

Efecte repressor de **Snail** en la proliferació cel·lular

TESI DOCTORAL

Ariadna Virgós Soler
Juny 2008

“Efecte repressor de **Snail** en la proliferació cel·lular”

Memòria presentada per l' Ariadna Virgós Soler per optar al grau de Doctora

Juny 2008

Treball realitzat sota la direcció del Dr. Antonio García de Herreros Madueño
en l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica

Antonio García de Herreros Madueño
Director de tesi

Ariadna Virgós Soler
Doctoranda

INTRODUCCIÓ	4
1. CÀNCER I DESENVOLUPAMENT, DOS PROCESSOS QUE TENEN MOLTS PUNTS EN COMÚ	4
2. ELS PROCESSOS EMT: PÈRDUA DE TRETOS EPITELIALS I GUANY DE TRETOS	4
MESENQUIMALS	4
2.1 EMT: “ Epithelial-Mesenchymal Transition”	4
2.2 EMT: rellevància fisiològica	6
2.2.1. EMT en Desenvolupament	6
2.2.2 EMT en processos patològics	7
2.3. EMT: Inducció i regulació	8
2.3.1. Vies de senyalització de l’EMT	9
2.3.2. Rol de l’E-cadherina en l’EMT	11
3. SNAIL	13
3.1. La superfamília Snail; factors de transcripció repressors	13
3.2. Família Snail: processos on participen	16
3.2.1. Snail: EMT i moviment cel·lular	16
3.2.2. Snail: supervivència cel·lular	21
4. SNAIL I CICLE CEL·LULAR	22
4.1. Rol inhibidor de l’endoreduplicació	22
4.2. ROL ACTIVADOR DE LA DIVISIÓ ASSIMÈTRICA EN EL PROCÉS DE NEUROGÈNESI DE <i>Drosophila</i>	24
4.3. ROL INHIBIDOR DE CICLE CEL·LULAR EN PROCESSOS EMT	26
4.3.1. Snail i Slug participen en el processos de determinació i delaminació de les cèl·lules de la cresta neural, però no s’ha descrit que participin en el control del cicle cel·lular d’aquestes cèl·lules	27
4.3.2. Snail juga un paper essencial en el procés de gastrulació, induint fenotip migrador i a l’hora bloquejant la mitosi	28
4.3.2.1. SNAIL i string en el procés de gastrulació de <i>Drosophila</i>	30
4.3.2.2. Tribbles: Vincle entre Snail i String	32
4.3.2.3. String/CDC25	33
CDC25 i checkpoints	37
CDC25 i càncer	39
OBJECTIUS	42
RESULTATS	44
1. L’EXPRESSIÓ DE SNAIL EN LES LÍNIES CEL·LULARS DE MAMÍFER FA DISMINUIR LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR	44
2. LES CÈL·LULES MDCK QUE EXPRESSEN SNAIL PRESENTEN UN RETARD EN L’ENTRADA A LA FASE S DEL CICLE CEL·LULAR	45
2.1. Anàlisi per citometria de flux en cultiu assincrònic	45
2.2. Estudi de l’entrada a fase S en cèl·lules MDCK sincronitzades en G0/G1 amb medi sense sèrum	46
3. LES CÈL·LULES HT-29 M6 QUE EXPRESSEN SNAIL PRESENTEN UN RETARD EN L’ENTRADA A LA FASE S I EN ETAPES POSTERIORES	46
3.1. Anàlisi de cicle cel·lular per citometria de flux en cultiu assincrònic	47
3.2. Estudi de l’entrada a la fase S en cèl·lules HT-29 M6 sincronitzades en G0/G1 amb medi sense sèrum	47
3.3. Les cèl·lules HT-29 M6 que expressen Snail, presenten en cultiu un elevat nombre de cèl·lules no adherides a la placa	48
3.4. Anàlisi de cicle cel·lular en cultius en matriu de col·lagen	51
3.5. Estudi de l’arribada a la mitosi en les cèl·lules HT-29 M6	52
4. LES CÈL·LULES RWP1 TRANSFECTADES TRANSITÒRIAMENT AMB GFP-SNAIL TAMBÉ PRESENTEN UN BLOQUEIG EN L’ENTRADA A LA FASE S	54
5. ELS NIVELLS DE SNAIL ENDOGEN OSCIL·LEN AL LLARG DEL CICLE CEL·LULAR	56
5.1. L’expressió de Snail oscil·la a l’afegir sèrum al medi de cultiu	56

5.2. El pic d'expressió de Snail poc després d'afegir sèrum al medi, és dependent de sèrum, i no de cycle cel·lular.....	57
5.3. L'expressió cíclica de Snail concorda amb les fases del cycle cel·lular.....	58
6. LES CÈL·LULES QUE EXPRESSEN SNAIL PRESENTEN MENYS ACTIVITAT CDK1.....	60
6.1. En un cultiu assincrònic, els nivells de CDK1 inactiva incrementen quan les cèl·lules expressen Snail.....	60
6.2. Les cèl·lules que expressen Snail presenten menys activitat CDK1.....	61
7. ELS NIVELLS DE CDC25A DISMINUEIXEN EN LES CÈL·LULES QUE EXPRESSEN SNAIL..	62
7.1. Els nivells de CDC25A disminueixen en les línies HT-29 M6 i MDCK transfectades establement amb Snail.....	62
7.2. Les cèl·lules que expressen Snail, aturades en G0/G1 rera el deplecionament de sèrum, presenten nivells basals de CDC25A més baixos.....	64
7.3. La fracció de cèl·lules en la fase G0/G1 d'un cultiu assincrònic, presenten nivells de CDC25A més baixos si expressen Snail.....	65
7.4. Els nivells de CDC25A endògena disminueixen en les MDCK transfectades transitòriament amb quantitats creixents de Snail.....	66
8. SNAIL NO INHIBEIX LA TRANSCRIPCIÓ DE CDC25A.....	67
8.1. Els nivells del mRNA de CDC25A no disminueixen en les cèl·lules que expressen establement Snail.....	67
8.2. Els nivells de CDC25A exògena també disminueixen quan les cèl·lules són cotransfectades amb Snail.....	68
9. SNAIL NO FA MÉS INESTABLE LA CDC25A.....	69
9.1. La davallada de CDC25A en les cèl·lules que expressen Snail no es deu a una menor estabilitat de la proteïna.....	69
9.2. La davallada de CDC25A en les cèl·lules que expressen Snail no es deu a una major degradació de la proteïna via proteosoma.....	70
10. TRIBBLES NO COOPERA AMB SNAIL EN EL BLOQUEIG DEL CICLE CEL·LULAR.....	73
10.1. No hi ha correlació entre els nivells d'expressió de Tribbles i Snail.....	73
10.2. Tribbles i Snail no interaccionen <i>in vitro</i>	74
10.3. L'expressió de Tribbles no fa més acusada l'aturada en cycle que pateixen les cèl·lules que expressen Snail.....	75
10.3.1. Les cèl·lules que expressen Tribbles no presenten un fenotip més mesenquimal.....	76
10.3.2. Els clons estables MDCK que expressen elevats nivells de Tribbles presenten un percentatge important de cèl·lules binucleades.....	77
10.3.3. L'expressió de Tribbles en les cèl·lules MDCK, no afecta el cycle cel·lular.....	78
10.4. L'expressió de Tribbles no fa disminuir els nivells de CDC25A.....	79
11. LA DAVALLADA DE CDC25A PROVOCADA PER SNAIL, TÉ LLOC AL NUCLI I NO DEPÈN DE L'ACTIVITAT REPRESSORA TRANSCRIPCIONAL DE SNAIL.....	80
11.1. Els mutants SNA-SA i SNA-LA tenen més efecte en la davallada de CDC25A. El mutant SNA-P2A té el mateix efecte que SNAwt.....	81
11.2. Els mutants nuclears, SNA-SA i SNA-LA no fan disminuir els nivells de CDC25A fent més inestable la proteïna.....	83
12. ELS NIVELLS DE mRNA DE CDC25A ENDÒGENA SÓN MÉS ALTS EN LES CÈL·LULES QUE EXPRESSEN SNAIL.....	85
13. POSSIBLES MECANISMES QUE PODRIA UTILITZAR SNAIL PER INHIBIR LA TRADUCCIÓ DE CDC25A.....	86
14. LA REGIÓ DE CDC25A RESPONSABLE QUE EN PRESENCIA DE SNAIL BAIXIN ELS NIVELLS DE PROTEÏNA ES LOCALITZA EN L'EXTREM N-TERMINAL.....	89
15. ELS NIVELLS DE mRNA DE CDC25A EXÒGENA NO SÓN MÉS ALTS EN LES CÈL·LULES QUE EXPRESSEN SNAIL.....	91
16. ELS NIVELLS DE mRNA _{NUCLEAR} DE CDC25A PUGEN I ELS DE mRNA _{CITOSÒLIC} BAIXEN QUAN LES CÈL·LULES EXPRESSEN SNAIL.....	92
DISCUSSIÓ.....	95
1. L'EXPRESSIÓ DE SNAIL EN CÈL·LULES EPITELIALS FA DISMINUIR LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR.....	95
2. SNAIL BLOQUEJA L'ENTRADA A LA FASE S I L'ENTRADA A LA FASE M DEL CICLE CEL·LULAR.....	97
3. SNAIL FA DISMINUIR L'EXPRESSIÓ DE CDC25A A NIVELL DE PROTEÏNA.....	99
4. LA BAIXADA DELS NIVELLS DE CDC25A NO PODEN EXPLICAR-SE PER UNA MENOR ESTABILITAT DE LA PROTEÏNA, NI TRIBBLES HI JUGA CAP PAPER.....	102
5. SNAIL ACTIVA LA TRANSCRIPCIÓ DE CDC25A I RETÈ EL mRNA AL NUCLI IMPEDINT LA SEVA TRADUCCIÓ.....	105

5.1 Snail fa que l'expressió de CDC25A baixi a nivell de proteïna i pugi a nivell de mRNA.	105
5.2 Pugen els nivells de mRNANUCLEAR i baixen els nivells de mRNA _{CITOSÒLIC} de la CDC25A.	106
CONCLUSIONS	112
MATERIALS I MÈTODES	115
BIBLIOGRAFIA.....	130
ABREVIACIONS	137
ÍNDIX DE TAULES I FIGURES	138

INTRODUCCIÓ

1. CÀNCER I DESENVOLUPAMENT, DOS PROCESSOS QUE TENEN MOLTS PUNTS EN COMÚ

L'estudi del càncer va fer un avenç important quan en la dècada dels 80, s'observà que aquesta malaltia estava provocada per versions alterades de gens cel·lulars normals. Uns anys més tard es va veure que per entendre el càncer, calia estudiar com actuaven els gens implicats durant el desenvolupament normal. Aquesta idea, juntament amb el fet que organismes tan distants evolutivament com poden ser un ésser humà i una mosca conservin els mateixos marcadors moleculars, van conduir a explorar les molècules comunes en el desenvolupament i en els processos tumorals.

L'autosuficiència en senyals de creixement, la insensibilitat a senyals inhibidores de la proliferació, l'evasió dels programes de mort cel·lular, l'elevat potencial replicatiu, la capacitat d'angiogènesi i la tendència a envair nous teixits, són els trets comuns de les cèl·lules tumorals (Hanahan et al., 2000) i poden explicar-se per un "saltar-se les regles" que les cèl·lules segueixen durant el desenvolupament. L'angiogènesi i la metastasi són trets comuns dels tumors més agressius i requereixen que les cèl·lules perdin contactes amb les cèl·lules veïnes, esdevinguin mòtils i envaeixin nous territoris on proliferaran i adoptaran un comportament invasiu. La fase inicial d'aquest procés està associada a una transformació morfològica sovint anomenada Transició Epiteli-Mesènquima (EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition) (Revisat per Thiery, 2006).

2. ELS PROCESSOS EMT: PÈRDUA DE TRETS EPITELIALS I GUANY DE TRETS MESENQUIMALS

2.1 EMT: " Epithelial-Mesenchymal Transition"

La Transició Epiteli-Mesènquima és el mecanisme pel qual les cèl·lules epitelials generades en regions particulars, poden dissociar-se de l'epiteli i migrar cap a nous destins. Aquesta capacitat de moure's és possible gràcies a uns canvis morfològics que transformen les cèl·lules epitelials en cèl·lules mesenquimals. Aquesta transformació requereix que hi hagi alteracions en la morfologia, l'arquitectura, l'adhesió i la capacitat motriu de les cèl·lules (revisat per Lee, 2006).

Les cèl·lules epitelials formen capes de cèl·lules contigües, estretament unides per estructures especialitzades de membrana: les unions estretes, les unions adherents, els

desmosomes i les unions gap. Presenten polarització apical-basolateral que es posa de manifest a través d'una distribució de molècules d'adhesió diferent entre la superfície apical i basal, d'un citoesquelet d'actina polaritzat i de la presència de la làmina basal en la superfície basal de la cèl·lula (fig. I-1). Les cèl·lules epitelials poden moure's dins la capa epitelial, però en condicions normals no se'n separen i en cultiu creixen en plè contacte amb les cèl·lules veïnes, formant colònies.

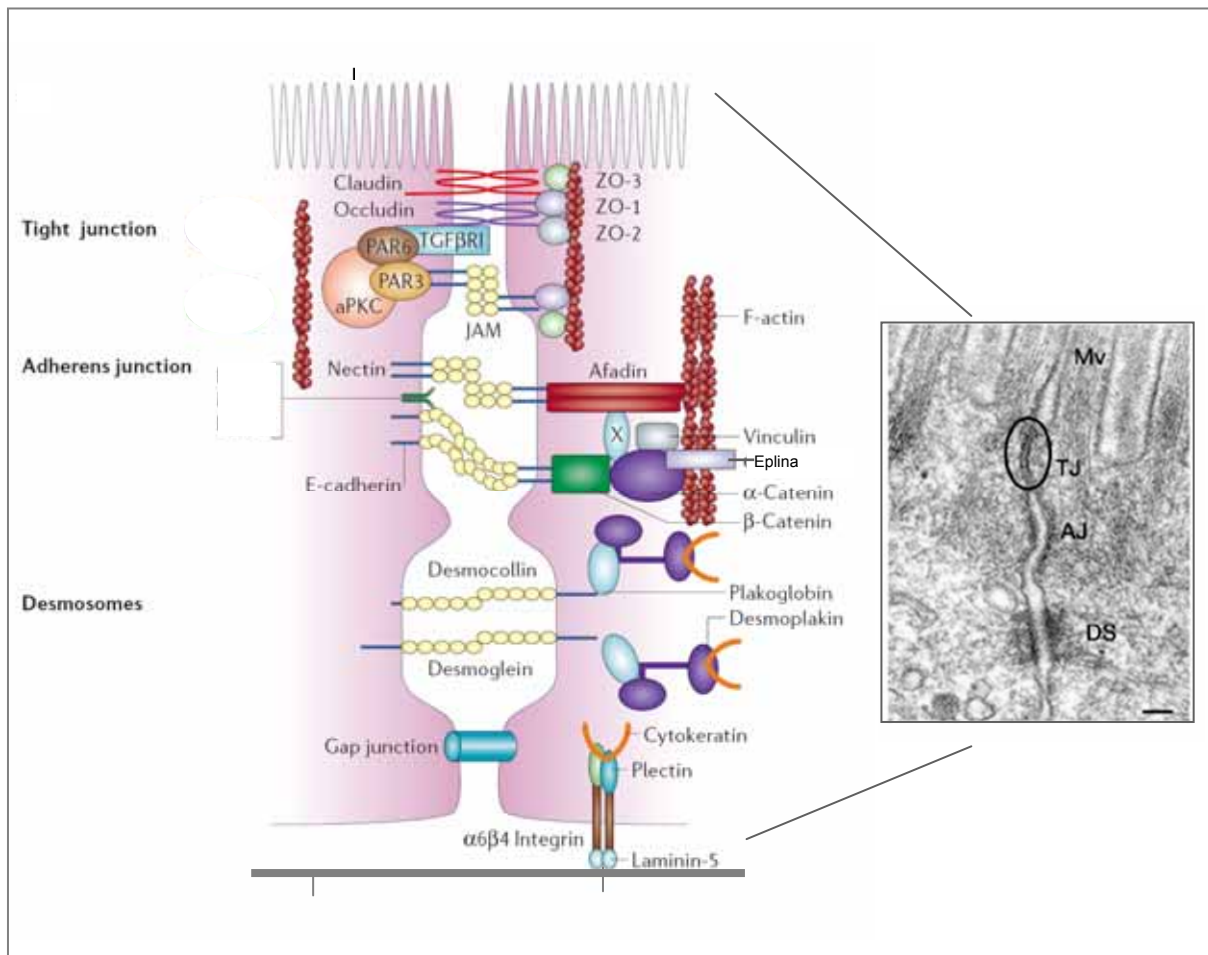


Figura I-1 : Unions intercel·lulars de les cèl·lules epitelials. A: Estructura molecular de les unions estretes, les unions adherents i els desmosomes, en un epitel polaritzat (Figura modificada de Thiery, 2007). **B:** Imatge de microscopia electrònica.

Les cèl·lules mesenquimals no formen una capa de cèl·lules organitzada. Contacten amb la matriu per contactes focals, unions menys fortes que les presents en les cèl·lules epitelials. No presenten la mateixa organització apical-basolateral que les cèl·lules epitelials ni tampoc presenten polaritzat el citoesquelet d'actina, ni s'uneixen a la làmina basal. Tenen una elevada capacitat motriu. Poden migrar juntes en cadena o com a cèl·lules individuals, exhibint la translocació cíclica extensió-adhesió-retracció o el tipus d'arrossegament ameboide. En cultiu presenten una morfologia fibroblàstica (Revisat per Thiery, 2006).

L'EMT és la culminació d'aconteixaments transcripcionals i modificacions proteiques, com a resposta a un conjunt de senyals extracel·lulars que condueixen a uns canvis inter i intracel·lulars sovint reversibles (el procés rep el nom de MET de "Mesenchymal-Epithelial Transition"), i que no sempre es donen tots junts. Dits canvis aniran associats a una reducció de l'adhesió intercel·lular, que permetrà dissociar-se de les capes cel·lulars epitelials, i a un increment en la mobilitat, que permetrà migrar cap a altres teixits (Revisat per Hugo, 2007; Savagner et al., 2001), (fig. I-2).

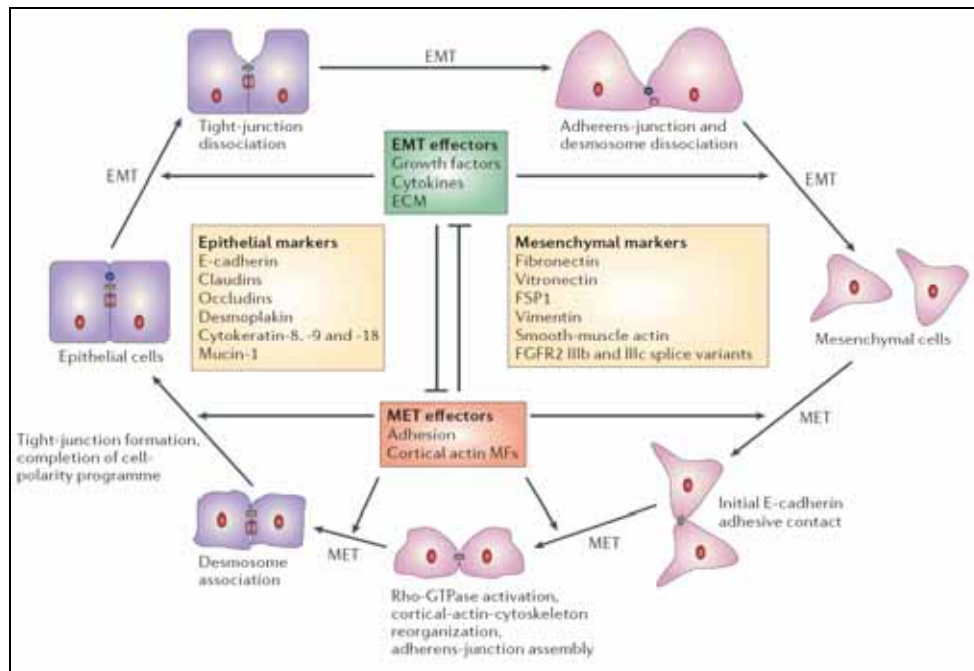


Figura I-2: EMT i MET en cèl·lules epitelials. El diagrama mostra el cicle d'aconteixaments que es donen quan les cèl·lules epitelials es transformen en cèl·lules mesenquimals i viceversa. ECM: "Extracellular matrix"; FGFR2: "Fibroblast-growth-factor-receptor"; FSP1: "Fibroblast-specific-protein"; MFs: "microfilaments". (Thiery, 2006)

2.2 EMT: rellevància fisiològica

L'EMT és fonamental tant en processos de desenvolupament normal com en situacions patològiques com és l'adquisició de fenotip invasiu en tumors epitelials (Hay et al., 1995).

2.2.1. EMT en Desenvolupament

Durant el desenvolupament embrionari, diferents senyals extracel·lulars poden engegar un procés de EMT i convertir cel·lules epitelials en cèl·lules mesenquimals. Dits processos de EMT han esdevinguts claus durant l'evolució dels éssers vius, ja que han permès l'aparició d'estructures tissulars molt el·laborades.

En la majoria de metazous, el primer estadi del desenvolupament on es dona la EMT és en el procés de gastrulació. L'ectoderma pressumpteu de la blàstula, constituït per capes de

cèl·lules fortament unides entre elles per les unions adherents i fortament unides a la matriu extracel·lular, s'invagina i es delamina per donar lloc a cèl·lules mesenquimals que migraran i constituïran l'endoderm i el mesoderm.

En vertebrats, es donarà una segona EMT en la formació de les cèl·lules de la cresta neural a partir de la delaminació d'una petita porció de cèl·lules del tub neural. Rera la EMT, les cèl·lules de la cresta neural migren i es diferencien en una àmplia gamma de teixits (revisat per Lee, 2006).

Però els processos EMT no es donen només durant el desenvolupament embrionari. S'ha descrit que en estadis normals de desenvolupament d'un organisme adult, com són la formació de la placenta (Vicovac et al., 1996) o en els ovaris de dones adultes (Auersperg et al., 1999), també hi poden tenir lloc.

2.2.2 EMT en processos patològics

L'EMT té un rol important en el desenvolupament de molts teixits durant l'embriogènesi, però canvis cel·lulars similars succeeixen durant certs processos patològics. Estudis recents mostren una similitud remarcable entre les vies de senyalització que regulen la EMT en aquests processos patològics:

Re-epitelització: Durant la re-epitelització de la pell ferida, els queratinòcits pateixen una sèrie de canvis que recorden la EMT: pèrdua de polaritat, alteracions el citoesquelet d'actina, trencament de contactes cèl·lula-cèl·lula i descomposició de la membrana basal. Aquestes cèl·lules canvien les seves propietats motrius i migren cap a la zona que cal re-epitelitzar. En el darrer estadi de re-epitelització, els queratinòcits recuperen els trests epitelials (Savagner et al., 2005)

Fibrosi: L'acumulació de fibroblasts, l'excés de col·làgen i altres components de la matriu extracel·lular (ECM de ExtraCellular Matrix) en regions d'inflamació crònica, condueix a un progressiu dany de teixit. Aquests fibroblasts provenen majoritàriament de la EMT que pateixen les cèl·lules de l'epiteli danyat, que perd progressivament la funció. La EMT està implicada en malalties fibròtiques progressives del cor, el pulmó, el fetge i el ronyó.

Càncer: Cada cop sembla més evident la idea que la EMT té un rol central en la progressió tumoral. Durant aquests processos, les cèl·lules del carcinoma adquireixen propietats i patrons d'expressió de gens mesenquimals que fan que canviïn les seves propietats d'adhesió, motilitat i proteolísis permetent que les cèl·lules migrin a través del teixit hoste cap al corrent sanguini i s'estableixin en llocs distants del tumor primari, on poden iniciar un nou focus tumoral (Yang et al., 2004) (fig. I-3).

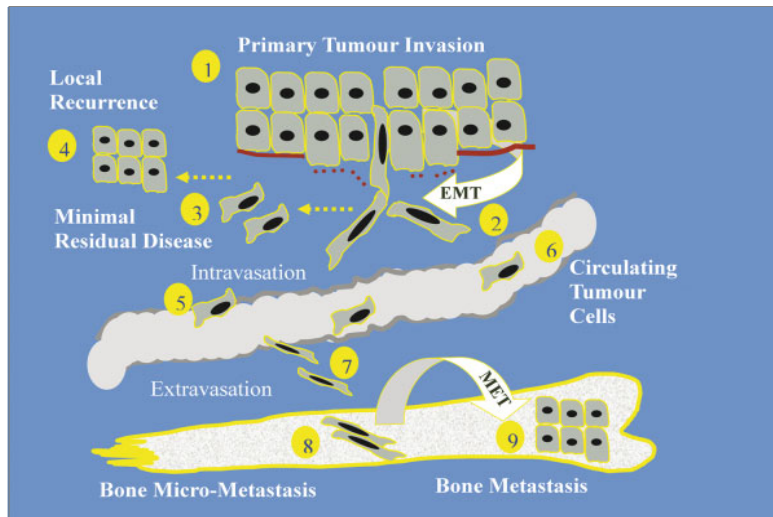


Figura I-3: Transicions EMT i MET en la progressió d'un carcinoma. Les cèl·lules del carcinoma epitelial pateixen EMT per escapar-se de la massa (1, 2), “semblant” una mínima afecció residual (3) que requereix re-epitelitzar per ser maligne de nou (4). Les formes mesenquimals poden intravasari en els vasos sanguinis (5) i romandre mesenquimals en la circulació (6). Això ajudarà a la seva extravasació (7), i reestabliment en altres llocs on podran persistir com a micrometastasi (8) o revertir a fenotip epitelial via MET i establir-se com a macrometastasi (9) (modificada de Hugo, 2007).

Recentment s'ha suggerit que l'adquisició de marcadors mesenquimals durant la progressió tumoral simplement reflexa inestabilitat genòmica, i que la EMT no es dona en tumors (Tarin et al., 2005). Però sembla improbable que els complexos patrons d'expressió gènica que calen per dotar la cèl·lula tumoral de propietats mesenquimals puguin aparèixer per mutacions a l'atzar resultat de la inestabilitat genòmica. L'EMT observada en cèl·lules tumorals no pot ser un artefacte sense significat biològic, sino que ha d'estar encaminada a incrementar el potencial metastàtic (revisat per Thiery, 2006).

2.3. EMT: Inducció i regulació

L'original descobriment de M. Stoker i M. Perryman l'any 1985 que el sobrenedant d'un cultiu de fibroblasts contenia activitat “scatter” per les cèl·lules epitelials MDCK, va obrir vies de recerca en el camp de la EMT. Als anys 90, es va trobar que el factor “scatter” era el HGF (de *Hepatocyte Growth Factor*), el lligant del receptor c-met (revisat per Thiery, 2003). Des d'aleshores, nombrosos estudis de cultius de teixits mostren que existeixen diverses senyals extracel·lulars que poden activar la EMT, que existeix una comunicació entre les vies de transducció que indueixen i inhibeixen la EMT i que les vies que indueixen la EMT tenen molts finals de ruta comuns que condueixen a dit canvi fenotípic. *In vivo* cada aconeteixament EMT és regulat per un grup d'efectors positius i negatius particular i l'inductor d'un proces EMT en un context fisiològic, pot ser-ne inhibidor en un altre (per exemple, HGF activa EMT durant la somitogènesi i la inhibeix en la fibrosi de ronyó (Mizuno et al., 1998)).

La EMT s'engega per in "interplay" de senyals extracel·lulars que s'uneixen a receptors de membrana específics, que engegaran l'activació de molècules efectores intracel·lulars. Aquests efectors, orquestraran el "desensamblatge" dels complexos que formen les unions cel·lulars i els canvis en l'organització del citoesquelet, mitjançant l'activació de factors transcripcionals de la família Snail, ZEB, factors de transcripció bHLH (basic-helix-loop-helix) i coactivadors β -catenina/TCF/LEF. El fet determinant de la EMT serà la repressió de l'E-cadherina, molècula clau de les unions adherents (fig. I-4).

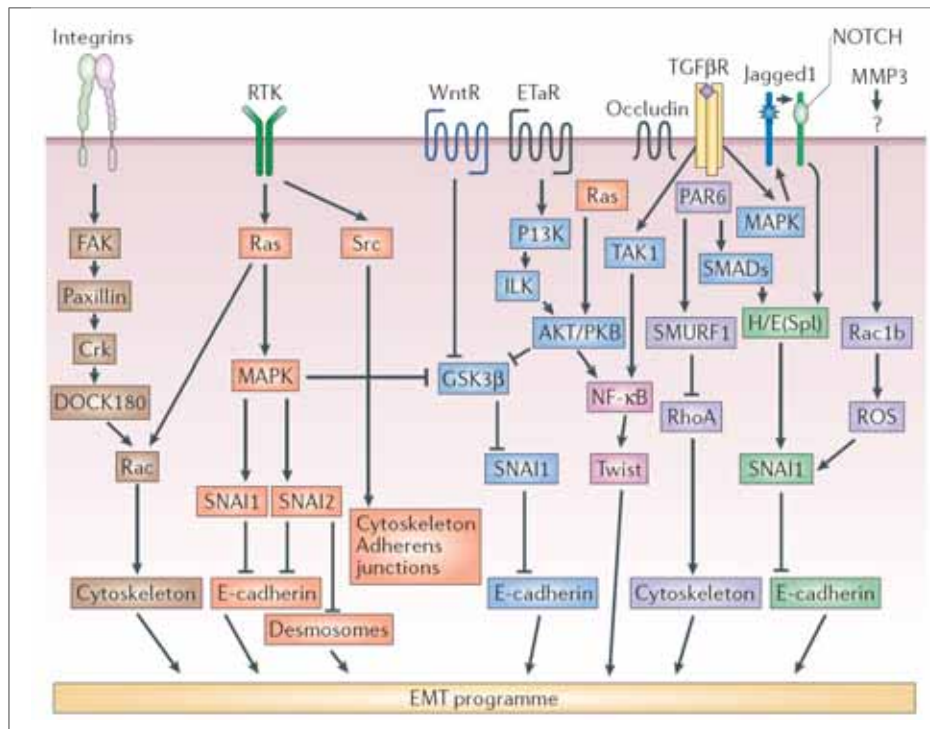


Figura I-4: Xarxa molecular que regula la EMT. Es mostra una selecció de les vies de senyalització que són activades per reguladors de la EMT així com una representació parcial de les relacions entre elles. *EtaR*, receptor d'endotelina-A; *FAK*, quinasa d'adhesió focal; *GSK3 β* , quinasa 3 β de la glicogen sintasa; *H/E(Spl)*, amplificador de *Split*; *ILK*, quinasa unida a integrina; *MAPK*, quinasa activada per mitogènesi; *NF- κ B*, factor nuclear κ B; *PAR6*, proteïna 6 defectiva en la partició, *PI3K*, fosfatidilinositol quinasa-3; *PKB*, quinasa proteica B; *ROS*, espècies reactives derivades de l'oxigen; *TAK1*, quinasa 1 activada per *TGF β* ; *TGF β R*, receptor de *TGF β* ; *WntR*, receptor de *Wnt* (Thiery, 2006).

2.3.1. Vies de senyalització de l'EMT

Via "Receptor Tyrosin Kinases" (RTK): SF/HGF, FGF (de *Fibroblast Growth Factor*), EGF (de *Epidermal Growth Factor*) i PDGF (de *Platelet-Derived Growth Factor*) són factors de creixement solubles que s'uneixen a receptors RTK específics de membrana. Dits receptors, presenten un domini quinasa intracel·lular que s'activa amb la unió del lligant. Rera la fosforilació, recluten diferents factors que activen petites proteïnes d'unió a GTP com Ras, Rho i Rac. Dites GTPases activen la via de la MAPK i PI3K (activació que no s'observa

quan cal activar mitogènesi) i culmina amb la transcripció de Snail i la consegüent “downregulació” de l'E-cadherina (Grotegut et al., 2006).

L'activació dels RTKs, pot activar altres vies independents de la via Ras/MAPK, com la de la família de tirosina quinases Src, l'activitat catalítica de les quals, és necessària per trencar els contactes cel·lula-cel·lula depenents de caderines (revisat per Savagner, 2001).

Treballs recents suggereixen que el receptor RTK c-Met activat, pot fosforilar la β -catenina i promoure la seva translocació al nucli, tot desunint-la de la α -catenina (Brembeck et al., 2004).

Via TGF- β : És la via d'EMT per excel·lència. Els membres de la família de factors de creixement TGF- β , poden iniciar i mantenir l'EMT en una varietat de sistemes biològics. Ja en els anys 90, es van establir com a mediadors de la progressió tumoral (Zavadil et al., 2005). Els factors TGF- β s'uneixen al receptor ser/thr quinasa tipus II, que rera la unió al lligant, fosforilarà el receptor ser/thr quinasa tipus I, que fosforilarà les proteïnes citoplasmàtiques Smad2 i Smad3. Dites proteïnes formaran un complex amb Smad4 i es translocaran al nucli on s'uniran a la cromatina conjuntament amb altres factors de transcripció, regulant l'expressió de certs gens. Les proteïnes Smad poden actuar de repressors transcripcionals (inhibeixen l'expressió dels gens Id, coneguts inhibidors de la EMT) i d'activadors transcripcionals activant l'expressió de Zeb1 i LEF1, Twist, Snail i Slug (revisat per Moustakas, 2007).

Alternativament a l'activació de les Smad, els receptors TGF- β poden activar MAPK, PI3K, Rho i Scr i induir les respostes EMT, desorganitzant directament les unions cel·lula-cel·lula i activant un programa genòmic crític per la generació de cèl·lules amb fenotip mesenquimal.

Via Wnt: Les proteïnes Wnt/Wg són glicoproteïnes secretades, que tenen un paper crucial en diversos processos del desenvolupament tant en ratolí, com en *Xenopus* i en *Drosophila*. Wnt-1 (homòleg de Wg en ratolí) va aïllar-se com un oncogen en adenocarcinomes mamari de ratolí, i apareix desregulació de la via Wnt en tumors humans de pulmó i de còlon (revisat per Bienz, 2000).

La interacció de les proteïnes Wnt amb els receptors transmembrana Frizzled provoca un bloqueig del complex Axina-APC-GSK3 β i la consegüent estabilització de la β -catenina, que translocarà al nucli on interaccionarà amb els coactivadors TCF/LEF fent que s'activi la transcripció de gens implicats en l'EMT (per exemple, s'ha descrit que pot activar-se la transcripció de Slug (Conacci-Sorrell et al., 2003).

Via ILK: La ILK (de *Integrin Linked Kinasa*) és una Ser-Thr-quinasa expressada en cèl·lules de mamífer, identificada per interaccionar amb el domini citoplasmàtic de les

integrines. Participa en processos de proliferació, migració, angiogènesi i supervivència cel·lular, tot transduint senyals des de la ECM. L'activitat quinasa de la ILK s'activa ràpidament per la unió de les integrines a la ECM i és dependent de PI3K. ILK fosforila GSK3 β i la inactiva, promoguent l'estabilització de la β -catenina i la seva translocació a nucli. ILK indueix l'expressió de Snail (Tan et al., 2001), tot inhibint l'expressió de MTA3 (Metastasis factor 3), proteïna que forma part del complexe inhibidor de la transcripció de Snail (Oloumi et al., 2003).

Via Notch: La via Notch s'inicia quan interaccionen lligant (en mamífer són Delta i Jagged) i receptor de dues cèl·lules veïnes. El receptor es proeolitza i allibera el domini Notch intracel·lular (NIC) que transloca al nucli i s'uneix al factor de transcripció CSL, convertint-lo en activador transcripcional de la família de factors bHLH, entre d'altres (Grego-Bessa et al., 2004). Aquesta via de senyalització cel·lular regula un important nombre de processos embrionaris com per exemple la formació de les vàlvules cardíaques via l'activació transcripcional de Snail. Alteracions de la via en adults, van associades a càncer, on Notch pot actuar com a oncogen i com a gen supressor de tumors.

2.3.2. Rol de l'E-cadherina en l'EMT

Les cadherines exerceixen la seva funció a diferents nivells biològics com són la de conferir resistència al despreniment, controlar la morfogènesis dels contactes de les cèl·lules integrades en una població i la d'influir en el patró tissular i la cohesió. És per això que no ens ha de sorprendre que moltes vies de senyalització i processos cel·lulars afectin la biologia de les cadherines (revisat per Peinado, 2004b).

L'E-cadherina és una glicoproteïna transmembrana que media l'adhesió cel·lular dependent de calci entre les cèl·lules epitelials. A través el seu domini extracel·lular, les E-cadherines formen una "cremallera" molecular necessària per la formació de les anomenades unions adherents entre cèl·lules adjacents. El seu domini intracel·lular interacciona amb el citoesquelet d'actina a través d'un complexe proteic que conté α -catenina i β/γ -catenina (veure fig. I-1).

La síntesi de l'E-cadherines es dona ja en l'estadi de dues cèl·lules del desenvolupament embrionari. Inicialment es distribueix de forma uniforme en la superfície cel·lular, però s'acaba amuntegant en els llocs d'adhesió cel·lular en l'estadi de 8 cèl·lules en aquelles cèl·lules destinades a diferenciar-se en cèl·lules epitelials (revisat per Guilford, 1999).

La seva expressió es manté en tots els teixits epitelials adults, però és silenciada durant els processos EMT i en cèl·lules mesenquimals, on altres cadherines com la N-cadherina comencen a expressar-se (Takeichi et al., 1995).

En la majoria de carcinomes l'E-cadherina ha deixat d'expressar-se i per això se la considera un gen supressor del procés invasiu. El seu rol directe en la supressió de la invasió tumoral es va veure rera la reversió del fenotip invasiu de cèl·lules epitelilals tumorals malignes al ser transfectades amb el cDNA d'E-cadherina. Dita invasivitat podia ser restaurada rera el tractament amb anticossos anti-E-cadherina o amb el RNA antisentit (Vleminckx et al., 1991). Uns anys més tard es va determinar que la pèrdua de l'E-cadherina que media l'adhesió cel·lular és un pas limitant en la progressió d'adenoma a carcinoma i és suficient per promoure la invasió tumoral i la metastasi *in vivo* (Perl et al., 1998).

La regulació a la baixa de l'E-cadherina en tumors, pot ser deguda a mutacions puntuals en el gen CDH1 que codifica per l'E-cadherina o més freqüentment per una "downregulació" de l'expressió gènica. Molts carcinomes presenten les illes CpG del promotor de l'E-cadherina hipermetilades. Aquesta hipermetilació està associada a una compactació de la cromatina de la regió promotora i a la seva inactivació gènica. A nivell transcripcional, el promotor de l'E-cadherina conté molts elements reguladors. En el fragment proximal dels promotors humà i de ratolí es van descriure 3 caixes E-box amb core idèntic (5'-CACCTG-3'), que es va veure que eren importants per la repressió de l'E-cadherina en els fibroblastes. Aquesta seqüència és el lloc d'unió del factor de transcripció Snail (Nakayama et al., 1998) que es va demostrar que s'hi unia i en reprimia la transcripció (Batlle et al., 2000 i Cano et al., 2000). Actualment se sap que a més a més de Snail, també són repressors transcripcionals de l'E-cadherina, Slug, els factors bHLH i Zeb1/2. Tots ells poden participar de forma específica en el silenciament de l'E-cadherina en diferents tumors o potser en diferents estadis tumorals. Els mecanismes específics que utilitzen dits repressors per silenciar l'expressió gènica de l'E-cadherina no és encara del tot conegut. Se sap que la repressió del promotor mediada per Snail i Slug implica reclutament d'un complex repressor que conté Histones deacetilases (HDAC) mediat pel domini SNAG (domini repressor de la proteïna Snail). Zeb en comptes del domini SNAG presenta un domini d'interacció amb el corepressor CtBP i és dit corepressor qui forma complexos amb HDAC1 provocant la regulació a la baixa de l'E-cadherina (Revisat per Peinado, 2004a).

Paral·lelament a la repressió transcripcional de l'E-cadherina en en aquelles cèl·lules que necessiten adoptar un fenotip més mòtil, es proposa l'existència d'una modulació dinàmica de l'E-cadherina present en les unions cel·lulars. De fet, s'ha detectat endocitosis constitutiva de diverses cadherines en cèl·lules que aparentment presenten contactes cèl·lula-cèl·lula estables. Els nivells basals de la internalització de les cadherines dependrien del seu "turnover" metabòlic i potser contribuirien al remodelatge local dels contactes. La endocitosi podria ser alterada fisiològica i patològicament en resposta a estímuls externs. (Yap et al., 2007).

La pèrdua d'expressió de l'E-cadherina, no només condueix a la pèrdua de les unions intercel·lulars dependents de calci, sino que promou l'alliberament de la β -catenina de dites unions i al restar lliure pel citoplasma, transloca a nucli i activa la regulació transcripcional vinculada a l'EMT. En cèl·lules de càncer de mama amb l'E-cadherina truncada s'ha demostrat que perque β -catenina vagi a nucli, cal alguna senyal més, independent de la impossibilitat d'ancorar-se a la membrana per unió a la E-cadherina, ja que APC la degrada impeding la seva translocació al nucli (Wetering et al., 2001).

3. SNAIL

3.1. La superfamília Snail; factors de transcripció repressors.

El primer membre de la família Snail, va ser descrit en *Drosophila melanogaster* pel seu paper essencial en el procés de gastrulació (els embrions mutants per snail no gastrulaven correctament i adoptaven forma de cargol). Posteriorment s'han trobat homòlegs de snail en molts organismes evolutivament molt distants i s'han organitzat en una superfamília Snail (fig. I-5).

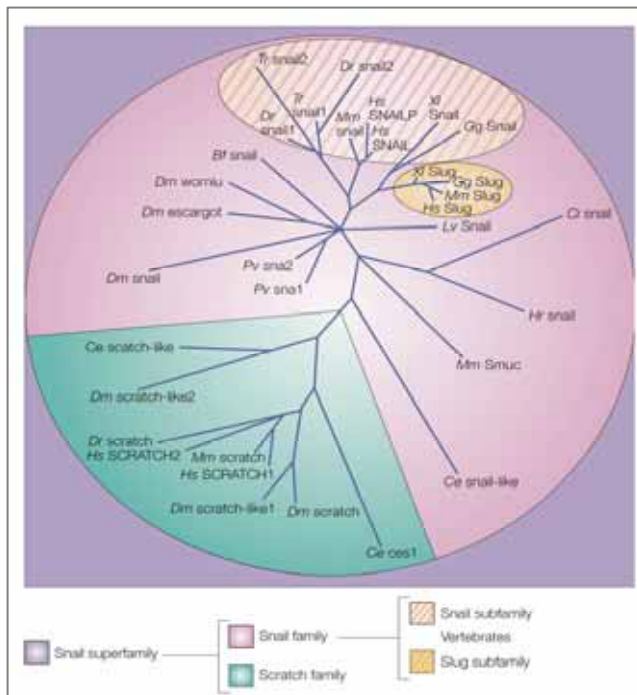


Figura I-5: Arbre filogenètic de la superfamília Snail. Arbre filogenètic de la superfamília Snail. El requadre lila fosc inclou a tots els membres de la superfamília Snail. El fons rosat agrupa als membres de la família Snail mentre que el fons verd destaca els membres de la família Scratch. Les subfamílies de vertebrats Snail i Slug es mostren mitjançant una trama groc clar o groc fort, respectivament. Les espècies mostrades representen membres dels protostomats: *Pv*, *Patella vulgata*; *Ce*, *Caenorhabditis elegans*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; i deuterostomats: *Bf*, *Brachyostoma floridae* (amphioxus); *Ci*, *Ciona intestinalis* i *Hr*, *Holocynthia roretzi* (ascidia); *Dr*, *Danio rerio* (peix zebra); *Gg*, *Gallus gallus*

(pollastre), *Hs*, *Homo sapiens* (home); *Lv*, *Lytechinus variegatus*; *Mm*, *Mus musculus*; *Tr*, *Takifugu rubripes*; *i XI*, *Xenopus laevis*. (Nieto, 2002a)

Es postula que inicialment existia un gen snail ancestral implicat en mobilitat cel·lular (Hemavathy et al., 2000), i que durant la radiació dels metazous per duplicació gènica va aparèixer un nou gen snail que va divergir de l'ancestra assumint noves funcions, i així quedaren establerts snail i scratch. Posteriorment, al llarg de l'evolució es donàren noves duplicacions gèniques que permeteren l'aparició de nous gens, la divisió en subfamílies i la conseqüent participació en nous processos del desenvolupament (Manzanares et al., 2001; Nieto et al., 2002b)

Tots els membres d'aquesta superfamília codifiquen per factors de transcripció de tipus dits de zenc, amb un domini C-terminal d'unió al DNA altament conservat (l'alineament dels dits de zenc reflexa una seqüència consens que permet assignar els membres a la superfamília Snail) i un domini regulador N-terminal més divergent (fig. I- 6).

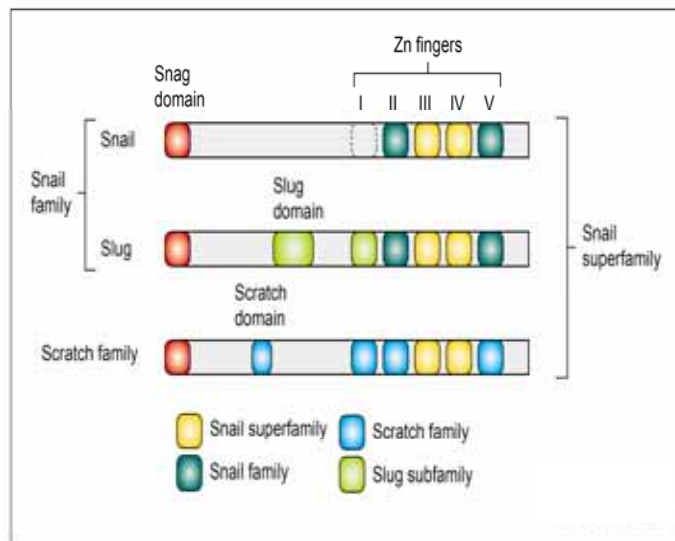


Figura I-6: Dominis funcionals dels membres de la superfamília Snail. Els dits de zenc III i IV són comuns en els 29 membres de la superfamília Snail descrits fins ara (groc). Els dits de zenc II i V permeten diferenciar membres de la família Snail i membres de la família Scratch (verd fosc). En vertebrats, la família Snail es divideix en dos subfamílies, Snail i Slug, per presència o no d'un domini Slug (verd clar). En vertebrats els Scratch també presenten una seqüència consens anomenada domini Scratch (blau). El motiu SNAG (vermell) és comú en tots els membres de la superfamília Snail de vertebrats. (modificada de Manzanares et al., 2001).

El domini C-terminal és la regió conservada que conté 4-5 dits de zenc de tipus C_2H_2 , que reconeixen una seqüència palindròmica de 6 bases 5'-CACCTG-3' (Mauhin et al., 1993), que

es correspon a una caixa-E del tipus E2 a la qual s'hi poden unir també altres factors de transcripció del tipus bHLH.

La meitat N-terminal, molt menys conservada entre els diferents membres de la superfamília Snail, conté diversos motius implicats en la regulació de l'activitat de Snail, la seva localització i la seva estabilitat. Tots els membres de la superfamília, presenten en aquest domini una seqüència repressora de la transcripció que pot ser un motiu SNAG o un lloc d'unió al corepressor CtBP, fet que fa pensar que l'activitat repressora transcripcional de Snail s'ha conservat al llarg de l'evolució. En vertebrats tots els membres de la superfamília Snail presenten aquest motiu SNAG en l'extrem més aminoterminal de la proteïna, que consta de 7 aminoàcids i que exerceix el seu rol de repressor al reclutar les deacetilases d'histones (HDAC1/2) necessàries per inhibir la transcripció gènica (Peinado et al., 2004a). En *Drosophila* i en altres protostomats, en canvi, l'activitat repressora de Snail és mediada per la interacció amb un corepressor CtBP (Manzanares et al., 2001).

