001, **152**:87-96.
56. M. van de Wetering, E. Sancho, C. Verweij, W. de Lau, I. Oving, A. Hurlstone, K. van der Horn, E. Batlle, D. Coudreuse, A.P. Haramis, M. Tjon-Pon-Fong, P. Moerer, M. van den Born, G. Soete, S. Pals, M. Eilers, R. Medema and H. Clevers: **The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells.** *Cell* 2002, **111**:241-50.
57. M.J. Hart, R. de los Santos, I.N. Albert, B. Rubinfeld and P. Polakis: **Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta.** *Curr Biol* 1998, **8**:573-81.
58. J. Behrens, B.A. Jerchow, M. Wurtele, J. Grimm, C. Asbrand, R. Wirtz, M. Kuhl, D. Wedlich and W. Birchmeier: **Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta.** *Science* 1998, **280**:596-9.
59. C. Liu, Y. Li, M. Semenov, C. Han, G.H. Baeg, Y. Tan, Z. Zhang, X. Lin and X. He: **Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism.** *Cell* 2002, **108**:837-47.
60. B.P. Zhou and M.C. Hung: **Wnt, hedgehog and snail: sister pathways that control by GSK-3beta and beta-Trcp in the regulation of metastasis.** *Cell Cycle* 2005, **4**:772-6.
61. S.I. Matsuzawa and J.C. Reed: **Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses.** *Mol Cell* 2001, **7**:915-26.
62. J. Liu, J. Stevens, C.A. Rote, H.J. Yost, Y. Hu, K.L. Neufeld, R.L. White and N. Matsunami: **Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein.** *Mol Cell* 2001, **7**:927-36.
63. F. Fagotto, U. Gluck and B.M. Gumbiner: **Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin.** *Curr Biol* 1998, **8**:181-90.
64. T. Kramps, O. Peter, E. Brunner, D. Nellen, B. Froesch, S. Chatterjee, M. Murone, S. Zullig and K. Basler: **Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex.** *Cell* 2002, **109**:47-60.

65. F.M. Townsley, A. Cliffe and M. Bienz: **Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:626-33.
66. M. Molenaar, M. van de Wetering, M. Oosterwegel, J. Peterson-Maduro, S. Godsave, V. Korinek, J. Roose, O. Destree and H. Clevers: **XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos.** *Cell* 1996, **86**:391-9.
67. J.R. Miller, A.M. Hocking, J.D. Brown and R.T. Moon: **Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca2+ pathways.** *Oncogene* 1999, **18**:7860-72.
68. M.A. Oosterwegel, M.L. van de Wetering, F.C. Holstege, H.M. Prosser, M.J. Owen and H.C. Clevers: **TCF-1, a T cell-specific transcription factor of the HMG box family, interacts with sequence motifs in the TCR beta and TCR delta enhancers.** *Int Immunol* 1991, **3**:1189-92.
69. T.C. He, A.B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L.T. da Costa, P.J. Morin, B. Vogelstein and K.W. Kinzler: **Identification of c-MYC as a target of the APC pathway.** *Science* 1998, **281**:1509-12.
70. M. Shtutman, J. Zhurinsky, I. Simcha, C. Albanese, M. D'Amico, R. Pestell and A. Ben-Ze'ev: **The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:5522-7.
71. O. Tetsu and F. McCormick: **Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells.** *Nature* 1999, **398**:422-6.
72. J. Roose, G. Huls, M. van Beest, P. Moerer, K. van der Horn, R. Goldschmeding, T. Logtenberg and H. Clevers: **Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1.** *Science* 1999, **285**:1923-6.
73. T.C. He, T.A. Chan, B. Vogelstein and K.W. Kinzler: **PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** *Cell* 1999, **99**:335-45.
74. B. Mann, M. Gelos, A. Siedow, M.L. Hanski, A. Gratchev, M. Ilyas, W.F. Bodmer, M.P. Moyer, E.O. Riecken, H.J. Buhr and C. Hanski: **Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:1603-8.
75. T. Brabletz, A. Jung, S. Dag, F. Hlubek and T. Kirchner: **beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer.** *Am J Pathol* 1999, **155**:1033-8.