Darrerament, s'han trobat altres seqüències reguladores en la meitat N-terminal de la proteïna Snail dels mamífers (fig. I-7): Una regió rica en serines (SD de Serine rich), fosforilable per diverses quinases i una seqüència NES (Nuclear Export Sequence) responsables de l'export nuclear de la proteïna i de la seva estabilitat. Es creu que Snail entraria al nucli gràcies a unes seqüències d'import (NLS) i actuaria com a repressor transcripcional. En determinades condicions CK2 i GSK3 β fosforilarien el domini SD, que facilitaria el desplegament de la proteïna i l'accessibilitat del motiu NES al sistema d'export CRM1/exportina (Domínguez et al., 2003). Snail seria exportat del nucli al citoplasma, on podria ser fosforilat de nou en el domini SD per la GSK3 β , reconegut per β -TrCP i degradat via proteosoma (Zhou et al., 2004) (fig. I-7)

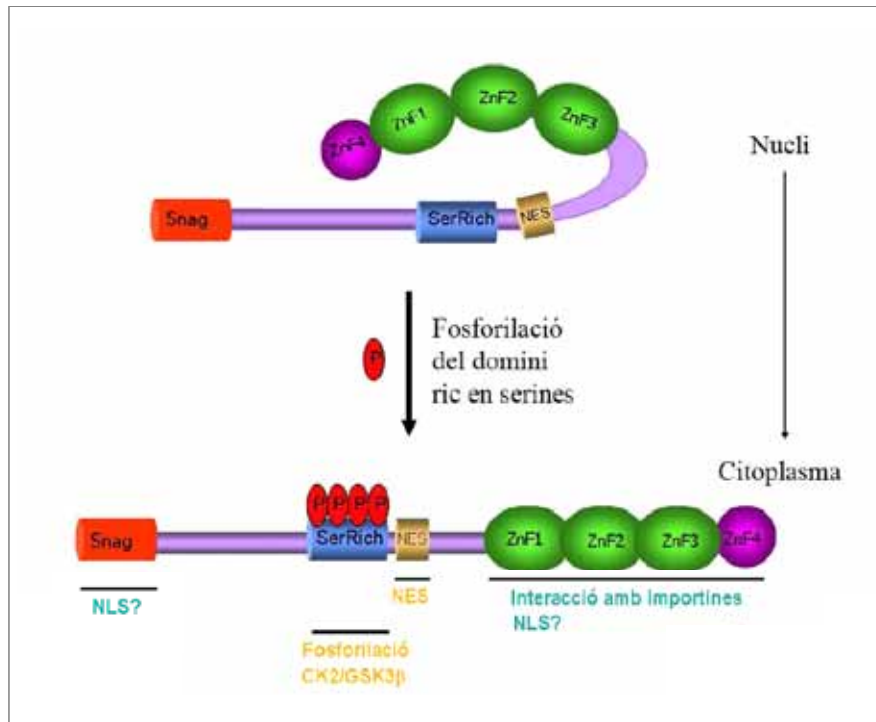


Figura I-7: Model hipotètic d'export nuclear de Snail. Regions implicades. Esquema on es mostra com la fosforilació pot modular l'export nuclear de Snail: La proteïna fosforilada es trobaria plegada sobre si mateixa i emascararia la seqüència d'export (NES). La fosforilació en el domini ric en serines causaria una acumulació de càrrega negativa que donaria lloc a la inestabilització de l'estructura plegada de manera que s'obriria deixant al descobert la seqüència NES permetent així la sortida de la proteïna del nucli al citoplasma. NLS: hipotètiques seqüències d'import del citoplasma al nucli. (modifica de Montserrat, 2006)

3.2. Família Snail: processos on participen

3.2.1. Snail: EMT i moviment cel·lular

En desenvolupament

El primer membre descrit de la família Snail, *Dm Snail*, va ser descrit en *Drosophila melanogaster* on es va veure que era una proteïna essencial per la correcta formació del mesoderm. L'aïllament dels homòlegs de Snail en altres espècies ha confirmat el seu rol en el desenvolupament del mesoderm (Carver et al., 2001), així com en altres processos que requereixen moviments cel·lulars a gran escala, com ara la formació de la cresta neural. Tant el mesoderm com la cresta neural deriven de la delaminació del teixit d'origen (solc primitiu i tub neural respectivament) i de la posterior migració cap a noves regions de l'embrió on s'establiran i formaran noves estructures, processos que es donen gràcies a una EMT.

De fet, Snail s'expressa en tots els processos EMT estudiats, tant en els que cal generar una EMT completa, com en els que no. En el procés de gastrulació dels amniotes, les cèl·lules

del mesoderm prospectiu es delaminen i migren individualment gràcies a una EMT complerta. En canvi, en el procés de gastrulació de *Drosophila* les cèl·lules que formaran el mesoderm migren en grup, mantinguent certs contactes entre elles; disminueixen les unions cèl·lula-cèl·lula, però es mantenen agrupades a causa d'un canvi en l'expressió de l'E-cadherina per N-cadherina. En aquest cas, la EMT és incomplerta, però Snail segueix sent necessari perquè es dongui el moviment cel·lular (Oda et al., 1998). En organismes diblàstics, Snail s'expressa en l'endoderm que es forma per invaginació de l'ectoderm i en certs moluscs els homòlegs de Snail s'expressen en els teixits ectodèrmics que patiran canvis de forma cel·lular i moviments morfogènics (revisat per Barrallo-Gimeno et al., 2005). Així doncs, s'està tendint a pensar que els membres de la família Snail regulen l'adhesió i el moviment cel·lular, més que no pas el destí de les cèl·lules i que engagar la EMT és un dels mecanismes que tenen aquests factors de transcripció per promoure aquest moviment cel·lular.

En processos patològics

La funció més conservada de les proteïnes Snail, és la del control de la mobilitat cel·lular. El càncer és una conseqüència de la desdiferenciació incontrolada i de canvis en les propietats d'adhesió i en la capacitat invasiva d'un grup de cèl·lules. Era esperable, doncs, que Snail jugués un paper en la progressió tumoral.

Des que es va veure que Snail s'expressava en línies cel·lulars de carcinoma humà i de ratolí i en tumors primaris invasius, on l'expressió de Snail es correlacionava amb una baixa expressió de l'E-cadherina i amb l'adquisició de fenotip migratori i invasiu (Batlle et al., 2000 i Cano et al., 2000), s'ha detectat la seva expressió en molts tumors i en línies cel·lulars derivades, juntament amb altres factors de transcripció que reprimeixen el promotor de l'E-cadherina, com Slug, ZEB1/2 i factors del tipus bHLH (revisat per Peinado, 2007). Tumors gàstrics (Peña et al., 2005), carcinomes de mama i d'ovari (Elloul et al., 2005), carcinomes hepàtics (Miyoshi et al., 2005) i melanomes són alguns dels tumors on s'ha detectat una correlació clara entre la davallada de l'E-cadherina i l'expressió de Snail. Dita correlació fins ara observada a nivell de mRNA comença a ser confirmada a nivell de proteïna (Franci et al., 2006).

La downregulació de l'E-cadherina en els carcinomes és un aconteixament dinàmic, és a dir, en certs processos les cèl·lules epitelials pateixen una EMT i perden l'E-cadherina i la tornen a recuperar quan els llinatges epitelials de les capes mesodèrmiques s'estableixen. Dita reconversió MET es dona en diferents estadis morfogènics del desenvolupament i també en cèl·lules tumorals que volen establir-se com a tumor secundari (Thiery et al., 2003; Conacci-Sorrell et al., 2003). Això suggereix que l'adquisició de característiques invasives requereix una ràpida i efectiva repressió de l'E-cadherina mediada per Snail que s'estabilitzaria al nucli

raera la inhibició de la GSK3 β . Dita inhibició seria duta a terme per les senyals oncogèniques inductores de la EMT (PI3K/Akt; MAPK i Wnt) que a l'inhibir GSK3 β , no només estabilitzarien Snail, sino també la β -catenina, que aniria a nucli i activaria la transcripció gènica de totes aquelles proteïnes implicades en migració i oncogènesi. En l'establiment del carcinoma secundari, caldria degradar Snail via GSK3 β per expressar de nou gens epitelials implicats en les unions intercel·lulars (Zhou et al., 2004; Schlessinger et al., 2004). De fet, certs estudis indiquen que Snail és un marcador primerenc de la EMT implicat en el fenotip migratori inicial dels tumors primaris (Franci et al., 2006), però que els responsables de mantenir les propietats tumorals podrien ser altres repressors transcripcionals implicats en els mateixos processos, com Slug (Bolós et al., 2002), ZEB1/2 (Guaita et al., 2002) i Twist/E47 (fig. I-8).

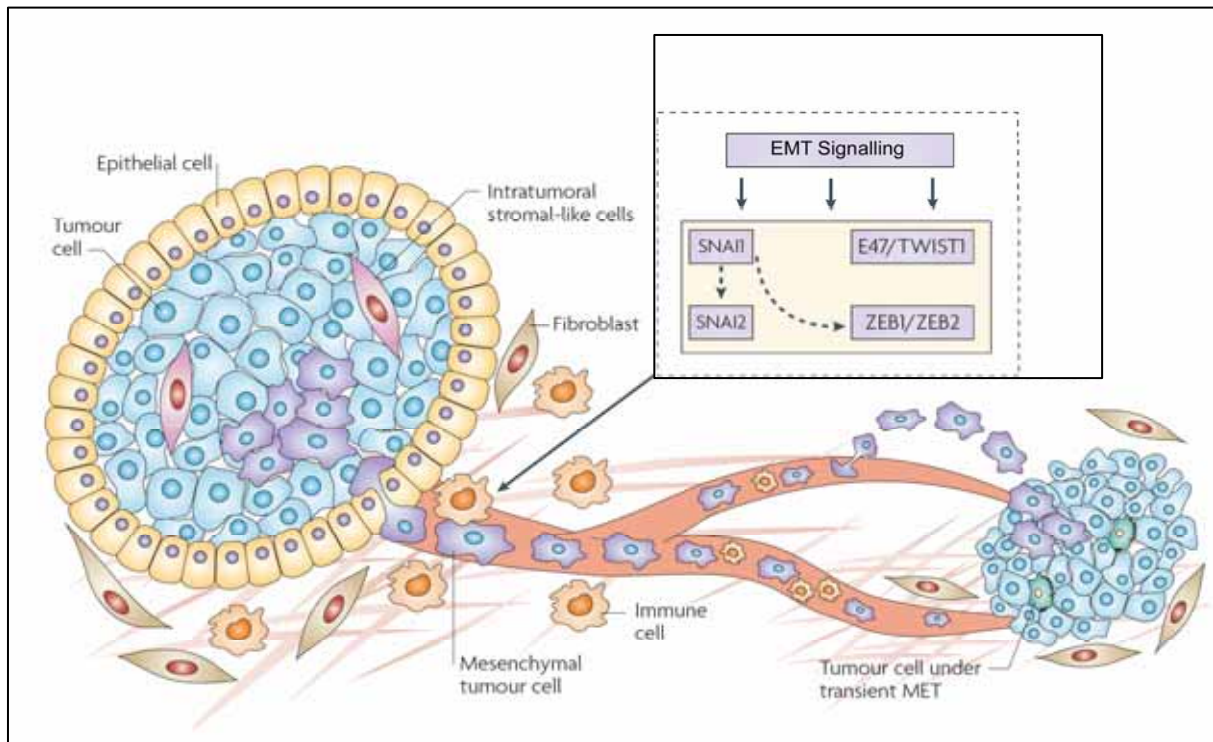


Figura I-8. Esquema de la interrelació dels repressors de l'E-cadherina i el microambient durant la progressió tumoral. Snail (SNAI1) podria estar implicat en el fenotip migratori inicial, actuant com a marcador primerenc de la EMT i a vegades contribuir a la inducció d'altres factors. En contraposició, Slug(SNAI2), ZEB1, ZEB2 i/o TWIST podrien ser responsables de mantenir les característiques migratòries i malignes (modificada de Peinado, 2007).

EMT i Snail: Senyals inductores

Les vies de senyalització inductores de l'EMT (apartat 2.3.1, figura I-3) convergeixen en la inducció de l'expressió dels membres de la família Snail, tant en els processos EMT implicats en desenvolupament, com en els processos EMT implicats en progressió tumoral.

Hi ha molts estudis tant *in vivo* com *in vitro* que demostren com diferents senyals inductores de l'EMT indueixen l'expressió dels membres de la família Snail (fig. I-9): TGFβ1 indueix l'expressió de Snail durant la formació del paladar en mamífers (Martínez-Álvarez et al., 2003), en hepatòcits de rata (Valdés et al., 2002) i en cèl·lules epitelials en cultiu, induint una EMT (Peinado et al., 2003); Les BMPs indueixen l'expressió de Slug en la cresta neural de *Xenopus* i peix zebra (LaBonne et al., 1998). El factor FGF indueix Slug en certs carcinomes i ratolins amb el FGFR mutat no gastrulen correctament perquè no expresen Snail en el solc primitiu (Ciruna et al., 2001); L'activació de la via β-catenina/TCF rera l'activació de la via Wnt, promou l'activació de Slug en cèl·lules tumorals de còlon (Conacci-Sorrell et al., 2003) i en la cresta neural de *Xenopus* (Vallin et al., 2001); ILK indueix l'expressió de Snail en carcinomes de colon humà (Oloumi et al., 2003).

Així doncs, veiem que diferents vies convergeixen en que Snail engegi l'EMT, situant-lo en una posició central en dit procés de transició. Cal una estricta regulació de l'expressió gènica per induir la EMT i mantenir el fenotip migratori i per tant és essencial la cooperació entre les diferents casacades de senyal. Es postula un model interessant que integra les diferents vies de senyalització: membres de la família TGF-β/BMP activarien els gens Snail, els nivells dels quals serien mantinguts per la via FGF. Snail mantindria la downregulació de l'E-cadherina fet que permetria que la β-catenina estabilitzada per inducció de la via Wnt anés al nucli i s'unís als les proteïnes TCF/LEF-1 i activés la transcripció gènica (revisat per Nieto, 2002a).

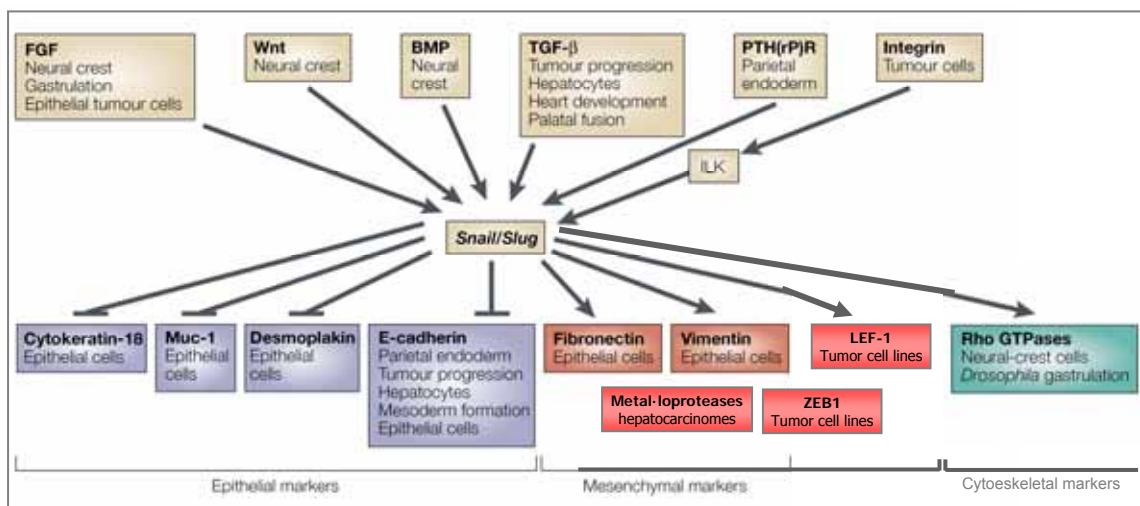


Figura I-9: Senyals inductores i dianes moleculars de Snail en els processos EMT. Diferents molècules senyal es troben implicades en l'activació de gens Snail en diversos processos que condueixen a la conversió de cèl·lules epitelials en cèl·lules mesenquimals. Diverses aproximacions *in vivo* i *in vitro* apunten cap a series de gens diana que estan directament o indirecta regulats per aquests factors de transcripció. *BMP*, proteïna morfogenètica de l'ós; *FGF*, factor de creixement de fibroblast; *ILK*, quinasa unida a integrina; *PTH(rP)R*, receptor de pèptid vinculat a la hormona paratiroidèica; *TGF-β*, factor de creixement β transformant. (Modificada de Nieto, 2002).

Dianes moleculars de Snail en els processos EMT

E-cadherina: És la diana “estrella”, pel seu paper crucial en les unions cel·lulars i per tant en els processos EMT, i per ser diana directe del factor de transcripció Snail, el qual s'uneix directament a les caixes E-box presents en el promotor d'aquesta cadherina i en reprimeix la transcripció mitjançant la interacció amb les deacetilases d'histones (veure apartats 2.3.2 i 3.1).

Tot i que hi ha estudis que defensen que la pèdua d'expressió de l'E-cadherina és suficient per induir EMT i metàstasi (Perl et al., 1998; Vleminckx et al., 1991), actualment es tendeix a pensar que que dita pèdua és necessària, però no suficient (Navarro et al., 2003; Yang et al., 2004) i que Snail ha de tenir dianes addicionals independents de l'E-cadherina (fig. I-9). Estudis on s'ha expressat ectòpicament Snail en cèl·lules epitelials i s'ha induït una EMT completa, s'ha vist que a més a més de reprimir l'E-cadherina, Snail és capaç de reprimir directament la transcripció d'altres marcadors epitelials per unió a les caixes E-box presents en el promotor: MUC-1 (mucina epitelial, glicoproteïna associada a la membrana cel·lular), Citoqueratina-18 (forma els filaments intermedis del citoesquelet) (Guaita et al., 2002) i la desmoplaquina (cadherina desmosomal) (Cano et al., 2000) en són alguns exemples. L'expressió de Snail, també induïx l'expressió de gens mesenquimals. Els nivells de missatge de la vimentina (forma els filaments intermedis del citoesquelet), la fibronectina (component de la ECM), LEF-1 i ZEB1 incrementen rera l'expressió de Snail. Un treball fet en el nostre grup demostra que la baixada d'E-cadherina és necessària per l'expressió d'aquests gens, ja que permet que la β -catenina i NF- κ B s'alliberin de les unions adherents i puguin translocar al nucli i activar la transcripció dels gens mesenquimals (Solanas et al., 2008)

RhoB (membre de la família de les Rho-GTPases), implicada en el remodelatge del citoesquelet d'actina durant la gastrulació i la delaminació de la cresta neural en el desenvolupament embrionari de pollastre, també sembla ser upregulada per Snail (Del Barrio et al., 2002).

Les metal·loproteïnases de matriu (MMP) són una família d'enzims dependents de zinc i calci, que degraden la matriu extracel·lular per tal de fer possible la progressió tumoral. En línies cel·lulars de carcinoma hepatocel·lular (HCC), s'ha trobat que els nivells de certes MMP incrementen rera l'expressió de Snail, fet que causaria la invasió vascular i la metàstasi intrahepàtica en els tumors primaris de HCC (Miyoshi et al., 2005). En carcinomes metastàsics d'ovari, Slug també induïria l'expressió de MMP-2 (Elloul et al., 2004).

3.2.2. Snail: supervivència cel·lular

La EMT és el resultat d'alteracions dramàtiques en la morfologia cel·lular i en les interaccions de les cèl·lules amb l'ambient. Sobreviure en dites condicions és fonamental i requereix desenvolupar resistències a la mort cel·lular. Hi ha evidències que membres de la superfamília Snail ofereixen protecció a la mort cel·lular i confereixen una ventatja selectiva a les cèl·lules invasives a migrar a través de territoris hostils. Aquesta resistència a la mort cel·lular és essencial en els embrions perquè les cèl·lules migradores arribin al seu destí i també en les cèl·lules malignes de l'adult per disseminar-se i formar metàstasi.

En desenvolupament

La repressió de l'homòleg de Scratch en *C.elegans* promou la mort fisiològica d'un tipus particular de neurones. Snail media la supervivència cel·lular durant l'emigració de les cèl·lules de la cresta neural o la downregulació de Slug en certes zones on cal induir mort cel·lular en desenvolupament de pollastre, són alguns dels exemples on s'ha vinculat algun membre de la superfamília Snail en supervivència cel·lular durant processos del desenvolupament embrionari (revisat per Nieto, 2002)

En processos patològics

En alguns processos tumorals també s'ha pogut establir aquesta relació, per exemple, en carcinoma de mama humà, s'ha confirmat que l'expressió ectòpica de Snail o Slug indueixen una resistència a la mort cel·lular per apoptosi generada per un agent quimioterapèutic que causa dany al DNA. Quan s'analitzen les vies apoptòtiques troben que quan s'expressa Snail es downregulen gens amb rol conegut en la mort cel·lular programada, com per exemple p53, conegut supressor de tumors com a resposta al dany del DNA, que resulta ser una diana directa de Snail (Kajita et al., 2004). En leucèmia, Slug és upregulada i antagonitza l'apoptosi mediada per p53, provocant una supervivència cel·lular patològica (Wu et al., 2005).

Altres treballs han demostrat que al retirar de factors de creixement del medi, Snail indueix l'activació de la via PI3K/Akt que confereix resistència a la mort cel·lular (Vega et al., 2004). Un treball recent del nostre grup, demostra que en el mateix model cel·lular, però induint apoptosi rera el tractament amb radiació gamma, Snail s'uneix al promotor de PTEN i en reprimeix la transcripció, permetent que hi hagi més activitat Akt i una major resistència a l'apoptosi (Escrivà et al., 2008).

4. SNAIL I CICLE CEL·LULAR

Aquesta família de repressors transcripcionals és principalment coneguda pel rol que tenen els seus membres en els processos d'adhesió i moviment cel·lular, possiblement funcions ancestrals d'aquesta família. No obstant, alguns dels membres de la família Snail han assumit rols relacionats amb el control de cicle cel·lular en certs episodis del desenvolupament embrionari. Alguns d'aquests rols estan estretament vinculats als processos de EMT, d'altres com l'endoreduplicació, no.

4.1. Rol inhibidor de l'endoreduplicació

En la majoria de cèl·lules somàtiques la ploidia de la progènie es manté per un estret control en l'alternància de la replicació del DNA i la mitosi. No obstant, la poliploidització es dona en diferents tipus cel·lulars per formar part del seu programa de diferenciació fisiològica. L'endoreduplicació constitueix una estratègia que permet a la cèl·lula continuar fent les seves funcions específiques sense deixar de créixer, ja que no requereix desensamblatge de les membranes ni reorganització del citoesquelet ni dels contactes (Zybina et al., 2005). La podem trobar sovint en cèl·lules diferenciades que requereixen un metabolisme molt actiu (Edgar et al., 2001).

Tant en *Drosophila* com en ratolí, membres de la família Snail bloquegen la poliploidització per un mecanisme fins el moment poc definit (fig. I-10).

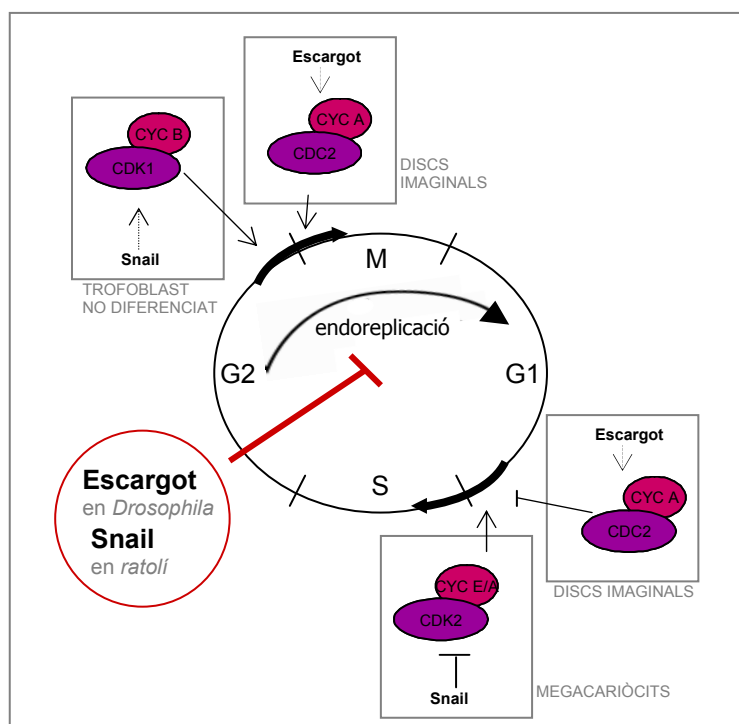


Figura I-10: Rol inhibidor de membres de la família Snail en el procés d'endoreduplicació. Escargot en els discs imaginals de *Drosophila* i Snail en trofoblast de ratolí, mantindrien elevats els nivells dels complexos CDK-ciclina implicats en la transició G2/M, per evitar l'entrada prematura en la fase S. En megacariòcits es postula que Snail no actuaria activant la maquinària G2/M, sino bloquejant la maquinària G1/S.

En *Drosophila* Escargot manté elevats nivells de Cdc2-Ciclina per bloquejar l'endoreduplicació.

Les cèl·lules presents en l'estadi larvari de *Drosophila* pateixen una sèrie temporal i espaiament ordenada d'endocicles per formar cromosomes politènics, de manera que el creixement larvari es du a terme sense mitosis. Durant el procés de metamorfosi, les cèl·lules poliploids de la larva moren i són reemplaçades per un grup de cèl·lules imaginals i diploids que expressen Escargot. Aquest factor de transcripció de la família Snail regula la transcripció dels gens que controlen l'entrada a l'endoreduplicació per tal de mantenir la diploidia d'aquestes cèl·lules que hauran de proliferar i diferenciar-se per formar els teixits adults (Fuse et al., 1994).

L'estudi d'embrions mutants de *Drosophila* ha permès establir una relació entre Escargot i les proteïnes reguladores del cicle cel·lular Cdc2 (Cdk1), CiclinaA (CycA) i E2F en el control de l'endoreduplicació: les cèl·lules en condicions de cicle normals no entren de nou en la fase de síntesi de DNA (fase S) fins que no han completat la mitosi, ja que d'aquesta manera asseguren transmetre la informació genètica completa al llarg del creixement cel·lular. L'entrada a la mitosi es donaria rera l'activació del complexe Cdc2-CycA per la fosfatasa String (Cdc25) que a l'hora bloquejaria l'entrada a la fase de síntesi, tot inhibint l'activitat de E2F, factor de transcripció dels gens implicats en l'entrada a la fase S (Hayashi et al., 1999). Els nivells elevats del complexe Cdc2-CycA en G2 serien mantinguts per Escargot per tal d'inhibir l'endoreduplicació en les cèl·lules imaginals diploids que substitueixen les cèl·lules larvàries poliploids (Hayashi et al., 1996) (fig. I-10).

En trofoblast de ratolí Snail manté una elevada activitat Cdk1-ciclina per bloquejar l'endoreduplicació.

La diferenciació de les cèl·lules gegants trofoblàstiques de la placenta de ratolí, va acompanyada d'una sortida del cicle cel·lular mitòtic i d'una entrada a un cicle endoreplicatiu en el qual es trenca l'alternància de síntesi de DNA i mitosi i les cèl·lules esdevenen poliploids. La transició des de cicle cel·lular mitòtic a endocicles implica canvis severos en els punts de control del cicle cel·lular. Quan les cèl·lules gegants s'han compromès a diferenciar-se, s'inhibeix l'activitat Cdk1, fent que les cèl·lules quedin arrestades en G2. Després, l'activitat Cdk2-CycE indueix l'entrada a la fase S i Cdk2-CycA la completen. Rera el primer endocicle, CycB, CycE i CycA es degraden i només la CycE i la CycA se sintetitzen de nou en l'entrada en un nou cicle endoreduplicatiu. El pas de cicle mitòtic a endocicle es

pensa que depèn de l'activitat Cdk1-CycB bloquejada en la G2 i causant per tant d'una no entrada a mitosi i d'una entrada a fase S. Es postula que Snail juga un paper capdal en aquest pas, ja que els nivells de Snail són elevats en cèl·lules gegants proliferatives (fan cicles mitòtics) i inexistentes en cèl·lules gegants diferenciades (endociclen) i que la sobreexpressió de Snail impedeix l'entrada a endociclar en dites cèl·lules fent que es mantinguin en estadi proliferatiu de diploidia. Es creu que Snail inhibiria la transcripció dels gens implicats en promoure la transició a endociclar (els mutants que no tenen activitat repressora de la transcripció no poden bloquejar l'endoreduplicació). Aquesta repressió transcripcional exercida per Snail, faria incrementar l'activitat Cdk1 associada a G2/M, probablement incrementant els nivells de ciclines G2 (CycA i CycB) (Nakatama et al., 1998) (fig. I-10).

En megacariòcits Snail podria bloquejar l'activitat Cdk2-ciclina impedit l'endoreduplicació.

Els megacariòcits, cèl·lules sanguínies especialitzades en la producció de plaquetes, en l'estadi final de maduració aturen la proliferació i entren repetides vegades a la fase S sense completar l'anafase mitòtica i esdevenint poliploids. Aquesta transició induïda per la citoquina trombopoietina permet que incrementi la mida dels megacariòcits i la seva habilitat de produir plaquetes.

No es coneixen amb precisió els mecanismes moleculars que controlen aquesta transició de cicle mitòtic a endoreduplicació. Hi ha grups de recerca que postulen que és la maquinària reguladora G1/S la que controlaria l'entrada a la poliploidització (Ballester et al., 2001) mentre que altres grups defensen que el punt de control estaria en la fase G2/M (Nagata et al., 1997). Fins el moment però, s'ha vist que les cèl·lules megacarioblàstiques HEL poliploiditzen rera la inducció de la diferenciació amb ésters de forbol, incrementant l'activitat Cdk2 necessària per l'entrada a la fase S. Quan aquestes cèl·lules expressen alts nivells de Escargot o Snail ectòpic, deixen de poliploiditzar a l'hora que disminueix l'activitat Cdk2 i els nivells de ciclines associades (CycE i CycA) (Ballester et al., 2001) (fig. I-10).

4.2. ROL ACTIVADOR DE LA DIVISIÓ ASSIMÈTRICA EN EL PROCÉS DE NEUROGÈNESI DE *Drosophila*

Els neuroblasts de *Drosophila* són els precursors del SNC i sorgeixen de la delaminació de les cèl·lules epitelials polaritzades (neuroectoderm) durant el desenvolupament embrionari. Rera l'abandonament de l'epiteli, els neuroblasts es divideixen asimètricament al llarg de l'eix apical/basal donant lloc a dos tipus cel·lulars polaritzats: una cèl·lula GMC (Ganglion

Mother Cell) que es dividirà un cop més per donar dues neurones, i una nova cèl·lula neuroblàstica que continuarà dividint-se asimètricament.

Inscutable sembla ser una de les proteïnes claus del procés. Durant la delaminació dels neuroblasts, Inscutable s'acumula en la zona de contacte i s'exten per la zona apical d'aquesta cèl·lula. Aquesta expressió es manté durant la major part d'aquesta primera mitosi fins que desapareix en la telofase. Si no hi ha Inscutable els fusos mitòtics dels neuroblasts acabats de delaminar no s'orienten correctament. La localització apical de Inscutable requereix de la colocalització amb la proteïna Bazooka, ja expressada en les cèl·lules epitelials (fig. I-11). Bazooka és l'ortòleg de *Drosophila* de les proteïnes PAR. En vertebrats, les proteïnes PAR es localitzen en les unions estretes i estan implicades en la polaritat de les cèl·lules epitelials unint-se a GTPases reguladores del citoesquelet d'actina (Revisat per Knoblich, 2001).

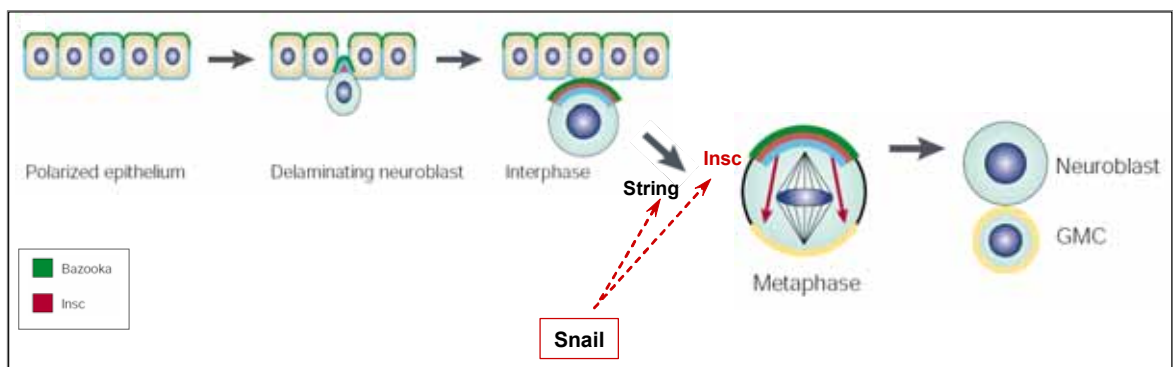


Figura I-11: Procés de divisió asimètrica en neuroblasts de *Drosophila*. Els neuroblasts de *Drosophila* delaminen de l'epiteli polaritzat i es divideixen asimètricament al llarg de l'eix apical-basal. Inscutable és essencial per l'orientació del fus mitòtic, directament relacionat amb la correcta divisió asimètrica. String és essencial per l'entrada a la Mitosi. Ambdues proteïnes requereixen activitat repressora transcripcional dels membres de la família Snail per ser expressades. (modificada de Knoblich, 2001).

Snail, Escargot i Worniu, són els membres de la família Snail implicats en el procés de neurogènesi de *Drosophila* on presenten una redundància funcional. Tots tres gens s'expressen en els neuroblasts i els embrions *sna esg wor* (presenten deletada la regió cromosòmica que conté els tres gens) pateixen defectes severos en el desenvolupament neural (Ashraf et al., 1999) (Cai et al., 2001). Aquests defectes estan relacionats amb una davallada en l'expressió de dos gens, Inscutable que és essencial per la correcta segregació dels components citoplasmàtics i String que és essencial per engegar la maquinària de cicle cel·lular, encarregada d'activar la transició G2-M rera la delaminació dels neuroblast. La presència de Inscutable i String és dependent de la funció repressora transcripcional dels membres de la família Snail (els triples mutants *sna esg wor* pel motiu d'unió al corepressor CtBP presenten els mateixos defectes en neurogènesi que els mutants complets) però el mecanisme pel qual Snail faria incrementar l'expressió de String i Inscutable a nivell de

mRNA és desconeguda. Es pensa que Snail regula altres gens implicats en la divisió asimètrica (el fenotip *insc* és menys agressiu que el fenotip *sna esg wor*) i que String està regulada per altres gens a part de Snail (el fenotip *string* pot ser només parcialment rescatat per membres de la família Snail) (Ashraf et al., 2001).

En vertebrats, l'únic membre de la família Snail que participa en neurogènesi és Scratch, però no en el procés de proliferació com els membres Snail de *Drosophila*, sino en el procés de diferenciació neuronal (Nakakura et al., 2001).

4.3. ROL INHIBIDOR DE CICLE CEL·LULAR EN PROCESSOS EMT

Durant el desenvolupament embrionari les cèl·lules del mesoderm i de la cresta neural han de delaminar-se del teixit original, solc primitiu i tub neural respectivament i migrar cap a diferents regions de l'embrió per contribuir a la formació de múltiples estructures. La delaminació és mediada per processos EMT que converteixen les cèl·lules epitelials en cèl·lules mesenquimals que migren a través de la matriu extracel·lular. L'estadi del cicle cel·lular en el que es trobin les cèl·lules podria condicionar el procés de migració, establint un vincle entre ambdós processos.

Els membres de la família Snail, concretament Snail i Slug, tenen un paper important en especificar mesoderm i cresta neural i en promoure la Transició Epiteli-Mesènquima en aquests teixits embrionaris per tal de fer possible la seva migració (fig. I-12) (revisat per Nieto, 2002a). El primer indici que aquesta família gènica estava implicada en processos EMT va ser la no delaminació del mesoderm ni de les cèl·lules de la cresta neural (NCC, de "Neural Crest Cells") rera la incubació del blastoderm de pollastre amb un oligonucleòtid antisentit de Slug (Nieto et al., 1994).

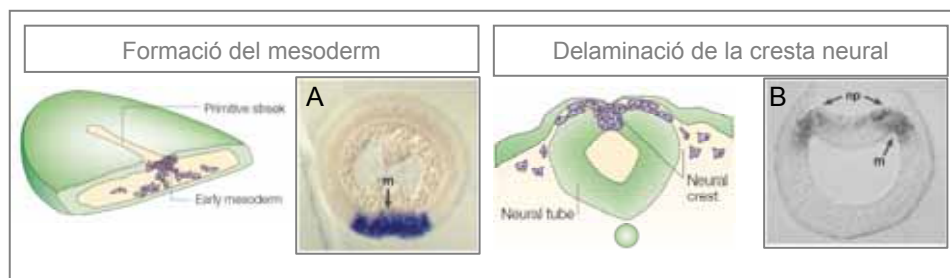


Figura I-12: Delaminació de les cèl·lules de la cresta neural i del mesoderm durant el desenvolupament embrionari, per un procés EMT: A: Expressió de Snail (blau) en els precursors del mesoderm de *Drosophila*. **B:** Expressió de Snail en els marges de la placa neural en *Amphioxus*. *m*: mesoderm; *np*; placa neural. (modificada de Nieto, 2002a)

4.3.1. Snail i Slug participen en el processos de determinació i delaminació de les cèl·lules de la cresta neural, però no s'ha descrit que participin en el control del cicle cel·lular d'aquestes cèl·lules.

Les cèl·lules de la cresta neural (NCC) són una població transitòria i versàtil de cèl·lules derivades del tub neural en els embrions de vertebrats. La seva ontogènia és un procés morfogènètic complex que implica l'especificació dels precursors NCC i l'adquisició de propietats premigradores, la delaminació de les NCC del tub neural dorsal gràcies a una EMT i la migració de dites cèl·lules cap a la perifèria on es diferenciaran en múltiples tipus cel·lulars.

El procés de determinació i delaminació de les NCC, sembla ser diferent en les regions cranial i troncal del tub neural. Tant la determinació com la delaminació de les NCC troncal en embrions de pollastre semblen ser mediades per un balanç BMP4/Noggin. BMP4 es distribueix uniformament per tot el tub neural dorsal, mentre que Noggin, el seu inhibidor, s'expressa seguint un gradient que determinarà el "pool" de cèl·lules de la cresta que delaminaran. Si es bloqueja la BMP4 no es dona el procés i les cèl·lules precursors NCC s'acumulen al tub (SeLa-Donenfeld et al., 1999). RhoB (GTPasa expressada en els precursors NCC), seria un dels efectors downstream de BMP (SeLa-Donenfeld et al., 1999) o de SoxE, una altra família de proteïnes que s'ha descrit que poden participar en la determinació NCC de pollastre (Cheung et al., 2005). Slug sembla tenir un rol en el procés de delaminació de les NCC troncal de pollastre, però no sembla ser suficient ja que quan inhibeixen BMP4, es bloqueja la delaminació i baixen els nivells de RhoB, però en canvi els nivells de Slug es mantenen (SeLa-Donenfeld et al., 1999) possiblement perquè Slug necessita actuar conjuntament amb altres factors downstream de BMP4.

Slug participa tant en la determinació com en la delaminació de les NCC cranial d'embrions de pollastre. La sobreexpressió de Slug en embrions, provoca un increment en el nombre de cèl·lules que expressen els marcadors NCC: HNK1, RhoB, cadherina 6B i Pax3 (Del Barrio et al., 2002). En *Xenopus*, XSlug també participa en l'establiment dels precursors de la cresta neural i en la seva posterior migració (LaBonne et al., 2000).

En el tronc, les cèl·lules NCC migren individualment i en fase S i el bloqueig de la transició G1-S inhibeix la delaminació. Es postula que en dita fase, el nucli cel·lular es posiciona en la cara basal del neuroepiteli facilitant així la sortida de les cèl·lules (fig. I-13) (Burstin-Cohen et al., 2002), o que és en dita fase, quan la cromatina ha perdut l'organització, els promotors dels gens implicats en el procés de delaminació (dianes BMP, Wnt i FGF) estan accessibles i permeten la seva transcripció (Théveneau et al., 2007). En el crani, les cèl·lules NCC migren massivament en grup, i ho fan de forma independent a l'etapa del cicle cel·lular en el que es troben. Dites cèl·lules expressen ETS1, un factor de transcripció que s'expressa

durant l'embriogènesi en diversos tipus cel·lulars que es mouen, i postulen que possiblement ETS1 induiria la transcripció dels gens implicats en la delaminació, conjuntament amb Slug. (quan les NCC troncales expresen ETS1 erròniament, delaminen independentment de l'etapa S) (Théveneau et al., 2007).

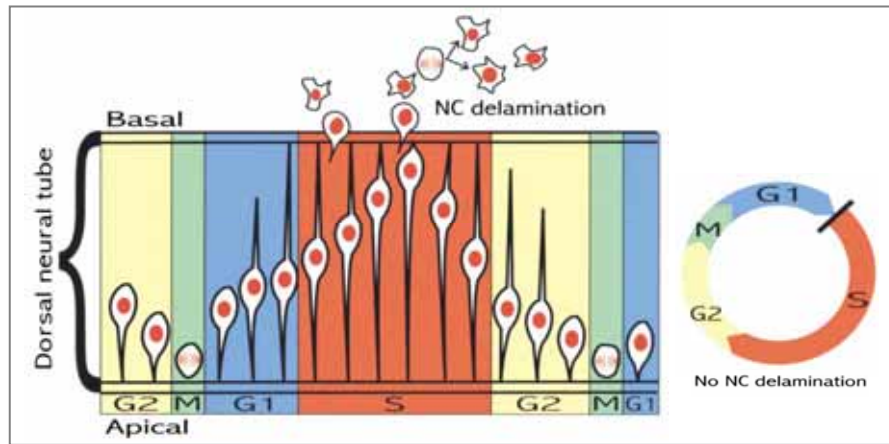


Figura I-13: Delaminació de les NCC troncales en el contexte del cicle cel·lular en el neuroepiteli. Les cèl·lules NCC troncales delaminen del tub neural durant la fase S quan els nuclis estan propers als marges de l'epiteli i continuen proliferant durant el procés de migració. La transició G1/S és necessària perquè es dongui la delaminació. La inhibició específica amb bloquejants G1/S, però no S ni G2, prevé la mesenquimalització de les cèl·lules NCC premigradores (Burstin-Cohen et al., 2002).

4.3.2. Snail juga un paper essencial en el procés de gastrulació, induïnt fenotip migrador i a l'hora bloquejant la mitosi

La gastrulació és el primer procés morfològic del desenvolupament embrionari. Rera la fertilització, ràpides divisions cel·lulars permeten la formació d'una blàstula multicel·lular. Grups de cèl·lules migraran cap a noves regions de l'embrió durant l'anomenat procés de gastrulació, en el qual quedaran determinats els tres teixits embrionaris: l'ectoderm, el mesoderm i l'endoderm (fig. I-14). Tant en *Drosophila* (Leptin et al., 1990) com en ratolí (Carver et al., 2001) Snail és un factor clau en el procés de gastrulació ja que els embrions mutants *sna* no gastrulen correctament i esdevenen inviables.

En ratolí la via de senyalització FGF juga un rol crucial en el procés de gastrulació. Fgf8 i el seu receptor Fgfr1 són essencials per l'especificació del mesoderm i la seva internalització (implica EMT de les cèl·lules epitelials que adopten fenotip mesenquimal i migren individualment). Embrions *Fgfr1^{-/-}* o *Fgf8^{-/-}* mostren defectes similars en la gastrulació: es redueixen els teixits derivats del mesoderm i l'endoderm possiblement a causa de la no migració de les cèl·lules progenitores des del solc primitiu (revisat per Solnica-Krezel, 2005). FGF promou la EMT regulant positivament l'expressió de Snail, que downregula l'E-cadherina (Ciruna, 2001). En embrions *Sna^{-/-}* el mesoderm és morfològicament anormal ja que al no ser downregulada l'E-cadherina les cèl·lules del mesoderm prospectiu retenen

característiques epitelials (Carver et al., 2001). Els defectes en gastrulació observats en els embrions *Sna^{-/-}* comparats amb els embrions deficients en FGF suggereixen que el programa morfogenètic mediat per FGF és executat per factors addicionals a Snail. De fet, els embrions *Fgfr1^{-/-}* també presenten menys expressió del gens *Tbx6* i *T/Brachyury* implicats en el moviment del mesoderm, i es creu que l'expressió d'aquests gens T-box és indirectament regulada per *Fgfr1* a través de la interacció amb la via *Wnt/β-catenina* (Ciruna et al., 2001).

En *Drosophila* *Twist* i *Snail* són claus en diverses etapes del procés de gastrulació: Dorsal d'origen matern activa la transcripció d'aquests dos gens zigòtics en la regió ventral de la blàstula, el primordi mesodèrmic. *Twist* mantindrà l'expressió elevada de *Snail*, per tal que es donguin els canvis de forma cel·lulars necessaris perque es formi el solc ventral i el primordi mesodèrmic s'invagini (revisat per Leptin, 1999; Seher et al. 2007). L'activació de les RhoGTPases implicades en els canvis de forma cel·lular depenents d'actina i miosina, i el control de la quantitat i la localització subcel·lular de les unions adherents (depenents de E-cadherina i β-catenina) són crucials pel procés d'invaginació del mesoderm prospectiu (Oda et al., 1998; revisat per Ip, 2002). Rera la invaginació, les cèl·lules pateixen una EMT i l'E-cadherina deixa d'expressar-se completament, deixant lloc a la N-cadherina, activada per *Twist* (Oda et al., 1998; Shook et al., 2003), que també induirà expressió de *String* fent que les cèl·lules entrin en Mitosi i de *heartless* i *dof/hbr*, necessaris per la migració que tancarà la fase de gastrulació (revisat per Leptin, 1999).

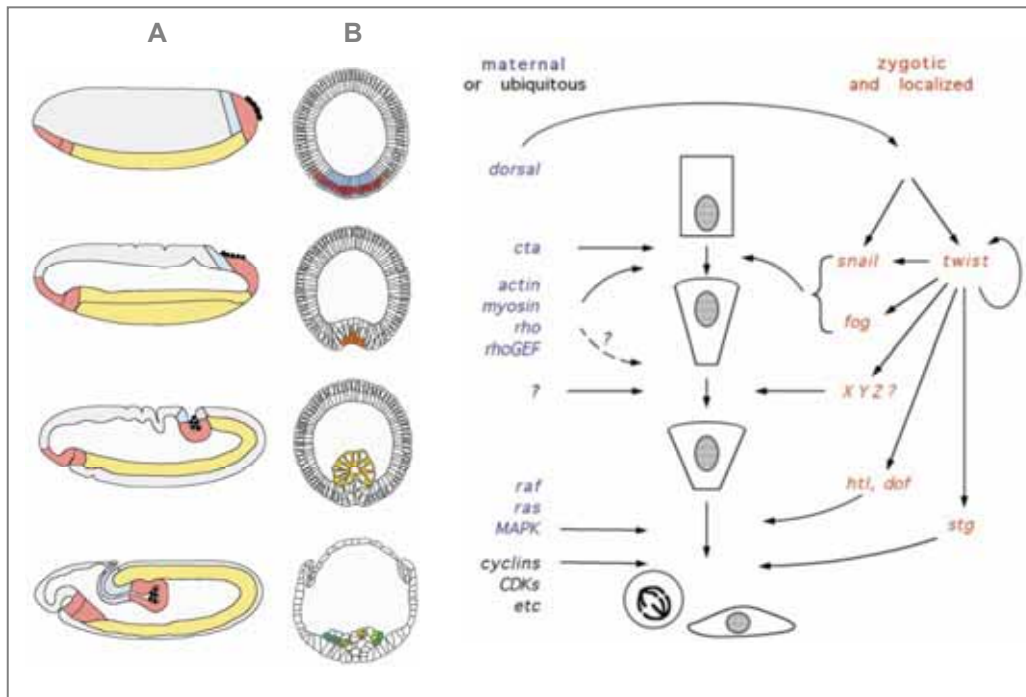


Figura I-14: Activitats gèniques maternals i zigòtiques que dirigeixen la gastrulació en *Drosophila*: A: Diagrama dels embrions sencers indicant les regions dels primordis

mesodèrmic, endodèrmic i ectodèrmic. En l'estadi de blàstula el primordi és superficial, després el prospectiu mesoderm forma el solc ventral en la cara ventral de l'embrió. Després, la part posterior de l'endoderm s'invagina i la banda germinal coenà a estendre's per la cara dorsal de l'embrió. Finalment, el mesoderm s'internalitza completament i comença a scampar-se per formar una capa simple. **B:** Seccions dels embrions. Es coloren les regions on es donen aconeteixaments rellevants: Twist (vermell); Snail (blau); Fog, Concertina, miosina i actina (taronja); activitat desconeguda que es dona en l'escurçament (groc); activitat relacionades amb cycle cel·lular i migració (verd) (modificada de Leptin 1999).

Les cèl·lules ventrals de l'embrió de *Drosophila* presenten retrassada la divisió cel·lular, retràs que és necessari perquè la invaginació del primordi mesodèrmic es dongui correctament. Perquè la gastrulació sigui exitosa caldrà evitar l'entrada a la mitosi tot bloquejant l'activitat de String (revisat per Ip, 2002).

4.3.2.1. SNAIL i string en el procés de gastrulació de Drosophila

Darrera la fusió dels gamets, el nucli zigòtic pateix una serie de divisions mitòtiques ràpides, sincròniques, carents de fases G1 i G2, utilitzant la maquinària molecular d'origen matern present en l'ou. Els nuclis migren a la perifèria del sincici i es cel·lularitzen envoltant-se de membranes i formant el blastoderm cel·lular. En aquest moment, totes les cèl·lules de l'embrió resten aturades en la fase G2 de la interfase 14 (fig I-15).