76. H.C. Crawford, B.M. Fingleton, L.A. Rudolph-Owen, K.J. Goss, B. Rubinfeld, P. Polakis and L.M. Matrisian: **The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors.** *Oncogene* 1999, **18**:2883-91.
77. D. IYan, M. Wiesmann, M. Rohan, V. Chan, A.B. Jefferson, L. Guo, D. Sakamoto, R.H. Caothien, J.H. Fuller, C. Reinhard, P.D. Garcia, F.M. Randazzo, J. Escobedo, W.J. Fantl and L.T. Williams: **Elevated expression of axin2 and hnk2 mRNA provides evidence that Wnt/beta -catenin signaling is activated in human colon tumors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:14973-8.
78. B. Lustig, B. Jerchow, M. Sachs, S. Weiler, T. Pietsch, U. Karsten, M. van de Wetering, H. Clevers, P.M. Schlag, W. Birchmeier and J. Behrens: **Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:1184-93.
79. E.H. Jho, T. Zhang, C. Domon, C.K. Joo, J.N. Freund and F. Costantini: **Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:1172-83.
80. M.E. Conacci-Sorrell, T. Ben-Yedidia, M. Shtutman, E. Feinstein, P. Einat and A. Ben-Ze'ev: **Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis.** *Genes Dev* 2002, **16**:2058-72.
81. F.T. Kolligs, M.T. Nieman, I. Winer, G. Hu, D. Van Mater, Y. Feng, I.M. Smith, R. Wu, Y. Zhai, K.R. Cho and E.R. Fearon: **ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation.** *Cancer Cell* 2002, **1**:145-55.
82. T.J. Koh: **Extragastric effects of gastrin gene knock-out mice.** *Pharmacol Toxicol* 2002, **91**:368-74.
83. V.J. Wielenga, R. Smits, V. Korinek, L. Smit, M. Kielman, R. Fodde, H. Clevers and S.T. Pals: **Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway.** *Am J Pathol* 1999, **154**:515-23.
84. E. Batlle, J.T. Henderson, H. Beghtel, M.M. van den Born, E. Sancho, G. Huls, J. Meeldijk, J. Robertson, M. van de Wetering, T. Pawson and H. Clevers: **Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB.** *Cell* 2002, **111**:251-63.

85. J.S. Kim, H. Crooks, T. Dracheva, T.G. Nishanian, B. Singh, J. Jen and T. Waldman: **Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells.** *Cancer Res* 2002, **62**:2744-8.
86. N. Miwa, M. Furuse, S. Tsukita, N. Niiikawa, Y. Nakamura and Y. Furukawa: **Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers.** *Oncol Res* 2000, **12**:469-76.
87. X. Zhang, J.P. Gaspard and D.C. Chung: **Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia.** *Cancer Res* 2001, **61**:6050-4.
88. B. Rubinfeld, P. Robbins, M. El-Gamil, I. Albert, E. Porfiri and P. Polakis: **Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines.** *Science* 1997, **275**:1790-2.
89. R. Nusse and H.E. Varmus: **Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome.** *Cell* 1982, **31**:99-109.
90. K.W. Kinzler, M.C. Nilbert, L.K. Su, B. Vogelstein, T.M. Bryan, D.B. Levy, K.J. Smith, A.C. Preisinger, P. Hedge, D. McKechnie and et al.: **Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21.** *Science* 1991, **253**:661-5.
91. K.W. Kinzler and B. Vogelstein: **Lessons from hereditary colorectal cancer.** *Cell* 1996, **87**:159-70.
92. Y. Miyoshi, K. Iwao, Y. Nagasawa, T. Aihara, Y. Sasaki, S. Imaoka, M. Murata, T. Shimano and Y. Nakamura: **Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3.** *Cancer Res* 1998, **58**:2524-7.
93. J.S. Kim, H. Crooks, A. Foxworth and T. Waldman: **Proof-of-principle: oncogenic beta-catenin is a valid molecular target for the development of pharmacological inhibitors.** *Mol Cancer Ther* 2002, **1**:1355-9.
94. M. Lepourcelet, Y.N. Chen, D.S. France, H. Wang, P. Crews, F. Petersen, C. Bruseo, A.W. Wood and R.A. Shivdasani: **Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex.** *Cancer Cell* 2004, **5**:91-102.
95. B.A. Parr and A.P. McMahon: **Wnt genes and vertebrate development.** *Curr Opin Genet Dev* 1994, **4**:523-8.

96. R.T. Moon, J.D. Brown and M. Torres: **WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development.** *Trends Genet* 1997, **13**:157-62.
97. M. Bienz: **beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling.** *Curr Biol* 2005, **15**:R64-7.
98. K. Tamai, M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J.P. Saint-Jeannet and X. He: **LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction.** *Nature* 2000, **407**:530-5.
99. G.M. Thomas, S. Frame, M. Goedert, I. Nathke, P. Polakis and P. Cohen: **A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin.** *FEBS Lett* 1999, **458**:247-51.
100. J.M. Seeling, J.R. Miller, R. Gil, R.T. Moon, R. White and D.M. Virshup: **Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A.** *Science* 1999, **283**:2089-91.
101. D.H. Song, D.J. Sussman and D.C. Seldin: **Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells.** *J Biol Chem* 2000, **275**:23790-7.
102. J. Gloy, H. Hikasa and S.Y. Sokol: **Frodo interacts with Dishevelled to transduce Wnt signals.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**:351-7.
103. R.A. Cavallo, R.T. Cox, M.M. Moline, J. Roose, G.A. Polevoy, H. Clevers, M. Peifer and A. Bejsovec: **Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity.** *Nature* 1998, **395**:604-8.
104. A. Bauer, S. Chauvet, O. Huber, F. Usseglio, U. Rothbacher, D. Aragnol, R. Kemler and J. Pradel: **Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity.** *Embo J* 2000, **19**:6121-30.
105. A.B. Reynolds, D.J. Roesel, S.B. Kanner and J.T. Parsons: **Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene.** *Mol Cell Biol* 1989, **9**:629-38.
106. J.R. Downing and A.B. Reynolds: **PDGF, CSF-1, and EGF induce tyrosine phosphorylation of p120, a pp60src transformation-associated substrate.** *Oncogene* 1991, **6**:607-13.
107. S. Shibamoto, M. Hayakawa, K. Takeuchi, T. Hori, K. Miyazawa, N. Kitamura, K.R. Johnson, M.J. Wheelock, N. Matsuyoshi, M. Takeichi and et al.: **Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes.** *J Cell Biol* 1995, **128**:949-57.