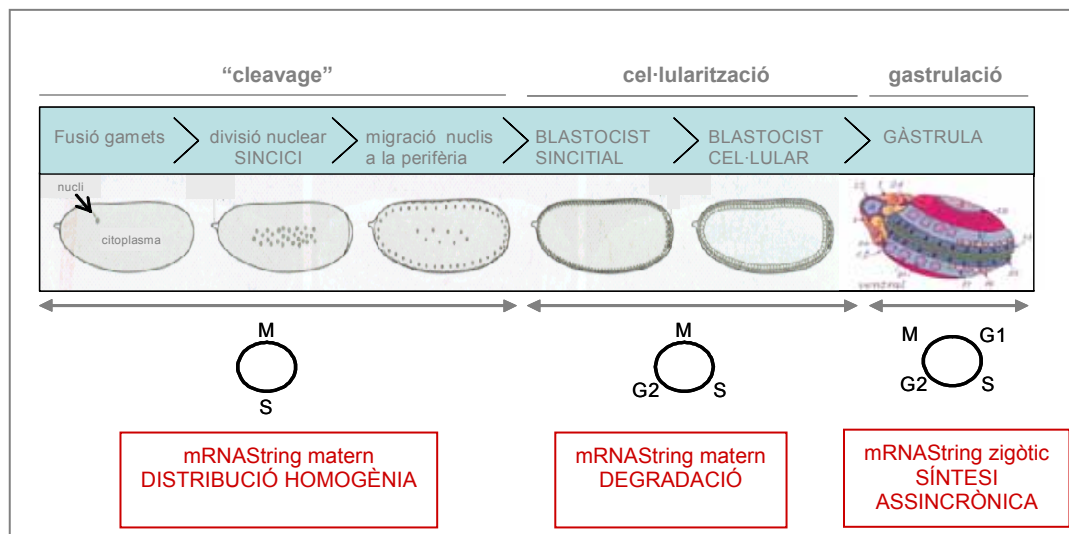


Figura I-15: Primers estadis del desenvolupament embrionari de Drosophila. (cicles 1-16). Durant el procés de gastrulació (cicle 14-16), l'embrió queda dividit en dominis mitòtics, grups de cèl·lules que finalitzen el cicle 14 rera l'expressió de String zigòtica, fosfatasa essencial per activar l'entrada a la Mitosi en aquest estadi embrionari (Adaptat de Lewis-Wolpert).

A partir d'ara les divisions seràn assincròniques per tal de possibilitar que els moviments morfogènics característics de la gastrulació i la divisió cel·lular es donguin simultàniament en diferents regions de l'embrió (Foe et al., 1989). La formació de la gàstrula s'inicia quan les

cèl·lules ventrals del blastoderm s'internalitzen , formant el solc ventral a partir del qual es forma el tub mesodèrmic d'on es dissociaran les cèl·lules mesodèrmiques per migrar a través de l'ectoderm cap a l'interior de l'embrió per transformar-se més endavant en els teixits adults .

String sembla ser la proteïna clau en la regulació del cicle cel·lular durant tot aquest procés de gastrulació. String pertany a una família conservada de reguladors mitòtics que juntament amb les ciclines, activen la quinasa Cdc2 encarregada del pas G2/M (Edgar, 1994). Prèviament a la gastrulació, String d'origen matern es distribueix uniformament per l'embrió i serà degradada quan es cel·lularitza l'embrió, quedant totes les cèl·lules aturades en la fase G2. A partir d'aquest moment serà String zigòtica la que passarà a controlar el cicle cel·lular i ho farà expressant-se de forma assincrònica en diferents grups de cèl·lules que quedaran definits com a dominis mitòtics, ja que entraran en mitosi immediatament després d'expressar el mRNA de String (fig. I-15). Els embrions mutants *string* resten aturats en la fase G2 de la interfase 14, mentre que l'expressió ectòpica de String engega divisions ectòpiques durant els cicles postblastodèrmics 14-16 (Edgar, 1990).

Quan reapareix String rera el procés de cel·lularització, en tots els dominis que s'expressa, excepte en el domini 10, la mitosi comença pocs minuts després. El domini mitòtic 10 que comprèn les cèl·lules del futur mesoderm, és el primer en expressar el mRNA de String però no entrarà en mitosi fins que haurà format el solc ventral i s'haurà invaginat completament cap a l'interior de l'embrió. Aquest retràs en la mitosi suggereix que les cèl·lules ventrals contenen un factor que allarga l'interval de temps entre l'expressió del mRNA de String i l'entrada en mitosi. La sobreexpressió de String fa que les cèl·lules ventrals entrin en mitosi a l'hora amb els dominis 1-3, i que no es dongui l'invaginació mesodèrmica, fet que indica que el retràs en la mitosi és crucial perquè les cèl·lules puguin moure's (Großhans et al., 2000).

Els embrions mutants *snail* o *twist*, tampoc formen el solc ventral i no expressen mRNA de String en el domini 10. Si els embrions mutants *snail* reestableixen els nivells de String (gràcies a la sobreexpressió de Twist, activador transcripcional de String) les cèl·lules ventrals són les primeres en dividir-se, fet que deixa clar, que Snail juga un paper essencial en el bloqueig de la mitosi en el futur mesoderm (Großhans et al., 2000).

Com que Snail està directament implicat en la regulació de gens que coordinen els canvis de forma cel·lulars que possibiliten el procés de gastrulació, com són les RhoGTPases i la Concertina, es va estudiar si mutants per dites proteïnes presentaven alterat el retràs de la mitosi. En ambdós casos el retràs mitòtic va ser el normal, fet que indica que Snail no actua via la maquinària implicada en els canvis de forma cel·lular a l'hora de bloquejar el cicle (Großhans et al., 2000).

4.3.2.2. Tribbles: Vincle entre Snail i String

Tribbles en *Drosophila*

S'ha identificat Tribbles com un nou inhibidor de la mitosis en el primordi mesodèrmic durant el procés de gastrulació de *Drosophila* (Seher et al., 2000). Com passa amb els embrions mutants *snail*, les cèl·lules del domini 10 (mesoderm prospectiu) dels mutants *tribbles* entren en mitosi immediatament després de l'expressió del mRNA de String, fet que no es formi el solc ventral i que en el 50% dels embrions la gastrulació no es dongui correctament. El retràs en l'entrada a la mitosi que es dona en embrions normals rera l'expressió del mRNA de String, es reestableix en els mutants *tribbles*, quan recuperen l'expressió de tribbles en les cèl·lules ventrals (Großhans et al., 2000). El fet que el fenotip dels embrions mutants *tribbles* sigui el mateix que el dels embrions que sobreexpressen String, i que els dobles mutants *tribbles string* formin correctament el solc ventral i no pateixen mitosis precoces, indica que en aquest episodi del desenvolupament Tribbles i String tenen funcions oposades i que l'efecte de Tribbles no és en la formació del solc ventral, sino en el bloqueig de la mitosi activada per String. En els embrions *tribbles* els nivells de mRNA de String no varien, fet que indica que Tribbles no regula transcripcionalment String, i si que incrementen els nivells de proteïna acumulada. Una sèrie d'experiments confirmen que Tribbles promou la degradació de String via proteosoma (Mata et al., 2000).

L'expressió de Tribbles excedeix la regió mesodèrmica, però només és capaç de bloquejar la mitosi en dita regió, de manera que es pensa que Tribbles necessita un factor exclusiu de mesoderm per tal de poder retrassar la mitosi tot degradant la fosfatasa String. Els embrions mutants *snail* que recuperen l'expressió de String tampoc retrassen la mitosi en el mesoderm prospectiu tal i com passa en els embrions mutants *tribbles*, indicatiu de la necessitat de Snail per bloquejar la mitosi en el domini 10.

La tendència actual hipotetitza el següent model (fig I-16): Snail (i Twist), són els marcadors mesodèrmics per excel·lència, necessaris per la formació del solc ventral (via l'activació d'un programa morfogenètic directament relacionat amb els canvis de forma i la migració cel·lular), i necessaris a la vegada per controlar l'entrada en la mitosi. Snail (i Twist) activarien la transcripció de String a l'hora que en bloquejarien l'activitat (es postula que aquest efecte oposat serviria per agilitzar el procés de gastrulació (Johnston et al., 2000)). Tribbles, activat indirectament per Snail (i Twist) promouria la degradació de String via proteosoma impeding l'entrada a la Mitosi durant la invaginació del mesoderm. Es pensa que Snail bloquejaria l'activitat de String no només via Tribbles, ja que Tribbles per si sol (si més no en aquest teixit embrionari) no és capaç de bloquejar la mitosis.

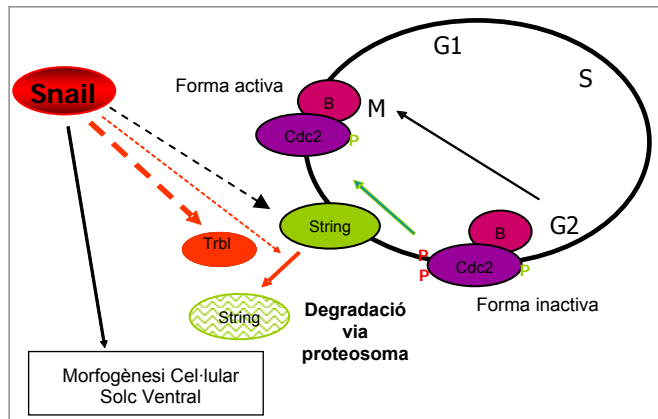


Figura I-16: Model hipotètic d'actuació de Tribbles, Snail i String/Cdc25 en les cèl·lules del mesoderm prospectiu de *Drosophila*. Snail és necessari per la transcripció de String (---), i a l'hora activa la seva degradació via proteosoma directament (----) i a través de Tribbles (- - -), impedit la activació del complex Cdc2-ciclina B implicat en la transició G2/M.

S'ha descrit que Tribbles media la degradació de String durant el desenvolupament embrionari, no només en les cèl·lules del prospectiu mesoderm, sino també en els discs imaginals de les ales i en les cèl·lules de la línia germinal (Mata et al., 2000). També s'ha descrit que Tribbles media la degradació de Slbo en les cèl·lules migradores durant l'ovogènesi, i també ho fa via la ubiquïtinació i el proteosoma, fets que fan pensar que Tribbles podria tenir un rol ancestral en la degradació proteica i que podria formar part del complex E3-Ubiquitina (Rorth et al., 2000).

Tribbles en vertebrats

En vertebrats s'han descrit 3 homòlegs de Tribbles (TRB-1, TRB-2 i TRB-3), que presenten el domini Ser-Thr quinasa conservat i no funcional. TRB-3 es el membre més ben estudiat i tot i que es desconeix com actua, s'ha vist que interacciona amb diverses proteïnes implicades en diverses vies de senyalització: en cèl·lules tumorals la interacció de TRB-3 amb ATF4, promou la degradació d'aquest factor de transcripció, fent disminuir la susceptibilitat de les cèl·lules a condicions de estrés (Bowers et al., 2003). En condicions de dejú, sembla que TRB-3 interacciona amb Akt impedit que es fosforili i que activi l'emmagatzematge de la glucosa en les cèl·lules hepàtiques mitjançant l'activació de la glicogen sintasa (Du et al., 2003). En vertebrats, no s'ha trobat que cap dels membres TRB interaccionin amb Cdc25 (homòloga de String) (revisat per Hegedus, 2006; Hegedus, 2007).

4.3.2.3. String/CDC25

Les CDKs (cyclin-dependent kinases), tenen un paper central en la regulació de la progressió del cicle cel·lular de les cèl·lules eucariotes (Morgan et al., 1995). Un dels mecanismes activadors de la seva activitat, és la defosforilació dels dos residus (Y15 i T14)

que mantenen els complexos CDK-ciclina inactius, duta a terme per les fosfatases CDC25. En mamífers, les proteïnes CDC25 són codificades per una família multigènica, la *cdc25A*, *cdc25B* i *cdc25C*, i totes tres proteïnes poden complementar funcionalment l'única CDC25 expressada en llevat. Totes tres isoformes presenten un domini catalític en la meitat carboxiterminal i un domini regulador en la meitat aminoterminal subjecte al "splicing" alternatiu, que almenys dóna lloc a tres variants de splicing per CDC25A, i cinc variants per CDC25B i CDC25C (Prevost et al., 2003). Certes variants són exclusivament detectades en cèl·lules tumorals que cicleu ràpid (Wegener et al., 2000), però la majoria d'estudis no diferencien entre les diverses variants de "splicing", de manera que es coneix poc sobre la importància relativa de les diferents formes (Kristjansdóttir et al., 2004).

Per tal d'assegurar que els nivells d'activació de cada CDK-ciclina siguin correctes en cada etapa del cicle cel·lular, l'activitat de les fosfatases CDC25 es fàcilment regulada per múltiples mecanismes que inclouen: nivells de proteïna, localització subcel·lular (parcialment regulada per la unió a les proteïnes 14-3-3) i estat de fosforilació. L'activitat catalítica de cada CDC25 depen del balanç entre síntesi i degradació proteica i de la localització subcel·lular, que a l'hora depenen de l'estat de fosforilació, de la unió a les proteïnes 14-3-3 i de la presència de seqüències d'export (NES) i d'import (NLS) nuclear (fig. I-17).

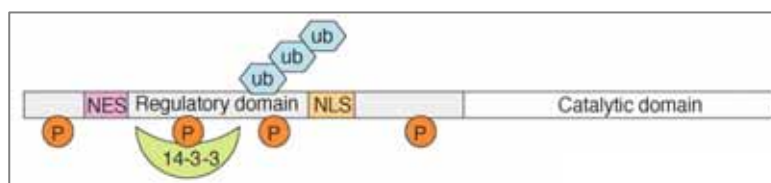


Figura I-17: Model general de regulació de la fosfatasa CDC25. Múltiples i encavalcats mecanismes contribueixen a la regulació de l'activitat de CDC25. La localització intracel·lular és regulada per un trànsit entre el nucli i el citoplasma, que a l'hora és regulat per les seqüències NES i NLS i la interacció amb membres de la família 14-3-3. L'estat de fosforilació contribueix a la localització de CDC25 a més a més de medair la seva degradació via ubiquitina-proteosoma. Tot i que entre les diferents isoformes hi ha un grau important d'homologia, cada membre de la família CDC25 és regulat per alguns o per tots els mecanismes esmentats (Boutros, 2007).

CDC25 en el cicle cel·lular normal

Inicialment es postulava que cada isoforma de CDC25 actuava només en una fase concreta del cicle. Actualment se sap que totes tres isoformes participen en les transicions G1-S i G2-M i que durant la Mitosi totes tres fosfatases mostren activitat específica cap a CDK1-ciclinaB (revisat per Boutros, 2007).

CDC25A: Tradicionalment se li va assignar el rol de promotora de l'entrada a la fase S, al defosforilar els complexos CDK2-ciclinaE i CDK2-ciclinaA i activar-los (Blomberg et al., 1999). E2F i c-myc, n'activen la transcripció a la segona meitat de la fase G1, conjuntament

amb la transcripció de la ciclina E (Vigo et al., 1999). La sobreexpressió de CDC25A, avança l'entrada a la fase S, per defosforilació i conseqüent activació prematura dels complexos CDK2-ciclina (Blomberg et al., 1999), mentre que cèl·lules transfectades amb el siRNACdc25A (Mailand et al, 2002) o amb un dominant negatiu sense activitat fosfatasa (Blomberg et al., 1999), presenten un retràs en l'entrada a la fase S.

Durant la interfase, CDC25A és una proteïna làbil, en constant "turnover", gràcies a la unió amb β -TrCP del complex SCF ^{β -TrCP} ubiquitina lligasa, que la ubiquitina i en promou la seva degradació (Kanemori, 2005 ; Bernardi, 2000). La unió de β -TrCP a CDC25A en certes condicions pot ser facilitada per Smad3-TGF β (Ray, 2005). Les seqüències NES i NLS promouen un trànsit constant entre el nucli i el citoplasma (Kallstrom et al., 2005).

Estudis més recents han demostrat que CDC25A també té un rol important en l'entrada a la mitosi. Cèl·lules transfectades amb el siRNACdc25A presenten un retràs en la transició G2/M (Lindqvist et al., 2005) causada per una falta d'activitat CDK1-ciclinaB (Mailand et al., 2002), mentre que la sobreexpressió de CDC25A provoca una entrada a la mitosi abans d'hora (Molinari et al., 2000). Un "pool" actiu inicial de CDK1-ciclinaB (activat per CDC25B) hiperfosforila la CDC25A activa i la fa estable i nuclear, permetent-li la participació en la condensació del DNA (Lindqvist et al., 2005), fins que al final de la mitosi el complex APC/C ubiquitina lligasa (de *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) en promou la degradació (Busino et al., 2004). Durant la interfase, CDC25A no pot activar la CDK1-ciclina B perquè Chk1 la fosforila promovent la seva unió a les proteïnes 14-3-3 i la conseqüent localització al citoplasma (cèl·lules que expressen un mutant de CDC25A que no pot unir-se a la 14-3-3, presenten activitat CDK1-ciclina B i condensació de cromosomes en la fase S) (Chen et al., 2003) (fig. I-18).

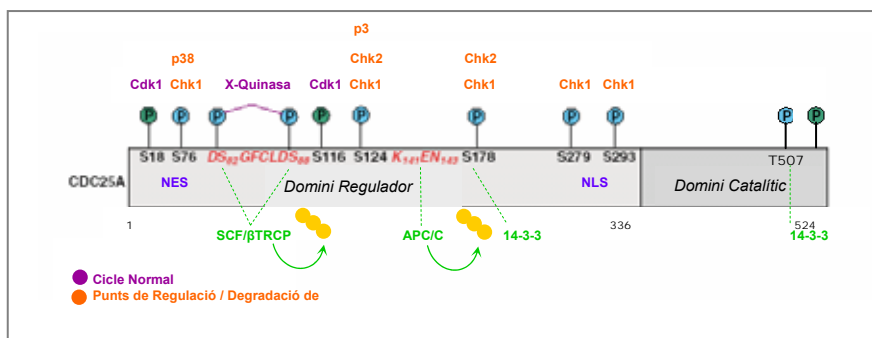


Figura I-18 : Regulació dels nivells i de l'activitat de CDC25A al llarg del cicle cel·lular, per fosforilació de múltiples llocs, per diverses quinases.(modificada de Busino et al., 2004).

CDC25B: Es coneix pel seu paper clau en l'activació del complex CDK-ciclina implicada en la transició G2-M. La microinjecció d'anticossos anti-Cdc25B en cèl·lules humanes (Lammer et al., 1998), o la transfecció siRNACdc25B ocasiona una aturada en la fase G2

(Lindqvist et al., 2005), mentre que la sobreexpressió de CDC25B promou l'entrada a la Mitosi (trencament d'envolcall nuclear i formació de mini-fusos) tot i no estar replicat el DNA (Karlsson et al., 1994). Es proposa que CDC25B és la fosfatasa activadora inicial de la CDK1-ciclinaB que s'ha anat acumulant en els centrosomes durant la interfase, i que rera la defosforilació translocarà al nucli on activarà CDC25A (Mailand et al., 2002) i CDC25C (Lindqvist et al., 2005) per tal que la Mitosi prossegueixi. L'activació de la CDC25B centrosomal al final de la fase G2 aniria lligada a una hiperfosforilació del domini regulador (Gabrielli et al., 1997) que seria duta a terme per la quinasa Aurora-A entre d'altres quinases encara desconegudes. Dita fosforilació seria suficient per promoure la separació dels centrosomes i engegar la Mitosi (Dutertre et al., 2004).

Els nivells de CDC25B van incrementant al llarg del cicle cel·lular, sent màxims en la metafase. La localització de CDC25B en els diferents estadis del cicle cel·lular genera controvèrsies possiblement degut a l'existència de diferents variants de "splicing". No obstant sembla clar que igual que CDC25A i CDC25C, CDC25B transita del nucli al citoplasma i del citoplasma al nucli gràcies a les seqüències NES i NLS i a la unió a les proteïnes 14-3-3, i que a finals de la fase G2 s'estabilitza en els centrosomes citosòlics per un mecanisme fins ara desconegut que implica presència de ciclina B (Karlsson et al., 1994). CDC25B també està sotmesa a degradació via proteosoma, mediada per fosforilacions dutes a terme per CHK1 (Krämer et al., 2004) i CDK1-ciclinaA (Baldin et al., 1997a), per evitar que s'activi el complexe CDK1-ciclinaB abans d'hora.

Estudis amb molècules antisentit asCdc25B o de sobreexpressió de la fosfatasa en cèl·lules humanes, demostren que CDC25B podria tenir un rol en la progressió per la fase S (Gabrielli et al., 1996), però no sembla que participi en l'activació de CDK2-ciclinaA (Lammer et al., 1998).

CDC25C: Va ser inicialment coneguda pel seu rol en la progressió per la mitosi. Cèl·lules humanes transfectades amb el dominant negatiu de CDC25C, presenten un boqueig en la fase M, més tardà i pronunciat que el que ocasiona el dominant negatiu de CDC25B, fet que concorda amb la proposta que CDC25C activaria un "pool" de CDK1-ciclinaB en el nucli, prèviament activat en els centrosomes per CDC25B (Gabrielli et al., 1996).

CDC25C se sintetitza en la fase G1 i els nivells de proteïna són força constants durant tot el cicle cel·lular normal. Una seqüència NLS promou l'import a nucli, i almenys dues seqüències NES en promouen l'export. C-TAK i CHK1 es creu que medien la fosforilació en la S216 conservada (Takizawa et al., 2000) que promou la unió de CDC25C a la 14-3-3. Dita unió es creu que bloqueja l'accés al motiu NLS i impedeix l'entrada de CDC25C a nucli i l'activació indeguda de CDK1 (Peng et al., 1997; Dalal et al., 1999; Kumagai et al., 1999). La unió a la 14-3-3, es pensa que també impedeix la interacció de CDC25C amb la ciclina B

(Morris et al., 2000). En l'inici de la Mitosi, CDK1-ciclinaB (Lindqvist et al., 2005; Kumagai et al., 1999) i Plk-1 (Toyoshima-Morimoto et al., 2002) hiperfosforilen la CDC25C, fent que es desuneixi de la 14-3-3 i deixant accessible el motiu NLS a la maquinària d'import nuclear, de manera que CDC25C serà translocada al nucli on prosseguirà l'activació de CDK1-ciclinaB iniciada per CDC25B i la progressió per la Mitosi (Morris et al., 2000).

Estudis posteriors amb molècules antisentit as-Cdc25C i el siRNACdc25C indiquen que CDC25C també té un rol en la transició G1/S (Turowski et al., 2003) diferent al rol de la CDC25A. En cèl·lules humanes (i no en cèl·lules de ratolí (Cheng et al., 2001)), CDC25C té un pic d'activitat durant la fase S, que coincideix amb la síntesi de DNA i que suggereix que CDC25C participa en el procés de replicació. L'activitat de CDC25C cal per entrar a la fase S, fet que suggereix que podria actuar activant el complex CDK-ciclina implicat en la transició G1-S, però fins el moment no s'ha vist que l'activitat, ni l'estat de fosforilació de CDK2 s'alterin en funció de l'estat de CDC25C (Turowski et al., 2003).

CDC25 i checkpoints

Totes tres isoformes CDC25 són dianes clau de les vies checkpoint que bloquegen el cicle cel·lular quan el DNA està danyat o no és completament replicat. Les famílies de quinases ATM (de *Ataxia-Telangiectasia Mutated*) i ATR (de *ATM and Rad3-related*) activen CHK1 i CHK2 respectivament i aquestes poden fosforilar els diferents membres de la família CDC25 impedit-ne l'activitat i la progressió pel cicle fins que la condició adversa s'ha superat i es pot garantir la integritat genòmica, o fins que la cèl·lula entra en apoptosi. Recentment s'ha descobert un nou checkpoint que endarrerix la transició G2-M com a resposta a diverses adversitats ambientals. Aquesta via és independent de ATM i ATR i requereix activació de la MAPK p38, que acabarà promoguent la fosforilació i la inactivació de les CDC25 mitjançant l'associació i l'activació de MAPKAP-kinasa2 (de *MAPK-associated protein*)(revisat per Karlsson-Rosenthal, 2006) (fig. I-19).

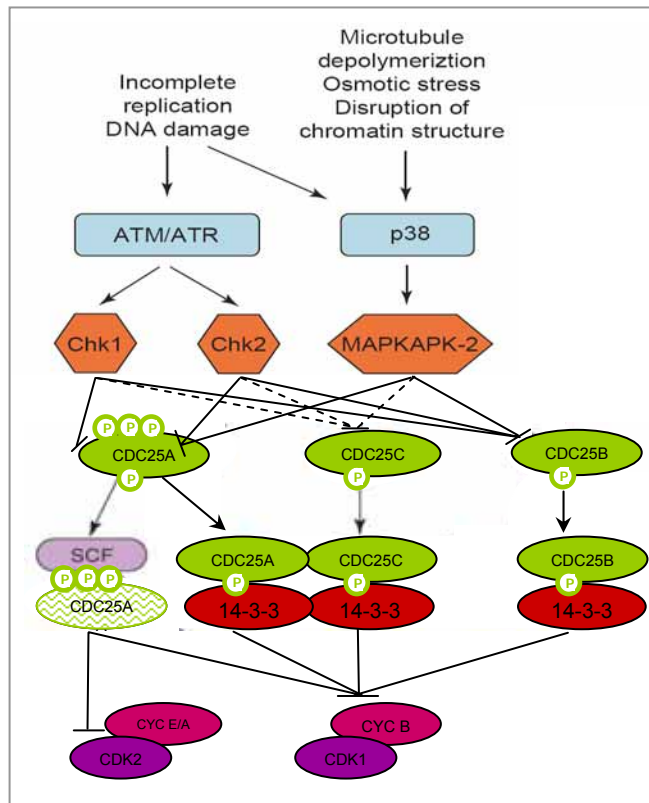


Figura I-20: Vies checkpoint que controlen les isoformes CDC25 en cèl·lules de mamífer. Diferents vies checkpoint convergeixen en la inactivació de les fosfatases CDC25, impedit que puguin activar els complexos CDK-ciclina i provocant per tant un arrest cel·lular. L'estrès genotòxic indueix les vies ATM/ATR causant la fosforilació i la inactivació de CDC25 per les quinases CHK1/CHK2. La MAPK p38 s'ha suggerit recentment que inactiva CDC25 en resposta a l'estrès osmòtic, la radiació UV o la despolimerització dels microtúbuls. Tot i que tant CDC25A, com CDC25B com CDC25C contenen llocs de fosforilació per CHK1, CHK2 i MAPKAPK-2, no s'ha demostrat que tots ells es donguin realment. -----> fosforilacions in vitro (modificada de Karlsson-Rosenthal et al., 2006).

CDC25A: La inactivació de CDC25A pot contribuir al bloqueig immediat del cicle cel·lular en la fase G1 i en la fase G2. CDC25A és una proteïna làbil durant tota la interfase, i la seva degradació pot ser críticament accelerada en presència de DNA danyat o no replicat. CHK1 i CHK2 poden hiperfosforilar diferents residus de la CDC25A (la S123 sembla er la protagonista en condicions de dany al DNA) i accelerar la degradació via SCF^{β-TrCP} en els diferents checkpoints (Sampath et al., 2002; Xiao et al., 2003; Busino et al., 2004), impedit l'activació de CDK2 (Falch et al., 2001; Mailand et al., 2000) i de CDK1 (Mailand et al., 2002) i la transició G1/S i G2/M respectivament. Un altre mecanisme que actua en paral·lel a la degradació i que es creu que també participa en el checkpoint G2 és la inactivació de la CDC25A rera la unió a membres de la família 14-3-3 (Chen et al., 2003).

Recentment s'ha vist que la MAPK p38 també pot promoure la fosforilació de CDC25A i bloquejar l'entrada a la fase S al promoure la degradació de CDC25A en resposta a l'estrès

osmòtic (revisat per Karlsson-Rosenthal, 2006) i a la radiació ultraviolada (Manke et al., 2005).

CDC25B: Sota l'exposició a radiació UV, p38 promou la fosforilació de CDC25B *in vitro* i la conseqüent unió a les proteïnes 14-3-3 fet que impedeix l'activació de CDK1-ciclinaB i per tant la progressió cap a la mitosi *in vivo* (Bulavin et al., 2001; Bulavin et al., 2002; Manke et al., 2005). CDC25B també conté llocs de fosforilació per CHK1 i CHK2, no obstant tampoc han sigut verificats *in vivo* (revisat per Karlsson-Rosenthal, 2006). Un cop el DNA s'ha reparat, cal apagar el checkpoint i que el cicle prossegueixi. PLK1 juga un paper important en aquest moment, tot fosforilant i activant CDC25B, per tal que defosforili i activi CDK1-ciclinaB i la cèl·lula pugui entrar a la Mitosi (van Vugt et al., 2004).

CDC25C: En cèl·lules humanes, la CHK1 i la CHK2 activades, poden fosforilar la CDC25C, creant un lloc d'unió a la 14-3-3 (Peng et al., 1997) que emmascararà la NLS necessària per l'import a nucli i l'activació de CDK1-ciclinaB, fins que el DNA no sigui reparat (Dalal et al., 1999; Takizawa et al., 2000). El mateix residu fosforilat per CHK1 i CHK2 (la S216), pot ser fosforilat rera l'activació de p38, per exposició a radiació ultraviolada (Manke et al., 2005).

CDC25 i càncer

Les fosfatases CDC25 han de ser finament regulades al llarg del cicle de divisió cel·lular per mantenir els nivells d'activitat CDK-ciclina espacial i temporalment precisos. A més a més, les fosfatases CDC25 han d'inactivar-se en resposta a l'activació dels checkpoints per tal d'aturar la progressió del cicle i donar temps a la cèl·lula perquè repari el DNA o iniciï l'apoptosi. La no regulació d'aquests processos pot contribuir a la inestabilitat genòmica.

El primer estudi que va relacionar la sobreexpressió de CDC25 amb càncer va ser un estudi de l'any 1991, on es detectaven elevats nivells de mRNA de CDC25B en fibroblastes transformats. Des d'aleshores CDC25A i CDC25B (però no CDC25C), s'han trobat sobreexpressades a nivell tant de mRNA com de proteïna en diversos tumors humans com el càncer de mama (Löffler, 2003) i el càncer colorectal (Takemasa et al., 2000) entre molts d'altres (revisat per Boutros, 2007). Les causes directes de la sobreexpressió de CDC25 en teixit tumoral no són clares. Sovint, tot i que no sempre, els nivells elevats de proteïna, coincideixen amb nivells elevats de mRNA. Com que c-Myc activa la transcripció tant de CDC25A com CDC25B, s'ha postulat que potser la sobreexpressió de les fosfatases és deu a un excés indegut de c-Myc. Però els nivells elevats de CDC25A o B no sempre es correlacionen amb elevats nivells de c-Myc, de manera que deuen existir altres mecanismes

causants de la sobreexpressió de les fosfatases en cèl·lules tumorals (Kristjansdóttir et al., 2004; Wu et al., 1998).

La manca de degradació, és una altra raó candidata a explicar els nivells anormalment elevats de CDC25 en càncer. Un nombre important de tumors presenten mutacions en components de les vies implicades en l'estabilitat de CDC25, com són les mutacions en β -TRCP i CHK1/2. Es podria pensar que dites mutacions fan que CDC25 sigui excessivament estable durant la interfase de cicle cel·lular i que activi indegudament els complexos CDK-ciclina, fent que les cèl·lules entrin abans d'hora a noves etapes del cicle i facilitant l'adquisició d'aberracions genètiques (Karlsson et al., 1999; Blomberg et al., 1999).

Mutacions en components de les vies checkpoint (ATM, CHK1/2) (Craig et al., 2004) també són freqüents en càncers humans. En aquests casos, rera el dany al DNA, CDC25 no es degrada fet que provoca una inestabilitat genòmica i una predisposició tumoral.

Però no n'hi ha prou en sobreexpressar CDC25 per induir tumorogènesi, cal que hi hagi altres proteïnes mutades. Per exemple, tant en fibroblasts com en teixit mamari de ratolí, la sobreexpressió de CDC25A coopera amb Hras o amb Rb mutat, en la inducció de fenotip transformant o tumoral. De fet, se suggereix que en càncers humans, la sobreexpressió de CDC25 pot donar-se en diferents moments la llarg de la vida tumorogènica i contribuir a la progressió de la malaltia, causant inestabilitat genètica, desregulat el cicle i/o cooperant amb altres oncògens importants en les vies de senyalització normal (revisat per Boutros, 2007).

Les fosfatases CDC25 són un enllaç directe entre la senyalització mitogènica i el cicle de divisió cel·lular a més a més de facilitar la transformació cel·lular, per això són una diana ideal per la nova teràpia anticàncer: Els components que bloquegen l'activitat de CDC25, oxidant irreversiblement residus del domini catalític, com els quinoids, són uns bons candidats, ja que tot i que no són específics de cèl·lules tumorals, sembla que aquestes són més susceptibles a dits inhibidors. Una altra estratègia proposada és justament el contrari, induir l'activitat de CDC25 durant els tractaments amb radiació ionitzant o drogues que danyen el DNA, fent que les cèl·lules tumorals acumulin mutacions i entrin en apoptosi. El problema però, és que sovint les cèl·lules tumorals es comporten diferent a les cèl·lules normals i rera l'acumulació d'errors genètics, en comptes de morir-se, poden esdevenir encara més agressives (revisat per Boutros, 2007).

OBJECTIUS

Diversos treballs realitzats en el nostre grup descriuen que en les cèl·lules tumorals en cultiu Snail és suficient per activar una Transició Epiteli-Mesènquima, generant un profund canvi fenotípic en les cèl·lules que l'expressen, caracteritzat per una pèrdua de marcadors epitelials i un guany de marcadors mesenquimals (Batlle, et al. 2000; Guaita et al., 2002; Solanas et al. 2008)). Per dur a terme aquests estudis es van generar uns clons que expressaven Snail de forma estable i que a més a més de patir els canvis fenotípics esmentats, proliferaven més lentament.

En desenvolupament, hi ha diversos processos on s'ha descrit que la inducció de la EMT per membres de la família Snail, sovint està relacionada amb una aturada en el cicle cel·lular de manera que vam plantejar-nos com a objectiu de treball, descriure **el mecanisme utilitzat per Snail per fer disminuir la taxa de proliferació cel·lular al ser expressat ectòpicament en cèl·lules en cultiu que han patit una EMT**

RESULTATS

1. L'EXPRESSIÓ DE SNAIL EN LES LÍNIES CEL·LULARS DE MAMÍFER FA DISMINUIR LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR.

Per tal d'estudiar l'efecte que tenia l'expressió de Snail en el cicle cel·lular, vam fer corbes de creixement de 3 línies cel·lulars transfectades establement amb mmSnail: les MDCK, les HT-29 M6 i les SW480. Es van sembrar les cèl·lules a baixa densitat per tal d'evitar aturada de cicle per confluència i es van anar determinant el nombre de cèl·lules durant diversos dies per tal d'elaborar les corbes següents (fig. R-1):

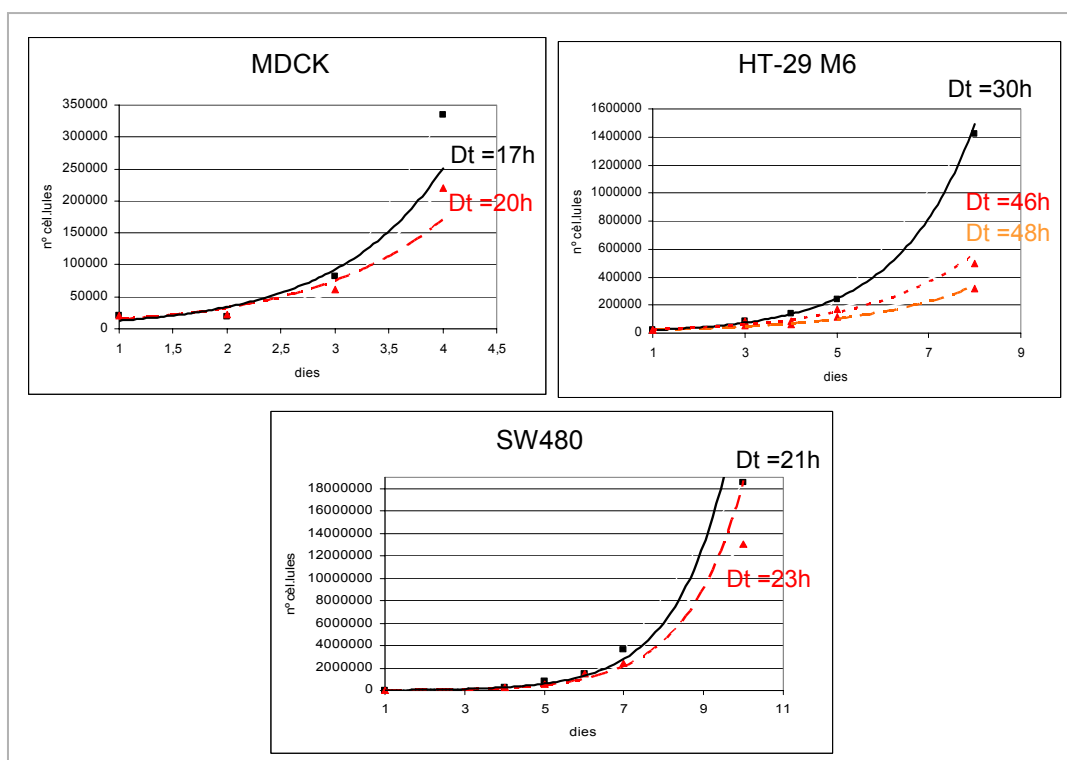


Figura R-1: L'expressió de Snail en les línies cel·lulars de mamífer fa disminuir la proliferació cel·lular. Tendència exponencial de les corbes de creixement de les 3 línies cel·lulars transfectades establement amb Snail-HA (- - -) o amb el vector buit (—). Dt: Temps de duplicació. Valor R2: R2MDCKc=0,87; R2MDCKsna=0,9; R2M6c=0,99; R2M6sna1=0,96; R2M6sna2=0,97; R2SWc=0,98; R2SWsna=0,98.

En els 3 estudis, les cèl·lules que expressaven Snail proliferaven més lentament que les cèl·lules control, ja que presentaven un temps de duplicació (Dt) superior. Dit endarreriment no era degut a una inferior viabilitat causada per la sobreexpressió de dit factor de transcripció, ja que el percentatge de cèl·lules mortes (permeables al blau tripà) presents en les cèl·lules que expressaven Snail, era equivalent al de les cèl·lules control, sent del 6% en

la línia SW480, del 0,7% en les MDCK, i del 8% en les HT-29 M6. Els valors R2 propers a 1 en tots els casos indicaven que en cap punt hi va haver aturada de cicle cel·lular per confluència.

2. LES CÈL·LULES MDCK QUE EXPRESSEN SNAIL PRESENTEN UN RETARD EN L'ENTRADA A LA FASE S DEL CICLE CEL·LULAR.

2.1. Anàlisi per citometria de flux en cultiu assincrònic.

Per tal de determinar quin pas del cicle cel·lular, podria estar regulat per Snail, vam analitzar per citometria de flux la distribució en les diferents etapes del cicle cel·lular dels clons MDCK transfectats estabament amb Snail. Aquesta tècnica permet classificar les cèl·lules en funció del contingut de DNA prèviament tenyit amb Iodur de Propidi (IP): les cèl·lules amb contingut $2n$ seràn cèl·lules en fase G0/G1, les $4n$ seran cèl·lules en G2/M i les cèl·lules amb contingut intermig seran cèl·lules en fase S.

Com pot veure's en la figura R-2, les cèl·lules MDCK que sobreexpressaven Snail presentaven un percentatge de cèl·lules en fase G1 superior al de les cèl·lules control. El percentatge de cèl·lules en les fases S i G2/M disminuïa a l'expressar Snail com a conseqüència de l'increment en G1. Aquest resultat indicava que Snail estava bloquejant l'entrada de les cèl·lules a la fase S, causant una acumulació de cèl·lules en la fase G1.

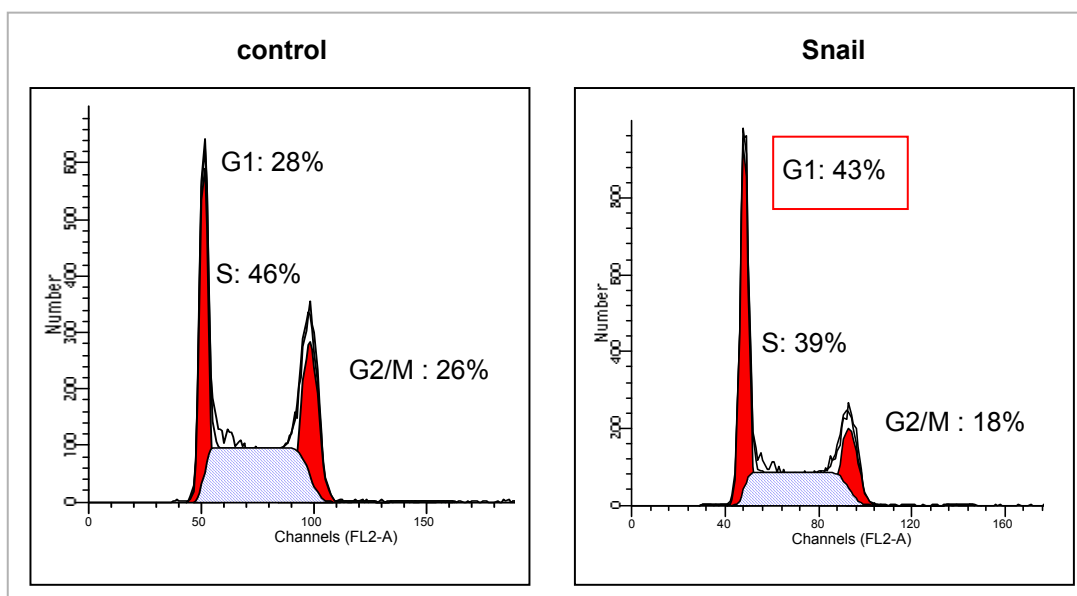


Figura R-2: El percentatge de cèl·lules en G1 incrementa en les cèl·lules MDCK que expressen Snail. Histograma de cicle cel·lular de cèl·lules MDCK transfectades estabament amb Snail-HA o amb el vector buit (control), 24h post sembra. Les cèl·lules van ser prèviament fixades amb 70% EtOH i tractades amb iodur de propidi i RNAasa abans d'analitzar-les pel citòmetre de fluxe.

2.2. Estudi de l'entrada a fase S en cèl·lules MDCK sincronitzades en G0/G1 amb medi sense sèrum.

Per confirmar que en la línia MDCK l'expressió constitutiva de Snail provocava un endarreriment en l'entrada a fase S, vam sincronitzar les cèl·lules en l'etapa G0/G1 privant el medi de cultiu de sèrum (FBS de fetal bovin serum). Rera l'aturada es tornava a reiniciar el cicle reconstituint el medi amb 10%FBS i quantificant per citometria de flux l'entrada a fase S. Les cèl·lules que expressaven Snail aturades en G1 per l'absència de sèrum al medi trigaven més en entrar a la fase S que les cèl·lules control, ja que rera 24h d'haver reconstituït el medi, un 51% de les cèl·lules que expressaven Snail romanien encara en l'etapa G1 davant el només 33% de les cèl·lules control (fig.R-3).

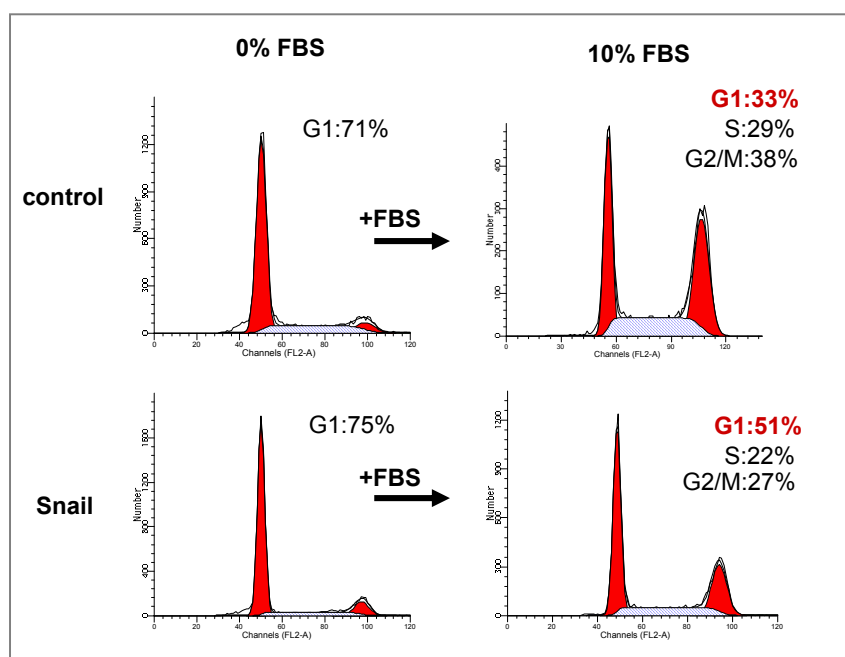


Figura R-3: Les cèl·lules MDCK que expressen Snail presenten un retard en l'entrada a la fase S del cicle cel·lular. Histograma de cicle cel·lular de cèl·lules MDCK transfectades establement amb Snail-HA o amb el plàsmid buit (control), privades de sèrum (0%FBS) durant 5 dies i reactivades amb 10%FBS durant 24h. Les cèl·lules van ser prèviament fixades amb 70% EtOH i tractades amb iodur de propidi i RNAasa abans d'analitzar-les pel citòmetre de fluxe.

3. LES CÈL·LULES HT-29 M6 QUE EXPRESSEN SNAIL PRESENTEN UN RETARD EN L'ENTRADA A LA FASE S I EN ETAPES POSTERIORIS

Vam voler confirmar l'aturada en G1 causada per Snail en la línia MDCK, en una altra línia cel·lular, la HT-29 M6.

3.1. Anàlisi de cicle cel·lular per citometria de flux en cultiu assincrònic.

Vam analitzar per citometria de flux la distribució dels clons HT-29 M6 al llarg del cicle. Els patrons obtinguts eren molt semblants entre els clons que sobreexpressaven Snail i el clò control (fig. R-4).

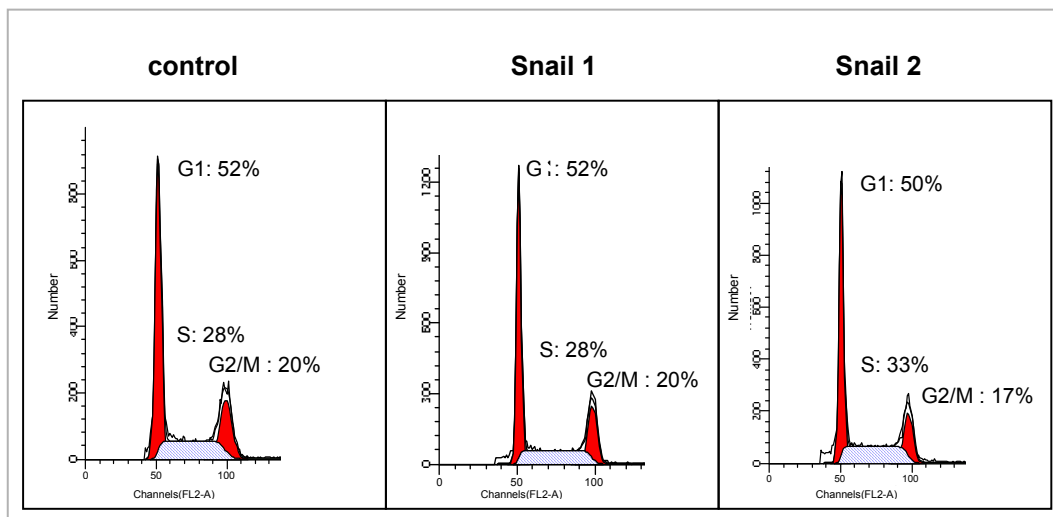


Figura R-4: No hi ha canvis significatius en les fases de cicle cel·lular en els clons de la línia HT-29 M6 que expressen Snail respecte les control. Histograma de cicle cel·lular de cèl·lules HT-29 M6 transfectades establement amb Snail-HA (Snail1 i Snail2) o amb el plàsmid buit (control), 96h post sembra. Les cèl·lules van ser prèviament fixades amb 70% EtOH i tractades amb iodur de propidi i RNAasa abans d'analitzar-les pel citòmetre de flux.

Aquest estudi no explicava per què els índexs de proliferació eren tan diferents entre les cèl·lules control i les cèl·lules que expressaven Snail (fig. R-1). Per tal de determinar si Snail podia bloquejar el cicle en més d'un punt (possible raó per la qual no vèiem diferències a nivell global), vam sincronitzar les cèl·lules en diverses etapes del cicle cel·lular i veure quines fases podien estar afectades per Snail.