108. M.A. Thoreson, P.Z. Anastasiadis, J.M. Daniel, R.C. Ireton, M.J. Wheelock, K.R. Johnson, D.K. Hummingbird and A.B. Reynolds: **Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion.** *J Cell Biol* 2000, **148**:189-202.
109. A.S. Yap, C.M. Niessen and B.M. Gumbiner: **The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn.** *J Cell Biol* 1998, **141**:779-89.
110. S. Aono, S. Nakagawa, A.B. Reynolds and M. Takeichi: **p120(ctn) acts as an inhibitory regulator of cadherin function in colon carcinoma cells.** *J Cell Biol* 1999, **145**:551-62.
111. T. Ohkubo and M. Ozawa: **p120(ctn) binds to the membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity.** *J Biol Chem* 1999, **274**:21409-15.
112. J. van Hengel, P. Vanhoenacker, K. Staes and F. van Roy: **Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:7980-5.
113. J.M. Daniel and A.B. Reynolds: **The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:3614-23.
114. S.W. Kim, X. Fang, H. Ji, A.F. Paulson, J.M. Daniel, M. Ciesiolka, F. van Roy and P.D. McCrea: **Isolation and characterization of XKaiso, a transcriptional repressor that associates with the catenin Xp120(ctn) in *Xenopus laevis*.** *J Biol Chem* 2002, **277**:8202-8.
115. S.W. Kim, J.I. Park, C.M. Spring, A.K. Sater, H. Ji, A.A. Otchere, J.M. Daniel and P.D. McCrea: **Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:1212-20.
116. S. Hirano, N. Kimoto, Y. Shimoyama, S. Hirohashi and M. Takeichi: **Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization.** *Cell* 1992, **70**:293-301.
117. B. Janssens, S. Goossens, K. Staes, B. Gilbert, J. van Hengel, C. Colpaert, E. Bruyneel, M. Mareel and F. van Roy: **alphaT-catenin: a novel tissue-specific beta-catenin-binding protein mediating strong cell-cell adhesion.** *J Cell Sci* 2001, **114**:3177-88.

118. E.R. Koslov, P. Maupin, D. Pradhan, J.S. Morrow and D.L. Rimm: **Alpha-catenin can form asymmetric homodimeric complexes and/or heterodimeric complexes with beta-catenin.** *J Biol Chem* 1997, **272**:27301-6.
119. S. Pokutta and W.I. Weis: **Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin.** *Mol Cell* 2000, **5**:533-43.
120. H. Aberle, H. Schwartz, H. Hoschuetzky and R. Kemler: **Single amino acid substitutions in proteins of the armadillo gene family abolish their binding to alpha-catenin.** *J Biol Chem* 1996, **271**:1520-6.
121. A. Nagafuchi: **Molecular architecture of adherens junctions.** *Curr Opin Cell Biol* 2001, **13**:600-3.
122. L.C. Bullions, D.A. Notterman, L.S. Chung and A.J. Levine: **Expression of wild-type alpha-catenin protein in cells with a mutant alpha-catenin gene restores both growth regulation and tumor suppressor activities.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**:4501-8.
123. M. Ozawa and R. Kemler: **Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of alpha-catenin from the E-cadherin.catenin complex.** *J Biol Chem* 1998, **273**:6166-70.
124. M. Fukata, M. Nakagawa, N. Itoh, A. Kawajiri, M. Yamaga, S. Kuroda and K. Kaibuchi: **Involvement of IQGAP1, an effector of Rac1 and Cdc42 GTPases, in cell-cell dissociation during cell scattering.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**:2165-83.
125. A. Ben-Ze'ev: **The dual role of cytoskeletal anchor proteins in cell adhesion and signal transduction.** *Ann N Y Acad Sci* 1999, **886**:37-47.
126. A.L. Giannini, M. Vivanco and R.M. Kypta: **alpha-catenin inhibits beta-catenin signaling by preventing formation of a beta-catenin*T-cell factor*DNA complex.** *J Biol Chem* 2000, **275**:21883-8.
127. V. Vasioukhin, C. Bauer, L. Degenstein, B. Wise and E. Fuchs: **Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of alpha-catenin in skin.** *Cell* 2001, **104**:605-17.
128. R.A. Morton, C.M. Ewing, A. Nagafuchi, S. Tsukita and W.B. Isaacs: **Reduction of E-cadherin levels and deletion of the alpha-catenin gene in human prostate cancer cells.** *Cancer Res* 1993, **53**:3585-90.