3.2. Estudi de l'entrada a la fase S en cèl·lules HT-29 M6 sincronitzades en G0/G1 amb medi sense sèrum.

Després de 24h d'haver sembrat les cèl·lules a baixa densitat, vam privar el medi de cultiu de sèrum durant 72h. Després de comprovar que les cèl·lules estaven majoritàriament aturades en la fase G0/G1 (fig. R-5A), vam reiniciar el cicle reconstituint el medi amb 10%FBS i quantificant per citometria de flux l'entrada a fase S. Rera 16h d'haver reestablert el medi, només les cèl·lules control havien reiniciat el cicle i presentaven un percentatge important de cèl·lules en fase S i en fase G2/M, mentre que les cèl·lules que expressaven

Snail es mantien aturades (fig. R-5B). Rera 24h les cèl·lules que expressaven Snail també havien reiniciat el cicle presentant un elevat percentatge de cèl·lules en fase S (fig. R-5C).

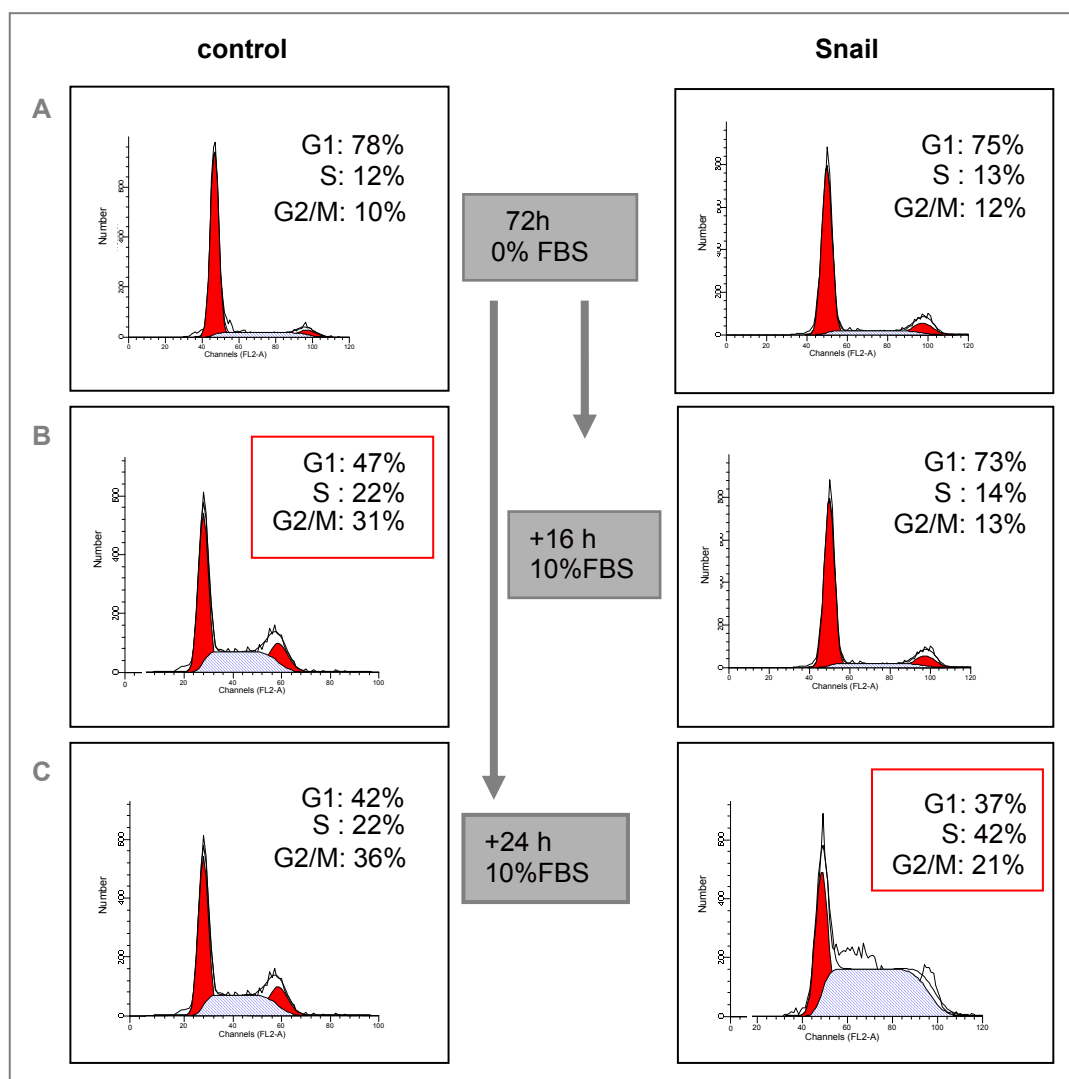


Figura R-5: Les cèl·lules HT-29 M6 que expressen Snail presenten un retard en l'entrada a la fase S del cicle cel·lular. Histograma de cicle cel·lular de cèl·lules HT-29 M6 transfectades establement amb Snail-HA o amb el plàsmid buit (control) privades de sèrum (0%FBS) durant 72h i reactivades amb 10% FBS durant 16h i 24h. Les cèl·lules van ser prèviament fixades amb 70% EtOH i tractades amb iodur de propidi i RNAasa abans d'analitzar-les pel citòmetre de flux.

3.3. Les cèl·lules HT-29 M6 que expressen Snail, presenten en cultiu un elevat nombre de cèl·lules no adherides a la placa.

Durant l'estudi d'aquesta línia estable ens va cridar l'atenció el gran nombre de cèl·lules no adherides que suraven en el medi en els clons que expressaven Snail (fig. R-6). La morfologia d'aquestes cèl·lules no adherides presents en el medi de cultiu dels clons HT-29 M6 que expressaven Snail, semblava indicar que no es tractava de cèl·lules mortes. Vam voler comprovar-ho comptant el percentatge de cèl·lules viables (impermeables al blau tripà)

respecte la població total (cèl·lules adherides+cèl·lules suspeses) en un cultiu HT-29 M6 en creixement exponencial 48h després d'haver canviat el medi. Vam comprovar que els 2 clons analitzats que expressaven Snail, tenien un percentatge de cèl·lules viables no adherides del 3% i del 17%, respecte el 0,2% de les cèl·lules control.

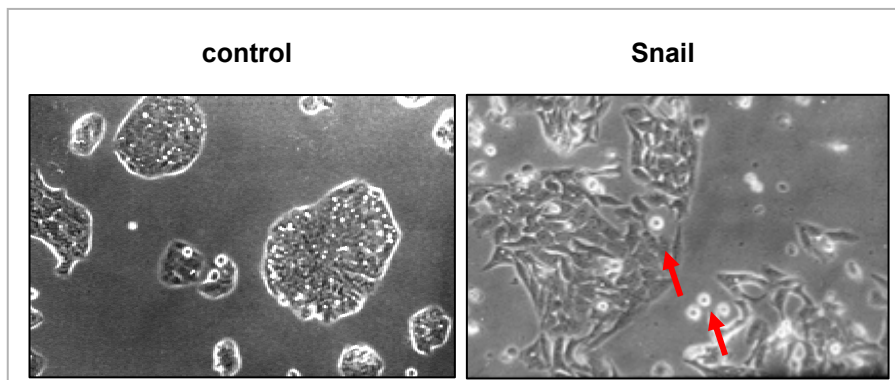


Figura R-6: Els clons de la línia HT-29 M6 que expressen Snail presenten un elevat nombre de cèl·lules suspeses. Cultiu de cèl·lules HT-29 M6 transfectades establement amb Snail-HA o amb el plàsmid buit (control). → cèl·lules suspeses.

Vam voler confirmar la viabilitat d'aquestes cèl·lules suspeses, comprovant a nivell molecular els nivells de procaspases, proteases inactives que s'activen rera l'estímul apoptòtic. Vam comprovar que els nivells de la procaspasa-3 no disminuïen en les cèl·lules no adherides respecte la població adherida, fet que recolzava la seva viabilitat (fig. R-7B).

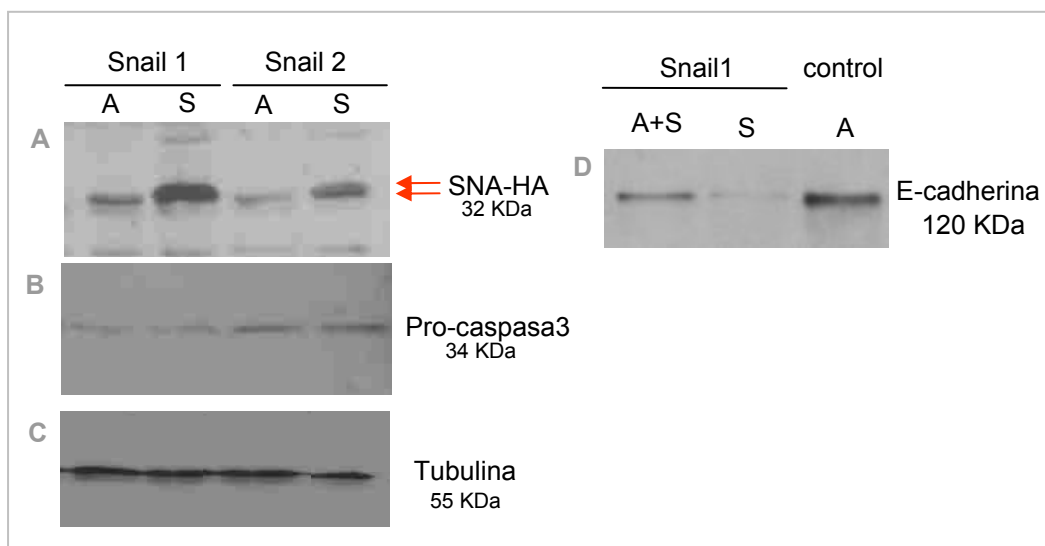


Figura R-7: Les cèl·lules HT-29 M6 no adherides presenten elevats nivells de Snail fosforilat, baixos nivells d'E-cadherina i no són apoptòtiques. Anàlisi per Western blot de l'expressió de Snail-HA (A), Pro-caspasa3 (B) Tubulina (control de càrrega) (C) en els extractes fraccionats de dos clons estables HT-29 M6 (Snail 1 i Snail 2). Estudi dels nivells d'E-cadherina (D) de la població total (A+S) i la població suspesa (S) d'un dels clons que expressen Snail-HA i de la població total (A) del clò control. Rera l'electroforesi en un gel del 12% de poliacrilamida i la seva transferència

es van blotejar les membranes amb els anticossos indicats A: cèl·lules adherides; S: cèl·lules suspeses.

Una altra dada a favor de la viabilitat de les cèl·lules no adherides presents en els cultius de les cèl·lules HT-29 M6 que expressaven Snail, era la seva capacitat de tornar-se a unir de nou a la placa de cultiu. Les cèl·lules descendents d'aquesta població "readherida" presentaven un fenotip mesenquimal més acusat, propi de cèl·lules amb una elevada expressió de Snail. Analitzant si hi havia diferències en el contingut de Snail entre les cèl·lules adherides i les suspeses, vam veure a més a més d'incrementar els nivells totals de la proteïna, apareixia una isoforma de major pes molecular molt més abundant en les cèl·lules no adherides, que es corresponia possiblement amb la forma fosforilada de dit factor (fig. R-7A).

La proteïna Snail reprimeix el promotor de l'E-cadherina i provoca una pèrdua d'adhesió cèl·lula-cèl·lula. Vam analitzar si els nivells superiors de Snail coincidien amb una davallada en els nivells de E-cadherina en aquesta població de cèl·lules no adherides i vam observar que els nivells d'E-cadherina, inferiors en les cèl·lules que expressaven Snail davant les cèl·lules control, disminuïen encara més en les cèl·lules no adherides (fig. R-7D).

Per últim vam analitzar en quina fase del cicle cel·lular es trobaven les cèl·lules no adherides. Vam anar recol·lectant cèl·lules suspeses durant 2h en el medi de cultiu per tal d'intentar esbrinar en quin moment del cicle cel·lular esdevenien cèl·lules no adherides. Vam observar que estaven majoritàriament en fase S i G2/M (fig. R-8b). Fent un anàlisi de cicle de la població total (adherida+suspesa) vèiem que el percentatge de cèl·lules en fase S i en fase G2/M incrementava respecte la població únicament adherida (fig. R-8a comparar-la amb la fig. R-4). En la població control, les partícules suspeses presentaven un cicle aberrant al ser analitzades pel citòmetre, indicatiu de la poca presència de cèl·lules viables no adherides en aquesta població control (fig. R-8c).

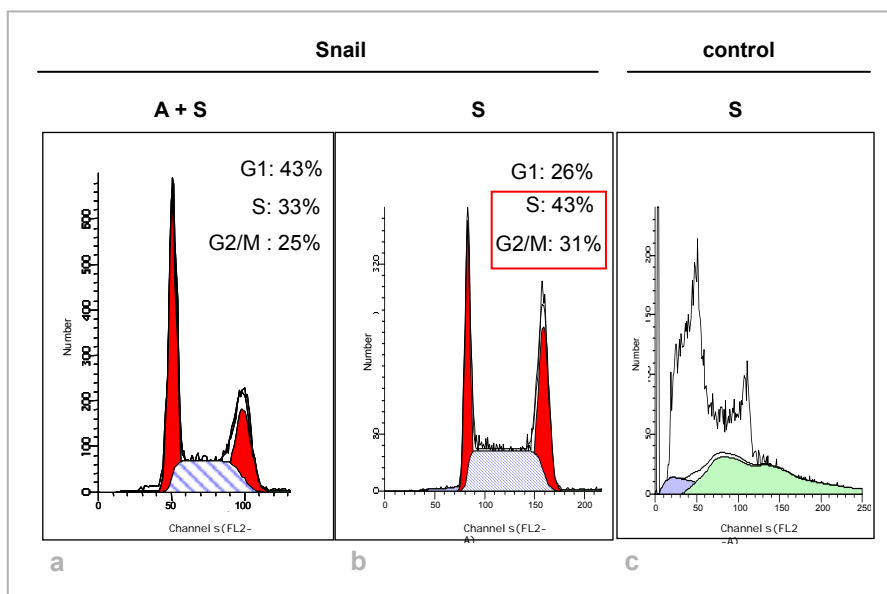


Figura R-8: Les cèl·lules no adherides dels clons HT-29 M6 que expressen Snail estan majoritàriament en les fases S i G2/M del cicle cel·lular. Histograma de cicle cel·lular de la població de cèl·lules adherides+suspeses (a) i suspeses (b) de les cèl·lules HT-29 M6 transfectades establement amb Snail-HA. Histograma de cicle cel·lular de la població de cèl·lules suspeses en la població control (c). Els histogrames b i c són fets a partir de cèl·lules fixades cada 2h, mentre que l'histogrames a és fet a partir d'un cultiu assincrònic fixat rera 24h de sembra. Les cèl·lules van ser prèviament fixades amb 70% EtOH i tractades amb iodur de propidi i RNAasa abans d'analitzar-les pel citòmetre de flux. (A: cèl·lules adherides; S: cèl·lules suspeses)

El fet que les cèl·lules HT-29 M6 que expressaven Snail perdessin l'adhesió possiblement en algun punt de S, G2 o M, podia incrementar el percentatge de cèl·lules en dites etapes, i emascarar un possible bloqueig en algun altre punt, com per exemple el bloqueig en G1 detectat en les MDCK. Aquest fet recolzaria la idea que a nivell de taxa de proliferació observéssim diferències, però que no les detectéssim a nivell de fases del cicle cel·lular.

3.4. Anàlisi de cicle cel·lular en cultius en matriu de col·lagen

Per tal d'esbrinar si el retard en cicle ocasionat per Snail era independent del possible endarreriment ocasionat per la pèrdua d'adhesió, vam sembrar cèl·lules HT-29 M6 dins d'una matriu de col·lagen i vam analitzar de nou la taxa de proliferació (fig. R-9). Dins la matriu de col·lagen les cèl·lules que expressaven Snail seguien proliferant més lentament que les cèl·lules control, tal i com indicaven la corba de creixement i el temps de duplicació (Dt), superior en dites cèl·lules. Els estudis de citometria de flux per veure en aquestes noves condicions quina etapa del cicle estava bloquejada per Snail, no ens van aportar cap dada d'interès. Dins la matriu les cèl·lules proliferaven molt lentament (els temps de duplicació eren molt més alts que els obtinguts en condicions de cultiu sense matriu de col·lagen (comparar els Dt de la fig. R-9 amb els Dt de la fig. R-1) de manera que presentaven un 80% de la població en fase G0/G1, tant si expressaven Snail com si no.

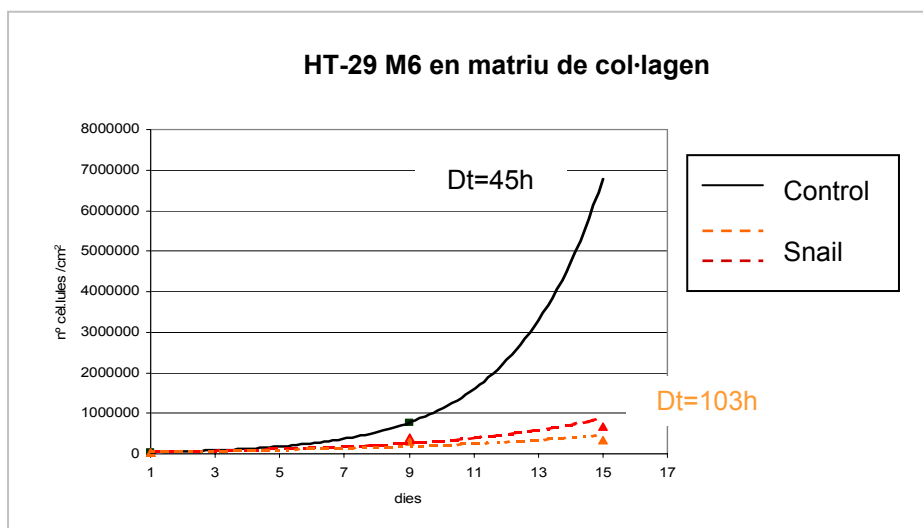


Figura R-9: Dins la matriu de col·lagen les cèl·lules HT-29 M6 segueixen proliferant menys quan expressen Snail. Tendència exponencial de les corbes de creixement de dos clons HT-29 M6 que expressen Snail-HA i el clo control sembrats dins d'una matriu de col·lagen. Per comptabilitzar el nombre de cèl·lules, el cultiu dins la matriu va ser incubat amb col·lagenasa abans de tripsinitzar-lo. Dt: Temps de duplicació. Valor R2: R2M6c=1; R2M6sna1=0,86; R2M6sna2=0,96.

Per tant, si en condicions on no és possible desunir-se del substrat, les cèl·lules que expressaven Snail seguien proliferant més lentament, volia dir que l'endarreriment ocasionat per dit factor de transcripció era independent del fenomen de pèrdua d'adhesió, que només en podria estar incrementant els efectes.

3.5. Estudi de l'arribada a la mitosi en les cèl·lules HT-29 M6.

Vam dissenyar un experiment per tal de determinar si l'increment de cèl·lules S i G2/M detectat en els clons HT-29 M6 que expressaven Snail al considerar la població de cèl·lules no adherides, era indicatiu de que Snail podia bloquejar l'arribada a la mitosi o alguna de les seves etapes, a més a més de retrassar l'entrada a la fase S.

Després de tractar les cèl·lules durant 12h amb nocodazol (agent que inhibeix la polimerització de microtúbuls i que bloqueja les cèl·lules en la prometafase) vam comptabilitzar les cèl·lules mitòtiques, positives per l'anticòs contra MPM-2 (reconeix fosfoproteïnes molt abundants durant la mitosi). La immunofluorescència revelava que el nombre de cèl·lules positives per MPM-2 corresponents a cèl·lules mitòtiques era molt més baix en els clons que expressaven Snail (5%) que en les cèl·lules control (45%) (fig. R-10).

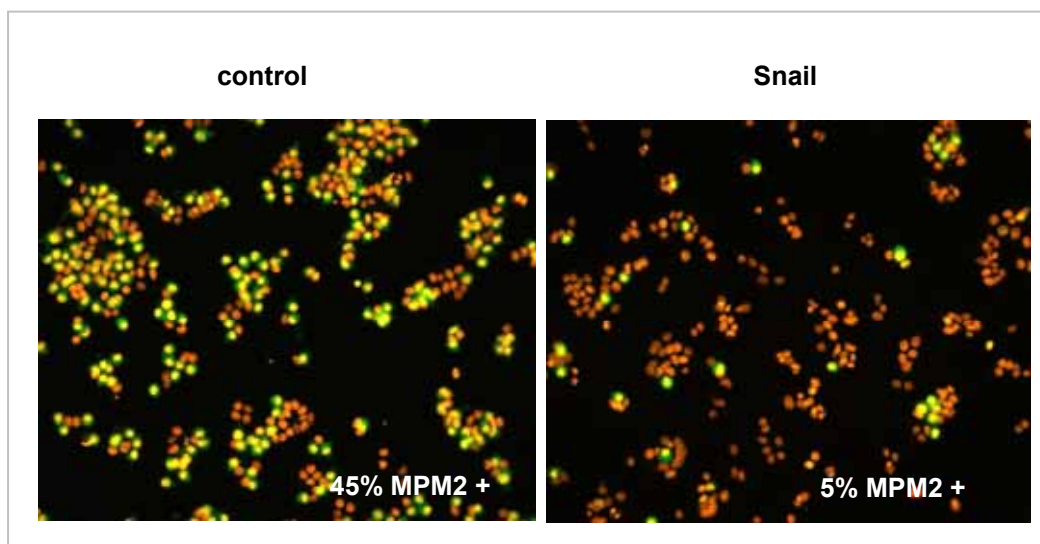


Figura R-10: Després del tractament amb nocodazol, a les cèl·lules HT-29 M6 que expressen Snail els costa més entrar en mitosi. Immunofluorescència anti-MPM2 i anti-mouse-FITC (marcatge verd) en cèl·lules adherides HT-29 M6 que expressen Snail-*HA* i HT-29 M6 control, tractades 12h amb 10uM nocodazol rera 24h post-sembra. Tinció nuclear amb iodur de propidi (marcatge vermell).

El tractament amb nocodazol fa que les cèl·lules siguin molt susceptibles a desenganxar-se del substrat en el procés de mitosi. Com que en aquesta línia cel·lular, l'expressió de Snail podia estar fent un efecte similar (que explicaria la presència de les cèl·lules no adherides), vam repetir l'experiment considerant la població adherida i la població suspesa en el medi rera el tractament amb nocodazol. En comptes d'anàlitzar pel microscopi les cèl·lules MPM-2 positives, vam fer-ho per citometria de flux. Com indiquen les figures R-11a i R-11c, les cèl·lules mitòtiques HT-29 M6 control es mantien unides a la placa de cultiu (no apareixen cèl·lules suspeses en la figura R-11c), mentre que les cèl·lules mitòtiques del clo que expressava Snail quedaven surant en el medi (en la figura R-11b s'observen molt poques cèl·lules mitòtiques adherides que encanvi són abundants en la fracció de cèl·lules suspeses (fig. R-11d)). Si consideràvem la població total (adherides i suspeses) conjuntament (fig. R-11e i R-11f), vèiem que les cèl·lules que expressaven Snail (fig. R-11f), presentaven menys cèl·lules en mitosi (31%) que les cèl·lules control (42%) (fig. R-11e), fet que indicava aturada en algun punt anterior a l'arribada a la fase M. El percentatge de cèl·lules en G2 però, era més elevat que en les cèl·lules control (23% respecte el 13% en les cèl·lules control) fet que podria indicar que el pas limitant era el pas de G2 a M.

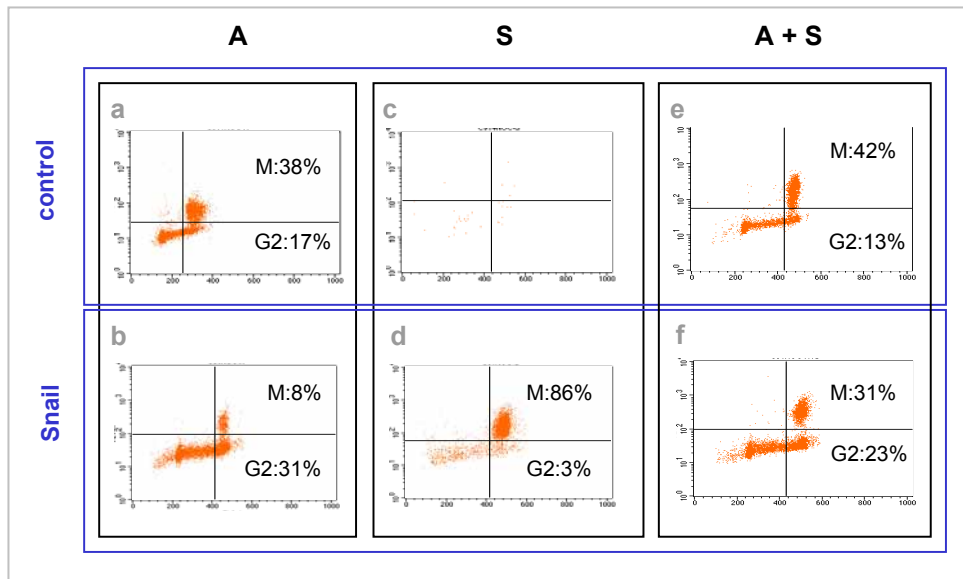


Figura R-11: Les cèl·lules HT-29 M6 que expressen Snail, presenten un retard en l'arribada a la mitosi i són més susceptibles a desunir-se del substrat. Histograma de cicle cel·lular de cèl·lules HT-29 M6 tractades amb 10uM nocodazol i incubades amb anti-MPM2 i anti-mouse-FITC. *a, c, e*: histograma de HT-29 M6 control. *b, d, f*: histograma de HT-29 M6 Snail-HA. *a, b*: població de cèl·lules adherides. *c, d*: població de cèl·lules suspeses. *e, f*: població de cèl·lules adherides i suspeses. Els quadrants dreta-dalt contenen les cèl·lules 4n i MPM2 positives (cèl·lules mitòtiques). Els quadrants dreta-baix contenen les cèl·lules 4n i MPM2 negatives (cèl·lules G2). El quadrants esquerra-baix contenen les cèl·lules que són 2n i MPM2-negatives (cèl·lules G0/G1 i S). A: cèl·lules adherides; S: cèl·lules suspeses.

4. LES CÈL·LULES RWP1 TRANSFECTADES TRANSITÒRIAMENT AMB GFP-SNAIL TAMBÈ PRESENTEN UN BLOQUEIG EN L'ENTRADA A LA FASE S

Vam voler confirmar l'aturada en G1 provocada per Snail en les línies estables MDCK i HT-29 M6, trasfectant transitòriament cèl·lules en cultiu amb diferents mutants GFP-SNA i fent un marcatge amb BrdU (esquema R-1) descriu la seqüència primària de Snail i facilita entendre les seqüències primàries del diferents mutants GFP-SNA). Les cèl·lules trasfectades (positives per GFP) i positives per BrdU, havien superat la fase G1 i havien començat a replicar el seu DNA (Figura R-12). De les cèl·lules trasfectades amb el vector peGFP (control) un 30% eren positives per BrdU (havien entrat a fase S durant les 6h que hi havia BrdU al medi). En canvi, de les GFP-SNA (1-264), només un 3% eren BrdU positives, fet que confirmava, que en aquesta línia cel·lular i en transitori, Snail també era capaç de bloquejar cicle, i també ho feia en el pas de G1 a S, com en les línies estables MDCK i HT-29 M6.

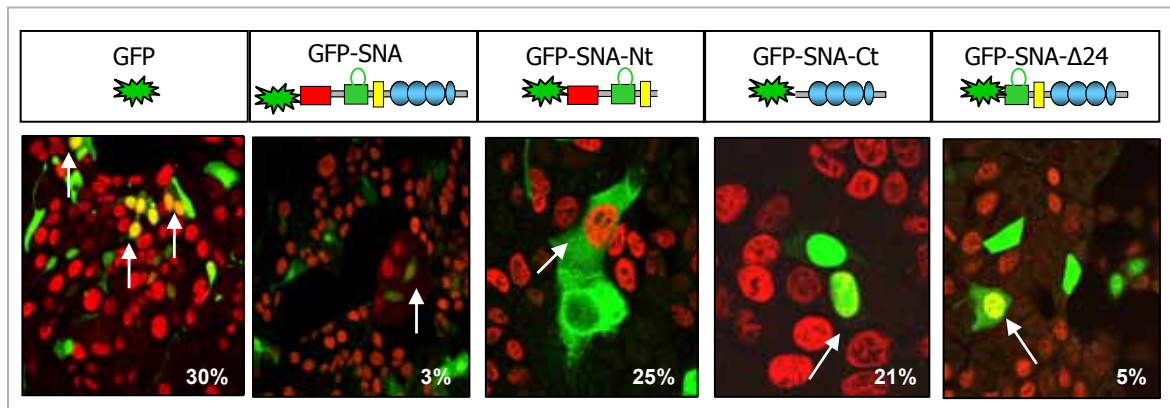


Figura R-12: GFP-SNA i el mutant GFP-SNA- Δ 24 retarden l'arribada a la fase S del cicle cel·lular i els mutants GFP-SNA-Ct i GFP-SNA-Nt no. Transfeccions transitòries de cèl·lules RWP1 amb diversos constructes GFP: GFP/ GFP-SNA/ GFP-SNA-Ct/ GFP-SNA-Nt/ GFP-SNA Δ 24. Rera 20h de transfecció, es va afegir 20uMBrdU al medi. 6h més tard es van fixar les cèl·lules amb 4%PFA, es va fer una immunofluorescència anti-BrdU i anticòs secundari conjugat amb rodamina. Cèl·lules vermelles: cèl·lules BrdU-positives (han passat per la fase S després d'afegir BrdU al medi). Cèl·lules verdes: cèl·lules transfectades amb algun constructe GFP . Percentatges i fletxes: cèl·lules positives per GFP i per BrdU.

Les cèl·lules transfectades amb el mutant GFP-SNACt (151-264) al qual li manca la regió d'unió al DNA, o amb el mutant GFP-SNANt (1-151) incapaç de ser exportat fora del nucli, es comportaven com les cèl·lules transfectades amb el vector peGFP, és a dir, que dits mutants no eren capaços de bloquejar l'entrada a la fase S. El mutant GFP-SNA Δ 24 (25-264) mancat del domini repressor SNAG, es comportava com Snail sencer (GFP-SNA (1-264)). Aquests resultats indicaven que en aquest model cel·lular, Snail també bloquejava l'entrada a la fase S i que per fer-ho necessitava regions del domini amino-terminal i carboxiterminal, però no de l'activitat repressora transcripcional.

Així doncs els resultats obtinguts fins aquest moment indicaven que l'expressió de Snail provocava un endarreriment de cicle cel·lular al bloquejar l'entrada a la fase S en les línies MDCK , HT-29 M6 i RWP1. Les cèl·lules HT-29 M6 que expressaven Snail presentaven un percentatge significatiu de cèl·lules no adherides a la placa de cultiu, que eren viables, expressaven elevats nivells de Snail i estaven majoritàriament en fase S i G2/M i que podrien estar relacionades amb el segon bloqueig esperat en aquesta línia cel·lular.

5. ELS NIVELLS DE SNAIL ENDOGEN OSCIL·LEN AL LLARG DEL CICLE CEL·LULAR.

Les cèl·lules NIH-3T3 (fibroblasts immortalitzats de ratolí) expressen elevats nivells de Snail, presenten un fenotip mesenquimal molt pronunciat i presenten una elevada taxa de proliferació. Per què en aquest model cel·lular no semblava que Snail bloquegés el cicle?.

5.1. L'expressió de Snail oscil·la a l'afegir sèrum al medi de cultiu.

Estudis anteriors fet en el nostre grup apuntaven que en un cultiu de NIH-3T3 Snail deixava d'expressar-se quan se suprimia el sèrum del medi de cultiu i ho tornava a fer de forma oscil·latòria a l'afegir sèrum de nou. En la figura R-13 pot veure's com l'expressió de Snail quasi desapareixia al sotmetre les NIH-3T3 a 24h de medi sense sèrum i s'expressava de nou al completar el medi amb 10%FBS. El pic màxim d'expressió de Snail endògen s'assolia a cap de 3 hores i posteriorment els nivells anaven oscil·lant, fent cicles d'unes 18 hores.

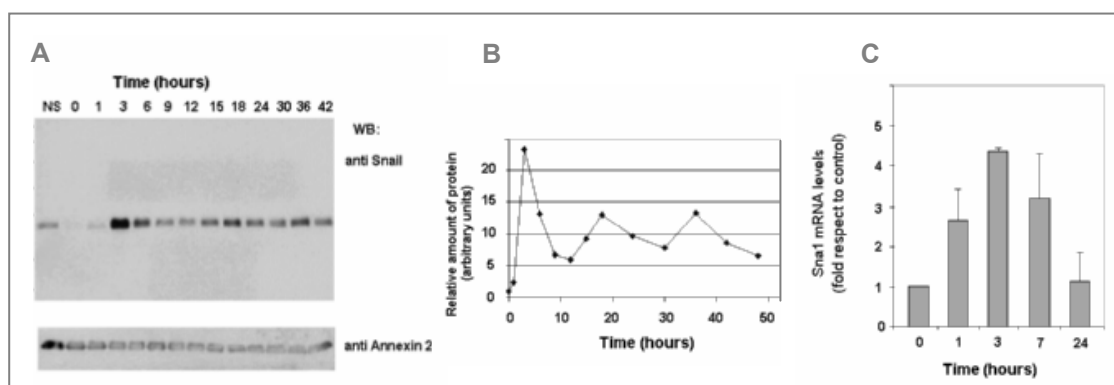


Figura R-13: En les NIH-3T3 Snail deixa d'expressar-se al treure el sèrum del medi i ho torna a fer de forma oscil·latòria al completar de nou el medi amb 10%FBS. Estudi dels nivells de proteïna i de mRNA de Snail endogen en les cèl·lules NIH-3T3 després de sotmetre el cultiu a 24h a medi sense sèrum (0h). Es va completar de nou el medi amb 10%FBS i durant els temps indicats es van recollir mostres per fer extractes proteics i de RNA. Es van determinar els nivells de proteïna Snail per Western blot (A) i els nivells de mRNA per RT-PCR semiquantitativa. Van densitometrar les bandes respectives i van dibuixar els gràfics amb les quantitats relatives de proteïna (B) i de mRNA (C) (assaig fet per Escrivà M.).

Al deplecionar el medi de cultiu de sèrum durant 24h, estaven aturant les cèl·lules en la fase G0/G1 del cicle cel·lular i aquest es tornava a engegar quan es completava de nou el medi de cultiu amb 10%FBS, moment a partir del qual Snail s'expressava de forma oscil·latòria. Aquest fet apuntava la possibilitat que l'expressió de Snail anés lligada al cicle cel·lular.

5.2. El pic d'expressió de Snail poc després d'afegir sèrum al medi, és dependent de sèrum, i no de cycle cel·lular.

Aquest primer pic d'expressió de Snail tres hores després d'haver afegit sèrum al medi, vam pensar que no era dependent de cycle cel·lular perquè en dit punt les cèl·lules encara no havien començat a ciclar de nou. L'oscil·lació posterior però, sí que podia anar lligada al cycle cel·lular.

Per comprovar que l'expressió inicial de Snail era dependent del sèrum afegit al medi, vam sincronitzar les 3T3 en una etapa del cycle cel·lular diferent de l'etapa G0/G1. Vam induir una aturada en la fase G2/M sincronitzant primer el cultiu cel·lular en G0/G1 amb medi deplecionat de sèrum durant 24h (fig. R-14; 0%FBS) i reconstituint-lo després amb 10%FBS + nocodazol durant 24h més. En aquest punt, quan teníem un percentatge important de cèl·lules mitòtiques tornàvem a treure el sèrum (per tal d'inhibir l'expressió de Snail) tot mantenint el nocodazol per evitar que les cèl·lules acabessin el cycle. Passades 24h més, vam afegir de nou sèrum al medi durant 3h, per tal d'induir de nou l'expressió de Snail mantenint el nocodazol per tal que les cèl·lules seguïssin aturades en la fase G2/M (fig. R-14; 10%FBS+noc). Una mostra la vam mantenir amb 0%FBS per tal que servís com a control de que l'expressió de Snail era dependent del sèrum afegit (fig. R-14; 0%FBS+noc). De les diferents mostres, vam fixar part de les cèl·lules per analitzar-les per citometria de flux i estudiar les fases del cycle cel·lular (fig. R-14A) i vam fer extractes proteics de la resta per tal d'analitzar els nivells de Snail endògen (fig R-14B).

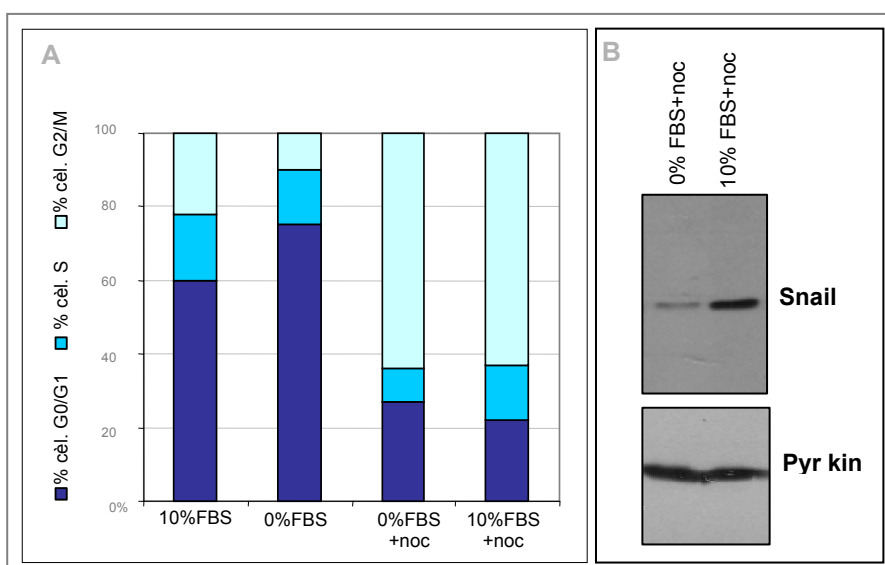


Figura R-14: La pujada dels nivells de Snail a l'afegir sèrum al medi es dona també quan les cèl·lules estan majoritàriament en G2/M. Estudi dels nivells de Snail endògen a l'afegir sèrum al medi de cultiu de cèl·lules NIH-3T3 sincronitzades amb nocodazol en la fase G2/M. Vam sembrar les 3T3 en medi DMEM-10%FBS i les vam deixar créixer durant 48h (mostra 10%FBS). Vam sincronitzar-les en l'etapa G0/G1 deixant-les 24h en medi sense sèrum (mostra 0%FBS). Vam reconstituir de nou el medi amb 10%FBS i vam afegir 600ng/ml nocodazol durant

24h més per tal d'obtenir un percentatge important de cèl·lules en G2/M. Vam deplecionar de nou el medi de sèrum (per inhibir l'expressió de Snail) i vam mantenir els nocodazol 24 hores més (perque les cèl·lules no prosseguïssin el cicle). Després, vam tractar les cèl·lules amb 10%FBS+600ng/ml nocodazol (mostra 10%FBS+noc) o les vam mantenir amb 0%FBS+600ng/ml nocodazol durant 3h. Part de les cèl·lules les vam fixar amb 70% EtOH i les vam analitzar per citometria de fluxe (A), i de la resta en vam fer extractes de proteïna total, electroforesi en un gel de poliacrilamida del 12% i assaig *Western blot* amb un anticòs anti-Snail i anti-piruvat quinasa (Pyr kin) com a control de càrrega (B).

L'estudi de citometria ens indicava que el procés de sincronització en la fase G2/M havia funcionat, ja que les mostres 10%FBS+noc i 0%FBS+noc presentaven un percentatge important de cèl·lules en G2/M (del 63% i del 64% respectivament) respecte el cultiu en creixement assincrònic (mostra 10%FBS) i les cèl·lules sincronitzades en G0/G1 (mostra 0%FBS) que presenten molt poques cèl·lules en G2/M. Analitzant l'expressió de Snail per *Western blot*, vam confirmar que cèl·lules aturades en G2/M i en absència de sèrum en el medi (mostra 0%FBS+noc) presentaven nivells molt baixos de Snail, i encanvi dits nivells pujaven quan les cèl·lules aturades en G2/M tenien sèrum al medi (mostra 10%FBS+noc). Aquest fet confirmava que el pic inicial de Snail observat després de 3h d'haver afegit sèrum al medi de cultiu, no era depenent de l'etapa del cicle cel·lular en que es trobaven les cèl·lules, sino de la presència de sèrum.

5.3. L'expressió cíclica de Snail concorda amb les fases del cicle cel·lular.

Per tal de determinar si l'expressió oscil·lant de Snail posterior a les 3h d'haver completat el medi amb sèrum era depenent del cicle cel·lular, vam fer estudis de citometria de flux i vam correlacionar els canvis d'expressió amb les etapes del cicle cel·lular. Vam sembrar NIH-3T3, les vam aturar en la fases G0/G1 i vam apagar l'expressió de Snail, deplecionant de sèrum el medi (idem assaig fig. R-13) durant 24h. Passat aquest temps, vam reiniciar el cicle cel·lular i vam induïr l'expressió de Snail afegint 10%FBS al medi de cultiu. Vam anar recollint mostres a diferents temps per tal de fer extractes proteics i analitzar l'expressió de Snail (fig. R-15A), i per fer estudis de citometria i analitzar en quina etapa del cicle cel·lular estaven dites cèl·lules (fig. R-15B).

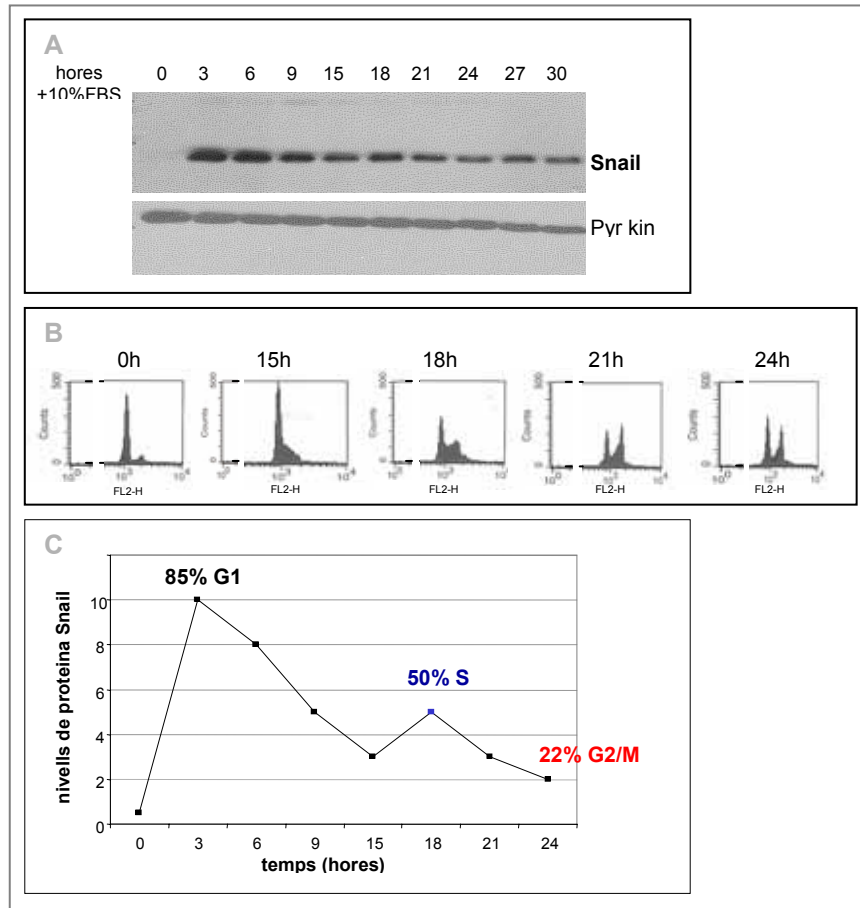


Figura R-15: L'expressió de Snail va oscil·lant, i dita oscil·lació concorda amb les fases del cicle cel·lular. Estudi correlatiu dels nivells de Snail endogen i l'estadi de cicle cel·lular en les cèl·lules NIH-3T3. Vam sembrar NIH-3T3 i vam sincronitzar-les en G0/G1 deplecionant el medi de sèrum durant 24h. Vam afegir sèrum de nou i durant els temps indicats vam recollir mostres per fer extractes proteics i determinar els nivells de Snail per Western blot (A). També vam anar fixant les cèl·lules amb 70% etanol i les vam analitzar per citometria de flux (B). Vam densitometrar les bandes del Western blot i vam correlacionar-ho amb la distribució en les fases del cicle, apuntant les dades més representatives (C). Pyr kin: piruvat quinasa : control de càrrega.

Com indica la figura R-15C, si que semblava que hi havia una correlació entre els nivells de Snail i les etapes del cicle cel·lular. Rera el punt àlgid inicial degut al sèrum acabat d'afegir al medi, els nivells de Snail dequèien coincidint amb l'entrada a l'etapa G1. Cap a les 18h els nivells de Snail tornaven a dibuixar un petit pic, just en el moment en que un percentatge important de cèl·lules entrava en la fase S. Després, quan les cèl·lules començaven a arribar a la G2/M els nivells tornaven a baixar.

El fet que en les NIH-3T3, que presentaven una elevada taxa de proliferació, l'expressió de Snail dequèies en les fases G1 i G2 del cicle cel·lular podia indicar que quan Snail s'expressava constitutivament bloquejava dites etapes i que en els fibroblastes l'expressió

oscil·latòria de Snail evitava l'aturada de cicle observada en les línies transfectades on l'expressió de Snail no està regulada transcripcionalment.

6. LES CÈL·LULES QUE EXPRESSEN SNAIL PRESENTEN MENYS ACTIVITAT CDK1.

Per tal de determinar quin mecanisme podia utilitzar Snail per bloquejar el cicle cel·lular, vam iniciar estudis moleculars.

6.1. En un cultiu assincrònic, els nivells de CDK1 inactiva incrementen quan les cèl·lules expressen Snail.

Una primera aproximació, per entendre quin efecte feia Snail a nivell molecular, va ser comparar les quantitats de CDK1 (implicada en la transició G2/M) i CDK2 (implicada en la transició G1/S) inactives (fosforilades en el residu Y15) entre les cèl·lules que expressaven establement Snail i les cèl·lules control. Aquest anàlisi es va dur a terme fent un assaig de *Western Blot* amb un anticòs que reconeixia la Y15 fosforilada de CDK1 i CDK2 (CDK1/2-Y15P).

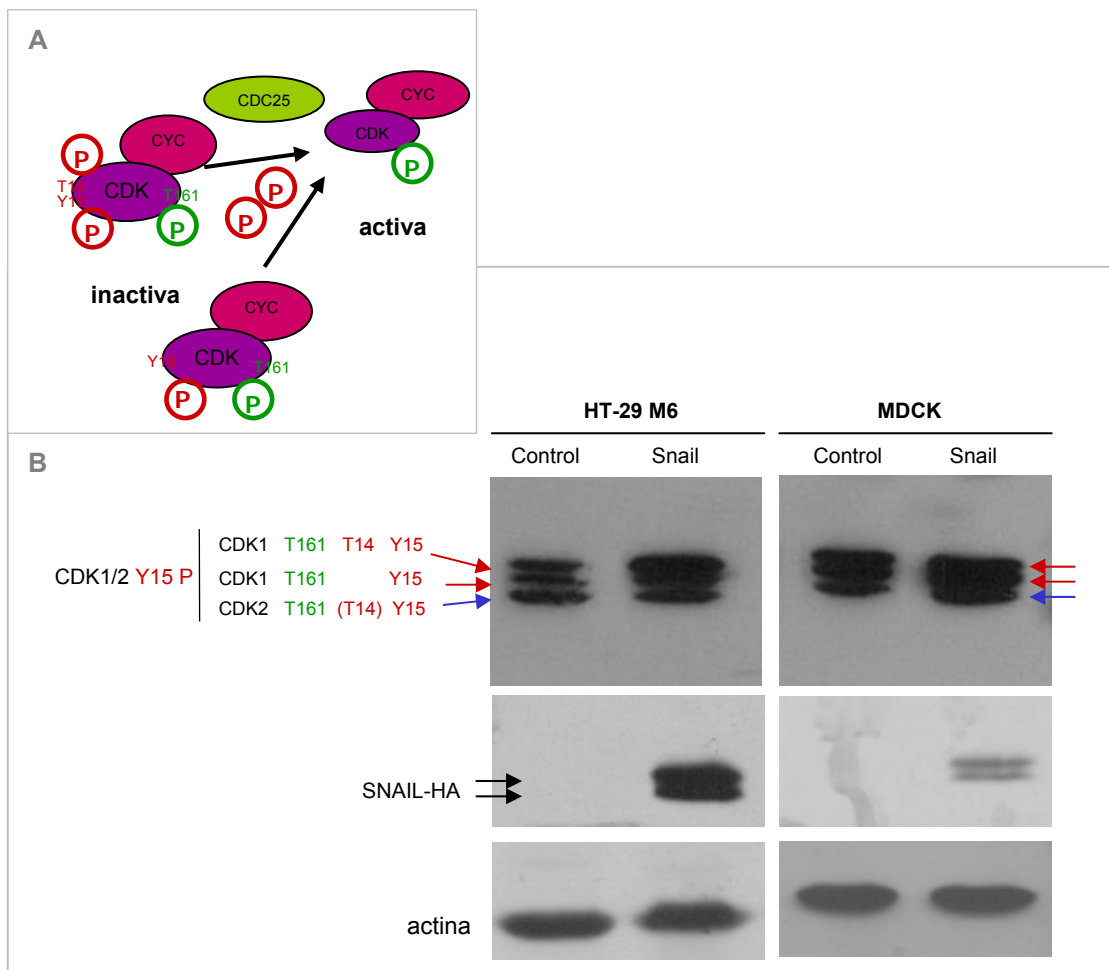


Figura R-16: Les cèl·lules que expressen Snail presenten més CDK1 inactiva que les cèl·lules control. **B:** Detecció de les isoformes inactives per fosforilació en el residu Y15 de CDK1 (*fletxes vermelles*) i CDK2 (*fletxes blaves*) en les línies HT-29 M6 i MDCK transfectades establenent amb Snail-HA i amb el vector buit (control). Els extractes totals es van fer a partir de cèl·lules tripsinitzades 24h post-sembra. Rera l'electroforesi en un gel del 15% de poliacrilamida i la seva transferència es va blotejar la membrana amb anti-Y15-P-cdk1/2, anti-HA i anti-actina (control de càrrega). **A:** Esquema de les isoformes activa i inactives de CDK1/2 depenent dels residus fosforilats.