129. B.V. Kallakury, C.E. Sheehan, E. Winn-Deen, J. Oliver, H.A. Fisher, R.P. Kaufman, Jr. and J.S. Ross: **Decreased expression of catenins (alpha and beta), p120 CTN, and E-cadherin cell adhesion proteins and E-cadherin gene promoter methylation in prostatic adenocarcinomas.** *Cancer* 2001, **92**:2786-95.
130. E. Papadavid and A. Katsambas: **The interactions and role of epithelial cadherin and catenins in tumorigenicity.** *Int J Dermatol* 2001, **40**:254-7.
131. T. Kadowaki, H. Shiozaki, M. Inoue, S. Tamura, H. Oka, Y. Doki, K. Iihara, S. Matsui, T. Iwazawa, A. Nagafuchi and et al.: **E-cadherin and alpha-catenin expression in human esophageal cancer.** *Cancer Res* 1994, **54**:291-6.
132. M. Torres, A. Stoykova, O. Huber, K. Chowdhury, P. Bonaldo, A. Mansouri, S. Butz, R. Kemler and P. Gruss: **An alpha-E-catenin gene trap mutation defines its function in preimplantation development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:901-6.
133. T. Brabletz: **[The Rudolf Virchow Prize 2001. The role of the oncoprotein beta-catenin ni the progression of colorectal cancers].** *Verh Dtsch Ges Pathol* 2001, **85**:243-9.
134. M.S. Steinberg and M. Takeichi: **Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:206-9.
135. S. Tsukita, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura and S. Tsukita: **Submembranous junctional plaque proteins include potential tumor suppressor molecules.** *J Cell Biol* 1993, **123**:1049-53.
136. L. Kim and T.W. Wong: **The cytoplasmic tyrosine kinase FER is associated with the catenin-like substrate pp120 and is activated by growth factors.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**:4553-61.
137. R. Rosato, J.M. Veltmaat, J. Groffen and N. Heisterkamp: **Involvement of the tyrosine kinase fer in cell adhesion.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**:5762-70.
138. F. Geissmann, J.F. Emile, P. Andry, C. Thomas, S. Freitag, Y. De Prost and N. Brousse: **Lack of expression of E-cadherin is associated with dissemination of Langerhans' cell histiocytosis and poor outcome.** *J Pathol* 1997, **181**:301-4.

139. T. Shibata, A. Ochiai, Y. Kanai, S. Akimoto, M. Gotoh, N. Yasui, R. Machinami and S. Hirohashi: **Dominant negative inhibition of the association between beta-catenin and c-erbB-2 by N-terminally deleted beta-catenin suppresses the invasion and metastasis of cancer cells.** *Oncogene* 1996, **13**:883-9.
140. R.B. Hazan and L. Norton: **The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton.** *J Biol Chem* 1998, **273**:9078-84.
141. J. Lilien, J. Balsamo, C. Arregui and G. Xu: **Turn-off, drop-out: functional state switching of cadherins.** *Dev Dyn* 2002, **224**:18-29.
142. S. Roura, S. Miravet, J. Piedra, A. Garcia de Herreros and M. Dunach: **Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation.** *J Biol Chem* 1999, **274**:36734-40.
143. J. Piedra, D. Martinez, J. Castano, S. Miravet, M. Dunach and A.G. de Herreros: **Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation.** *J Biol Chem* 2001, **276**:20436-43.
144. P. Bonvini, W.G. An, A. Rosolen, P. Nguyen, J. Trepel, A. Garcia de Herreros, M. Dunach and L.M. Neckers: **Geldanamycin abrogates ErbB2 association with proteasome-resistant beta-catenin in melanoma cells, increases beta-catenin-E-cadherin association, and decreases beta-catenin-sensitive transcription.** *Cancer Res* 2001, **61**:1671-7.
145. J. Piedra, S. Miravet, J. Castano, H.G. Palmer, N. Heisterkamp, A. Garcia de Herreros and M. Dunach: **p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:2287-97.
146. S.M. Brady-Kalnay, D.L. Rimm and N.K. Tonks: **Receptor protein tyrosine phosphatase PTPmu associates with cadherins and catenins in vivo.** *J Cell Biol* 1995, **130**:977-86.
147. T. Muller, A. Choidas, E. Reichmann and A. Ullrich: **Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration.** *J Biol Chem* 1999, **274**:10173-83.
148. G. Xu, A.W. Craig, P. Greer, M. Miller, P.Z. Anastasiadis, J. Lilien and J. Balsamo: **Continuous association of cadherin with beta-catenin requires the non-receptor tyrosine-kinase Fer.** *J Cell Sci* 2004, **117**:3207-19.

149. I. Simcha, C. Kirkpatrick, E. Sadot, M. Shtutman, G. Polevoy, B. Geiger, M. Peifer and A. Ben-Ze'ev: **Cadherin sequences that inhibit beta-catenin signaling: a study in yeast and mammalian cells.** *Mol Biol Cell* 2001, **12**:1177-88.
150. S. Bek and R. Kemler: **Protein kinase CKII regulates the interaction of beta-catenin with alpha-catenin and its protein stability.** *J Cell Sci* 2002, **115**:4743-53.
151. K. Kaibuchi, S. Kuroda, M. Fukata and M. Nakagawa: **Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases.** *Curr Opin Cell Biol* 1999, **11**:591-6.
152. M. Fukata, M. Nakagawa, S. Kuroda and K. Kaibuchi: **Cell adhesion and Rho small GTPases.** *J Cell Sci* 1999, **112 (Pt 24)**:4491-500.
153. K. Ihara, S. Muraguchi, M. Kato, T. Shimizu, M. Shirakawa, S. Kuroda, K. Kaibuchi and T. Hakoshima: **Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue.** *J Biol Chem* 1998, **273**:9656-66.
154. J. Zhurinsky, M. Shtutman and A. Ben-Ze'ev: **Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles.** *J Cell Sci* 2000, **113 (Pt 18)**:3127-39.
155. B.O. Williams, G.D. Barish, M.W. Klymkowsky and H.E. Varmus: **A comparative evaluation of beta-catenin and plakoglobin signaling activity.** *Oncogene* 2000, **19**:5720-8.
156. L. Shapiro: **beta-catenin and its multiple partners: promiscuity explained.** *Nat Struct Biol* 2001, **8**:484-7.
157. G. Solanas, S. Miravet, D. Casagolda, J. Castano, I. Raurell, A. Corriero, A.G. de Herreros and M. Dunach: **beta-Catenin and plakoglobin N- and C-tails determine ligand specificity.** *J Biol Chem* 2004, **279**:49849-56.
158. S. Miravet, J. Piedra, J. Castano, I. Raurell, C. Franci, M. Dunach and A. Garcia de Herreros: **Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:7391-402.
159. C. Jamora and E. Fuchs: **Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**:E101-8.