En la figura R-16 pot veure's que els nivells de les dos isoformes inactives de CDK1, indicades amb fletxes vermelles, pujaven considerablement en la línia HT-29 M6 que expressava Snail. En la Línia MDCK les diferències no eren tan clares, però també s'observava la mateixa tendència. A nivell de formes inactives de CDK2, indicades amb una fletxa blava, no semblava que en la línia HT-29 M6 hi haguessin diferències entre les cèl·lules control i les cèl·lules que expressaven Snail. En canvi en les MDCK si que semblava que en presència de Snail hi havia una mica més de CDK2 inactiva.

6.2. Les cèl·lules que expressen Snail presenten menys activitat CDK1 .

Per tal de confirmar que les cèl·lules HT-29 M6 i MDCK quan expressaven Snail tenien menys activitat CDK1, vam fer assaigs quinasa, immunoprecipitant CDK1 d'extractes cel·lulars, i avaluant-ne l'activitat mitjançant la capacitat de fosforilar la histona H1 amb γ -**32P** ATP (fig. R-17). Com a control negatiu d'activitat CDK1 vam tractar cèl·lules control amb Roscovitina, inhibidor de CDK1 i CDK2.

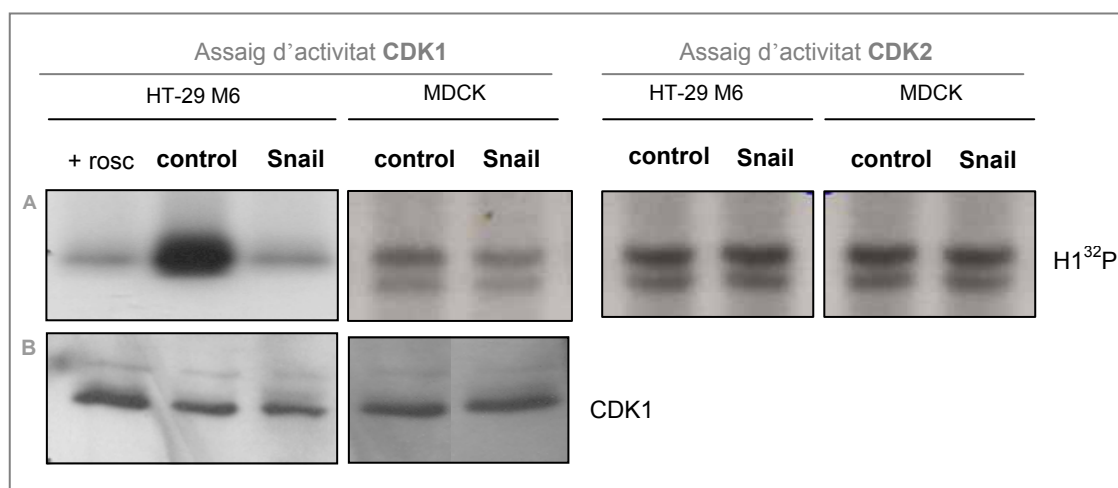


Figura R-17: Les cèl·lules que expressen Snail presenten menys activitat CDK1 que les cèl·lules control. **A :** Assaig d'activitat CDK1/CDK2 fet a partir de proteïna CDK1/CDK2 immunoprecipitada d'uns d'extractes proteïcs de cèl·lules HT-29 M6 i MDCK transfectades establenent amb Snail-HA o amb el vector buit (control). Els assaigs quinasa van realitzar-se utilitzant [γ -32P] ATP i histona H1 com a substrat de fosforilació. Com a control negatiu

d'activitat, vam utilitzar extractes de cèl·lules control tractades O/N amb 25µM roscovitina (+rosc). *B*: Western Blot anti-CDK1, de la CDK1 immunoprecipitada per fer l'assaig d'activitat.

En la línia HT-29 M6, les cèl·lules que expressaven Snail presentaven menys histona H1 fosforilada, indicatiu de menys activitat CDK1 respecte les cèl·lules control (fig. R-17A). En la línia MDCK, on la davallada de la forma inactiva de CDK1 no era tan evident com en la línia HT-29 M6 també detectàvem una lleugera disminució de l'activitat de dita quinasa en les cèl·lules que expressaven Snail. Una part de la quinasa immunoprecipitada es feia córrer en un gel d'acrilamida i es feia un assaig Western blot anti-CDK1 per tal d'assegurar-nos que les quantitats totals de CDK1 eren les mateixes en totes les mostres de l'assaig i que el que diferia era l'estat d'activitat de dita quinasa (fig. R-17B).

Vam fer el mateix assaig, però immunoprecipitant CDK2. Ni en la línia HT-29 M6 ni en la línia MDCK vam observar diferències a nivell d'activitat CDK2 al comparar les cèl·lules que expressaven Snail amb les cèl·lules control (fig. R-17A).

7. ELS NIVELLS DE CDC25A DISMINUEIXEN EN LES CÈL·LULES QUE EXPRESSEN SNAIL.

7.1. Els nivells de CDC25A disminueixen en les línies HT-29 M6 i MDCK transfectades estabament amb Snail.

El bloqueig de cicle cel·lular que pateixen les cèl·lules del mesoderm prospectiu durant la gastrulació és causa d'una davallada d'activitat Cdc2/CDK1 (Cdc2 en llevat i *Drosophila*; CDK1 en mamífers). Snail hi juga un paper essencial, ja que els mutants per aquest factor de transcripció, no gastrulen correctament en part degut a que les cèl·lules mesodèrmiques entren a la fase M abans d'hora. Snail, fa el seu efecte repressor sobre Cdc2/CDK1, impedit que la fosfatasa String/CDC25 (String en *Drosophila*; CDC25 en mamífers) la defosforili (Johnston, 2000). En les cèl·lules de mamífer, s'han descrit tres fosfatases encarregades d'activar les diferents etapes del cicle cel·lular, la CDC25A, la CDC25B i la CDC25C. Vam voler analitzar els nivells de les tres proteïnes en cultius assincrònics de les dos línies estables per Snail, les HT-29 M6 i les MDCK .

Quan vam analitzar els nivells de CDC25A per Western Blot, tant les HT-29 M6 com les MDCK que expressaven Snail presentaven una davallada en els nivells de la proteïna detectada al comparar-les amb les cèl·lules control (fig. R-18A).

Vam confirmar que la banda de 62KDa corresponia a CDC25A expressant la variant 1 de splicing de la CDC25A humana (fig. R-18C) en les cèl·lules MDCK. En la figura R-18B, es detecta la CDC25A transfectada, amb un pes hipotètic de 58KDa i un pes real de 62KDa, equivalent a la CDC25A endògena detectada en les cèl·lules MDCK transfectades només

amb el pcDNA3. Les bandes de pes inferior presents en la mostra de cèl·lules que expressaven la CDC25A exògena possiblement eren bandes de degradació. D'aquesta manera, confirmàvem que la banda de 62 KDa detectada amb l'anticòs anti-CDC25A en les línies estables HT-29 M6 i MDCK (fig. R-18A) era realment la fosfatasa esperada.

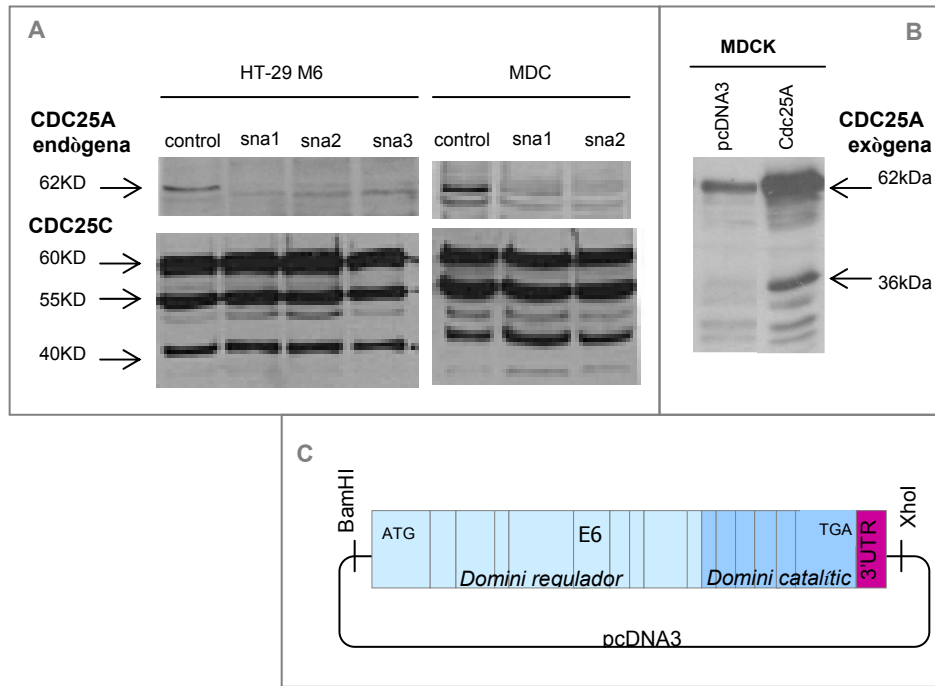


Figura R-18: Els nivells de CDC25A disminueixen en les línies HT-29 M6 i MDCK transfectades establement amb Snail. *A:* Detecció de CDC25A endògena en extractes de proteïna total de cèl·lules HT-29 M6 i MDCK, transfectades establement amb Snail-*HA* o amb el vector buit (control). Rera l'electroforesi en gels del 12% de poliacrilamida es va fer un assaig Western blot utilitzant l'anticòs anti-CDC25A i anti-CDC25C. * No sabem del cert si totes les bandes es corresponen a diferents isoformes de la Cdc25C, però en tot cas, no canvien els nivells de cap d'elles al comparar els clons Snail amb els controls, i ens es útil per normalitzar el WB de Cdc25A. *B:* Detecció de CDC25A en cèl·lules MDCKwt transfectades amb 1 ug de pcDNA3/pcDNA3-CDC25A. Es feren extractes de proteïna total i electroforesi en gel del 12% de poliacrilamida i la posterior detecció de CDC25A per Western blot. *C:* Variant 1 de splicing de CDC25A humana (524aa) clonada en el pcDNA3, conjuntament amb un fragment de 33nts del 3' UTR. Constructe transfectat en les MDCK de la figura B.

El fet que els anticossos anti-CDC25B i anti-CDC25C fossin poc específics (reconeixien diverses bandes d'un pes molecular que no coincidia amb l'esperat segons la mida de les diferents variants de splicing) i que en aquell moment semblava que l'únic membre de la família de les CDC25 implicat en més d'un punt del cicle era CDC25A, van ser els responsables que continuéssim l'estudi només de la CDC25A.

7.2. Les cèl·lules que expressen Snail, aturades en G0/G1 rera el deplecionament de sèrum, presenten nivells basals de CDC25A més baixos.

Però el fet que en un cultiu assincrònic les cèl·lules que expressaven Snail presentessin nivells inferiors de CDC25A no volia dir necessàriament que la davallada de CDC25A fos la causa de l'endarreriment del cicle cel·lular, sino que en podia ser la conseqüència. Snail podia estar bloquejant el cicle, no fent disminuir directament els nivells de CDC25A, sino inhibint l'activitat d'algun altre enzim implicat i dit efecte provocaria un endarreriment del cicle i com a conseqüència, una davallada dels nivells de CDC25A. Per això, vam voler estudiar els nivells de CDC25A en etapes concretes del cicle cel·lular i no en un "pool" de cèl·lules assincrònic.

L'objectiu era tenir grups de cèl·lules en una fase concreta del cicle cel·lular, prèvia a l'activitat de CDC25A, per tal de veure si les cèl·lules amb elevats nivells de Snail, presentaven nivells inferiors de CD25A, fet que retrassaria l'entrada a la fase següent.

Vam provar de sincronitzar les HT-29 M6 i les MDCK en diferents etapes del cicles cel·lular, utilitzant diverses drogues (Pines et al., 1989) però cap d'elles ens va funcionar prou bé, ja que no vam aconseguir aturar i engegar de nou un grup de cèl·lules prou representatiu per analitzar nivells de marcadors moleculars.

Vam optar per sincronitzar les cèl·lules amb medi sense sèrum i analitzar els nivells de CDC25A en les cèl·lules aturades en G0/G1. Després de 48h d'haver sembrat les cèl·lules a baixa densitat, vam privar el medi de cultiu de sèrum durant 72h. A les 0h, 12h, 16h i 20h d'haver reconstituït el medi amb 10% FBS vam fixar part de les cèl·lules per tal d'analitzar-les per citometria de flux, i vam fer extractes proteics per analitzar els continguts de CDC25A per Western blot (fig. R-19).

Rera els 3 dies de medi sense sèrum, tant les cèl·lules que expressaven Snail com les cèl·lules control estaven aturades en G0/G1 (fig. R-19A). En aquest estadi, les quantitats basals de CDC25A seguien sent més baixos en les cèl·lules que expressaven Snail (fig. R-19B). Després de 12h d'haver afegit el sèrum, les cèl·lules control ja havien començat a entrar a la fase S mentre que les cèl·lules que expressaven Snail no ho fèien fins cap a les 16h, quan les cèl·lules control ja estaven en plena fases S (ho indiquen l'histograma i la incorporació de BrdU) (fig. R-19A). Observem que a les 12h, les cèl·lules control presentaven nivells superiors de CDC25A, possiblement perque les cèl·lules transfectades amb Snail encara no havien començat a ciclar. Els nivells de CDC25A s'igualaven a les 16h, possiblement perque les cèl·lules control l'estaven utilitzant per passar per la fase S i entrar a la fase G2 i les cèl·lules que expressaven Snail per passar per la fase G1 i entrar a la fase S (fig. R-19B). Aquest experiment només ens permetia comparar els nivells de CDC25A entre poblacions de cèl·lules aturades en la fase G0/G1 del cicle i confirmar que en dit estadi, els nivells basals de CDC25A eren més baixos quan les cèl·lules expressaven Snail.

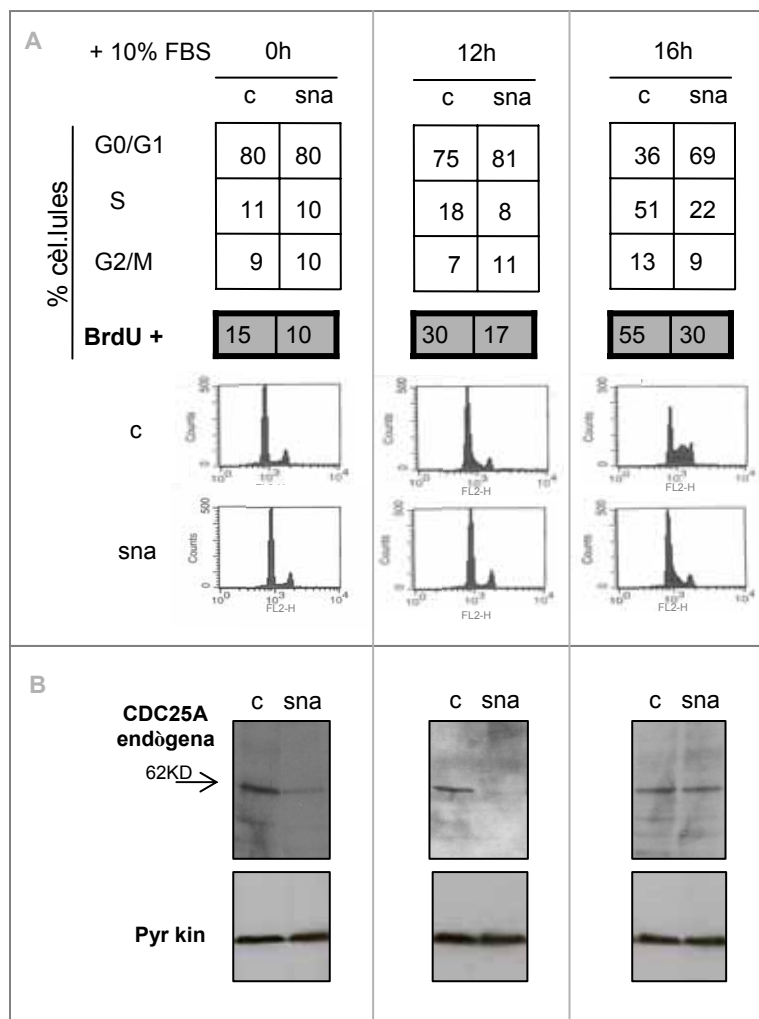


Figura R-19: Les cèl·lules HT-29 M6 que expressen Snail aturades en G0/G1 presenten nivells inferiors de CDC25A i triguen més en reiniciar el cycle cel·lular. Estudi de cycle cel·lular de cèl·lules HT-29 M6 transfectades establement amb Snail-HA (Sna) o amb el vector buit (c), privades de FBS durant 3 dies i reactivades a ciclar de nou amb 10%FBS. 1 hora abans de fixar les cèl·lules vam afegir BrdU al medi per tal de poder diferenciar la població que reiniciava el cycle. Part de les cèl·lules es van fixar per analitzar-les per citometria i de la resta se'n van fer extractes proteics per poder detectar els nivells de CDC25A per Western blot. A: Estudi de citometria de flux. Després de fixar les cèl·lules amb 70%EtOH es va procedir a detectar la BrdU i a fer la tinció nuclear amb iodur de propidi característica de l'anàlisi citomètric. B: Detecció de CDC25A en extractes de proteïna total. Rera l'electroforesi en gels del 12% de poliacrilamida es va fer un assaig de Western blot, utilitzant l'anticòs anti-CDC25A i anti-piruvat quinasa (Pyr kin) per normalitzar les mostres.

7.3. La fracció de cèl·lules en la fase G0/G1 d'un cultiu assincrònic, presenten nivells de CDC25A més baixos si expressen Snail.

Per tal de determinar si els nivells de CDC25A en etapes concretes del cycle cel·lular eren més baixos en les cèl·lules que expressaven Snail, vam provar de fraccionar les cèl·lules per Cell Sorting. Rera el procés descrit en la figura R-20, podíem obtenir poblacions pures en les

fases G0/G1, S i G2/M i de dites cèl·lules en podem fer extractes proteics i analitzar per Western blot els nivells de CDC25A.

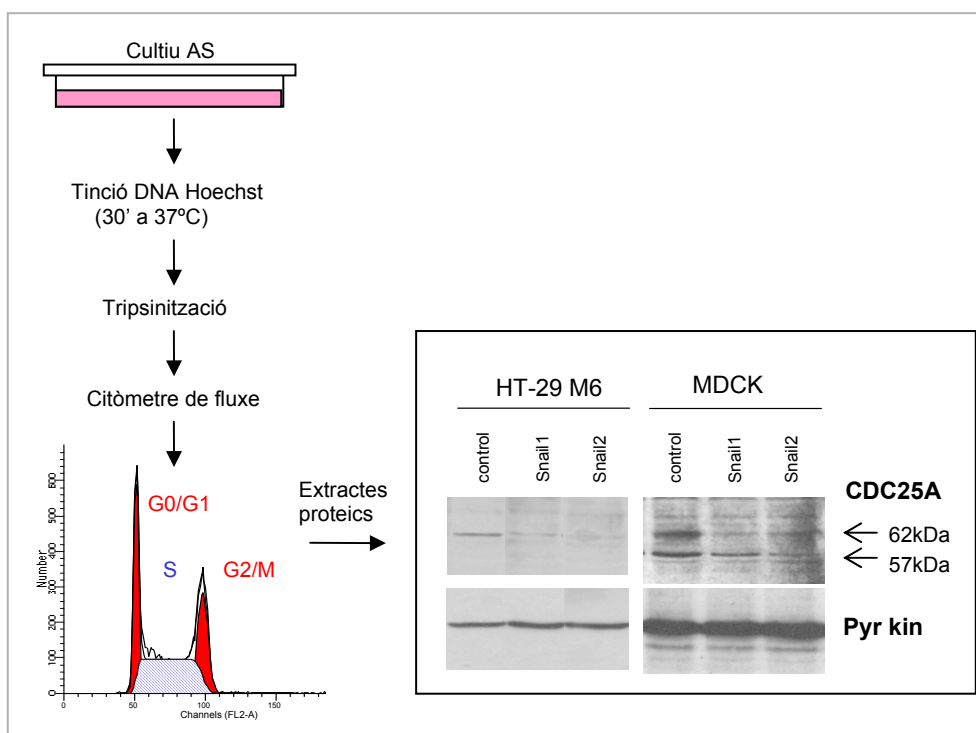


Figura R-20: La fracció de cèl·lules en G0/G1 presenta nivells inferiors de CDC25A quan les cèl·lules expressen Snail. Detecció de CDC25A en extractes de proteïna total de la població cel·lular en G0/G1 d'un cultiu AS de les línies transfectades establiment amb Snail-HA o amb el vector buit (control), obtinguda per *Cell Sorting* segons l'esquema.

Tant en la línia HT-29 M6 com en les MDCK, els nivells de CDC25A seguien sent més baixos en les cèl·lules que expressaven Snail.

No vam poder estudiar què passava en les poblacions S i G2/M perquè no disposàvem de "pools" cel·lulars prou purs. En tot cas però, analitzant la població en G0/G1 determinàvem que la davallada de CDC25A en les cèl·lules que expressaven Snail no era conseqüència d'un endarreriment en el cicle, sinó que semblava ser-ne la causa.

7.4. Els nivells de CDC25A endògena disminueixen en les MDCK transfectades transitòriament amb quantitats creixents de Snail.

En els clons estables Snail feia disminuir els nivells de la CDC25A endògena. Vam voler confirmar que dita davallada també es donava quan Snail es transfectava en transitori i que hi havia una correlació entre quantitats creixents de Snail i la baixada de CDC25A. Vam transfectar cèl·lules MDCK amb quantitats creixents pcDNA3-Snail-HA o de pEGFP i rera 48h d'expressió vam lisar les cèl·lules i vam fer extractes de proteïna total que vam analitzar per Western blot. Com indica la figura R-21, quantitats creixents de GFP no fèien disminuir

els nivells de CDC25A endògena presents en les MDCK, ja que dits nivells es mantienien iguals als de les cèl·lules transfectades amb el vector pcDNA3. En canvi, si que baixaven els nivells de CDC25A endògena quan les cèl·lules expressaven Snail i ho fèien de forma inversament proporcional a les quantitats creixents amb les que les cèl·lules eren transfectades.

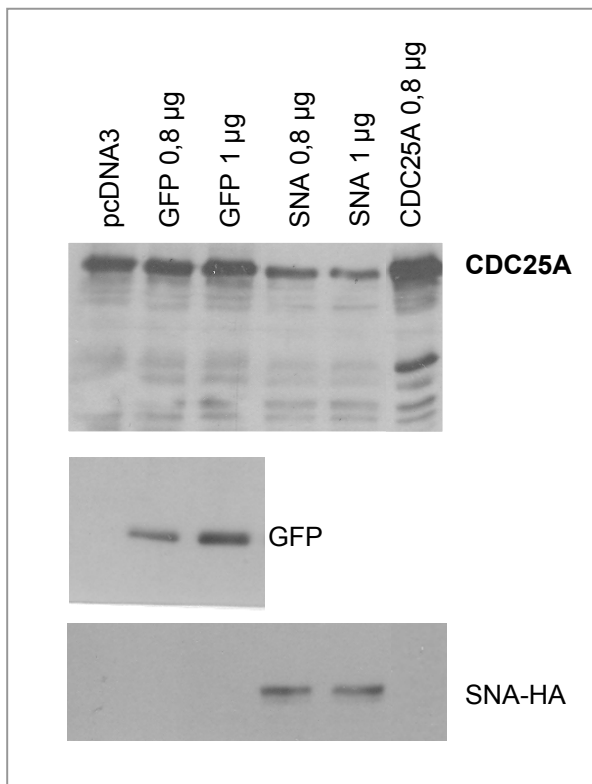


Figura R-21: Els nivells de CDC25A endògena disminueixen en les cèl·lules MDCK transfectades transitòriament amb quantitats creixents de Snail. Detecció de CDC25A en cèl·lules MDCK transfectades transitòriament amb pcDNA3-Snail-*HA* (SNA) o pEGFP (GFP) 24h post sembra. Rera 48h d'expressió es feren extractes de proteïna total i electroforesi en gel del 12% de poliacrilamida i la posterior detecció de CDC25A, GFP i SNA-*HA* per Western blot. També es van transfectar cèl·lules amb pcDNA3-CDC25A com a control d'expressió de CDC25A endògena.

8. SNAIL NO INHIBEIX LA TRANSCRIPCIÓ DE CDC25A

8.1. Els nivells del mRNA de CDC25A no disminueixen en les cèl·lules que expressen establement Snail.

Snail és un factor transcripcional conegut principalment per inhibir la transcripció de diversos gens epitelials implicats en la EMT. Vam tractar de determinar si la davallada en els nivells de la proteïna CDC25A rera l'expressió de Snail era deguda a que Snail en reprimia la transcripció.

Vam analitzar els nivells de mRNA de CDC25A per RT-PCR semiquantitativa en les cèl·lules HT-29 M6 transfectades establement amb Snail. Vam observar que els nivells de transcrit no

eren inferiors en les cèl·lules que expressaven Snail respecte les cèl·lules control, sino que més aviat, tendien a ser una mica mes alts (fig. R-22). (en el punt 12 completem aquest estudi)

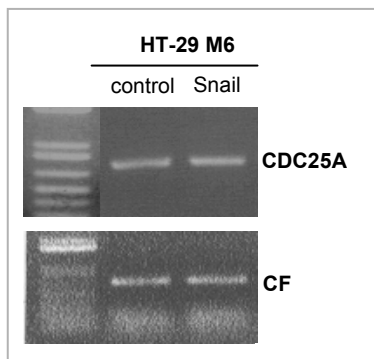


Figura R-22: Els nivells del mRNA de CDC25A no disminueixen en les cèl·lules que expressen Snail. Estudi dels nivells de mRNA de CDC25A en les línies HT-29 M6 transfectades estabament amb Snail-*HA* i amb el vector buit (control). Es van fer extraccions de RNA total i es van determinar els nivells de mRNA de CDC25A per RT-PCR semiquantitativa. CF: ciclofilina: control de càrrega.

8.2. Els nivells de CDC25A exògena també disminueixen quan les cèl·lules són cotransfectades amb Snail.

Quan les HT-29 M6 o les MDCK expressaven Snail, els nivells de la proteïna CDC25A endògena disminuïa però els nivells del mRNA no. Vam voler corroborar que la davallada de CDC25A no era a nivell transcripcional transfectant la CDC25A i analitzant si els nivells de proteïna exògena també baixaven al cotransfectar Snail. Vam cotransfectar cèl·lules MDCKwt amb pcDNA3-Cdc25A i pcDNA3/pcDNA3-Snail-HA i vam veure que en aquest cas, Snail també feia disminuir els nivells de la CDC25A cotransfectada (fig. R-23)

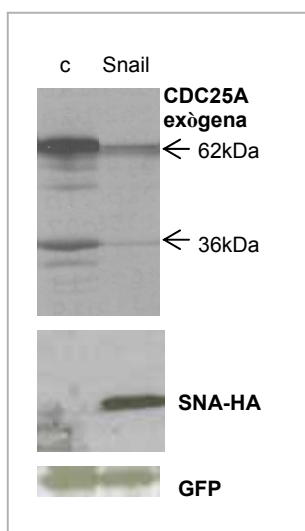


Figura R-23: Els nivells de CDC25A exògena disminueixen quan les cèl·lules són cotransfectades amb Snail. Detecció de CDC25A en cèl·lules MDCK cotransfectades amb pcDNA3-Cdc25A, pcDNA3/pcDNA3-SNA-HA i pEGFP (control de cotransfecció). Es feren extractes de proteïna total i electroforesi en gel del 12% de poliacrilamida i la posterior detecció de CDC25A, Snail i GFP per Western blot. c: control: cèl·lules transfectades amb pcDNA3. SNA: cèl·lules transfectades amb pcDNA3-SNA-HA.

Aquests resultats confirmaven que l'efecte de Snail sobre CDC25A no era un efecte transcripcional i indicaven que la CDC25A expressada contenia els elements necessaris (regió codificant + 33 nucleòtids de la regió 3'UTR; fig. R-18C) per a que Snail modulés la seva expressió.

9. SNAIL NO FA MÉS INESTABLE LA CDC25A

Es pensa que durant el procés de gastrulació de *Drosophila*, Snail indueix la formació del futur mesoderm fent que les cèl·lules que han de migrar no entrin en mitosi, tot promovent la degradació de String (homòloga de CDC25A en *Drosophila*) via proteosoma (Johnston, 2000). En cèl·lules de mamífer està descrit que la CDC25A es va traduint i degradant via proteosoma durant tota la interfase (Mailand et al., 2002).

Nosaltres havíem observat que les cèl·lules en cultiu que expressaven Snail, presentaven nivells més baixos de CDC25A i vam pensar que possiblement el mecanisme utilitzat per Snail per fer baixar els nivells de dita fosfatasa, era el mateix que el que utilitzava en el procés de gastrulació de *Drosophila*.

9.1. La davallada de CDC25A en les cèl·lules que expressen Snail no es deu a una menor estabilitat de la proteïna.

La cicloheximida (CHX) és un bloquejador de la traducció, de manera que al sotmetre les cèl·lules a aquesta droga, aturàvem la síntesi de CDC25A i podíem fer un seguiment de la seva degradació.

Vam tractar els clons estables Snail, amb 20µg/ml cicloheximida durant diferents intervals de temps, vam fer extractes de proteïna total i vam analitzar els nivells de CDC25A per *Western blot*. Tal i com indica la figura R-24, tant en les MDCK com en les HT-29 M6, els nivells basals de CDC25A (temps 0') eren més baixos en les cèl·lules que expressaven Snail. En cap de les dues línies semblava però, que la presència de Snail promogués una major taxa de degradació de la CDC25A ja que les pendents de les línies de tendència no eren pas més acusades en els clons que expressaven Snail.

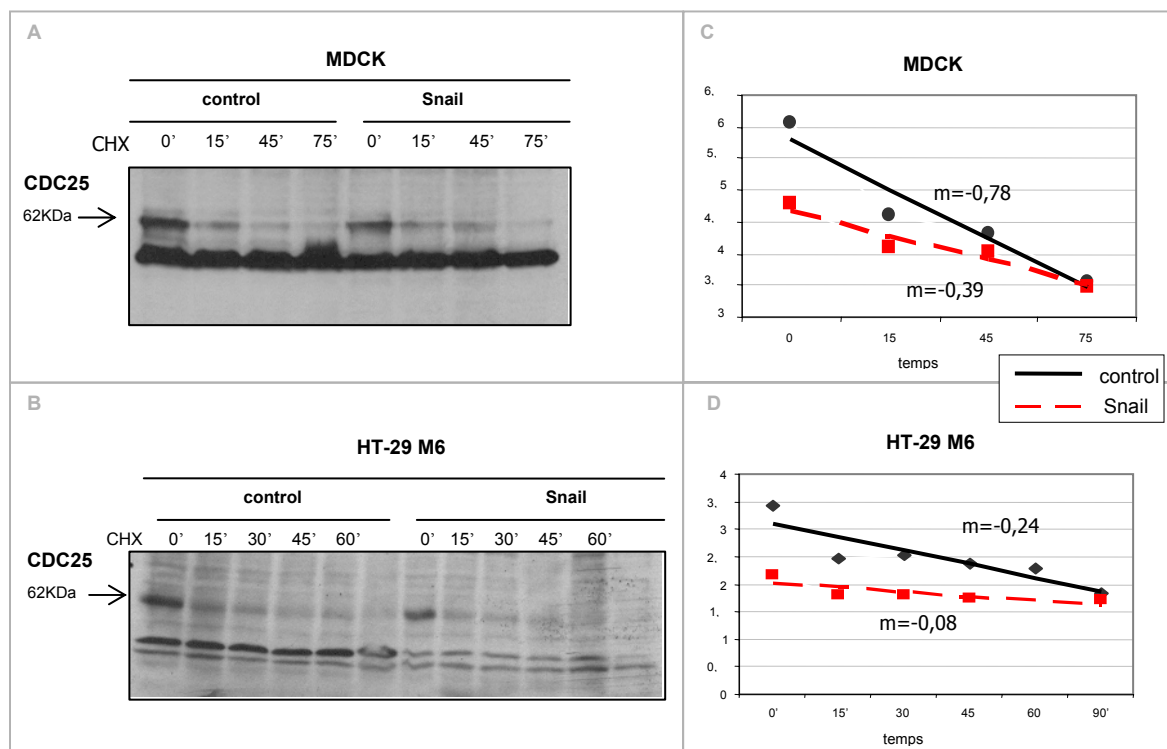


Figura R-24: En els clons estables MDCK i HT-29 M6, Snail no inestabilitza la CDC25A. Estudi de l'estabilitat de la CDC25A endògena de les línies MDCK i HT-29 M6 transfectades establement amb Snail-*HA* o amb el vector buit (control). Les cèl·lules en cultiu es van tractar amb 20µg/ml cicloheximida durant els temps indicats. Rera el tractament es feren extractes de proteïna total i electroforesi en gel del 12% de poliacrilamida i la posterior detecció de CDC25A per Western blot (A i B). Es van densitometrar les bandes corresponents a la proteïna endògena CDC25A, es va fer una gràfica i es van analitzar les pendents (m) de les línies de tendència (C i D). CHX: cicloheximida

9.2. La davallada de CDC25A en les cèl·lules que expressen Snail no es deu a una major degradació de la proteïna via proteosoma.

Els estudis fets amb la cicloheximida no semblaven indicar que la CDC25A es degradés més depressa en presència de Snail però vam voler confirmar-ho utilitzant el MG132 (inhibidor de la degradació via proteosoma) i en el model en transitori, on els efectes de Snail sobre CDC25A eren més evidents degut a l'elevada expressió de CDC25A que s'obtenia al transfectar-la. Vam transfectar cèl·lules MDCK amb pcDNA3-Cdc25A i amb pcDNA3/pcDNA3-Snail-HA o pcDNA3-SnailΔC28-HA, mutant al que li manquen els darrers 28 aminoàcids corresponents al quart dit de zinc. En assaigs previs havíem vist que no tenia efecte sobre els nivells de CDC25A i per tant ens era útil com a control negatiu. Rera 48h d'expressió, vam afegir 50µM MG132 al medi i el vam deixar actuar durant 5 hores. Vam fer extractes de proteïna total i vam analitzar els nivells de CDC25A i de Snail/SnailΔC28 per Western Blot.

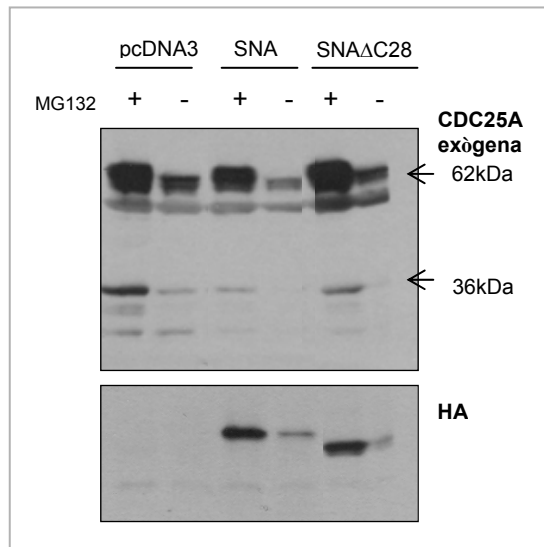


Figura R-25: Els nivells de CDC25A exògena disminueixen en les cèl·lules MDCK transfectades transitòriament amb Snail i els nivells no es recuperen al tractar les cèl·lules amb un inhibidor del proteosoma. Estudi de l'estabilitat de la CDC25A exògena en cèl·lules MDCK transfectades transitòriament amb pcDNA3-Cdc25A i pcDNA3/pcDNA3-Snail-HA/ pcDNA3-Snail Δ C28-HA, tractades o no amb 50 μ M MG132 durant 5h. Es feren extractes de proteïna total i electroforesi en gel del 12% de poliacrilamida i la posterior detecció de CDC25A i Snail/Snail Δ C28 per Western blot. HA: etiqueta de Snail i Snail Δ C28

Com pot veure's en la figura R-25, a l'afegir MG132 i bloquejar la degradació de CDC25A via proteosoma, incrementen els nivells de dita fosfatasa, però en les cèl·lules que expressen Snail-HA no es recuperen totalment els nivells, ja que segueix havent-hi menys CDC25A que en les cèl·lules control transfectades amb el vector buit. El mutant SNA- Δ C28 s'expressava com Snail-HA sencer i encanvi no rera capaç de fer baixar els nivells de CDC25A.

Veient aquests resultats, vam voler assegurar-nos que 5 hores de tractament amb 50 μ M MG132, eren suficients perquè en cas que Snail activés la degradació de CDC25A, es pogués recuperar els nivells de proteïna i igualar-los amb els nivells presents en les cèl·lules que no expressaven Snail (fig.R-26A). Si la vida mitja de CDC25A era inferior a 5h (A.1), 5h eren suficients per degradar completament la CDC25A present en les cèl·lules i al tractar les cèl·lules amb cicloheximida no havíem de veure gens de CDC25A, ni al transfectar pcDNA3 (a), ni al transfectar Snail (c). Si a més a més d'afegir cicloheximida, afegíem MG132 al medi de cultiu durant aquestes 5h, detectàvem elevats nivells de CDC25A (b i d), més alts en les cèl·lules transfectades amb pcDNA3 (b). En canvi, si la vida mitja de CDC25A era superior a 5h (A.2), 5h no eren suficients per degradar completament la CDC25A, i al tractar les cèl·lules amb cicloheximida durant 5h, seguiríem veient expressió de CDC25A, més baixa en les cèl·lules transfectades amb Snail (c) que en les control (a).

Rera el tractament simultani amb MG132, veuríem que els nivells de CDC25A serien més elevats que al tractar amb cicloheximida sola (*b* i *d*).

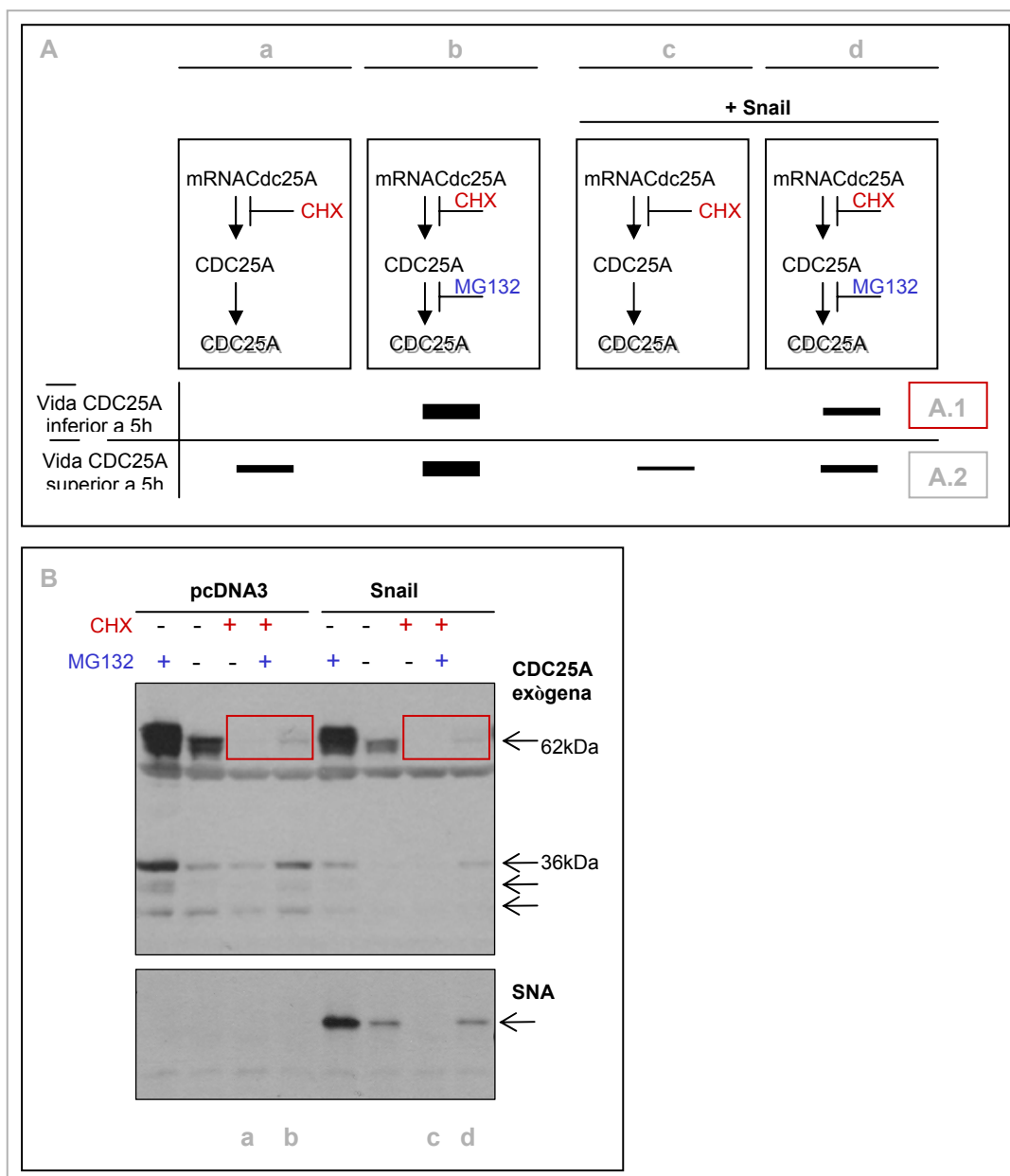


Figura R-26: La vida mitja de CDC25A és inferior a 5h, de manera que 5h de tractament amb MG132 són suficients per poder veure que els nivells de CDC25A s'equiparen als de les cèl·lules control, en el cas hipotètic que Snail participés en la degradació via proteosoma de CDC25A. *A*: Predicció de nivells de proteïna CDC25A en cèl·lules tractades amb cicloheximida i/o MG132 durant 5 hores, en presència o absència de Snail. *A.1*: Bandeig esperat en el cas que la vida mitja de CDC25A sigui inferior a 5h. *A.2*: Bandeig esperat en el cas que la vida mitja de CDC25A fós superior a 5h. *a*: MDCK-pcDNA3 tractades amb CHX durant 5h. *b*: MDCK-pcDNA3 tractades amb CHX i MG132 durant 5h. *c*: MDCK-Snail tractades amb CHX durant 5h. *d*: MDCK-Snail tractades amb CHX i MG132 durant 5h *B*: Estudi de l'estabilitat de la CDC25A exògena en cèl·lules MDCK transfectades transitòriament amb pcDNA3-Cdc25A i pcDNA3/pcDNA3-Snail-HA i tractades amb 50µM MG132 i/o 20µg/ml cicloheximida durant 5h. Es feren extractes de proteïna total i electroforesi en gel del 12% de poliacrilamida i la posterior detecció de CDC25A i Snail-HA per Western blot. CHX: cicloheximida. Els requadres vermells corresponen al bandeig A.1.

Vam transfectar cèl·lules MDCK amb pcDNA3-Cdc25A pcDNA3/pcDNA3-Snail-HA i les vam tractar amb cicloheximida i amb MG132 durant 5h tal i com indica la figura R-26B: Al tractar les cèl·lules amb MG132 durant 5h, detectàvem tota la CDC25A que s'havia anat sintetitzant durant aquest temps (carrils 1 i 5), nivells més elevats que quan no hi havia tractament amb MG132, que la CDC25A se sintetitzava i s'anava degradant (carrils 2 i 6) Dites quantitats sempre éren inferiors en les cèl·lules que expressaven Snail (carrils 5 i 6) respecte les control (carrils 1 i 2). Al tractar les cèl·lules amb cicloheximida durant 5 hores, desapareixia totalment la CDC25A indicatiu que amb 5h tota la CDC25A era degradada (carrils 3 i 7). Si a més a més de bloquejar la traducció, bloquejavem la degradació, afegint MG132, vèiem de nou expressió de CDC25A (carrils 4 i 8). Per tant, aquest experiment, ens permetia concloure que la no recuperació dels nivells de CDC25A en les cèl·lules que expressaven Snail tractades amb MG132 no era deguda a no deixar actuar la droga suficient temps, sino a que Snail, deuria estar fent baixar els nivells de CDC25A per una altra via independent a la degradació via proteosoma.

10. TRIBBLES NO COOPERA AMB SNAIL EN EL BLOQUEIG DEL CICLE CEL·LULAR

El bloqueig de cicle cel·lular induït per Snail via una disminució dels nivells de CDC25A trobat en les línies HT-29 M6 i MDCK que expressaven Snail, podria explicar-se per una participació directe de Tribbles, tal i com passa en les cèl·lules ventrals durant la gastrulació (Großhans et al., 2000). Tribbles, activat directa o indirectament per Snail, podria estar regulant a la baixa l'activitat de CDC25A, provocant una disminució en l'activitat de les CDKs i un endarreriment de cicle cel·lular.

10.1. No hi ha correlació entre els nivells d'expressió de Tribbles i Snail.

En el GenBank hi havia la seqüència de l'homòleg humà de Tribbles (hTRB). 1032 nucleòtids codificaven una hipotètica quinasa de 344 aminoàcids.

Durant el procés de gastrulació de *Drosophila*, les cèl·lules del mesoderm prospectiu expressen Tribbles i la seva activitat depèn de la presència de Snail, és per això vam voler analitzar si hi havia una correlació entre els nivells d'expressió de Snail i de Tribbles en diverses línies cel·lulars. Vam fer RT-PCR semiquantitativa de RNAs de les línies HT-29 M6 i MDCK transfectades establement amb Snail-HA i de dues línies que expressen Snail endògen, les RWP1 i les MCF7. Tal i com pot veure's en la figura R-27, els nivells de Snail no es correlacionen amb els nivells Tribbles: en els clons estables HT-29 M6, el clò SNA1 presenta elevats nivells de Tribbles, mentre que el clò SNA2 en presenta una quantitat equivalent al de les cèl·lules control. En la línia estable MDCK, tant el clò control com els

clons SNA presenten nivells equivalents de Tribbles. Les línies MCF7 i RWP1 amb expressió equivalent de Snail, presenten diferències en els nivells d'expressió de Tribbles.

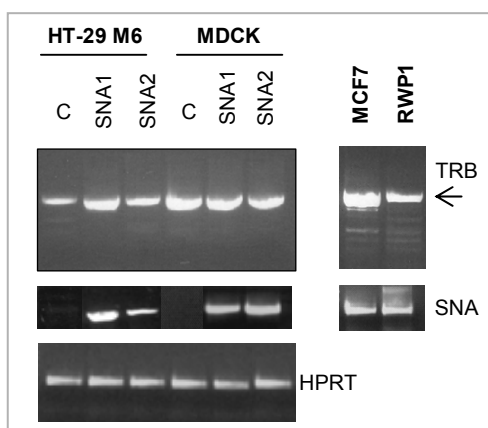


Figura R-27 : No hi ha correlació entre els nivells d'expressió de Tribbles i de Snail a nivell de mRNA. Estudi dels nivells de mRNA de Tribbles en línies cel·lulars amb diferents nivells d'expressió de Snail. Es van determinar els nivells de mRNA de Tribbles (TRB) i de Snail (SNA) en les línies HT-29 M6 i MDCK transfectades establement amb Snail-HA i en les línies MCF7 i RWP1 per RT-PCR semi-quantitativa a partir de 300ng de RNA total. HPRT es va amplificar com a control de càrrega.

10.2. Tribbles i Snail no interaccionen *in vitro*

Es postulava que Snail, durant el procés de gastrulació de *Drosophila*, podia estar activant Tribbles a nivell posttranscripcional (Großhans et al., 2000). Vam voler estudiar si en el nostre model cel·lular aquesta possible regulació podia explicar-se per una interacció directe entre les dues proteïnes.