160. A. Nagafuchi, S. Ishihara and S. Tsukita: **The roles of catenins in the cadherin-mediated cell adhesion: functional analysis of E-cadherin-alpha catenin fusion molecules.** *J Cell Biol* 1994, **127**:235-45.
161. A. Ridley: **Rho GTPases. Integrating integrin signaling.** *J Cell Biol* 2000, **150**:F107-9.
162. A. Hall: **Rho GTPases and the actin cytoskeleton.** *Science* 1998, **279**:509-14.
163. B. Boettner and L. Van Aelst: **The role of Rho GTPases in disease development.** *Gene* 2002, **286**:155-74.
164. J. Cherfils and P. Chardin: **GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins.** *Trends Biochem Sci* 1999, **24**:306-11.
165. L.E. Rameh, A. Arvidsson, K.L. Carraway, 3rd, A.D. Couvillon, G. Rathbun, A. Crompton, B. VanRenterghem, M.P. Czech, K.S. Ravichandran, S.J. Burakoff, D.S. Wang, C.S. Chen and L.C. Cantley: **A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains.** *J Biol Chem* 1997, **272**:22059-66.
166. E. Dransart, B. Olofsson and J. Cherfils: **RhoGDIs Revisited: Novel Roles in Rho Regulation.** *Traffic* 2005, **6**:957-66.
167. O. Kranenburg, M. Poland, M. Gebbink, L. Oomen and W.H. Moolenaar: **Dissociation of LPA-induced cytoskeletal contraction from stress fiber formation by differential localization of RhoA.** *J Cell Sci* 1997, **110** (Pt 19):2417-27.
168. A.P. Wheeler and A.J. Ridley: **Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility.** *Exp Cell Res* 2004, **301**:43-9.
169. A.L. Bishop and A. Hall: **Rho GTPases and their effector proteins.** *Biochem J* 2000, **348 Pt 2**:241-55.
170. T. Shimizu, K. Ihara, R. Maesaki, S. Kuroda, K. Kaibuchi and T. Hakoshima: **An open conformation of switch I revealed by the crystal structure of a Mg²⁺-free form of RHOA complexed with GDP. Implications for the GDP/GTP exchange mechanism.** *J Biol Chem* 2000, **275**:18311-7.
171. G.R. Hoffman, N. Nassar and R.A. Cerione: **Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI.** *Cell* 2000, **100**:345-56.

172. S. Grizot, J. Faure, F. Fieschi, P.V. Vignais, M.C. Dagher and E. Pebay-Peyroula: **Crystal structure of the Rac1-RhoGDI complex involved in nadph oxidase activation.** *Biochemistry* 2001, **40**:10007-13.
173. K. Aktories and J.T. Barbieri: **Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches.** *Nat Rev Microbiol* 2005, **3**:397-410.
174. H. Genth, R. Gerhard, A. Maeda, M. Amano, K. Kaibuchi, K. Aktories and I. Just: **Entrapment of Rho ADP-ribosylated by Clostridium botulinum C3 exoenzyme in the Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor-1 complex.** *J Biol Chem* 2003, **278**:28523-7.
175. H. Genth, K. Aktories and I. Just: **Monoglucosylation of RhoA at threonine 37 blocks cytosol-membrane cycling.** *J Biol Chem* 1999, **274**:29050-6.
176. M. Aepfelbacher, C. Trasak, G. Wilharm, A. Wiedemann, K. Trulzsch, K. Krauss, P. Gierschik and J. Heesemann: **Characterization of YopT effects on Rho GTPases in Yersinia enterocolitica-infected cells.** *J Biol Chem* 2003, **278**:33217-23.
177. I.N. Fleming, C.M. Elliott and J.H. Exton: **Differential translocation of rho family GTPases by lysophosphatidic acid, endothelin-1, and platelet-derived growth factor.** *J Biol Chem* 1996, **271**:33067-73.
178. A.J. Ridley, M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons and A.R. Horwitz: **Cell migration: integrating signals from front to back.** *Science* 2003, **302**:1704-9.
179. V.M. Braga, L.M. Machesky, A. Hall and N.A. Hotchin: **The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts.** *J Cell Biol* 1997, **137**:1421-31.
180. V.M. Braga, A. Del Maschio, L. Machesky and E. Dejana: **Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context.** *Mol Biol Cell* 1999, **10**:9-22.
181. M. Fukata, S. Kuroda, M. Nakagawa, A. Kawajiri, N. Itoh, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, H. Fujisawa, A. Kikuchi and K. Kaibuchi: **Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin.** *J Biol Chem* 1999, **274**:26044-50.
182. V.M. Braga: **Cell-cell adhesion and signalling.** *Curr Opin Cell Biol* 2002, **14**:546-56.
183. K. Kaibuchi, S. Kuroda and M. Amano: **Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells.** *Annu Rev Biochem* 1999, **68**:459-86.