Vam amplificar la regió codificant de l'homòleg humà de Tribbles en les cèl·lules HT-29 M6, vam clonar-lo en el vector d'expressió pcDNA3 seguit de l'etiqueta HA i vam fer un assaig de *Pull Down* per veure si TRB-HA podia interaccionar amb SNA-GST: vam transfectar cèl·lules RWP1 amb pcDNA3-TRB-HA i rera 40h d'expressió vam fer extracte de proteïna amb tampó no desnaturalitzant i vam incubar-lo amb la proteïna de fusió SNA-GST i després amb la resina glutatió-sefarosa. Vam fer l'electroforesi en un gel de poliacrilamida del 12% amb la fracció de l'extracte que va quedar unit a la resina-GST-SNA, i vam fer un *Western blot* anti-HA. El resultat del *Pull Down* pot veure's en la figura R-28 i demostrava que almenys en aquestes condicions TRB-HA i SNA-GST no interaccionaven.

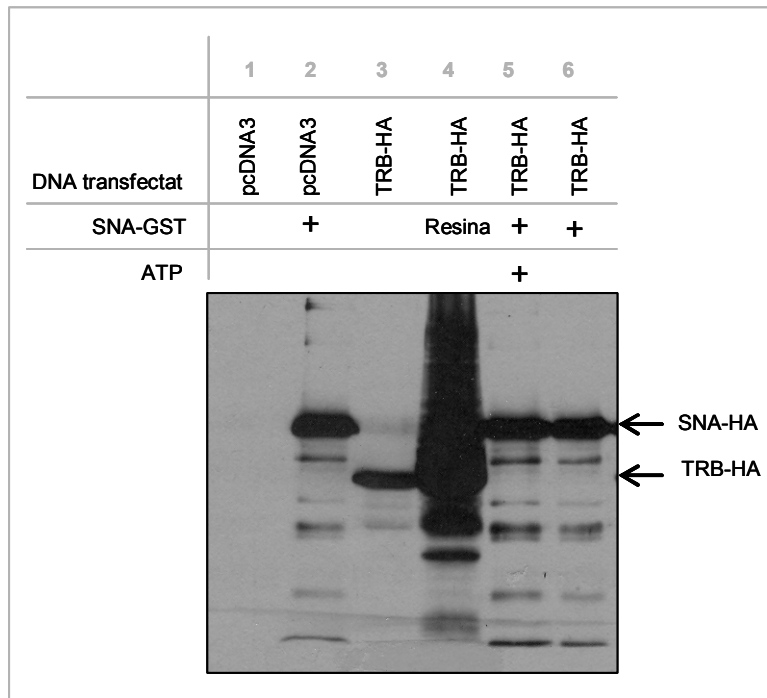


Figura R-28: Tribbles i Snail no interaccionen in vitro. PullDown TRB-HA i SNA-HA-GST en cèl·lules RWP1 transfectades amb pcDNA3-TRB-HA o el vector buit. Rera 40h d'expressió es feren extractes de proteïna total i es va procedir a fer el Pull Down. Les diverses mostres van ser analitzades per Western blot amb l'anticòs anti-HA. 1: Extracte de proteïna de cèl·lules transfectades amb el pcDNA3. 2: Extracte de proteïna de cèl·lules transfectades amb el pcDNA3 incubat amb proteïna de fusió SNA-GST. 3: Extracte proteic de cèl·lules transfectades amb el pcDNA3-TRB-HA. 4: resina incubada amb extracte proteic per tal de reduir la unió inespecífica. 5: Extracte de cèl·lules transfectades amb el pcDNA3-TRB-HA incubat amb SNA-GST + ATP. 6: Extracte de cèl·lules transfectades amb el pcDNA3-TRB-HA incubat amb SNA-GST

Tribbles s'expressava en les cèl·lules RWP1 (carril 3, respecte carril 1) però no s'unia al SNA-GST (carril 6), ni amb presència d'ATP (carril 5) ja que el bandeig present en dits carrils era inespecífic (igual al del carril 2, on no hi havia expressió de TRB-HA).

10.3. L'expressió de Tribbles no fa més acusada l'aturada en cicle que pateixen les cèl·lules que expressen Snail.

Durant el procés de gastrulació de *Drosophila*, Snail i Tribbles cooperen a l'hora de mantenir les cèl·lules del mesoderm prospectiu aturades en G2 fins que no han migrat. Per veure si en el nostre model cel·lular, Tribbles podia estar ajudant a Snail a bloquejar el cicle cel·lular, vam generar uns clons estables MDCK que expressaven Snail, Tribbles i Snail+Tribbles i vam analitzar el seu comportament a nivell de proliferació cel·lular, esperant que els clons que expressessin Snail i Tribbles simultàniament presentessin un endarreriment de cicle cel·lular més acusat.

Vam partir de les cèl·lules MDCK transfectades establement amb Snail-HA que ja teniem ben caracteritzades al laboratori, i les vam cotransfectar amb el vector PREP4 o PREP4-TRB-HA. Dit vector s'expressava i es replicava autònomament i donava resistència a higromicina. Vam seleccionar les cèl·lules transfectades durant 3 setmanes i vam resembrar colònies independents. Vam obtenir 11 clons control (MDCK PIREs-neo+pREP4), 20 clons TRB-HA (MDCK PIREs-neo+PREP4-TRB-HA), 10 clons SNA-HA (MDCK PIREs-neo-SNA-HA+pREP4), i 17 clons SNA-HA-TRB-HA (MDCK PIREs-neo-SNA-HA+ PREP4-TRB-HA) i vam fer diversos estudis:

10.3.1. Les cèl·lules que expressen Tribbles no presenten un fenotip més mesenquimal.

Vam analitzar els nivells de TRB-HA i de SNA-HA en els diversos clons fent extractes de proteïna total de cultius no confluents i *Western Blot* anti-HA. L'expressió de Snail era força similar en tots els clons on s'expressava, i encanvi l'expressió de Tribbles era més divergent i presentava diverses isoformes de pes molecular diferent (fig. R-29C). Pels estudis posteriors vam escollir 2 clons de cada tipus, amb més i menys expressió de TRB-HA (fig. R-29A).

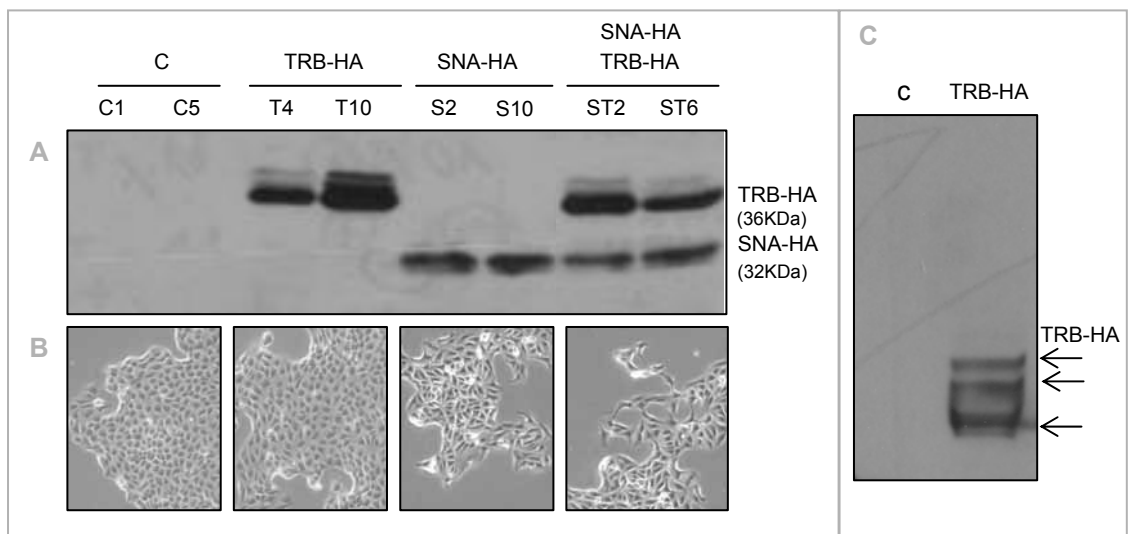


Figura R-29: Caracterització de la línia MDCK transfectada establement amb Snail-HA, cotransfectada amb pREP4/pREP4-TRB-HA. A: Detecció de Tribbles i Snail. Rera la selecció i la constitució de clons independents, es feren extractes de proteïna total i electroforesi en gel del 12% de poliacrilamida i es va detectar Tribbles (TRB-HA) i Snail (SNA-HA) fent *Western blot* anti-HA. B: Estudi fenotípic. Cultiu no confluent en medi DMEM-10%FBS observat pel microscopi òptic. C: Detecció de les diverses isoformes de pes molecular diferent de Tribbles. Extractes de proteïna total, electroforesi en un gel de poliacrilamida del 15% i detecció de TRB-HA per western blot anti-HA. Clons C: PIREs-neo+pREP4; T: PIREs-neo+pREP4-TRB-HA; S: PIREs-neo-SNA-HA+pREP4; ST: PIREs-neo-SNA-HA+pREP4-TRB-HA.

A nivell fenotípic, analitzant els clons sota microscopi òptic, no semblava que l'expressió de Tribbles conduís a un fenotip particular, els clons control i TRB-HA presentaven un fenotip epitelial i els clons SNA-HA i SNA-HA-TRB-HA presentaven un fenotip mesenquimal que no era pas més acusat en aquests últims (fig. R-29B).

10.3.2. Els clons estables MDCK que expressen elevats nivells de Tribbles presenten un percentatge important de cèl·lules binucleades.

Vam estudiar la localització intracel·lular de Tribbles, fent una immunofluorescència anti-HA de les cèl·lules MDCK transfectades establement amb TRB-HA i SNA-HA-TRB-HA. En tots dos tipus de clons la localització de Tribbles era semblant: es localitzava simultàniament a nucli i a citoplasma de forma difosa o fent petits dots (fig. R-30A) i entre un 2% i un 50% dels clons positius per anti-HA (10% del total) eren cèl·lules binucleades.

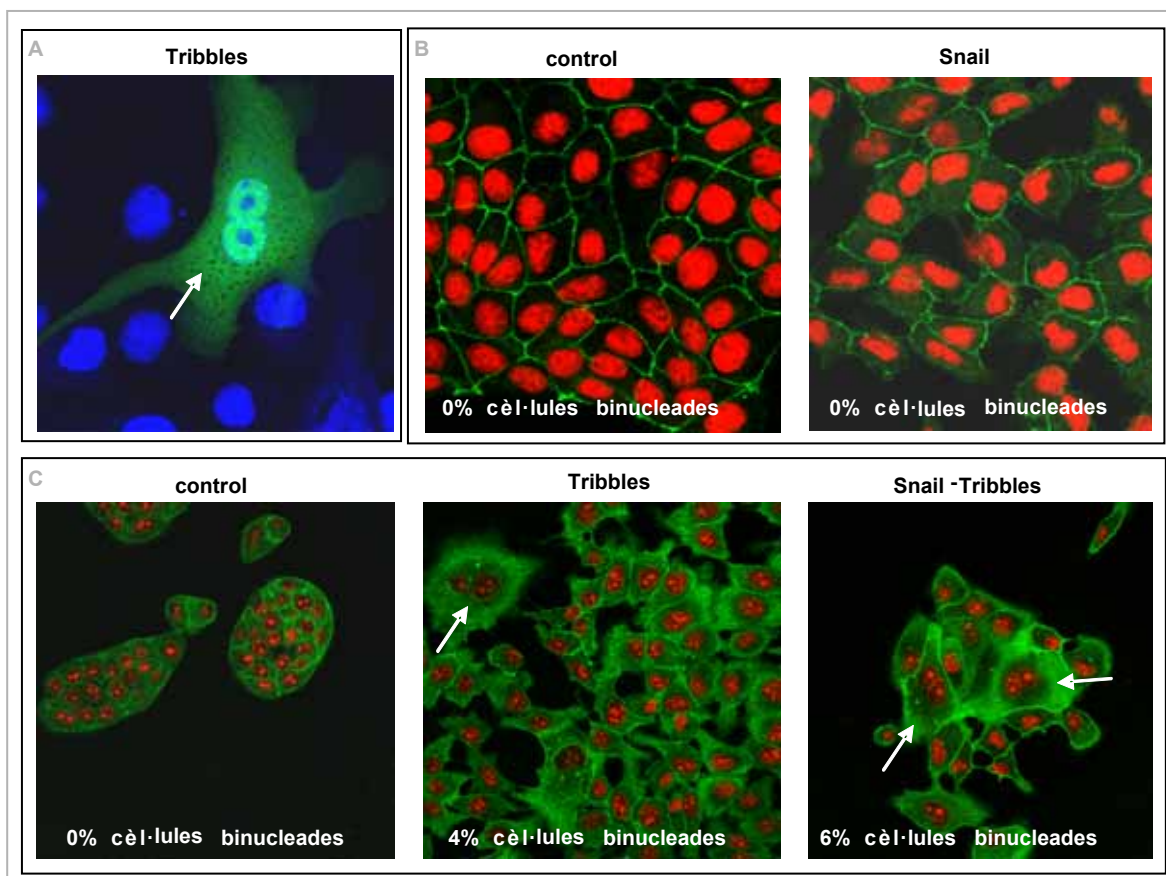


Figura R-30 : En els clons estables MDCK que expressen elevats nivells de Tribbles, Tribbles-HA es distribueix de forma difosa pel nucli i pel citoplasma, i provoca binucleació. **A:** Estudi de la localització intracel·lular de Tribbles-HA en les cèl·lules MDCK transfectades establement amb PIREs-neo+pREP4-TRB-HA. Rera 24h d'expressió, les cèl·lules van ser fixades amb 4% PFA, es va fer una immunocitoquímica anti-HA (verd), una tinció nuclear amb TopRo (blau) i van ser analitzades per microscopia confocal. **B:** Estudi de binucleació en les cèl·lules MDCK transfectades establement amb PIREs-neo (control) o PIREs-neo-SNA-HA (Snail). Detecció de ZO-1 per immunofluorescència. Rera 3 dies de sembra, vam fixar les cèl·lules amb 4%PFA, vam fer una immunocitoquímica anti-ZO-1 (verd), una tinció nuclear amb iodur de propidi (vermell) i vam analitzar-les per microscopia de fluorescència **C:** Estudi de binucleació en les cèl·lules MDCK transfectades establement amb PIREs-neo+pREP4 (control), PIREs-neo+pREP4-TRB-HA (Tribbles) o PIREs-neo-SNA-HA+pREP4-TRB-HA (Snail-Tribbles). Detecció d'annexina

per immunofluorescència. Rera 3 dies de sembra, vam fixar les cèl·lules amb 4%PFA, vam fer una immunocitoquímica anti-annexina (verd), una tinció nuclear amb iodur de propidi (vermell) i vam analitzar-les per microscopia de fluorescència. *Fletxes: cèl·lules binucleades.*

Vam analitzar diversos clons MDCK que expressessin Tribbles. Vam marcar membranes i vam comptabilitzar binucleació utilitzant un anticòs anti-annexina (fig. R-30C) i un anticòs anti-ZO-1(fig. R-30B). Els dos clons analitzats que expressaven Tribbles presentaven un 2% i un 4% de cèl·lules binucleades i el cló que expressava Tribbles+Snail en presentava un 6% (fig. R-30C). Ni el clo control, ni els clons Snail presentaven cap cèl·lula binucleada (fig. R-30B).

10.3.3. L'expressió de Tribbles en les cèl·lules MDCK, no afecta el cycle cel·lular.

A nivell de taxes de proliferació, tampoc semblava que l'expressió de Tribbles les modificués. Només les cèl·lules que expressaven Snail omplien els flascons de cultiu més lentament que les que no l'expressaven. Vam quantificar dits efectes en proliferació fent estudis de citometria de flux i marcant les cel·lules proliferants amb BrdU durant 90' abans de fixar-les(fig. R-31).

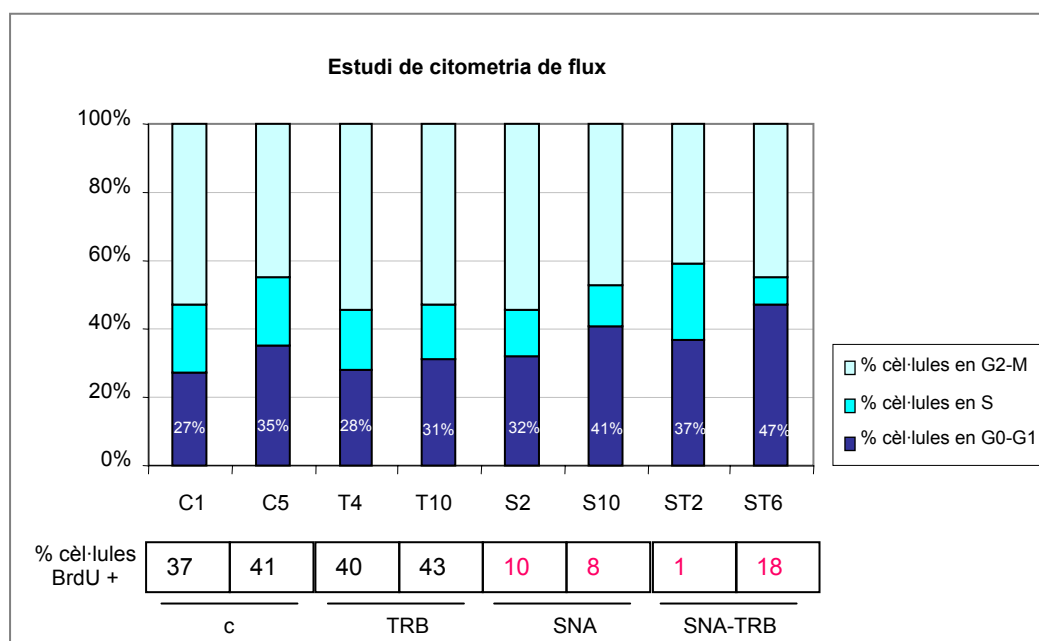


Figura R-31: L'expressió de Tribbles en les cèl·lules MDCK, no afecta el cycle cel·lular. Estudi del cycle cel·lular de la línia MDCK transfectada estabament Snail-HA i cotransfectada amb pREP4/pREP4-TRB-HA. Les cèl·lules van ser sembrades a baixa confluència en medi DMEM 10%FBS i es va deixar créixer el cultiu durant 48h. 1h abans de fixar-les es van tractar amb 10µM BrdU. Després de fixar les cèl·lules amb 70%EtOH es va procedir a detectar la BrdU i a fer la tinció nuclear amb iodur de propidi. *Clons C: PIREs-neo+pREP4; T: PIREs-neo +pREP4-TRB-HA; S: PIREs-neo-SNA-HA+pREP4; ST: PIREs-neo-SNA-HA+pREP4-TRB-HA.* Els % en blanc són el % de cèl·lules en G0/G1.

Com indica la figura R-31 a nivell d'estadis de cicle no s'apreciaven gaires diferències entre els diferents clons. Els clons que expressaven Snail (S2 i S10) tendien a presentar un percentatge superior de cèl·lules en G0/G1 respecte les cèl·lules que no l'expressaven i Tribbles no semblava potenciar l'efecte de Snail (ST2 i ST6 es comporten com S10). Si analitzàvem el marcatge de cèl·lules amb BrdU, indicatiu que dites cèl·lules havien passat de fase G1 a fase S, si que s'apreciaven diferències clares entre els clons que expressaven Snail i els que no l'expressaven, i dit efecte no era més evident en els clons que expressaven Tribbles.

10.4. L'expressió de Tribbles no fa disminuir els nivells de CDC25A

Durant el procés de gastrulació de *Drosophila*, Tribbles propicia la davallada de String/Cdc25, activant la seva degradació via proteosoma. Tot i que en els clons estables MDCK, Tribbles no semblava potenciar l'aturada de cicle ocasionada per Snail, vam voler analitzar què passava a nivell de CDC25A. Vam fer extractes de proteïna total de les cèl·lules MDCK transfectades establement amb Snail i Tribbles, de cultius no confluents 48h post-sembrada i vam fer assaig de *Western blot* anti-CDC25A. Tal i com indica la figura R-32A, els nivells de CDC25A són més alts en els clons control i en els clons que només expressen Tribbles i els clons que expressen Tribbles i Snail no presenten nivells de CDC25A més baixos que les cèl·lules que només expressen Snail.

Com que la davallada dels nivells de CDC25A es feia més evident quan fèiem transfeccions transitòries, vam cotransfectar pcDNA3-Cdc25A i pcDNA3/pcDNA3-SNA-HA/pcDNA3-TRB-HA en cèl·lules MDCKwt i vam analitzar l'expressió de CDC25A al cap de 48h d'expressió, fent extractes de proteïna total i assaig de *Western Blot* (fig.R-32B). Els nivells de CDC25A disminuïa clarament quan les cèl·lules eren cotransfectades amb Snail però no disminuïa quan dites cèl·lules eren cotransfectades amb Tribbles.

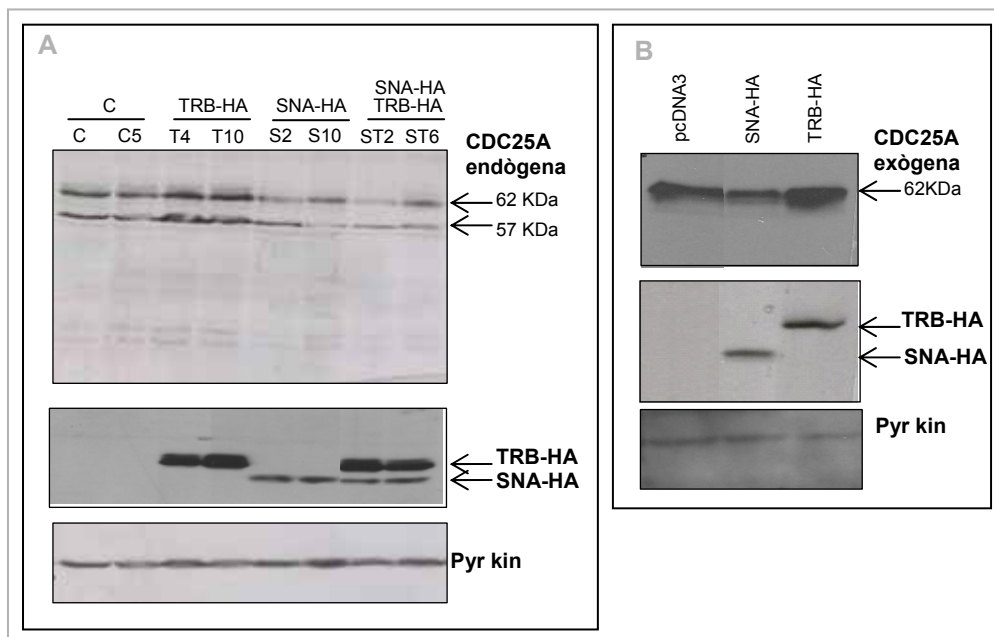
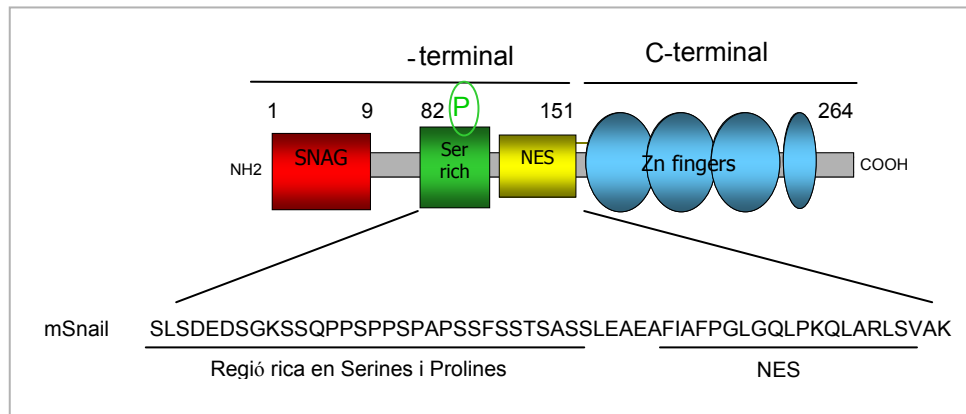


Figura R-32: L'expressió de Tribbles en les cèl·lules MDCK no fa disminuir els nivells de CDC25A. *Detecció de CDC25A en extractes de proteïna total de cèl·lules MDCK transfectades establement amb SNA i TRB (A) o transitòriament amb pcDNA3-Cdc25A i pcDNA3/pcDNA3-SNA-HA/pcDNA3-TRB-HA (B). Rera l'electroforesi en gels del 12% de poliacrilamida es van detectar CDC25A, Tribbles-HA, Snail-HA i piruvat quinasa (control de càrrega) per Western blot. Clons estables MDCK: C: PIRES-neo+pREP4; T: PIRES-neo+pREP4-TRB-HA; S:PIRES-neo -SNA-HA+pREP4; ST:PIRES-neo-SNA-HA+pREP4-TRB-HA.*

11. LA DAVALLADA DE CDC25A PROVOCADA PER SNAIL, TÉ LLOC AL NUCLI I NO DEPÈN DE L'ACTIVITAT REPRESSORA TRANSCRIPCIONAL DE SNAIL.

Snail és un factor de transcripció que consta de diferents dominis estructurals i funcionals: En l'extrem amino-terminal té el domini SNAG, repressor de la transcripció, el domini ric en Serines i prolines (Ser-rich) susceptible a ser fosforilat i imprescindible perquè Snail surti del nucli i el domini NES, d'export nuclear, també imprescindible perquè Snail surti al citosol. A l'extrem carboxi-terminal hi ha els 4 dits de zinc encarregats de l'unió al DNA (esquema R-1).



Esquema R-1: Representació de l'estructura primària de Snail. La meitat amino terminal comprèn el domini repressor (SNAG), la regió rica en serines (Ser-rich) i la seqüència d'export (NES). La meitat carboxi-terminal comprèn els dits de Zinc, d'unió al DNA.

Amb la idea de trobar quina estratègia podia estar seguint Snail per fer baixar els nivells de CDC25A en les cèl·lules, retrassant així el seu cycle cel·lular, vam cotransfectar conjuntament amb la CDC25A, diferents mutants de Snail, generats en el nostre grup per caracteritzar la regulació de l'activitat transcripcional de Snail: SNA-LA (2 Leucines de la seqüència NES van ser mutades a Alanines i Snail no podia ser exportat fora del nucli); SNA-SA (14 serines de la regió rica en serines van ser mutades a Alanines i Snail al no ser fosforilable, no podia ser exportat fora del nucli); SNA-P2A (la Prolina del domini SNAG va ser mutada a Alanina i Snail no podia inhibir la transcripció)(Batlle et al., 2000; Domínguez et al., 2004; Montserrat, 2006).

11.1. Els mutants SNA-SA i SNA-LA tenen més efecte en la davallada de CDC25A. El mutant SNA-P2A té el mateix efecte que SNAwt.

Vam transfectar cèl·lules MDCKwt amb pcDNA3-Cdc25A i pcDNA3/ SNA / SNA-SA/ SNA-LA/ SNA-P2A/ o tribbles (TRB). Vam fer extractes de proteïna total que vam analitzar per Western Blot.

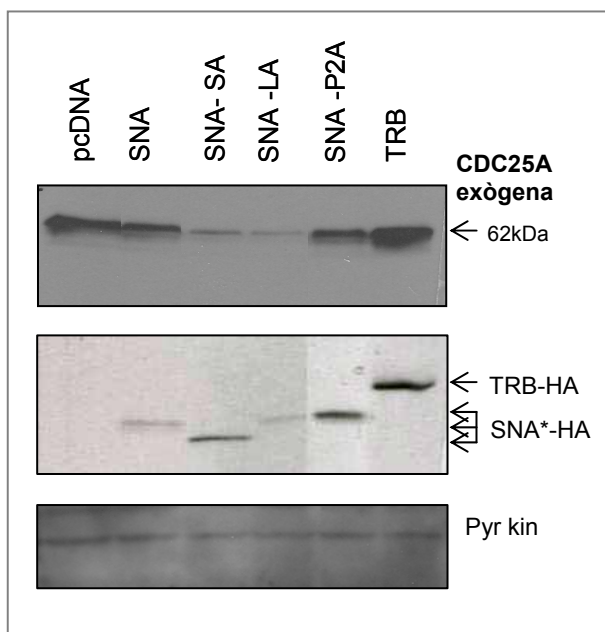


Figura R-33: Els nivells de CDC25A disminueixen quan les cèl·lules expressen Snail sencer (SNA) o el mutant SNA-P2A i encara disminueixen més quan expressen els mutants SNA-SA i SNA-LA. A: Detecció de CDC25A en cèl·lules MDCKwt transfectades transitòriament amb pcDNA3-CDC25A i pcDNA3/SNA/SNA-SA/SNA-LA/SNA-P2A/TRB (control negatiu). Rera 48h d'expressió es feren extractes de proteïna total i electroforesi en gel del 12% de poliàcrilamida i la posterior detecció de CDC25A, Snail i mutants Snail (SNA*-HA) i Tribbles (TRB-HA) per Western blot. Es va detectar piruvat quibasa (pyr kin) com a control de càrrega.

Com pot veure's en la figura R-33, les cèl·lules transfectades amb el mutant SNA-P2A presenten uns nivells de CDC25A equiparables als de les cèl·lules transfectades amb Snail sencer. Els mutants SNA-SA i SNA-LA fan disminuir moltíssim els nivells de CDC25A. Tribbles era un bon control negatiu, ja que no és capaç de fer baixar els nivells de CDC25A.

Analitzant per immunofluorescència la localització subcel·lular dels diferents mutants SNA fusionats a GFP en cèl·lules MDCK transfectades transitòriament amb GFP/GFP-SNA/ GFP-SNA-SA/ GFP-SNA-LA/ GFP-SNA-P2A/ GFP-SNA- Δ C28, vam observar que els mutants SA i LA es localitzaven majoritàriament al nucli cel·lular, perquè presenten mutades les regions imprescindibles per ser exportats al citosol. El mutant SNA-P2A, mancat d'activitat repressora, tenia una distribució similar a la que tenia el Snail sencer (localització citosòlica difosa i nuclis amb nucleols exclosos, mentre que el mutant SNA- Δ C28 (que prèviament havíem vist que no tenia efectes sobre els nivells de CDC25A (fig. R-25)) es localitzava majoritàriament al citosol. (figura R-34).

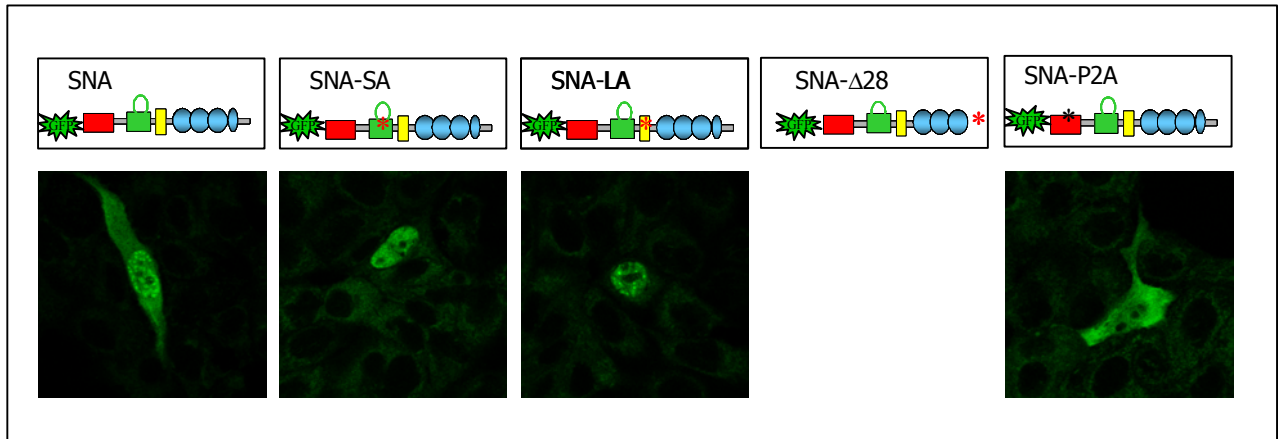


Figura R-34: Estudi de la localització subcel·lular dels diferents mutants GFP-SNA. Detecció de les proteïnes de fusió GFP en cèl·lules MDCK transfectades transitòriament amb el cDNA dels diferents mutants GFP-SNA, fixades rera 24h d'expressió.

11.2. Els mutants nuclears, SNA-SA i SNA-LA no fan disminuir els nivells de CDC25A fent més inestable la proteïna.

Estava descrit que durant el procés de gastrulació, Snail estava implicat en la degradació de CDC25A via proteosoma. Tot i que els assajos anteriors deixaven clar que en el model cel·lular estudiat, la davallada de CDC25A rera l'expressió de Snail, no era deguda a que Snail inestabilitzés la proteïna, vam voler confirmar que aixó era cert amb els mutants que encara tenien un efecte més pronunciat, el SNA-LA i SNA-SA. Vam transfectar cèl·lules amb pcDNA3-Cdc25A i pcDNA3/SNA/ SNA-SA/ SNA-LA/ SNA- Δ C28 i rera el tractament amb MG132 (fig. R-35) o cicloheximida (fig. R-36) vam fer extractes de proteïna total i vam analitzar els nivells de CDC25A per Western Blot.

Rera el tractament amb MG132, seguïem observant que els nivells de CDC25A eren molt més baixos en les cèl·lules trasfectades amb els mutants nuclears de Snail, el SNA-SA i el SNA-LA (figura R-35), indicatiu que la davallada de la CDC25A no era deguda a la degradació via proteosoma.

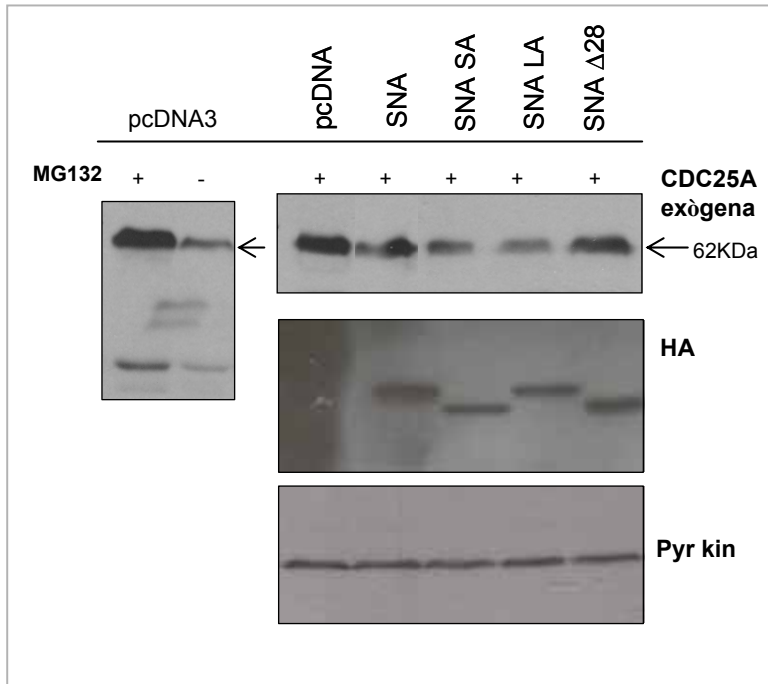


Figura R-35: La important davallada de CDC25A en les cèl·lules MDCK tranfectades transitòriament amb els mutants nuclears SNA-SA i SNA-LA no es deu a una major degradació de CDC25A via proteosoma, ja que al tractar les cèl·lules amb MG132 no es recuperen els nivells de CDC25A. A: Estudi de l'estabilitat de la CDC25A exògena en cèl·lules MDCK tranfectades transitòriament amb pcDNA3-Cdc25A i pcDNA3/SNA/SNA-SA/SNA-LA/SNA-ΔC28 i tractades amb MG132 durant 5h. Com a control d'"activitat" del MG132, es va fer una rèplica de la mostra control (transfectada amb pcDNA3) que no es va tractara amb MG132. Es feren extractes de proteïna total i electroforesi en gel del 12% de poliacrilamida i la posterior detecció de CDC25A i Snail-HA per Western blot. Es va detectar piruvat quinasa (pyr kin) com a control de càrrega.

Si tractàvem cèl·lules cotransfectades amb CDC25A i amb SNA/SNA-LA amb cicloheximida, tampoc detectàvem una taxa de degradació major en les cèl·lules transfectades amb el mutant de SNA-LA. Pot veure's en la figura R-36, que la pendent de la línia de tendència dels nivells de CDC25A no és pas significativament més acusada en les cèl·lules transfectades amb el mutant SNA-LA.

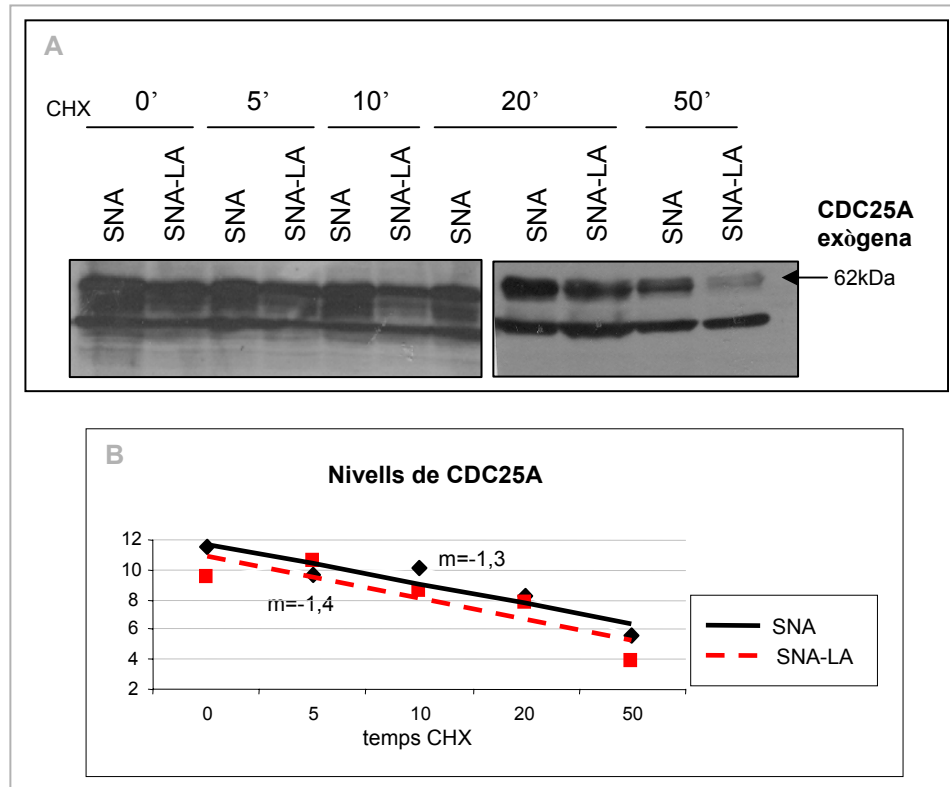


Figura R-36: La major davallada de CDC25A en les cèl·lules transfectades amb el mutant SNA-LA no es deu a una menor estabilitat de la proteïna. Estudi de l'estabilitat de la CDC25A exògena de la línia MDCK transfectada transitòriament amb pcDNA3-Cdc25A i pcDNA3-SNA/SNA-LA. Les cèl·lules en cultiu es van tractar amb cicloheximida durant els temps indicats. Rera el tractament es feren extractes de proteïna total i electroforesi en gel del 12% de poliacrilamida i la posterior detecció de CDC25A per Western blot (A). Es van densitometrar les bandes, es va fer una gràfica i es van analitzar les pendents (m) de les línies de tendència (B). CHX: cicloheximida

Aquests resultats confirmaven que Snail, estava fent disminuir la taxa de proliferació cel·lular tot fent baixar els nivells de la principal fosfatasa implicada per una via independent a la degradació de dita proteïna.

12. ELS NIVELLS DE mRNA DE CDC25A ENDÒGENA SÓN MÉS ALTS EN LES CÈL·LULES QUE EXPRESSEN SNAIL.

Snail és un factor repressor de la transcripció, però analitzant per RT-PCR semiquantitativa si podia estar actuant com a tal reprimint la transcripció de CDC25A, vam veure que en les cèl·lules HT-29 M6 els nivells de mRNA de CDC25A tenien certa tendència a incrementar enlloc de disminuir quan les cèl·lules expressaven Snail (fig. R-22). Vam analitzar de forma més precisa l'expressió de CDC25A a nivell de transcrit per RT-PCR quantitativa i també vam analitzar la línia MDCK, en la qual també havíem vist la davallada de CDC25A a nivell de proteïna. Tal i com pot veure's en la figura R-37, la RT-PCR quantitativa ens permetia

quantificar la tendència observada i confirmar que els nivells de mRNA de CDC25A eren més alts en les cèl·lules HT-29 M6 que expressaven Snail. En la línia MDCK els efectes de Snail es veïen per RT-PCR semiquantitativa i es confirmaven en la RT-PCR quantitativa, sent més elevats els nivells de mRNA de CDC25A en els dos clons analitzats que expressaven Snail.

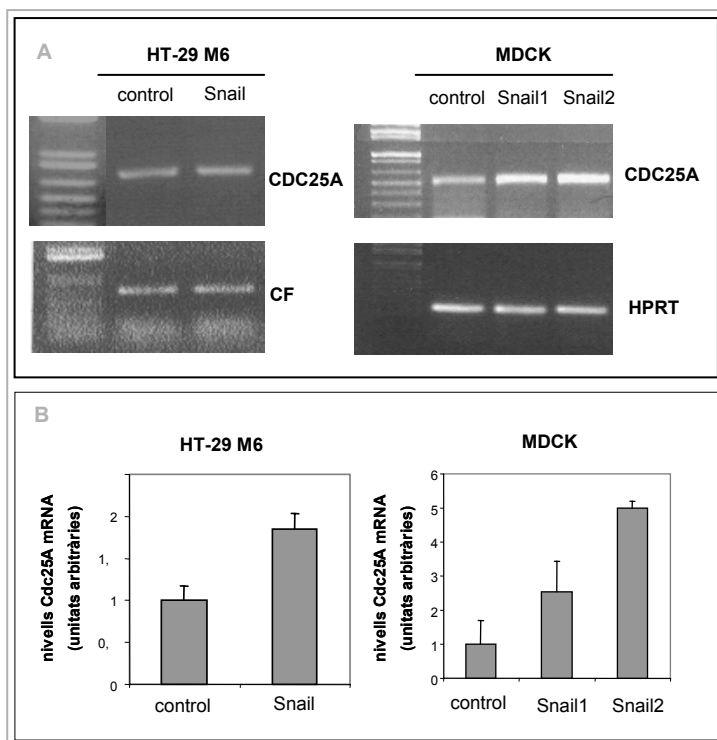


Figura R-37: Els nivells del mRNA de CDC25A endògena incrementen en les cèl·lules que expressen Snail. Estudi dels nivells de mRNA de CDC25A endògena en les línies MDCK i HT-29 M6 transfectades establement amb Snail-HA o amb el vector buit. Es van fer extraccions de RNA total i es van determinar els nivells de mRNA de CDC25A per RT-PCR semi-quantitativa (A) i quantitativa (B). Controls de càrrega: *CF*:ciclofilina i *HPRT*:

Que en presència de Snail incrementessin els nivells de mRNA de CDC25A i que a l'hora disminuïssin els nivells de proteïna podia estar indicant que Snail estava bloquejant la traducció de CDC25A.

13. POSSIBLES MECANISMES QUE PODRIA UTILITZAR SNAIL PER INHIBIR LA TRADUCCIÓ DE CDC25A

13.1. El mRNA de CDC25A conté possibles elements implicats en el control traduccional i d'estabilitat del mRNA.

En la regió 3'UTR del mRNA de la hCDC25A hi ha possibles seqüències CPE i ARES. Les seqüències CPE són seqüències variables (molt similars a la seqüència consens UUUUUAU)

presentes en el 3'UTR d'alguns mRNAs ja processats que per ser traduïts necessiten d'una poliadenilació extra en el citoplasma (Méndez et al., 2001). Les seqüències AREs (de *AU rich elements*) són seqüències riques en A i U presents en el 3'UTR de molts mRNAs que en general senyalen mRNAs que han de ser ràpidament degradats. Segons el context les proteïnes d'unió als AREs s'uneixen als mRNAs i els desestabilitzen fent que es degradin o els estableixen fent que es tradueixin (Barreau et al., 2005). La regió 5'UTR és anormalment rica en G/C, fet que implicaria una estructura secundària molt forta i una dependència d'activació traducciona (Esquema R-2).

```

GAAACAGCGAAGACAGCGGTGAGCCTGGGCGGTTGCCCTCGAGGCTCTCGCCCGGCTTCTCTTGGCCGACCCGC
CACGTTTGTGTTGGATTAAATCTTCAGGTTGCCGGCGCCCGCCCGCCGCTGGCCTCGCCGTGTGAGAGGG
AAGCACCCGTGCTGTGGCTGGTGGCTGGCGCCTGGAGGGTCCGCACACCCGCCCCGGCCGCGCCGCTTGC
CCGCGGACGAGCGGTCCCTGAACCGCGGAGTCGTGTTTGTGTTGACCCGCGGGCGCCGGTGGCGGCGCG
CCGAGGCCGGTGTCCGGCGGGCGGGGCGGTCCGCGCGGAGGCGAGGAAAGAGGAGCGGGGAGCTCTGCCGA
GGCCGGGCGCCGATGGAACCTGGGCCCGGAGCCCGCACCCGCGCCGCTGTCTTCCGCTGCAGCCC
CCCTCCCGCTGCAGCCCGTGTGAAGGCGCTATTGGCGCTTCAGCCGCGGGGGACTGTCCGCTGTG
ACCAACCTGACCGTCACTATGGACCAGCTGCAGGGTCTGGGCAGTGATTATGAGCAACCACTGGAGGTGA
AGAACAACAGTAATCTGCAGAGAATGGGCTCCTCCGAGTCAACAGATTAGGTTTCTGTCTAGATTCTCC
TGGGCCATTGGACAGTAAAGAAAACCTTGAAAATCCTATGAGAGAATAACATTCCCTACCTCAGAAGCTG
TTGGGATGTAGTCCAGCTCTGAAGAGGAGCCATTCTGATTCTCTTGACCATGACATCTTTCAGCTCATCG
AAACGATGAGAACAAAGAAAATGAAGCCTTTGAGTTTAAAGAAGCCAGTAAGACCTGTATCTCGTGGCTG
CCTGCACTCTCATGGACTCCAGGAGGGTAAAGATCTCTTACACAGAGGCAGAACTCTGCCCCAGCTCGG
ATGCTTTCCTCAAATCAAAGAGATAGCAGTGAACAGGGAATTCATTCTCTTTTACACCCAGTCACT
CTGTGACAGCCACTTTGTCTGATGAGGATGATGGCTTCGTGGACCTTCTCGATGGAGAGAATCTGAAGAA
TGAGGAGAGACCCCTCGTGCAATGGCAAGCCCTCTGGACAGCTCCTCTCGTCATGAGAGAATCTCAAAGGTTATC
GACAACCGATGCAAGCTGTTGACTCCCTTCCCTGTGTAGCTCCAGCACTCGGTGAGTGTGAAGAGAC
CAGAACGATCTCAAGAGGAGTCTCCACCTGGAAGTACAAGAGGAGGAAGAGCATGTCTGGGGCCAGCCC
CAAAGAGTCAACTAATCCAGAGAAGGCCATGAGACTTTCATCAGTCTTTATCCCTGGCATCTTCCCCC
AAAGGAACCATGAGAACATTTTGGACAATGACCCAAAGGACCTTATAGGAGACTTCTCAAAGGTTATC
TCTTTCATACAGTTGCTGGGAAACATCAGGATTTAAAATACATCTCTCCAGAAATATGGCATCTGTTTT
GAATGGCAAGTTTGGCAACCTCATTAAGAGATTTGTTATCATCGACTGTCGATACCCATATGAATACGAG
GGAGGCCACATCAAGGGTGCAGTGAACCTGCACATGGAAGAAGAGGTTGAAGACTTCTTATTGAAGAAGC
CAGTTGACCTACTGATGGCAAGCGTGTCACTTGTGTTTCACTGCGAGTTTTCTTCTGAGAGAGGTTCC
CCGCATGTGCCGTATGTGAGAGAGAGATCGCCTGGGTAATGAATACCCCAAACCTCCACTACCCTGAG
CTGTATGTCTGAAGGGGGGATACAAGGAGTCTTTATGAAATGCCAGTCTTACTGTGAGCCCCCTAGCT
ACCGGCCCATGCAACCAGAGGACTTTAAAGAAGACCTGAAGAAGTCCGCACCAAGAGCCGACCTGGGG
AGGGGAGAGCAAGAGGGGAGATGTACAGTCTGTAAGAAGCTCTGAAGGGCGGCGAGGACAGCCAGCA
GCAGCCCAAGCTTCCCTCCATCCCTTTACCTCTTTGCTGCAGAGAAACTTAAGCAAAGGGGACAGCT
GTGTGACATTTGGAGAGGGGCTGGGACTTCCATGCCTTAAACCTACCTCCCACTCCCAAGTTGGA
GCCAGGGCATCTTGTGGCTACGCCTTCTGTGCCCTGTAGACGTCCTGAGCCACAGTGGGATGAACAGCCGGGCTTA
TCGGGCTCCAGCCATCTCATGAGGGGAGAGGAGACGGAGGGGAGTAGAGAAGTTACACAGAAATGCTGCT
GGCCAAATAGCAAAGACAACCTGGGAAGGAAAGGCTTTGTGGGATAATCCATATGTTTATTTTATTCAA
CTTCATCAATCACTTTATTTTATTTTTTTCTAACTCCTGGAGACTTAATTTACTGCTTCATTAGGTTG
AAATACCTGCCATCTAGGTAGGGTTTTATATCCAGGGACTACCTCGGCCTTTTATTTTAAAAA
AAAAAA

```

Esquema R-2 : Seqüència codificant i UTRs de hCDC25A. *Sombrejat blau:* regió codificant: Exó1-Exó6 (1-562); Exó7-Exó14 (542-1575). *No sombrejat:* UTRs: 3'UTR: nucleòtids subratllats clonats amb la CDC25A exògena; possibles AREs: possibles CPEs; miRNAs descrits. 5'UTR: rica en G/C.

En el nostre estudi Snail no només controlava l'expressió de la CDC25A endògena sino que també feia baixar els nivells de la CDC25A ectòpica, que a més a més de la regió codificant (sombrejats blaus) contenia també els 33 primers nucleòtids de la seqüència 3'UTR (subratllats en negre). Dita seqüència no contenia cap dels possibles elements reguladors però la proteïna transfectada també s'expressava menys en presència de Snail. Aquest fet

indicava que la regulació exercida per Snail sobre l'expressió de CDC25A era independent dels possibles elements reguladors presents en les regions 3' i 5' no traduïdes.

13.2. S'han descrit miRNAs en la regió 3'UTR de CDC25A.

Els miRNAs (de *microRNAs*) són petits RNAs (21nts) que interfereixen en l'expressió gènica de gens estranys i de gens que no cal expressar (revisat per Rana, 2007). S'aparellen a seqüències 3'UTR del mRNA madur amb les que no són perfectament complementàries i en bloquegen la traducció (revisat per Chen, 2007; Zamore, 2005).

S'han descrit 15 miRNAs que s'uneixen a la regió 3'UTR del pre-mRNA de la hCDC25A. 2 d'ells poden unir-se a la regió 3'UTR del mRNA madur, però cap interacciona amb la petita regió 3'UTR clonada conjuntament amb la hCDC25A (Esquema R-2, **sombrejat lila**). Aquest fet indica que Snail, tampoc bloqueja la traducció de la CDC25A per una via que impliqui els miRNAs.

13.3. Snail podria interferir en el control posttranscripcional dut a terme per un mecanisme similar al que exerceixen les proteïnes DAZ sobre CDC25A en les cèl·lules germinals.

En *Drosophila* existeixen dues fosfatases homòlogues de CDC25, String que participa en la mitosi i Twine que és exclusiva de cèl·lules germinals i que és essencial per l'entrada a la meiosi dels espermatòcits: espermatòcits que no tenen *twine* funcional no assoleixen la transició G2/M i les cèl·lules gamètiques resultants esdevenen anòmales. Aquest mateix fenotip es dona quan hi ha mutacions en un altre gen, *boule* que codifica per una proteïna capaç d'interaccionar amb el RNA a través d'un motiu RRM (de *RNA-recognition motif*). El fet que els mutants de *Drosophila* *boule* presentin nivells baixos de proteïna Twine i nivells alts de mRNA de Twine i que l'expressió heteròloga de Twine rescati el defecte d'entrada a la meiosi dels mutants *boule*, fa pensar que Boule té un rol essencial en la traducció de Twine (Maines et al., 1999).

En vertebrats, Boule forma part de la família gènica DAZ (de *Deleted in azoospermia*), composta per tres gens (Boule, DAZ i DAZL), sovint deletats en organismes estèrils per ser incapaços de produir gamets (revisat per Yen, 2004). Totes tres proteïnes presenten un motiu RRM altament conservat i són capaces d'unir-se *in vitro* a diferents RNAs. En ratolí, s'ha descrit una seqüència consens anomenada DBS (de *DAZ binding site*) present en la regió 3'UTR del mRNA de CDC25A que s'uneix directament a mDAZL. Dita regió també és present en la regió 3'UTR de Twine de *Drosophila* i es postula que Boule en *Drosophila* i DAZL en ratolí s'uneixen als mRNAs de Twine i de CDC25A respectivament permetent la seva traducció durant el procés d'espermatogènesi (Jiao et al., 2002).

Les línies MDCK i HT-29 M6 quan expressaven Snail presentaven nivells elevats de mRNA de CDC25A i encanvi, expressaven poca proteïna si les comparàvem amb les cèl·lules control. Vam hipotetitzar que potser en el nostre model cel·lular DAZL també podia estar controlant la traducció de CDC25A i que en presència de Snail era reprimida.

Vam provar d'amplificar el transcrit DAZL. Vam fer RT-PCR semiquantitativa sobre extractes de RNAtotal de les línies MDCK i HT-29 M6 transfectades establement amb pcDNA3/pcDNA3-SNA-HA (fig. R-38). Com a control positiu vam utilitzar extractes de RNA de testicles de ratolí. Vam analitzar també la línia MCF7 per localitzar Snail en el citoplasma (la resta de línies cel·lulars el presenten majoritàriament en el nucli).

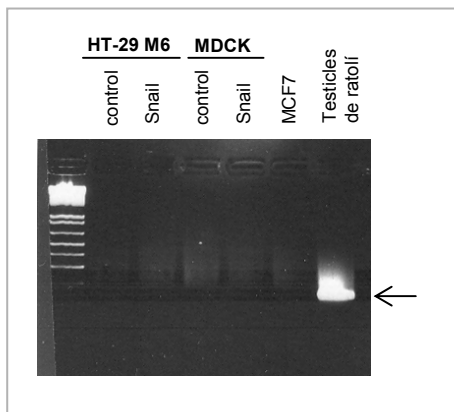


Figura R-38: DAZL només s'expressa en la línia germinal. Estudi dels nivells del mRNA de DAZL en les línies MDCK i HT-29 M6 transfectades establement amb Snail-HA o el vector buit (control), en MCF7 i en testicles de ratolí (control positiu). Es van determinar els nivells de mRNA de DAZL per RT-PCR semiquantitativa a partir de 500ng de RNAtotal.

Únicament vam amplificar DAZL en l'extracte de cèl·lules germinals. La resta de cèl·lules no expressaven DAZL, indicatiu que Snail bloquejava la traducció de CDC25A per una via independent a aquesta família de proteïnes amb capacitat d'unir-se al mRNA de CDC25A i modular-ne la traducció durant la meiosi.

14. LA REGIÓ DE CDC25A RESPONSABLE QUE EN PRESENCIA DE SNAIL BAIXIN ELS NIVELLS DE PROTEÏNA ES LOCALITZA EN L'EXTREM N-TERMINAL.

Per tal d'esbrinar el mecanisme que estava utilitzant Snail per inhibir la traducció de CDC25A i provocar un retràs de cicle cel·lular, vam optar per delimitar la regió de CDC25A responsable de dit efecte. Utilitzant oligonucleòtids sintètics vam amplificar i clonar la regió codificant del gen de la CDC25A humana clonada en el pcDNA3, en un vector pEGFP. El primer terç N-terminal de la proteïna, que comprèn els 6 primers exons (1-562nts) i les dos terços C-terminal, que comprenen els 9 exons restants (542-1575nts) també els vam clonar

en un vector pEGFP (fig. R-39A). Vam cotransfectar cèl·lules MDCK amb pcDNA3/pcDNA3-SNA-HA i pEGFP-CDC25A₁₋₁₅₇₅ / pEGFP-CDC25A₁₋₅₆₂ / pEGFP-CDC25A₅₄₂₋₁₅₇₅. Després de 48 hores d'expressió, vam fer extractes de proteïna total i per assaig *Western blot* anti-GFP vam visualitzar les tres formes de GFP-CDC25A. Quan les cèl·lules expressaven la CDC25A sencera (GFP-CDC25A₁₋₁₅₇₅) i la CDC25A truncada N-terminal (GFP-CDC25A₁₋₅₆₂) els nivells de totes dues CDC25A baixaven en presència de Snail. En canvi, no semblava que Snail afectés els nivells de la forma truncada C-terminal (GFP-CDC25A₅₄₂₋₁₅₇₅) (fig. R-39 B.1). Si fèiem el mateix assaig però tractant les cèl·lules amb MG-132, inhibidor de la degradació via proteosoma (fig. R-39 B.2), seguïem veient els mateixos resultats: Snail, fèia disminuir els nivells de la CDC25A sencera i de la CDC25A-Nt, però en canvi no fèia baixar els nivells de la CDC25A-Ct. Aquests resultats indicaven que la zona de CDC25A implicada en la regulació de la seva expressió per Snail, estava compresa en aquests primers 562 nucleòtids del domini regulador i reconfirmàven una vegada més que la davallada d'aquesta fosfatasa al ser coexpressada amb Snail, no era deguda a una major degradació, ja que bloquejant dita degradació amb MG132, Snail seguia tenint els mateixos efectes.

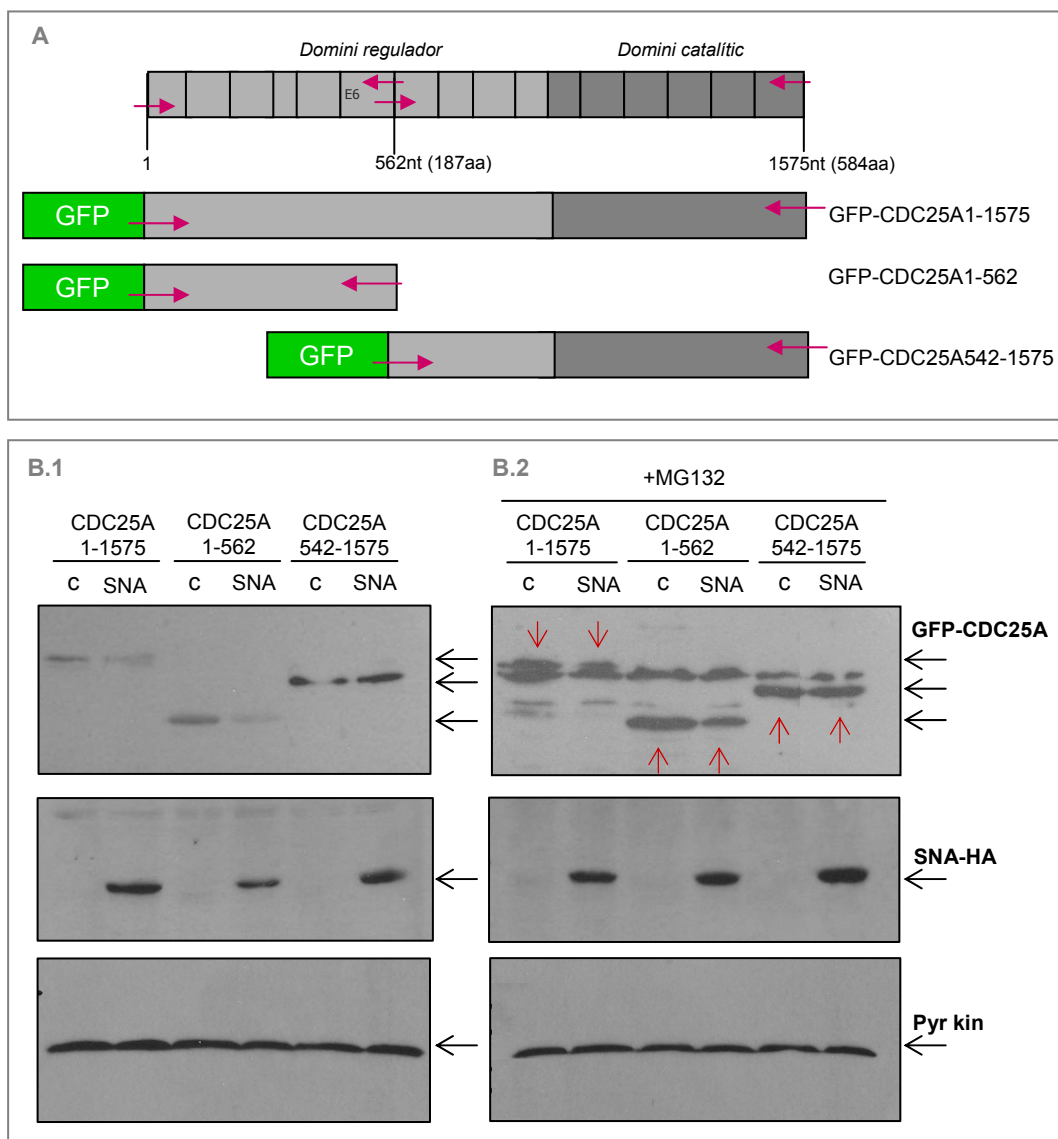


Figura R-39: Snail fa baixar els nivells de CDC25A. La regió de CDC25A implicada està en la meitat N-terminal. Estudi d'expressió de CDC25A en cèl·lules MDCK transfectades transitòriament amb pcDNA3/pcDNA3-SNA-HA i pEGFP-CDC25A₁₋₁₅₇₅/pEGFP-CDC25A₁₋₅₆₂ / pEGFP-CDC25A₅₄₂₋₁₅₇₅ (A) tractades o no, amb MG132 durant 5h. Es feren extractes de proteïna total i electroforesi en gel del 12% de poliacrilamida i la posterior detecció de GFP-CDC25A (amb anti-GFP), Snail-HA (amb anti-HA) i piruvat quinasa (Pyr Kin) per Western blot (B). Les fletxes roses de la figura A indiquen la posició dels oligonucleòtids utilitzats per fer dits constructs. Les fletxes vermelles de la figura B indiquen les bandes corresponents a GFP-CDC25A. E6: exò 6.

15. ELS NIVELLS DE mRNA DE CDC25A EXÒGENA NO SÓN MÉS ALTS EN LES CÈL·LULES QUE EXPRESSEN SNAIL.

Snail feia baixar els nivells de proteïna CDC25A endògena quan s'expressava en les línies HT-29 M6 i MDCK. En aquestes línies s'observava que dita davallada correlacionava amb una pujada dels nivells de mRNA de CDC25A, fet que ens va fer pensar que Snail estava bloquejant la traducció de dita fosfatasa. Snail també feia baixar els nivells de la CDC25A

clonada en el pcDNA3 (1-1575+33nts 3'UTR), de la GFP-CDC25A₁₋₁₅₇₅ i de la GFP-CDC25A₁₋₅₆₂, al ser cotransfectat en les MDCK. Encanvi, no feia baixar els nivells de la GFP-CDC25A₅₄₂₋₁₅₇₅. Vam analitzar què passava l'expressió dels mRNAs dels tres constructes GFP-CDC25A, esperant que també hi hagués una correlació entre la baixada de proteïna i la pujada de mRNA tal i com vèiem a l'analitzar l'expressió de la CDC25A endògena.

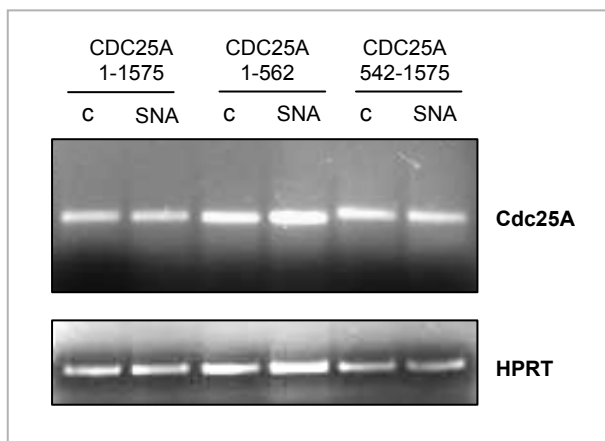


Figura R-40: Els nivells del mRNA de CDC25A exògena no incrementen en les cèl·lules que expressen Snail. Estudi dels nivells de mRNA de CDC25A exògea en les cèl·lules MDCK cotransfectades transitòriament amb pcDNA3/pcDNA3-SNA-HA i pEGFP-CDC25A(1-1575)/ pEGFP-CDC25A(1-562)/ pEGFP-CDC25A(542-1575). Es van fer extraccions de RNA total i es van determinar els nivells de mRNA de CDC25A per RT-PCR semi-quantitativa. Controls de càrrega: HPRT

Però tal i com s'observa en la figura R-40, els nivells de mRNA de GFP-CDC25A₁₋₁₅₇₅ i GFP-CDC25A₁₋₅₆₂ no semblaven ser més alts en presència de Snail (la pujada observada en la mostra GFP-CDC25A₁₋₅₆₂) creiem que es deu a que hi ha més mRNA total de partida, ja que també és més alta l'expressió de HPRT).

16. ELS NIVELLS DE mRNA_{NUCLEAR} DE CDC25A PUGEN I ELS DE mRNA_{CITOSÒLIC} BAIXEN QUAN LES CÈL·LULES EXPRESSEN SNAIL

Un altre possible mecanisme que podia utilitzar Snail, podria ser el de retenir el transcrit de CDC25A a nucli i impedir d'aquesta manera la seva traducció.

Amb un kit comercial, que permetia dividir el contingut cel·lular en fraccions citoplasmàtiques i en fraccions nuclears, vam fer extractes fraccionats de mRNA_{citosòlic} i mRNA_{nuclear} sobre cultius en creixement assincrònic de la línia MDCK transfectada establement amb Snail i vam amplificar CDC25A per RT-PCR.

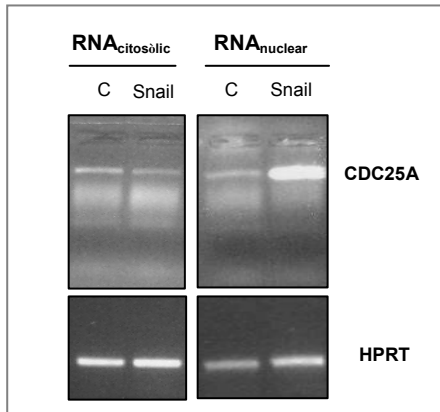


Figura R-41: En les cèl·lules que expressen Snail, els nivells de mRNA de CDC25A de la fracció nuclear incrementen i els de la fracció citosòlica disminueixen. Estudi dels nivells de mRNA de CDC25A endògena en les línies MDCK transfectades establint amb Snail-HA o amb el vector buit (control). Es van fer extractes fraccionats de RNA_{citòsòlic} i RNA_{nuclear} i es van determinar els nivells de mRNA de CDC25A per RT-PCR semi-quantitativa.

Tal i com indica la figura R-41, es veia clarament una acumulació de mRNA de CDC25A en la fracció nuclear de les cèl·lules que expressaven Snail i una davallada dels nivells de mRNA de CDC25A en la fracció citosòlica de dites cèl·lules respecte les control.

Aquests resultats indicaven que Snail bloquejava el cicle cel·lular impedit la traducció de CDC25A, una de les principals proteïnes implicades en la seva progressió, retenint el mRNA de dita fosfatasa en el nucli.

De fet el nostre grup havia descrit que Snail, quan es localitzava en el nucli cel·lular, sovint ho feia distribuïnt-se en uns cossos puntiformes, on co-localitzava amb el factor de splicing U2AF65 implicat en el mecanisme d'export nuclear dels mRNAs processats (Zolotukhin et al., 2002). Aquesta distribució plantejava la possibilitat que Snail pogués participar en la modulació del processament del mRNA en el nucli (Domínguez, 2003) i donava pes a la interpretació dels nostres resultats.

DISCUSSION

1. L'EXPRESSIÓ DE SNAIL EN CÈL·LULES EPITELIALS FA DISMINUIR LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

Cada vegada més es tendeix a pensar que les respostes al càncer les podem trobar en l'estudi del desenvolupament normal de l'organisme. S'ha vist que molts dels gens implicats en tumorigènesi són gens que participen normalment en processos essencials del funcionament cel·lular normal i que per raons diverses es desregulen (revisat per Thiery, 2006).

Els processos de Transició Epiteli-Mesènquima fonamentals durant el desenvolupament, també són rellevants en la progressió de tumors epitelials malignes (Hay, 1995). En tots dos casos les cèl·lules perden cohesió i adhesió i guanyen mobilitat. Aquests processos morfogènics impliquen una reorganització important del citoesquelet que serà incompatible amb un estat proliferatiu actiu, fins que les cèl·lules necessitin colonitzar un nou territori. Les cèl·lules neoplàsiques de la glia (Bolteaus et al., 2001), els limfòcits (Ratner et al., 1992), les cèl·lules MM1 altament invasives d'hepatoma de rata (Iwasaki et al., 1995) i les cèl·lules NBT-II de carcinoma de bufeta tractades amb FGF1 (Bonneton et al., 1999) són exemples de cèl·lules que migren més eficientment o exclusivament, depenent del model cel·lular, aturades en algun punt del cicle, en general en la fase G1. Diversos estudis demostren que en els fronts tumorals invasius de certs carciomes, l'expressió de l'inhibidor de CDKs , p16^{INK4A} és més elevada que en les zones centrals del tumor, fent que dites cèl·lules estiguin aturades en la fase G1 (Jung et al., 2001; Svensson et al., 2003) i proliferin menys (Palmqvist et al., 2000) (fig. D-1)

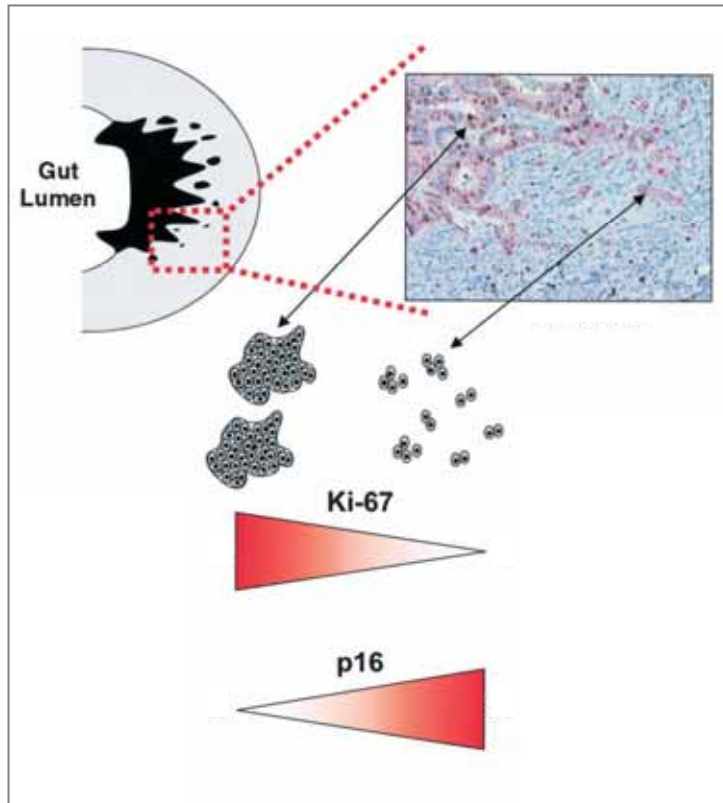


Figura D-1: Les cèl·lules del front tumoral dels càncers colorectals presenten en general baixa activitat proliferativa (baixa expressió de Ki-67). Dit efecte és mediat en part per p16, inhibidor de les CDKs implicades en la progressió per G1. (modificada de Palmqvist, 2000)

Snail és un factor clau en la regulació dels processos EMT, tant en el desenvolupament com en la progressió tumoral. S'ha vist que les zones infiltrants d'un nombre important de tumors epitelials expressen elevats nivells de Snail que es correlacionen amb una davallada dels nivells d'E-cadherina (Blanco et al., 2002; Franci et al., 2006). El nostre grup i altres van descriure que aquest factor de transcripció expressat en fibroblastes i en algunes cèl·lules de tumors epitelials reprimia l'expressió de l'E-cadherina per unió directe a les caixes-E presents en el seu promotor (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). Per demostrar-ho van generar clons estables de dues línies cel·lulars epitelials, les HT-29 M6 i les MDCK en les que l'expressió ectòpica de Snail induïa un fenotip mesenquimal. Durant l'estudi es va veure que els clons que sobreexpressaven Snail proliferaven més lentament.

Hi ha diversos processos en desenvolupament on la taxa de proliferació cel·lular baixa rera l'expressió de membres de la família Snail quan aquests indueixen una EMT i és notable indicar que l'aturada no és sempre en el mateix punt del cicle cel·lular. Les cèl·lules premigradores de la cresta neural que expressen Slug necessiten delaminar aturades en la fase S (Burstyn-Cohen et al., 2002), mentre que les de ratolí expressen Snail i ho fan en G1 (Vega et al., 2004). Durant el procés de gastrulació de *Drosophila* Snail indueix una EMT per tal que les cèl·lules ventrals del blastocist adoptin un fenotip mesenquimal i migrin cap a

l'interior de l'embrió per formar el mesoderm. Fins que les cèl·lules no han deixat de migrar no superen l'etapa de transició de G2 a M sent Snail el responsable d'aquest bloqueig (Edgar, 1994). En queratinòcits humans, Slug s'expressa en les cèl·lules de la làmina basal on reprimeix l'expressió de les proteïnes implicades en les unions intercel·lulars i bloqueja la proliferació cel·lular (Turner, 2006). En diversos models cel·lulars també s'ha demostrat una correlació entre l'expressió de Snail, la inducció de la EMT i el bloqueig de cycle cel·lular i en molts casos els membres de la família TGF β hi tenen un rol inductor principal (Peinado et al., 2003; Valdes et al., 2002; Iavarone et al., 1997; Yang et al., 2006).

Aquest treball té com a objectiu determinar quin mecanisme utilitzava Snail per bloquejar el cycle cel·lular en les línies epitelials que havien patit una EMT després d'expressar establement mmSnail (Batlle et al., 2000 ; Guaita et al., 2002 ; Solanas et al., 2008). Les corbes de creixement indicaven que Snail feia disminuir la taxa de proliferació cel·lular, ja que els temps de duplicació (Dt) dels clons que expressaven dit factor de transcripció eren més alts que els dels clons control. Vam comprovar que dita disminució no era deguda a una major mortalitat cel·lular ocasionada per la sobreexpressió de Snail, fet poc probable si es considera el rol antiapoptòtic que té aquests factor de transcripció durant el desenvolupament embrionari i en cèl·lules en cultiu (Escrivà et al., 2008).

2. SNAIL BLOQUEJA L'ENTRADA A LA FASE S I L'ENTRADA A LA FASE M DEL CICLE CEL·LULAR

Vam voler determinar quina fase del cycle estava afectada rera l'expressió de Snail. L'anàlisi per citometria de flux dels cultius assincrònics revelava que quan s'expressava Snail en la línia MDCK incrementava el percentatge de cèl·lules en la fase G1, indicatiu que en aquesta línia cel·lular Snail estava bloquejant algun pas de dita etapa i retrassant l'entrada a la fase S. En la línia HT-29 M6, on els efectes en proliferació eren més evidents, no vam trobar diferències importants en la distribució cel·lular per les fases del cycle al comparar les cèl·lules que expressaven Snail i les cèl·lules control. Possiblement, aquest resultat era indicatiu de que estava afectat més d'un punt del cycle, de manera que el retràs en una fase compensava el retràs en una altra i feia que de forma global, no veiéssim diferències.

Per confirmar l'aturada en G1 de les MDCK que expressaven Snail i comprovar si en les HT-29 M6 també estava afectada aquesta etapa, vam sincronitzar els cultius. Una forma habitual de sincronitzar un cultiu cel·lular en la fase G0/G1 és privant el medi de cultiu de sèrum, de manera que quan restitueixes de nou el medi amb el percentatge de sèrum habitual obtens una població cel·lular que de forma sincronitzada prossegueix el cycle. En la línia MDCK vam confirmar l'aturada en G1 vista en el cultiu assincrònic: l'expressió de Snail

fèia que les cèl·lules aturades en G0/G1 entréssin a la fase S més tard que no pas les cèl·lules control, tot i que aquestes últimes eren més susceptibles al deplecionament (aturaven el cicle cel·lular abans que les cèl·lules que expressaven Snail i esdevenien menys viables). El fet que Snail fés que les cèl·lules fóssin menys susceptibles a l'apoptosi causada per la depleció del sèrum del medi de cultiu s'ha confirmat posteriorment (Vega et al., 2004).

En la línia HT-29 M6 també vam veure el bloqueig en la fase G1. En aquesta línia les cèl·lules control havien superat l'aturada abans de les 16h de completar el medi mentre que les cèl·lules que expresaven Snail no ho feien fins que arribaven a prop de les 24h. En aquesta línia cel·lular l'estudi de les fases del cicle en cultius assincrònics, no reflexaven diferències entre les cèl·lules que expressaven Snail i les cèl·lules control de manera que el retràs en sortir de la fase G1 observat en cultius sincronitzats, havia de compensar-se amb un bloqueig en alguna altra etapa del cicle cel·lular.

Un tret interessant que presentaven les cèl·lules que expressaven Snail en la línia HT-29 M6 era l'elevat nombre de cèl·lules no adherides presents en el medi de cultiu. L'estudi detallat d'aquesta població de cèl·lules supeses ens va demostrar que moltes d'aquestes cèl·lules eren viables, que podien tornar-se a unir a la placa de cultiu i que presentaven elevats nivells de Snail que correlacionaven amb baixos nivells d'E-cadherina. Aquests elevats nivells de Snail coincidien amb l'aparició d'una nova isoforma que migrava per sobre del mida habitual, corresponent a la proteïna fosforilada de Snail altament abundant en les cèl·lules que perden l'adhesió al substrat (Domínguez et al., 2004). L'anàlisi del cicle cel·lular d'aquesta població no adherida mostrava un increment important de cèl·lules en fase S i G2/M respecte la població adherida. Quan tractàvem aquesta línia cel·lular amb nocodazol (agent bloquejador de la polimerització dels microtúbuls que bloqueja les cèl·lules en la prometafase mitòtica) i detectàvem les mitosi amb un anticòs específic, vèiem que en la població que expressava Snail, les cèl·lules mitòtiques estaven majoritàriament desadherides de la placa i eren menys abundants que en la població control. Aquest conjunt de resultats indicaven que les cèl·lules HT-29 M6 que expressaven Snail eren més susceptibles a desunir-se del substrat en l'arribada a la mitosi però no concluien que Snail bloquegés l'entrada a dita etapa.

Durant el desenvolupament de pollastre les cèl·lules premigradores de la cresta neural es delaminen del tub neural sincronitzades en la fase S (Burstyn-Cohen et al., 2002). Durant el procés de gastrulació de *Drosophila* Snail indueix una EMT per tal que les cèl·lules ventrals dels blastocist adoptin un fenotip mesenquimal i migrin cap a l'interior de l'embrió per formar el mesoderm. Aquestes cèl·lules migren aturades en la fase G2 (Foe et al. 1989) i no entren en mitosi fins que no deixen de migrar. Snail es el responsable d'aquest bloqueig ja que els embrions mutants *snail* entren en la fase M abans d'haver finalitzat el procés de migració

contribuint a que el procés de gastrulació no es dongui correctament (Großhans et al., 2000). Són dos exemples que es donen en desenvolupament rera l'expressió de Snail, que podrien explicar que en el nostre model cel·lular Snail bloquejés el cicle en S o/i G2 i facilités que les cèl·lules perdéssin adhesió. També podria ser però, que Snail en sí no bloquejés el cicle, sino que només facilités la desunió de les cèl·lules al substrat en etapes on són més susceptibles a fer-ho. Si aquestes cèl·lules no adherides tenen més dificultats per seguir ciclant fins que no poden adherir-se de nou al substrat, vam qüestionar-nos que el retràs en proliferació detectat en les HT-29 M6 no fos degut a aquesta facilitat a desadherir-se. L'estudi de proliferació sembrant les cèl·lules dins d'una matriu de col·làgen ens van confirmar que el retràs en cicle cel·lular no era conseqüència de la pèrdua d'adhesió provocada per Snail, ja que seguïem veient que les cèl·lules control proliferaven més depressa que les cèl·lules que expressaven Snail.

L'expressió ectòpica de Snail provocava un retràs en l'entrada a la fase S del cicle cel·lular tant en la línia MDCK com en la línia HT-29 M6. Aquesta darrera línia presentava també una predisposició a desunir-se de la placa de cultiu en les etapes S i G2/M del cicle que considerant el que passa en altres models cel·lulars, pensem que està estretament lligat a un bloqueig en algun punt d'aquestes etapes.

3. SNAIL FA DISMINUIR L'EXPRESSIÓ DE CDC25A A NIVELL DE PROTEÏNA

Per tal de determinar quines eren les possibles dianes de Snail a nivell molecular responsables del bloqueig en el cicle cel·lular vam considerar de nou la gastrulació en *Drosophila*, que en aquell moment era el procés més ben caracteritzat a l'hora de relacionar Snail amb aturada de cicle. En aquest model, Snail és necessari per bloquejar l'acció de la fosfatasa String (Großhans et al., 2000), la qual activa el complexe Cdc2-CiclinaB implicat en la transició G2/M en les cèl·lules del futur mesoderm que estan migrant (Edgar et al., 1990; Edgar et al., 1994).

En mamífers, existeixen 3 homòlegs de String : CDC25A, B i C, que no només regulen la transició G2/M (Molinari et al., 2000; Mailand et al., 2002; Linqvist et al. 2005;), sino que també regulen la transició G1/S i la progressió per la fase S. Dels tres membres de la família, la CDC25A és possiblement la "master" fosfatasa de les CDKs mentre que la CDC25B i CDC25C cooperen amb ella, però són dispensables (Donzelli, 2003). De fet s'ha descrit que ratolins que no expressen ni CDC25B ni CDC25C són totalment viables i presenten un cicle cel·lular normal gràcies a que la CDC25A i potser altres fosfatases compensen la seva pèrdua (Ferguson et al., 2005).

Podria ser que Snail conserves el rol que té en desenvolupament i que en les línies epitelials analitzades seguís controlant l'activitat de CDC25/String tot bloquejant una o més etapes del cicle, per això vam analitzar si l'expressió de CDC25A estava condicionada per l'expressió de Snail.

Vam analitzar els nivells de CDC25A en les línies HT-29 M6 i MDCK on havíem detectat el bloqueig de cicle rera l'expressió de Snail. Tant en cultius assincrònics, com en pools de cèl·lules en la fase G0/G1 (obtinguts al deplecionar el medi de sèrum, o fraccionant per Sorting) les cèl·lules HT-29 M6 i les MDCK que expressaven Snail presentaven nivells més baixos de la proteïna CDC25A. L'expressió ectòpica de quantitats creixents de Snail transfectat en cèl·lules MDCK correlacionaven amb quantitats decreixents de proteïna CDC25A, fet que confirmava una relació directe entre l'expressió de Snail i la baixada de proteïna CDC25A.

La CDC25A comença a expressar-se en la segona meitat de la fase G1 gràcies a l'activació transcripcional per E2F i c-myc (Vigo et al., 1999; Galaktionov et al., 1996). Durant tota la interfase està en constant "turnover" de manera que l'equilibri entre la seva expressió i la seva degradació permeten que la cèl·lula avanci pel cicle cel·lular (Kanemori et al., 2005; Bernardi et al., 2000). Tradicionalment se li va assignar el rol de promotora de l'entrada a la fase S al defosforilar els complexos CDK2-ciclinaE i CDK2-ciclinaA i activar-los (Blomberg et al., 1999). Més tard es va veure que també tenia un rol en l'entrada a la fase M al defosforilar i activar la CDK1-ciclinaB (Mailand et al., 2002).

Vam analitzar si la davallada dels nivells de CDC25A es correlacionaven amb una baixada en l'activitat de les CDKs regulades per dita fosfatasa. Una forma indirecte d'analitzar activitat CDK és estudiant els nivells de les formes inactives de les CDKs, fosforilades en la Y15 (residu susceptible a ser defosforilat per la CDC25A quan aquestes CDKs s'han d'activar). Quan les cèl·lules HT-29 M6 expressaven Snail pujaven els nivells de CDK1-Y15P que es correlacionava amb una davallada en l'activitat quinasa de la CDK1. En les MDCK també vam detectar un increment en els nivells de CDK1-Y15P que es correlacionaven amb una menor activitat CDK1. A nivell de CDK2 només detectàvem un lleuger increment de la isoforma inactiva (ICDK2-Y15P) en les MDCK que no es correlacionava amb una menor activitat quinasa de la CDK2.

Els extractes proteics utilitzats per fer aquests estudi, provenien de cèl·lules en creixement assincrònic comparables a les cèl·lules utilitzades per l'estudi del cicle cel·lular, on havíem detectat un bloqueig en G1 en les MDCK i en les HT-29 M6, compensat en aquestes darreres, per un bloqueig en algun altre punt del cicle. Creiem que la baixada en l'activitat de CDK1 detectada en les HT-29 M6 és indicatiu d'un bloqueig en l'entrada a la mitosi, ja que el percentatge de cèl·lules e G2/M és molt semblant entre les cèl·lules que expressen Snail i

les control i encanvi els nivells de CDK1-Y15P i d'activitat CDK1 són ben diferents. En canvi, la lleugera baixada d'activitat CDK1 (que es correlaciona amb una pujada en els nivells de CDK1-Y15P) detectada en les MDCK que expressen snail, creiem és una causa indirecte de l'aturada en G1 ja que el percentatge de cèl·lules en G2/M és inferior en les cèl·lules que expressen Snail.

L'aturada en G1 detectada en totes dues línies no la podíem explicar per una menor activitat CDK2 i podríem explicar-ho de dues maneres: A: Considerem que el bloqueig en G1 induït per Snail tant en les MDCK com en les HT-29 M6 és independent de CDK2 ja que tot i que es tendeix a pensar que els substrats moleculars de CDC25A són CDK2-ciclinaE, CDK2-ciclinaA i CDK1-ciclinaB, alguns estudis demostren que CDK4-ciclinaD i CDK6-ciclinaD, complexos CDK-ciclina implicats en el pas per G1, també podrien estar regulats per l'activitat fosfatasa de la CDC25A. (Iavarone et al., 1999; Terada et al., 1995; Blomberg et al., 2003; Saha et al., 2007;). Així doncs possiblement en les HT-29 M6 i en les MDCK, la baixa expressió de CDC25A dificulta l'activació de les CDKs implicades en la progressió per la fase G1, provocant el retard en l'entrada a la fase S rera l'expressió de Snail. De fet, hi ha diversos treballs que defensen que l'expressió de Snail provoca un bloqueig en l'entrada a la fase S però ho relacionen amb un increment dels nivells de p15^{INK4b} i amb una baixada d'expressió de les ciclines D (Hu et al., 2007; Vega et al., 2004)

B: La baixa expressió de CDC25A causada per Snail, si que bloqueja l'activitat de la CDK2 però les nostres condicions de treball no han permès detectar-ho. De fet les MDCK que pensem que presenten l'aturada principalment en l'etapa G1 si que presenten més CDK2-Y15P. Hi ha un treball que defensa que en aquesta mateixa línia cel·lular l'expressió de Snail bloqueja la transició G1/S al mantenir nivells elevats de p21^{CIP1} (Vega et al. 2004) CKI inhibidora dels complexos CDK2-ciclina. De fet quan vam començar el nostre estudi vam analitzar l'expressió de p21^{CIP1} en les cèl·lules HT-29 M6 i MDCK transfectades establements amb Snail i vam veure que els nivells de proteïna incrementaven rera l'expressió de Snail (fig. D-2).

Hi ha estudis que demostren que sovint hi ha una correlació inversa entre els nivells de CDC25A i els de p21^{CIP1} i que l'expressió pot ser induïda i reprimida respectivament per elements d'una mateixa via (Bartek et al. 2001) de manera que no descartem que en el nostre model cel·lular, Snail bloquegi l'activitat CDK2-ciclina i la conseqüent transició G1/S fent baixar els nivells de CDC25A i fent pujar els nivells de p21^{CIP1}.

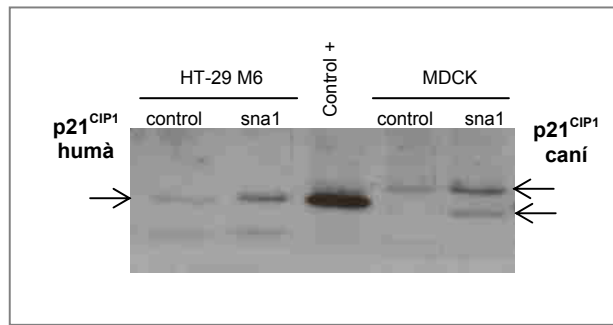


Figura D-2: Els nivells de proteïna de p21^{CIP1} són més alts en les cèl·lules que expressen Snail. Detecció de p21^{CIP1} en extractes de proteïna total de cèl·lules HT-29 M6 i MDCK, transfectades establement amb Snail-HA. Rera l'electroforesi en gels del 12% de poliacrilamida es va fer un assaig *Western blot* utilitzant l'anticòs anti- p21^{CIP1}. *No sabem del cert si les bandes detectades en les cèl·lules MDCK corresponen a p21^{CIP1} caní.*

Al transfectar cèl·lules MDCK amb un plàsmid portador de la seqüència codificant de la variant 1 de splicing de la CDC25A humana i una petita part (33 nucleòtids) del 3' UTR, també veïem que els nivells d'expressió de la CDC25A eren més baixos si aquesta era cotransfectada amb Snail-HA respecte les cèl·lules cotransfectades amb el plàsmid buit, o amb un mutant de Snail, el Snail- Δ C28 (més discutim perquè no té efecte aquest mutant). Aquest resultat indicava dues coses: per una banda, que la CDC25A sobreexpressada contenia els elements necessaris perquè Snail en modulés la seva expressió. Per l'altra, que la davallada de dita fosfatasa no es podia explicar per una repressió transcripcional exercida per Snail. Aquest darrer resultat lligava amb els estudis de RT-PCR on es veïa que els nivells de mRNA de CDC25A no eren pas més baixos en les línies estables que expressaven Snail-HA.

4. LA BAIXADA DELS NIVELLS DE CDC25A NO PODEN EXPLICAR-SE PER UNA MENOR ESTABILITAT DE LA PROTEÏNA, NI TRIBBLES HI JUGA CAP PAPER.

La regulació i la funció de la CDC25A a través dels seus múltiples estats d'estabilitat permeten a aquesta fosfatasa abastar diferents llindars d'activitat durant el cicle cel·lular dels mamífers. La CDC25A és làbil durant tota la interfase i la seva degradació pot ser críticament accelerada en presència de DNA danyat o no replicat. β -TRCP que reconeix el motiu DSG fosforilat de CDC25A, s'hi uneix i la ubiquïtina per tal que sigui degradada via proteosoma (Kanemori et al., 2005; Bernardi et al., 2000). Durant la mitosi, la CDC25A és hiperfosforilada per CDK1-ciclinaB i s'estabilitza i no és fins al final d'aquesta etapa que el complexe ubiquïtina-ligasa APC/C en promou la degradació (Busino et al., 2004).

Durant el procés de gastrulació de *Drosophila*, les cèl·lules del mesoderm prospectiu necessiten migrar abans d'entrar a la mitosi per tal que el procés es dongui correctament. 3

estudis paral·lels van concloure que Tribbles tenia un paper important a l'hora de bloquejar l'entrada a la mitosi al promoure la degradació de String/CDC25 mentre les cèl·lules ventrals estan migrant (Mata et al., 2000). El fet que l'expressió de Tribbles excedís el domini 10 i que els mutants *snail* que expressaven nivells normals de String i Tribbles no presentessin el bloqueig mitòtic els va fer concloure que Tribbles necessita que hi hagi activitat de Snail per ser funcional (GroBhans et al., 2000; Seher et al., 2000).

Tenint en compte que el procés de degradació és possiblement el mecanisme més important a l'hora de regular els nivells de CDC25A, i que en el procés de gastrulació de *Drosophila* Snail és necessari perquè dit mecanisme tingui lloc, vam pensar que possiblement, en el nostre model cel·lular, Snail estava fent baixar els nivells de CDC25A promoguent la seva degradació via proteosoma.

Vam analitzar l'estabilitat de la CDC25A en els clons estables que sobreexpressaven Snail tractant els cultius en creixement amb cicloheximida, droga que atura la traducció. Com que els nivells de CDC25A de partida eren més baixos en les cèl·lules que expressaven Snail, vam desitometrar les bandes i vam representar les línies de tendència. Ni en la línia HT-29 M6 ni en la línia MDCK vam observar que la pendent fos més acusada en les cèl·lules que expressaven Snail, indicatiu que en dites cèl·lules la CDC25A no era menys estable que en les cèl·lules control. Tractaments amb MG132, agent bloquejador de la degradació via proteosoma, van confirmar que els nivells de la CDC25A exògena seguien sent més baixos quan les cèl·lules MDCK eren cotransfectades amb Snail, indicatiu que l'efecte de Snail sobre CDC25A era independent de la degradació via proteosoma de dita fosfatasa. Els mutants SNA-SA i SNA-LA, mutants que no poden ser exportats fora del nucli, tenien un efecte major sobre la baixada de CDC25A independent de l'estabilitat de la proteïna mentre que el mutant SNA- Δ C28, mutant de distribució citoplasmàtica per no poder ser retingut al nucli, tenia un efecte molt menor.

Tot i que en el nostre model d'estudi no semblava que Snail fés baixar els nivells de CDC25A per degradació de la proteïna, vam creure oportú mirar si en aquests cas, Tribbles també col·laborava amb Snail en la baixada d'expressió de la fosfatasa.

Quan vam iniciar aquest estudi l'únic ortòleg de Tribbles humà descrit era TRB2 de manera que vam voler veure si TRB2 participava amb Snail a l'hora de fer baixar els nivells de CDC25A, tal i com passa en certes etapes del desenvolupament de *Drosophila*.

Vam clonar hTRB2 en un pcDNA3 amb l'etiqueta HA i vam fer línies estables que coexpressaven hTRB2 i Snail i vam analitzar si l'expressió de Tribbles incrementava l'efecte de Snail sobre el cicle cel·lular. Vam veure que l'expressió de hTRB2 en cèl·lules MDCK no afectava la progressió pel cicle cel·lular, ni quan s'expressava sol ni quan era coexpressat amb Snail.

Aquests resultats podien indicar tres coses: per RT-PCR havíem comprovat que tant les línies estables HT-29 M6 i MDCK com línies que expressaven Snail endògen, expressaven TRB2 i que no hi havia correlació entre els nivells de Snail i de Tribbles. Podria ser que Snail en tingués prou amb el Tribbles endògen present en les cèl·lules per fer disminuir els nivells de CDC25A.

Una altra possibilitat és que TRB2 no fos l'ortòleg de *Drosophila* que col·labora amb Snail en el retràs del cicle cel·lular. Posteriorment al nostre estudi, s'han descrit 2 ortòlegs més de Tribbles en vertebrats que només presenten homologia amb el Tribbles de *Drosophila* en el domini Ser-Thr quinasa conservat i no funcional que són TRB1 i TRB3. TRB3 és el membre de la família més ben caracteritzat en vertebrats. Es desconeix com actua però s'ha vist que interacciona amb diferents proteïnes implicades en diferents vies de senyalització: en cèl·lules tumorals en condicions d'hipòxia s'activa l'expressió de TRB3 i interacciona amb ATF4 tot promoguent la seva degradació fent menys susceptibles a les cèl·lules a les condicions de estrés (Bowers et al., 2003). En aquest treball també veuen que TRB3 bloqueja el cicle cel·lular i postulen que deu ser via la degradació de CDC25. Semblaria doncs que TRB3 en processos tumorals atura el cicle cel·lular i confereix resistència a la mort cel·lular, rols que també s'han descrit que té Snail (Vega et al., 2004; revisat per Barrallo-Gimeno 2005).

TRB2 en canvi està poc estudiat però un treball fet en *Xenopus* apunta que XTRB2 (homòleg de hTRB2) no és l'ortòleg del Tribbles de *Drosophila* perquè no pot rescatar el fenotip dels mutants *trbl* de *Drosophila* (Saka et al., 2004). Aquests autors diuen que en embrions de *Xenopus*, XTRB2 en comptes de bloquejar, promou la mitosi durant el procés de gastrulació i postulen que XTRB2 té un rol en citoquinesis perquè els embrions que expressen l'as-XTRB2 presenten un percentatge important de cèl·lules binucleades. Curiosament nosaltres també observem binucleació en la línia MDCK, però és al sobreexpressar TRB2. Tenint en compte aquestes dades pensem que si en l'aturada de cicle causada per snail hi participa Tribbles, ha de ser TRB3 i no pas TRB2 amb el que hem fet el nostre estudi.