184. T.L. Le, A.S. Yap and J.L. Stow: **Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics.** *J Cell Biol* 1999, **146**:219-32.
185. S. Ellis and H. Mellor: **Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases.** *Trends Cell Biol* 2000, **10**:85-8.
186. C. Lamaze, T.H. Chuang, L.J. Terlecky, G.M. Bokoch and S.L. Schmid: **Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac.** *Nature* 1996, **382**:177-9.
187. Y. Zhuge and J. Xu: **Rac1 mediates type I collagen-dependent MMP-2 activation. role in cell invasion across collagen barrier.** *J Biol Chem* 2001, **276**:16248-56.
188. J.M. Staddon, C. Smales, C. Schulze, F.S. Esch and L.L. Rubin: **p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex.** *J Cell Biol* 1995, **130**:369-81.
189. A.B. Reynolds, L. Herbert, J.L. Cleveland, S.T. Berg and J.R. Gaut: **p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo.** *Oncogene* 1992, **7**:2439-45.
190. A.B. Reynolds, J. Daniel, P.D. McCrea, M.J. Wheelock, J. Wu and Z. Zhang: **Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes.** *Mol Cell Biol* 1994, **14**:8333-42.
191. J.M. Daniel and A.B. Reynolds: **The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**:4819-24.
192. P.Z. Anastasiadis, S.Y. Moon, M.A. Thoreson, D.J. Mariner, H.C. Crawford, Y. Zheng and A.B. Reynolds: **Inhibition of RhoA by p120 catenin.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:637-44.
193. N.K. Noren, B.P. Liu, K. Burrige and B. Kreft: **p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases.** *J Cell Biol* 2000, **150**:567-80.
194. I. Grosheva, M. Shtutman, M. Elbaum and A.D. Bershadsky: **p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion.** *J Cell Sci* 2001, **114**:695-707.

195. M. Hatzfeld and C. Nachtsheim: **Cloning and characterization of a new armadillo family member, p0071, associated with the junctional plaque: evidence for a subfamily of closely related proteins.** *J Cell Sci* 1996, **109** (Pt 11):2767-78.
196. M. Hatzfeld, G.I. Kristjansson, U. Plessmann and K. Weber: **Band 6 protein, a major constituent of desmosomes from stratified epithelia, is a novel member of the armadillo multigene family.** *J Cell Sci* 1994, **107** (Pt 8):2259-70.
197. A. Keirsebilck, S. Bonne, K. Staes, J. van Hengel, F. Nollet, A. Reynolds and F. van Roy: **Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms.** *Genomics* 1998, **50**:129-46.
198. Y.Y. Mo and A.B. Reynolds: **Identification of murine p120 isoforms and heterogeneous expression of p120cas isoforms in human tumor cell lines.** *Cancer Res* 1996, **56**:2633-40.
199. R.C. Ireton, M.A. Davis, J. van Hengel, D.J. Mariner, K. Barnes, M.A. Thoreson, P.Z. Anastasiadis, L. Matrisian, L.M. Bundy, L. Sealy, B. Gilbert, F. van Roy and A.B. Reynolds: **A novel role for p120 catenin in E-cadherin function.** *J Cell Biol* 2002, **159**:465-76.
200. S. Esser, M.G. Lampugnani, M. Corada, E. Dejana and W. Risau: **Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells.** *J Cell Sci* 1998, **111** (Pt 13):1853-65.
201. D.J. Mariner, P. Anastasiadis, H. Keilhack, F.D. Bohmer, J. Wang and A.B. Reynolds: **Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120ctn.** *J Biol Chem* 2001, **276**:28006-13.
202. X. Xia, D.J. Mariner and A.B. Reynolds: **Adhesion-associated and PKC-modulated changes in serine/threonine phosphorylation of p120-catenin.** *Biochemistry* 2003, **42**:9195-204.
203. M.S. Kinch, G.J. Clark, C.J. Der and K. Burridge: **Tyrosine phosphorylation regulates the adhesions of ras-transformed breast epithelia.** *J Cell Biol* 1995, **130**:461-71.
204. E. Calautti, S. Cabodi, P.L. Stein, M. Hatzfeld, N. Kedersha and G. Paolo Dotto: **Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion.** *J Cell Biol* 1998, **141**:1449-65.
205. M. Ozawa and R. Kemler: **The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity.** *J Cell Biol* 1998, **142**:1605-13.

206. I.S. Nathke, L. Hinck, J.R. Swedlow, J. Papkoff and W.J. Nelson: **Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells.** *J Cell Biol* 1994, **125**:1341-52.
207. M.A. Davis, R.C. Ireton and A.B. Reynolds: **A core function for p120-catenin in cadherin turnover.** *J Cell Biol* 2003, **163**:525-34.
208. M. Cozzolino, V. Stagni, L. Spinardi, N. Campioni, C. Fiorentini, E. Salvati, S. Alema and A.M. Salvatore: **p120 Catenin is required for growth factor-dependent cell motility and scattering in epithelial cells.** *Mol Biol Cell* 2003, **14**:1964-77.
209. F. Grignani, S. De Matteis, C. Nervi, L. Tomassoni, V. Gelmetti, M. Cioce, M. Fanelli, M. Ruthardt, F.F. Ferrara, I. Zamir, C. Seiser, F. Grignani, M.A. Lazar, S. Minucci and P.G. Pelicci: **Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia.** *Nature* 1998, **391**:815-8.
210. J.I. Park, S.W. Kim, J.P. Lyons, H. Ji, T.T. Nguyen, K. Cho, M.C. Barton, T. Deroo, K. Vleminckx, R.T. Moon and P.D. McCrea: **Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets.** *Dev Cell* 2005, **8**:843-54.
211. C.M. Spring, K.F. Kelly, I. O'Kelly, M. Graham, H.C. Crawford and J.M. Daniel: **The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin.** *Exp Cell Res* 2005, **305**:253-65.
212. P.T. Tuazon and J.A. Traugh: **Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation.** *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1991, **23**:123-64.
213. L.A. Pinna and M. Ruzzene: **How do protein kinases recognize their substrates?** *Biochim Biophys Acta* 1996, **1314**:191-225.
214. M. Ozawa and T. Ohkubo: **Tyrosine phosphorylation of p120(ctn) in v-Src transfected L cells depends on its association with E-cadherin and reduces adhesion activity.** *J Cell Sci* 2001, **114**:503-12.
215. M.G. Lampugnani, M. Corada, P. Andriopoulou, S. Esser, W. Risau and E. Dejana: **Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells.** *J Cell Sci* 1997, **110** (Pt 17):2065-77.
216. J.M. Daniel and A.B. Reynolds: **Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function.** *Bioessays* 1997, **19**:883-91.

217. D.J. Mariner, M.A. Davis and A.B. Reynolds: **EGFR signaling to p120-catenin through phosphorylation at Y228.** *J Cell Sci* 2004, **117**:1339-50.
218. K. Takahashi, K. Suzuki and Y. Tsukatani: **Induction of tyrosine phosphorylation and association of beta-catenin with EGF receptor upon tryptic digestion of quiescent cells at confluence.** *Oncogene* 1997, **15**:71-8.
219. Z. Songyang and L.C. Cantley: **Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling.** *Trends Biochem Sci* 1995, **20**:470-5.
220. L.J. Holsinger, K. Ward, B. Duffield, J. Zachwieja and B. Jallal: **The transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase DEP1 interacts with p120(ctn).** *Oncogene* 2002, **21**:7067-76.
221. G.C. Zondag, A.B. Reynolds and W.H. Moolenaar: **Receptor protein-tyrosine phosphatase RPTPmu binds to and dephosphorylates the catenin p120(ctn).** *J Biol Chem* 2000, **275**:11264-9.
222. H. Keilhack, U. Hellman, J. van Hengel, F. van Roy, J. Godovac-Zimmermann and F.D. Bohmer: **The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 binds to and dephosphorylates p120 catenin.** *J Biol Chem* 2000, **275**:26376-84.
223. K.C. Miranda, T. Khromykh, P. Christy, T.L. Le, C.J. Gottardi, A.S. Yap, J.L. Stow and R.D. Teasdale: **A dileucine motif targets E-cadherin to the basolateral cell surface in Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells.** *J Biol Chem* 2001, **276**:22565-72.
224. Y.T. Chen, D.B. Stewart and W.J. Nelson: **Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells.** *J Cell Biol* 1999, **144**:687-99.
225. K. Xiao, D.F. Allison, K.M. Buckley, M.D. Kottke, P.A. Vincent, V. Faundez and A.P. Kowalczyk: **Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells.** *J Cell Biol* 2003, **163**:535-45.
226. K.C. Miranda, S.R. Joseph, A.S. Yap, R.D. Teasdale and J.L. Stow: **Contextual binding of p120ctn to E-cadherin at the basolateral plasma membrane in polarized epithelia.** *J Biol Chem* 2003, **278**:43480-8.
227. N.K. Noren, W.T. Arthur and K. Burridge: **Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP.** *J Biol Chem* 2003, **278**:13615-8.

228. Y. Fujita, G. Krause, M. Scheffner, D. Zechner, H.E. Leddy, J. Behrens, T. Sommer and W. Birchmeier: **Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**:222-31.
229. E.E. Sander, J.P. ten Klooster, S. van Delft, R.A. van der Kammen and J.G. Collard: **Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior.** *J Cell Biol* 1999, **147**:1009-22.
230. K. Abe, K.L. Rossman, B. Liu, K.D. Ritola, D. Chiang, S.L. Campbell, K. Burrige and C.J. Der: **Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA.** *J Biol Chem* 2000, **275**:10141-9.
231. T. Sasaki and Y. Takai: **The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **245**:641-5.
232. D.J. Mariner, J. Wang and A.B. Reynolds: **ARVCF localizes to the nucleus and adherens junction and is mutually exclusive with p120(ctn) in E-cadherin complexes.** *J Cell Sci* 2000, **113 (Pt 8)**:1481-90.
233. M.L. Taddei, P. Chiarugi, P. Cirri, F. Buricchi, T. Fiaschi, E. Giannoni, D. Talini, G. Cozzi, L. Formigli, G. Raugei and G. Ramponi: **Beta-catenin interacts with low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase leading to cadherin-mediated cell-cell adhesion increase.** *Cancer Res* 2002, **62**:6489-99.
234. J. Balsamo, C. Arregui, T. Leung and J. Lilien: **The nonreceptor protein tyrosine phosphatase PTP1B binds to the cytoplasmic domain of N-cadherin and regulates the cadherin-actin linkage.** *J Cell Biol* 1998, **143**:523-32.

LISTA DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

- ✓ Piedra, J., Martinez, D., **Castaño J.**, Miravet, S., Duñach, M., and Garcia de Herreros, A. 2001. **Regulation of β -catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation.** *J Biol Chem.* 276:20436-43.
- ✓ **Castaño, J.**, Raurell, I., Piedra, J., Miravet, S., Duñach, M., and Garcia de Herreros, A. 2002. **β -catenin N- and C-terminal tails modulate the coordinated binding of adherens junction proteins to β -catenin.** *J Biol Chem.* 277:31541-50.
- ✓ Piedra, J., Miravet, S., **Castaño, J.**, Palmer, H.G., Heisterkamp, N., Garcia de Herreros, A., and Duñach, M. 2003. **p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate α -catenin Tyr-142 phosphorylation and β -catenin- α -catenin interaction.** *Mol Cell Biol.* 23:2287-97.
- ✓ Solanas, G., Miravet, S., Casagolda, D., **Castaño, J.**, Raurell, I., Corrionero, A., Garcia de Herreros, A., and Duñach, M. 2004. **β -Catenin and plakoglobin N- and C-tails determine ligand specificity.** *J Biol Chem.* 279:49849-56.
- ✓ **Castaño, J.**, Bustelo, X., Garcia de Herreros, A., and Duñach, M., and. 2005. **p120-catenin regulates RhoA activity.** En fase de redactado final.

AGRADECIMIENTOS

Después de cinco años (y pico) de tesis doctoral, unos meses de escritura (con sus correspondientes correcciones) y mucha paciencia (que es la madre de la ciencia), llegó el momento de agradecer a todos aquellos que directa o indirectamente me han ayudado (o no) a llegar hasta aquí.

Lo principal es agradecer a mis “jefes”, Dra. Mireia Duñach y Dr. Antonio García de Herreros, que aquel verano de 2000 decidieran acogerme en su grupo de investigación, brindándome así la oportunidad de formarme como investigador y porque no, como persona. Además, y lo más importante para mí, me permitió conocer a una personita con la que espero pasar el resto de mis días.

Esto me lleva a ti, Imma. Tú más que nadie sabes lo mucho que me has ayudado, tanto experimental como moralmente. Sin tus consejos y tu enorme paciencia para conmigo no creo que hubiera llegado tan lejos. Ya se que parece típico y cursi, pero es la verdad.

El resto de los “cateninos” merecen ser divididos en dos grupos: la nueva y la vieja guardia. La nueva guardia (nueva teniendo en cuenta mis cinco años) son por orden de aparición: Guiomar, David, Patri y Neus. Juntos hemos pasado buenos momentos y algunos no tan buenos, pero el balance general considero que es bueno y me alegro mucho de haber coincidido en esta vida con vosotros. Gracias por ayudarme cuando he necesitado vuestra ayuda en el laboratorio y en algunas ocasiones fuera de él. La vieja guardia estaría formada por aquellos que estuvieron pero ya no están (por suerte o por desgracia) entre nosotros: Jose, Susana y Dani. Qué puedo decir...de todo el mundo se aprende algo, aunque de algunos más que de otros. Otro “catenino”, no legítimo sino adoptado, es Víctor Buzón; gracias por tus chistes y por introducirnos en el apasionante mundo del sudoku.

A Álex, un buen amigo, gracias por escuchar mis ralladas y mis idas de olla y por tus sabios consejos tanto científicos como personales. Empezamos juntos impartiendo nuestra ley en las clases de prácticas y acabamos...a ver como acabamos el viernes, jeje. Un abrazo muy grande y que te vaya muy bien por esos países nórdicos.

Como no acordarme de los dos informáticos más grandes de biofísica, Iván y Rafita. Dos grandes personas y grandes amigos. A ver si no os vais tan lejos que en España se está muy bien.

También dar las gracias al resto de la unidad de biofísica (presentes y pasados) con los que he compartido estos cinco años y que en algún momento u otro me han ayudado (o no) a que mi estancia sea más fácil aquí.

A mis amigos y mis padres que en algún momento u otro han sufrido en sus carnes la ira de mi tesis.

Y por último, y como diría el asturiano más famoso del momento, me lo agradezco a mi mismo.

Barcelona, lunes 14 de noviembre de 2005

THE DOCTOR