La darrera alternativa que podia explicar la no participació de Tribbles en la davallada de CDC25A induïda per Snail, era que en el nostre model cel·lular Snail reprimeix l'expressió de CDC25A sense la col·laboració de Tribbles. Si considerem que Tribbles té un rol conservat en promoure la degradació de proteïnes via proteosoma (Mata et al., 2000; Rorth et al., 2000; Bowers et al., 2003) i que en el nostre model cel·lular no sembla que aquesta sigui la via utilitzada per Snail per fer baixar els nivells de CDC25A, potser aquesta darrera interpretació dels resultats és la més encertada.

5. SNAIL ACTIVA LA TRANSCRIPCIÓ DE CDC25A I RETÈ EL mRNA AL NUCLI IMPEDINT LA SEVA TRADUCCIÓ.

5.1 Snail fa que l'expressió de CDC25A baixi a nivell de proteïna i pugi a nivell de mRNA.

Anàlisis més precisos de l'expressió de CDC25A a nivell de mRNA en les línies estables HT-29 M6 i MDCK que expressaven establement Snail, ens van indicar que l'expressió ectòpica de Snail provocava un increment en les quantitat de mRNA de la CDC25A endògena. El fet que en presència de Snail, l'expressió de CDC25A a nivell de proteïna fós més baixa i encanvi l'expressió a nivell de mRNA fós més alta, ens va fer pensar que alguna de les etapes que hi ha entre la transcripció i la traducció de CDC25A era interferida per Snail. Els elements reguladors implicats en aquests control traduccional exercit per Snail sobre la CDC25A, havien d'estar presents en la seqüència de la CDC25A que transfectàvem, ja que dita els nivells de proteïna de dita fosfatasa també baixaven quan era cotransfectada amb Snail. Els possibles mecanismes implicats en el control posttranscripcional (entenent com a control posttranscripcional el processament dels pre-mRNAs a mRNAs) i traduccional (entenent els processos que fan que el mRNA processat surti de nucli i es tradueixi) estan estretament lligats a les regions no traduïdes dels pre-mRNAs i dels mRNAs processats. Els elements reguladors implicats en el control traduccional de la CDC25A per Snail, havien de ser presents també en la seqüència de hCDC25A que transfectàvem. Dita seqüència contenia 33 nucleòtids del 3'UTR de manera que va analitzar si aquesta petita regió contenia possibles elements reguladors implicats en la traducció i en l'estabilitat del mRNA, com són les seqüències AREs, CPEs o miRNAs. Tot i que la regió 3'UTR del mRNA de la hCDC25A conté prou AREs i CPEs per explicar un control traduccional de dita fosfatasa i s'han descrit possibles miRNAs que hi interaccionen, cap d'elles estava compresa en els primers 33 nucleòtids del 3' UTR. Vam plantejar-nos la possibilitat que dits elements reguladors poguessin estar dins la regió codificant. Diversos treballs apunten cap a la possibilitat que la regió codificant dels mRNAs tingui un paper en la seva estabilitat (Wisdom et al. 1991; Shyu et al., 1991; revisat per Ross et al., 1995) i els anàlisis computacionals mostren evidències de l'existència de molts miRNAs amb seqüències complementàries als mRNAs en els ORFs (de *open reading frames*), tot i que es pensa que la unió funcional miRNA-mRNA és només en els 3'UTR (Lewis et al., 2005). El fet que Snail fés baixar els nivells de les proteïnes de fusió GFP-ICDC25A₁₋₁₅₇₅ i GFP-CDC25A₁₋₅₆₂ i que no fés baixar els nivells de GFP-CDC25A₅₄₂₋₁₅₇₅ indica que els elements reguladors de la traducció implicats en el nostre model, estan compresos en aquests primers 562 nucleòtids presents en la regió codificant de la CDC25A i que són independents de les regions UTR.

A l'analitzar els nivells de mRNA de les tres proteïnes de fusió GFP-CDC25A per RT-PCR semiquantitativa, vam veure que cap d'ells pujava quan les cèl·lules eren cotransfectades amb Snail. El fet que els nivells de proteïna CDC25A baixessin, tant si Cdc25A estava sota control del propi promotor com si estava sota control d'un promotor constitutiu però encanvi, els nivells de mRNA només pugessin en el primer cas, indicava que possiblement Snail estava activant la transcripció de la CDC25A.

De fet durant el desenvolupament embrionari de *Drosophila*, els embrions mutants *snail* no formen el solc ventral ni hi ha expressió del mRNA de String en el domini 10 (prospectiu mesoderm). S'hipotetitzava que Snail és necessari per la transcripció de String i que a l'hora bloqueja la seva expressió, promoguent-ne la degradació cooperant d'alguna forma amb Tribbles. Es diu que el fet d'activar la transcripció de String i a l'hora bloquejar-ne l'activitat permet sincronitzar divisió cel·lular i morfogènesi en el procés de gastrulació ràpid característic dels insectes més evolucionats (Johnston et al., 2000). En el procés de neurogènesi de *Drosophila* també s'ha descrit que membres de la família Snail activen, probablement de forma indirecte, la transcripció de String en els neuroblastes que es delaminen (Ashrah et al., 2001).

5.2 Pugen els nivells de mRNANUCLEAR i baixen els nivells de mRNA_{CITOSÒLIC} de la CDC25A.

Un treball fet en el nostre grup (Domínguez, 2003), ha demostrat que Snail a nucli sovint es distribueix en petits grànuls que estan implicats en el processament dels pre-mRNAs. En aquest grànuls, mSnail-GFP colocalitzava amb U2AF65 (fig. D-3), la subunitat gran del factor de splicing U2AF, que s'ha vist que in vivo facilita l'export nuclear dels mRNAs processats (Reed et al., 2003; Zolotukhin et al., 2002). Aquesta colocalització de Snail i U2AF65 en speckles plantejava la possibilitat que Snail pogués participar en la modulació del processament dels mRNAs al nucli, retrassant l'export del mRNA de CDC25A al citoplasma i com a conseqüència bloquejant la seva traducció.

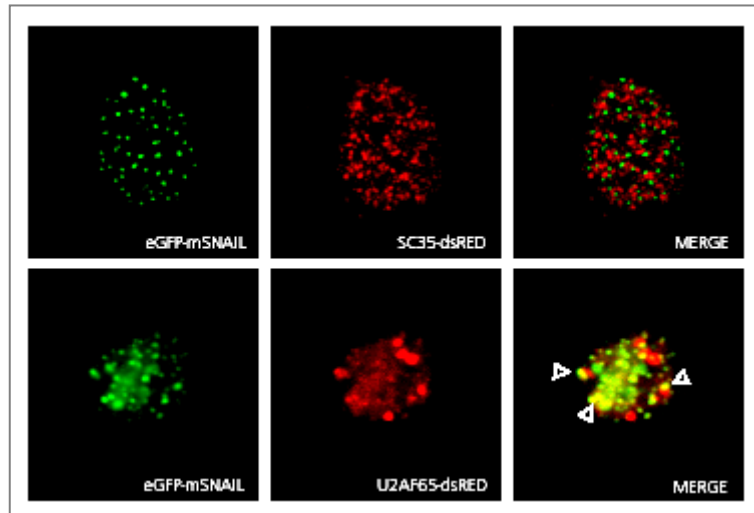


Figura D- 3: Snail colocalitza amb el factor U2AF65. Estudi de colocalització de eGFP-Snail (*verd*) i els factors de splicing U2AF65-dsRED (*vermell*) i SC35-dsRED (*vermell*) en cèl·lules NIH-3T3. No hi ha colocalització de snail amb SC35 i sí que n'hi ha amb el factor U2AF65 (*groc, fletxes*) (Domínguez, 2003).

El darrer resultat d'aquest treball dona pes a aquesta hipòtesi. Fent fraccions nuclears i citoplasmàtiques de mRNA en les línies estables i analitzant l'expressió de CDC25A a nivell de transcrit, vam veure que els nivells de mRNA de CDC25A en la fracció nuclear eren més elevats i en canvi eren més baixos en la fracció citosòlica quan les cèl·lules expressaven Snail. Aquest resultat plantejava la possibilitat que Snail retingués el mRNA de la CDC25A al nucli impedit així la seva traducció. El fet que els mutants SNA-SA i SNA-LA, amb distribució exclusivament nuclear, tinguessin un efecte major en la davallada de CDC25A i que el mutant citosòlic, SNA- Δ C28 no tingués efecte, donaven suport a aquesta idea. Que el mutant SNA-P2A fés baixar els nivells de la CDC25A exògena tant com el Snail wt i que el mutant GFP-SNA- Δ N24 (mancat del domini repressor) conservés la capacitat de bloquejar l'entrada a la fase S, indicava que l'efecte de Snail en el cicle cel·lular és independent de la seva activitat repressora de la transcripció.

6. MODEL D'ACTUACIÓ DE SNAIL COM A REPRESSOR DEL CICLE CEL·LULAR AL BLOQUEJAR LA TRADUCCIÓ DE LA CDC25A

Els resultats presentats en aquest treball suggereixen que Snail, expressat en cèl·lules epitelials que han patit una EMT, bloqueja el cicle cel·lular inhibint l'expressió de CDC25A i retrassant l'entrada a la fase S i a la fase M. El bloqueig en la primera fase del cicle, l'hem observat tant en la línia MDCK com en la línia HT-29 M6 transfectades establement amb Snail i també l'hem detectat en la línia RWP1 transfectada transitòriament amb eGFP-Snail. Dit bloqueig no hem pogut confirmar que estigui relacionat amb una davallada en l'activitat

CDK2 i hipotetitzem que possiblement Snail bloquegi l'activitat de les CDKs implicades en la progressió per G1, la CDK4 i la CDK6. En el nostre treball també hem detectat un bloqueig en l'entrada a la fase M en la línia HT-29 M6 que l'hem pogut relacionar amb una menor activitat CDK1 (fig. D-4A).

L'estudi dels nivells de mRNA fraccionat apunten una baixada de mRNA_{citòsòlic} (i la conseqüent pujada de mRNA_{nuclear}) de la CDC25A en les cèl·lules MDCK que expressen Snail, indicatiu que Snail reté el mRNA de CDC25A al nucli, impedit que sigui exportat i traduït. El fet que Snail colocalitzi amb el factor U2AF65 implicat en l'export del mRNA dona pes a aquesta idea (fig. D-4B).

No hem pogut demostrar que Snail s'uneixi directament al mRNA. Un treball previ fet en el nostre grup on es va intentar coimmunoprecipitar Snail-mRNAs va donar resultats poc concloents (Domínguez, 2003). Posteriorment vam intentar detectar la unió entre el mRNA de CDC25A i Snail fent assaig CLIP (de *in vivo cross-linking and immunoprecipitation method*), però tampoc vam obtenir resultats.

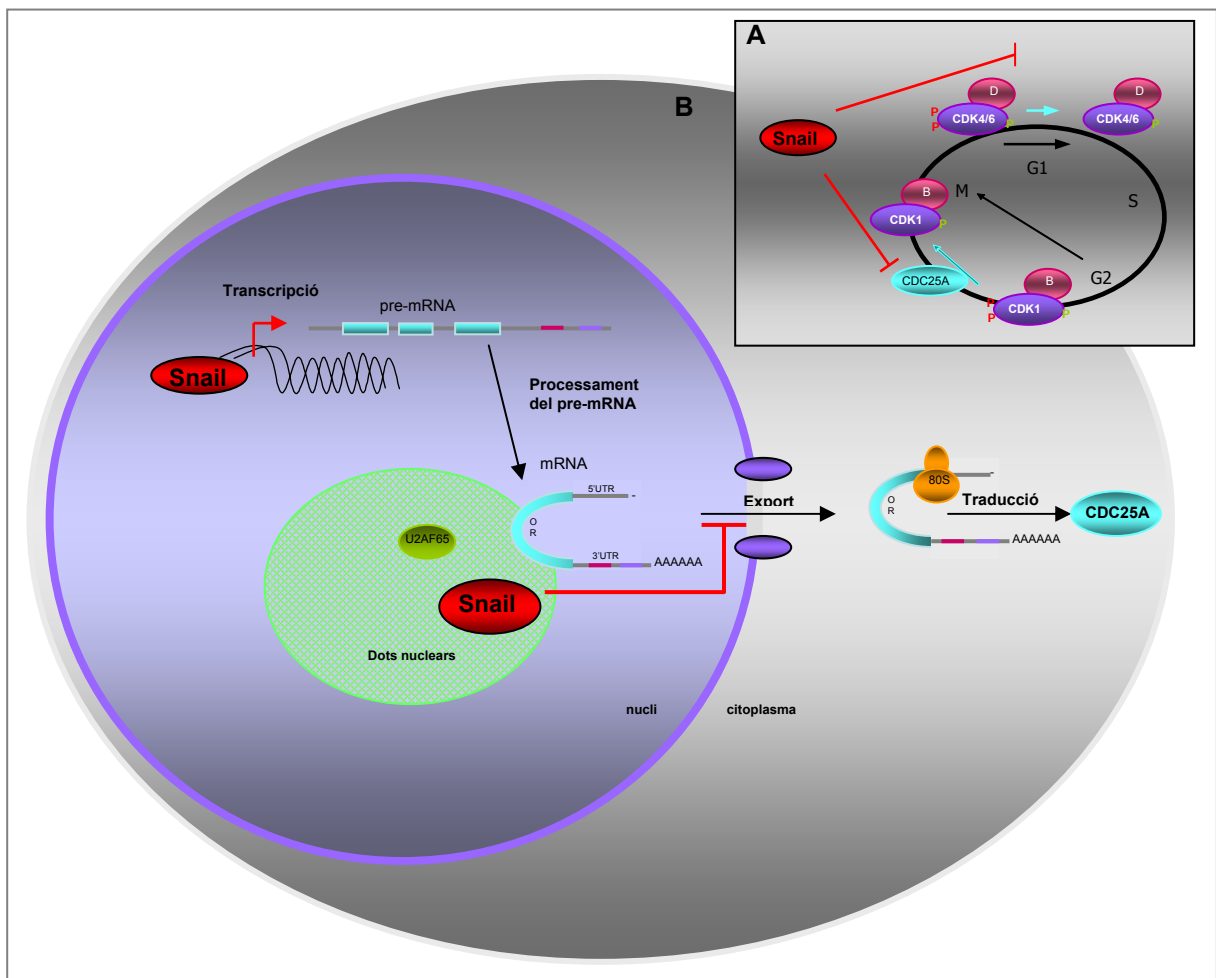


Figura D-4: Model d'actuació de Snail com a repressor de cycle cel·lular. A: Snail bloqueja l'entrada a la fase S i l'entrada a la fase M del cycle cel·lular inhibint l'expressió de la CDC25A. **B:** Snail reprimeix l'expressió de CDC25A al bloquejar l'export del mRNA de CDC25A al citoplasma i impedir

la seva traducció. A l'hora, Snail participa en l'activació transcripcional de CDC25A. El fet que activi transcripció i a l'hora bloquegi traducció, permet a les cèl·lules sincronitzar divisió cel·lular i morfogènesi i adaptar-se ràpidament a les necessitats del moment.

La primera dada que ens va fer pensar que Snail estava bloquejant la traducció de la CDC25A, va ser que en les línies transfectades establement amb Snail, els nivells de proteïna CDC25A baixaven i en canvi els nivells de mRNA pujaven. Quan expressavem la CDC25A sota promotor constitutiu, els nivells de proteïna de CDC25A seguien sent més baixos en presència de Snail, però en canvi els nivells de mRNA no incrementaven. Aquest fet ens podia indicar dues coses: per una banda, que Snail estava activant la transcripció de la CDC25A. Per l'altra, que el mRNA de la CDC25A exògena és molt estable i no es degrada ràpidament després de ser traduït de manera que els nivells de mRNA total són molt semblants tant si està majoritàriament retingut a nucli (en presència de Snail) com si està més al citosol traduït-se (en absència de Snail). Que Snail participi en l'activació de la transcripció de CDC25A no sorpren, perquè durant el procés de gastrulació i de neurogènesi passa. Tampoc sorpren que l'estabilitat dels mRNAs sigui diferent en funció de si es tracta del mRNA endògen (conté els elements reguladors propis i en el cas del mRNA de String s'ha descrit que és extremadament làbil (Edgar, 1994)) o el mRNA provinent del cDNA d'un gen clonat en un vector d'expressió, que conté els elements reguladors de la traducció propis del vector, i que en general fan que dit mRNA sigui molt estable i es tradueixi molt eficientment.

La CDC25A és freqüentment sobreexpressada en diversos càncers humans, però sovint hi ha una falta de correlació entre els nivells de mRNA i de proteïna (revisat per Boutros, 2007). Aquest fet suggereix que l'expressió de CDC25A deu estar desregulada en els diferents estadis que hi ha entre la transcripció i la traducció i recolza el nostre resultat segons el qual, quan s'expressa Snail les cèl·lules deixen de proliferar tot fent que disminueixi l'expressió de CDC25A a nivell de proteïna, però en canvi incrementi a nivell de mRNA.

Fins el moment no hi ha cap treball que defensi que l'expressió de CDC25A pugui ser regulada impedit l'export del mRNA al citosol, bloquejant d'aquesta manera la seva traducció. Diferents treballs apunten que String/CDC25A presenta nombrosos mecanismes que regulen la seva expressió i activitat. La degradació de la proteïna via proteosoma va ser el primer mecanisme descrit però posteriorment se n'han descrit d'altres, com els canvis de localització subcel·lular de la proteïna o la unió del mRNA de Twine/CDC25A als membres DAZ durant la gametogènesi. Un treball més recent defensa que durant el procés de

gastrulació de *Drosophila* existeix un mecanisme que actua en paral·lel a la degradació de la proteïna String, que estimula la degradació del mRNA per unió de la proteïna How al 3'UTR de dita fosfatasa (Nabel-Rosen et al. 2005)

Aquest treball completa una mica més el model segons el qual en certs estadis del desenvolupament embrionari o de la progressió tumoral les cèl·lules que necessiten adquirir moviment i invadir nous teixits expressen Snail, que a més a més d'induir els canvis fenotípics necessaris, confereix resistència a la mort cel·lular i atura el procés de proliferació. Aquests canvis confereixen a les cèl·lules una ventatge selectiva i una habilitat per viatjar fins a establir-se en un nou territori. El nostre model de treball defensa que dites cèl·lules aturen la proliferació gràcies a que Snail reté el mRNA de la CDC25A al nucli, provocant un bloqueig de la traducció de dita fosfatasa, una de les principals promotores del cicle cel·lular. Alhora creiem que Snail participa en activar la transcripció de la CDC25A, per tal que quan les cèl·lules necessitin activar de el cicle cel·lular al colonitzar un nou territori, ho puguin fer ràpidament.

CONCLUSIONS

1. Les cèl·lules epitelials HT-29 M6, MDCK i SW480 que han patit una EMT rera l'expressió de Snail, presenten índexs de proliferació més baixos.
2. Tant les cèl·lules MDCK i HT-29 M6 transfectades establement amb Snail presenten un retard en l'entrada a la fase S del cicle cel·lular.
3. Les cèl·lules HT-29 M6 presenten una predisposició a desunir-se de la placa de cultiu quan expressen Snail exogen. Les cèl·lules no adherides són viables i tenen la capacitat d'adherir-se de nou al substrat. Dita població cel·lular expressa menys E-cadherina que la població adherida, que es correlaciona amb nivells més alts de Snail. Les cèl·lules no adherides presenten una proporció elevada de cèl·lules en les fases S i G2/M del cicle cel·lular.
4. Les cèl·lules RWP1 que expressen GFP-Snail, incorporen quantitats inferiors de BrdU indicatiu d'un retard en l'entrada a la fase S. Els mutant GFP-SNA-Ct i GFP-SNA-Nt es comporten com la GFP control indicatiu que Snail, per aturar el cicle cel·lular, necessita d'elements presents en el domini regulador i en el domini d'unió al DNA. El mutant GFP-SNA- Δ N24, mancat del motiu SNAG, té el mateix efecte que GFP-Snail, indicatiu que per el bloqueig de l'entrada a la fase S és independent de l'activitat repressora transcripcional de Snail.
5. En cultiu assincrònic, les cèl·lules que expressen Snail presenten menys activitat CDK1.
6. Les cèl·lules HT-29 M6 i MDCK que expressen Snail presenten nivells més baixos de la proteïna CDC25A. Dita davallada s'observa tant en un cultiu en creixement assincrònic com en la població de cèl·lules en G0/G1 obtinguda al deplecionar el medi de sèrum o rera el fraccionament pel *Cell Sorting*.
7. En les línies HT-29 M6 i MDCK, la CDC25A no presenta una taxa de degradació més elevada, ni és més inestable en presència de Snail.

8. En cèl·lules MDCK els nivells de CDC25A exògena baixen quan es cotransfecta Snail. Els mutants de localització majoritàriament nuclear, SNA-SA i SNA-LA tenen un efecte major, mentre que el mutant majoritàriament citosòlic, SNA- Δ C28 no té efecte. Aquests resultats indiquen que la davallada en els nivells de CDC25A causada per Snail requereix de la seva localització nuclear. El mutant SNA-P2A, mancat d'activitat repressora de la transcripció, es comporta com Snail sencer indicatiu que la davallada en els nivells de CDC25A causada per Snail és independent de l'activitat repressora de la transcripció.
9. En diferents línies analitzades no hi ha correlació entre els nivells de mRNA de Tribbles2 i l'expressió de Snail. L'expressió de Tribbles2 en les MDCK, no afecta la taxa de proliferació cel·lular ni l'expressió de CDC25A ni la coexpressió de Tribbles2 i Snail fa més acusats els efectes de Snail sobre proliferació i nivells de CDC25A en aquesta línia cel·lular.
10. Els nivells de mRNA de la CDC25A són més alts en les línies HT-29 M6 i MDCK que expressen establement Snail. Aquest efecte no es detecta a l'analitzar la forma exògena.
11. En la línia MDCK la proteïna sencera CDC25A₁₋₁₅₇₅ i la forma truncada CDC25A₁₋₅₆₂ fusionades a GFP s'expressen menys quan són cotransfectades amb Snail. La forma truncada CDC25A₅₄₂₋₁₅₇₅ en canvi, no modifica la seva expressió. Aquests resultats indiquen que la regió de CDC25A responsable que en presència de Snail baixin els nivells de proteïna es localitza en els primers 562 nts de la regió codificant i és independent de la degradació via proteosoma ja que al bloquejar dit procés s'obtenen els mateixos resultats. Els nivells de mRNA de cap isoforma incrementa quan es coexpressen amb Snail.
12. En les cèl·lules MDCK on l'expressió de Snail fa disminuir l'expressió de CDC25A, pugen els nivells de mRNA_{nuclear} i baixen els nivells de mRNA_{citosòlic} de la fosfatasa. Aquests resultats suggereixen que Snail reté el mRNA de CDC25A al nucli impedit que pugui ser exportat i traduït.

MATERIALS I MÈTODES

1. CULTIU CEL·LULAR

Totes les línies cel·lulars utilitzades van ser mantingudes en medi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Life technologies), suplementat amb 4.5g/l glucosa, 2mM glutamina, 56u/ml penicil·lina 56µg/l estreptomina i 10% FBS (Fetal Bovine Serum). Es van mantenir a 37°C en una atmosfera humida amb 5% CO₂.

Línies cel·lulars utilitzades:

HT-29 M6: Línia cel·lular derivada de cèl·lules d'adenocarcinoma de còlon humà, resistents a tractaments perllongats de 10⁻⁶M de metotrexà. Presenten un fenotip diferenciat mucosecretor, polarització i presència de contactes d'adhesió (Lessuffleur et al., 1990).

MDCK: La línia cel·lular Madin-Darby Canine Kidney, deriva d'epiteli tubular renal de gos sà, immortalitzat rera l'exposició a carcinògens (Rindles MJ, 1979).

SW480: Línia cel·lular derivada de cèl·lules d'adenocarcinoma de còlon humà.

RWP1: Línia cel·lular derivada de carcinoma ductal de pàncrees humà.

NIH-3T3: Línia cel·lular originalment establerta a partir d'un cultiu primari de fibroblasts embrionaris de ratolí.

Les línies cel·lulars estables utilitzades:

Clons estables per Snail:

HT-29 M6 SNA: Els clons SNA1 i SNA2 corresponen a dos clons obtinguts a partir de la transfecció estable d'un vector d'expressió regulat per tetraciclina (tetoff) que té clonat el cDNA del Snail de ratolí (mmSnail) etiquetat amb hemaglutinina (HA). El promotor induïble deixa de ser funcional a l'afegir doxíciclina (2µg/ml) al medi de cultiu. (Batlle et al., 2000). 500µg/ml de G418 (neomicina, GIBCO) i 200µg/ml de Higromicina (*invitrogen*) permeten conservar l'expressió de Snail en dites cèl·lules.

MDCK SNA: Els clons SNA1 i SNA2 corresponen a dos clons obtinguts a partir de la transfecció estable amb el constructe pIRES-neo mmSnail-HA (Batlle et al., 2000). 500µg/ml de G418 (neomicina, GIBCO) permeten conservar l'expressió de Snail en dites cèl·lules.

SW480 SNA: El cló SNA correspon a un cló obtingut a partir de la transfecció estable amb un vector retroviral del gen mmSnail sota promotor constitutiu.

Clons estables per Tribbles i Snail:

Les línies cel·lulars estables es van generar a partir de les línies estables MDCKsna abans esmentades. Les MDCKcontrol (contenen el vector buit pIRES-neo) i les MDCKSNA1 (contenen pIRES-neo mmSnail-HA) van ser transfectades de manera estable amb el plàmid PREP4o pREP4-TRB2 amb el kit *Lipofectamine-Plus Reagent (Invitrogen)* seguint les instruccions de la casa comercial. Rera 48h de transfecció vam resembrar les cèl·lules en medi DMEM-10%FBS, amb 500µg/ml G418 (Neomicina, *GIBCO*) per mantenir l'expressió de Snail i 400µg/ml Hygromicina (*Invitrogen*) per seleccionar els clons que expressaven TRB2. Es van aïllar les colònies en condicions estèrils.

2. CORBES DE CREIXEMENT

Línia MDCK: Sembra de 2×10^4 cèl·lules en 5 plaques de 57 cm². Tripsinització i comptatge de cèl·lules els dies 2, 3 i 4. 2 rèpliques de cada comptatge.

Línia HT-29 M6: Sembra de 10^5 cèl·lules en 3 pous de 9,4 cm² (tripsinització i comptatge del nombre de cèl·lules els dies 2, 3 i 4) i en 2 plaques de 57 cm² (tripsinització i comptatge del nombre de cèl·lules el dia 7). 2 rèpliques de cada comptatge.

Línia SW480. Sembra de 2×10^4 cèl·lules en 3 pous de 9,4 cm² (tripsinització i comptatge del nombre de cèl·lules els dies 4, 5 i 6) i en 2 plaques de 20 cm² (tripsinització i comptatge del nombre de cèl·lules els dies 7 i 10). 2 rèpliques de cada comptatge.

Cultiu cel·lular en matriu de col·lagen

Es van resuspendre les cèl·lules HT-29 M6 en DMEM2X (DMEM10X (Sigma D-2429) ; 2mM Piruvat sòdic; 20%FBS; 4mM L-glutamina ; 200u/ml Penicilina; 0,2mg/ml estreptomina ; 7400mg/l Bicarbonat sòdic) a concentració de 4×10^6 cèl·lules/ml. Es van mesclar amb una solució de collagen tipus-I (*Becton Dickinson*), quedant a una concentració final de $1,2 \times 10^6$ cèl·lules/ml i 2mg collagen tipus-I/ml. 60 µl de la preparació fou sembrada en plaques de 24 pous i incubada 45' a 37°C. Rera la polimerització de la matriu es va completar el cultiu amb medi DMEM 10% FBS complert (500µl per pou).El dia 9 i el dia 15 es van comptar les cèl·lules. Va caldre incubar el cultiu en 0,2mg/ml collagenasa tipus-II(*GIBCO*) amb PBS, 20' a 37°C. Rera un rentat amb PBS, es van tripsinitzar les cèl·lules. Hi havia 3 rèpliques de mostra.

3. CITOMETRIA DE FLUXE

Rera la tripsinització, les cèl·lules van ser fixades amb 70% etanol O/N a 4°C. Rera 2 rentats amb PBS, les cèl·lules van ser tractades amb 300µg/ml RNasa A (*Sigma R-5503*), 15µg/ml de iodur de Propidi (*Sigma*) i 1,14mM de citrat sòdic, durant 30' a 37°C. Posteriorment va

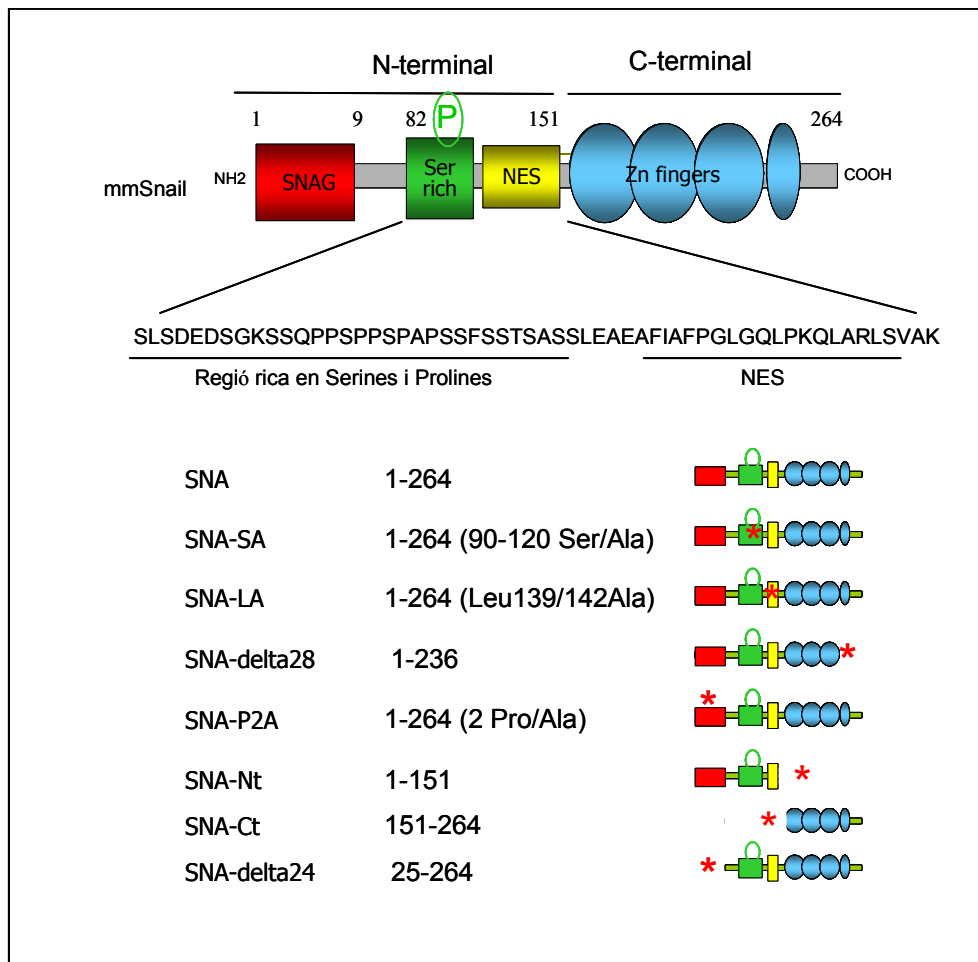
ser analitzat el contingut de DNA. La fluorescència del iodur de propidi fou analitzada amb el *FACScalibur flow cytometria (BD)*. Almenys 10000 cèl·lules foren analitzades amb el programa *CellQuest (BD)*. La distribució del cycle cel·lular fou calculat amb el programa *ModFit LT*.

Cell Sorting

Per separar les poblacions de cèl·lules en diferents etapes del cycle cel·lular, vam tenyir els nuclis de les cèl·lules de cultiu amb 5µg/ml Hoechst (*Invitrogen, 33342*) 30' a 37°C. Vam tripsinitzar les cèl·lules i vam analitzar-les pel *Cell Sorter, FACSvantageSE (Becton Dickinson)*. Vam separar la fracció cel·lular en fase G1 de la resta i en vam fer extractes de proteïna total i la posterior detecció de CDC25A seguint el protocol habitual.

4. CONSTRUCCIONS

SNAIL: El gen snail de ratolí (*mmSnail*) va ser amplificat per RT-PCR amb oligonucleòtids específics i clonat tal i com es descriu en *Batlle et al., 2000*. **GFP-SNA** va generar-se subclonant el *mmSnail* del constructe original al vector *pEGFP-C1 (Clontech)* tal com es descriu en la tesi de *Domínguez, 2003*. Els mutants de SNA clonats en el *pcDNA3* i en el *pEGFP* es van obtenir tal i com es descriu en *Domínguez et al., 2003* i *Montserrat, 2006*.



CDC25A: La seqüència nucleotídica de la regió codificant del gen humà de la Cdc25A va ser cedida pel Dr. Gabriel Gil. Vam seqüenciar els extrems 5' i 3' del gen per determinar les dianes de restricció i poder-lo clonar després en un vector conegut, el pcDNA3. L'extrem 5' el vam seqüenciar amb un primer T7 present en el vector original i la regió 3' amb un oligonucleòtid intern de la Cdc25A, el Cdc25A-S-1205 (seqüència descrita en l'apartat de PCR). Vam subclonar el gen de la Cdc25A en el pcDNA3, digerint el constructe original i el vector destí amb BamHI i XhoI.

GFP-CDC25A: hCdc25A1-1575, hCdc25A1-562 i hCdc25A542-1575 van ser amplificats del pcDNA3-Cdc25A per PCR mitjançant oligonucleòtids específics de les regions codificants 3' i 5' corresponents. Els oligonucleòtids utilitzats en cada cas van ser: CDC25A-S-1 i CDC25A-AS-1555 per amplificar la hCdc25A1-1575; CDC25A-S-1 i CDC25A-AS-562 per amplificar la hCdc25A1-562; CDC25A-S-542 i CDC25A-AS-1555 per amplificar la hCdc25A542-1575. Cada oligonucleòtid presentava dianes per enzims de restricció per tal de poder-los clonar en el pEGFPC1. (les seqüències de cada oligonucleòtid i les condicions d'amplificació estan descrites en l'apartat de PCR)

TRIBBLES: hTribbles2 (TRB2) va ser amplificat per RT-PCR mitjançant oligonucleòtids específics per a les zones 3' i 5' a partir de les seqüències exposades al GenBank (gi:1507671). **pcDNA3-TRB-HA:** TRB2 va ser clonat en el pcDNA3 utilitzant les dianes presents en els oligonucleòtids utilitzats per amplificar-lo. El codó Stop va ser eliminat per tal que la proteïna s'expressés fusionada a l'etiqueta HA clonada en el pcDNA3 destí. BamHI i EcoRV van ser les dianes digerides tant en l'incert com en el vector d'expressió a l'hora de fer el clonatge. **GFPC1-TRB-HA:** Es van digerir 3µg de pcDNA3-TRB-HA amb BamHI i XhoI i 1µg de pEGFPC1 amb Sall i BglII. Es va purificar el fragment de Tribbles-HA en un gel d'agarosa i es va lligar al vector digerit i defosforilat. **PREP4-TRB-HA:** Es van digerir 5µg de pcDNA3-TRB-HA i 2µg de PREP4 amb HindIII i NotI. Es va purificar el fragment de Tribbles-HA en un gel d'agarosa i es va lligar al vector digerit i defosforilat.

5. TRANSFECCIONS TRANSITÒRIES

Els vectors d'expressió pEGFP o pcDNA3 on havíem subclonat Tribbles, Snail i els diversos mutants o Cdc25A, foren transfectats en les diverses línies cel·lulars utilitzant el sistema de *Lipofectamina-Plus Reagent (Invitrogen)* en medi OptiMEM (*Invitrogen*) segons el protocol de la casa comercial. La mescla de transfecció es deixava durant 4h (en MDCK i en RWP1) i era substituïda per DMEM-10%FBS. Segons l'assaig, es deixaven expressar les proteïnes de 24 a 48h. Les quantitats de DNA i reactius utilitzats eren variables i depenents del nombre de cèl·lules transfectades i de la superfície utilitzada i seguia les instruccions del fabricant. En el cas dels estudis de localització de les proteïnes fusionades a GFP, les cèl·lules havien estat sembrades sobre cobreobjectes de vidre de 20x20mm en pous de

9,4cm². Rera la transfecció, eren fixades amb 4%paraformaldehid durant 12' i es muntaven amb Mowiol sobre portaobjectes.

6. MARCATGES AMB BrdU

Per analitzar per microscopia de fluorescència: 1 o més hores (depenent de l'assaig) abans de fixar les cèl·lules RWP1 transfectades transitòriament amb els constructes GFP-SNA es va afegir 1uM bromodeoxyuridine (BrdU) (*Sigma*) al medi de cultiu DMEM-10%FBS. Les cèl·lules es van rentar amb PBS, fixar amb 4% paraformaldehyde (PFA) durant 15' per tal de fixar la GFP i permeabilitzar amb 70% Etanol O/N. Es va desnaturalitzar el DNA amb 2M HCl-0,5%BSA (bovine serum albumin) durant 15' es van fer 4 rentats amb 0,5%BSA-PBS-T(PBS-0,5% Tween20). Les cèl·lules es van incubar amb anticòs anti-BrdU (dilució 1:2000 en 0,5%BSA-PBS-T; *BD-555627*) 1h a *RT*. Rera 3 rentats amb 0,5%BSA-PBS-T, les cèl·lules foren incubades amb anticòs secundari anti-Ig mouse-Rhodamine (dilució 1:100 en 0,5%BSA-PBS-T; *PIERCE-31660*) durant 45' a *RT*. Les cèl·lules es van rentar 3 cops amb 0,5%BSA-PBS-T i es van tenyir amb Hoechst (dilució 1:1000; *Sigma*) durant 5'. Rera un rentat amb PBS, es van muntar les mostres amb Mowiol i es van analitzar amb un microscopi de fluorescència. El percentatge de cèl·lules amb nuclis BrdU-positius fou determinat a partir de 200 cèl·lules transfectades per experiment.

Per analitzar per citometria de flux: 60' o 90' (en funció de l'experiment) abans de fixar les mostres amb 70%Etanol per tal de poder-les analitzar per citometria de flux, afegiem BrdU al medi de cultiu a una concentració final de 1uM . El procés de desnaturalització del DNA i de marcatge de la BrdU va ser exactament igual que l'utilitzat per marcar cèl·lules fixades sobre cobreobjectes. En aquest cas però vam utilitzar un anticòs secundari anti-Ig mouse-FITC (dilució 1:200 en 0,5%BSA-PBS-T; *Dako F0479*) durant 45' a *RT*. I els nuclis es van tenyir amb iodur de propidi i les cèl·lules van ser analitzades per citometria de flux, segons protocol habitual.

7. IMMUNOFLUORESCÈNCIA

MPM-2: Permeabilització amb 0,2% Tritò 5' a *RT*. Bloqueig amb 1%BSA-10%HS(Horse Serum)-TBS 1h a *RT*. 3 rentats amb TBS. Incubació amb un anticòs monoclonal de ratolí anti-MPM2 (dilució 1:100 en 1%BSA-TBS; *DAKO M3514*) 1 hora a *RT*. 3 rentats amb TBS. més, Incubació amb anticòs secundari anti-Ig mouse-FITC (dilució 1:100 en 1%BSA-TBS; *DAKO*) 45' a *RT*. 1 rentat amb PBS. Marcatge dels nuclis amb iodur de propidi (segons el protocol descrit en l'apartat de citometria de flux). Les mostres analitzades per microscopia

de fluorescència es van muntar sobre portaobjectes amb Mowiol. Les mostres analitzades per citometria de flux, van ser fixades prèviament amb 70% etanol O/N.

HA: Per detectar el TRB-HA transfectat transitòriament a les RWP1, es van fixar les cèl·lules amb 4%PFA durant 12' a RT. Després de 3 rentats amb TBS, es van permeabilitzar les cèl·lules amb 0,2% Tritò 5' a RT, es van bloquejar les cèl·lules amb 1%BSA-10%HS-TBS 1h a RT. Rera 3 rentats TBS, es van incubar amb anticòs monoclonal de ratolí anti-HA (dilució 1:20 en 1%BSA-TBS; *Sigma H9628*) 1 hora a RT. Rera 3 rentats més, les cèl·lules foren incubades amb anticòs secundari anti-Ig mouse-FITC (dilució 1:100 en 1%BSA-TBS; *DAKO*) durant 45' a RT. Rera 1 rentat amb PBS, es van marcar els nuclis amb 1µM To Pro-3 (*Invitrogen*) 10' a RT. Les mostres analitzades per microscopia de fluorescència es van muntar sobre portaobjectes amb Mowiol.

Annexina: Rera la fixació de les cèl·lules amb 4%PFA durant 12' a RT i 3 rentats amb TBS, es van permeabilitzar les cèl·lules amb metanol 5' en gel, es van bloquejar les cèl·lules amb 2%BSA 30' a RT. Rera 3 rentats TBS, es van incubar amb anticòs monoclonal de ratolí anti-annexina (dilució 1:1000 en 1%BSA-TBS) 1 hora a RT. Rera 3 rentats més, les cèl·lules foren incubades amb anticòs secundari anti-Ig mouse-FITC (dilució 1:100 en 1%BSA-TBS; *DAKO*) durant 30' a RT. Rera 1 rentat amb TBS, es van marcar els nuclis amb iodur de propidi segons el protocol descrit en l'apartat de citometria de flux. Les mostres analitzades per microscopia de fluorescència es van muntar sobre portaobjectes amb Mowiol

ZO-1: Rera la fixació de les cèl·lules amb 4%PFA durant 12' a RT i després de 3 rentats amb TBS, es van permeabilitzar les cèl·lules amb 0,2% Tritò 10' a RT i es van bloquejar les amb 0,5%BSA-0,5%Tween-PBS 20' a RT. Rera 3 rentats TBS, es van incubar amb anticòs policlonal de conill anti-ZO-1 (dilució 1:50 en 0,5%BSA-PBS) 2h a RT. Rera 3 rentats més, les cèl·lules foren incubades amb anticòs secundari anti-Ig rabbit-FITC (dilució 1:100 en 0,5%BSA-PBS; *DAKO*) durant 1h a RT. Rera 1 rentat amb TBS, es van marcar els nuclis amb iodur de propidi segons el protocol descrit en l'apartat de citometria de flux. Les mostres analitzades per microscopia de fluorescència es van muntar sobre portaobjectes amb Mowiol

8. EXTRACTES PROTEICS

Extractes de proteïnes totals: Es van fer els extractes a partir de aproximadament $5 \cdot 10^6$ cèl·lules. El pellet cel·lular rentat amb PBS fou lisat amb tampò de lisi (25mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 1% SDS, 1µg/ml Leupeptina, 1µg/ml Pepstatina, 10µg/ml aprotinina; 2mM Pefablock) durant 15' en gel. Es va sotmetre l'extracte a l'agulla d'insulina i a 100°C durant 5 minuts, per tal de trencar el DNA, i es va quantificar la concentració proteica per Lowry (*Bio-Rad*), seguint el protocol recomenat. Es van preparar

aliquotes de 40-100µg de proteïna (en funció de les proteïnes que volíem detectar) i tampò de càrrega (10% Glicerol , 2%SDS, 0,6M Tris-HCl pH6.8, 0,02% bromofenol , 5% beta-mercaptoetanol) en un volum de 40µl finals.

9. ANÀLISI DE PROTEÍNES PER ELECTROFORESI DESNATURALITZANT DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) I WESTERN BLOT

L'electroforesi de proteïnes es va realitzar en minigels de poliacrilamida del 10-15% segons el pes de la proteïna a estudiar en condicions desnaturalitzants. Les mostres s'havien bullit prèviament en tampò de càrrega i els gels es van resoldre en un tampò balancejat de Tris i Glicina, seguint el protocol clàssic. Les proteïnes del gel de poliacrilamida, van ser transferides a una membrana de nitrocel·lulosa de 0,45 µm de porus, mitjançant transferència en tampò de transferència ràpida (2,6g/l Tris-Base, 14,3g/l glicina, 0,05% SDS, 20% metanol) , 1h a 400mA. El protocol bàsic de la immunodetecció va ser: **Bloqueig** amb 5%llet-TBS-T (TBS-0,1%Tween20) 1h a temperatura ambient (RT: Room Temperature) amb agitació. Incubació amb l'**anticòs primari** en solució, temps i temperatura característica de cada anticòs. 3 rentats de 5' amb solució de bloqueig, amb agitació a RT. Incubació amb l'**anticòs secundari** conjugat amb HRP (peroxidasa de rave) en solució, temps i temperatura característica de cada anticòs. 3 rentats de 5' amb TBS-T amb agitació a RT. **Revelat** de la reacció amb un substrat específic per l'HRP, quimioluminiscent (*Enhanced ChemiLuminiscence (ECL), Amersham-Pharmacia*) durant un minut. Exposició de la membrana a pel·lícules autoradiogràfiques Agfa-Curix durant diferents temps.

Per analitzar les **isoformes inactives de les cdk1 i cdk2**, es va fer un gel del 15% de poliacrilamida, i es va incubar la mateixa membrana amb l'anticòs policlonal de conill anti-y15-P-cdk1/2 (dilució 1:1000; 5%BSA-TBS-T; O/N 4°C; de *Cell Signaling*); l'anticòs policlonal de conill anti-Cdk2 (dilució 1:1000; 1%BSA-TBS-T; 1h a RT; *sc-163 Santa Cruz*); l'anticòs monoclonal de ratolí anti-Cdk1 (dilució 1:1000; 1%BSA-TBS-T; 1h a RT; *554161 BD*). Els anticòs secundaris respectius foren: anti-rabbit Ig-HRP (dilució 1:2000; 5%llet-TBS-T; 1h a RT; *P 0448 DAKO*) i anti-mouse Ig-HRP (dilució 1:2000; 5%llet-TBS-T; 1h a RT; *P 0260 DAKO*). Per detectar **Snail-HA i Tribbles-HA** es va utilitzar l'anticòs monoclonal de rata anti-HA (dilució 1:2000; 5%llet-TBS-T; 1h a RT; *Roche*) i l'anticòs secundari anti-rat Ig-HRP (dilució 1:1500; 5%llet-TBS-T; 1h a RT; *P 0450 DAKO*). Per detectar les diferents isoformes derivades de modificacions posttraduccional, fèiem gels del 15% de poliacrilamida. Per detectar el **mmSnail** endogen en les 3T3, vam utilitzar un anticòs monoclonal de ratolí (dilució 1:15; 3%BSA TBS-T; O/N 4°C) i l'anticòs secundari anti-mouse Ig-HRP (dilució 1:2000; 5%llet-TBS-T; 1h a RT; *P 0260 DAKO*). Per **normalitzar** els extractes es van utilitzar: l'anticòs policlonal de conill anti-actina (dilució 1:2000; 5%llet-TBS-T; 1h a RT; *Boehringer*) i anticòs secundari anti-rabbit Ig-HRP; l'anticòs policlonal de cabra anti-piruvat-

quinasa (dilució 1:3000; 1%BSA-TBS-T; 1h a RT) i l'anticòs secundari anti-goat Ig-HRP (dilució 1:10000; 5%llet-TBS-T; 1h a RT; *DAKO*). La **tubulina** es va detectar amb un anticòs monoclonal de ratolí, anti-alpha-tubulina (dilució 1:1000; 1%BSA-TBS-T; 1h a RT, *Sigma*) i un secundari anti-mouse Ig-HRP. La **procaspasa 3** es va detectar amb l'anticòs policlonal de conill anti-procaspasa 3 (dilució 1:1000; 3%BSA-TBS-T; 1h a RT) i l'anticòs secundari anti-rabbit Ig-HRP. L' **E-cadherina** es va detectar amb un anticòs monoclonal de ratolí (dilució 1:2500; 1%BSA-TBS-T; 1h a RT) i un secundari anti-mouse Ig-HRP. Per detectar la **Cdc25A** es va utilitzar l'anticòs monoclonal de ratolí anti-Cdc25A (dilució 1:250; 5%llet-TBS-T; 1h a RT; *sc-7389 Santa Cruz*) i l'anticòs secundari anti-mouse Ig-HRP. La **GFP** es va detectar amb un anticòs policlonal de conill, (dilució 1:5000; 1%BSA-TBS-T; 1h a RT; *AbCam*) i un secundari anti-rabbit Ig-HRP.

10. ASSAIG D'ESTABILITAT

Per fer un seguiment de l'estabilitat de CDC25A, vam afegir cicloheximida (*Sigma*) al medi a una concentració final de 20µg/ml i la vam deixar actuar diferents temps. A mesura que arribavem al minut indicat, anàvem lisant les cèl·lules directament sobre la placa de cultiu amb el tampó d'extracció de proteïnes i seguïem el protocol habitual.

Per fer un seguiment de la degradació de CDC25A, vam afegir MG132 (*Sigma*) al medi de cultiu a una concentració final de 50µM. Passades 5h, lisàvem les cèl·lules directament sobre la placa de cultiu amb el tampó d'extracció de proteïnes i seguïem el protocol habitual.

11. IMMUNOPRECIPITACIÓ I ASSAIG QUINASA

Es van resuspendre els pellets cel·lulars (10^6 cèl·lules aproximadament) prèviament congelats a -80°C , amb 200 µl de tampó de lisis (50mM Tris-HCl pH7,5; 150µM NaCl; 20mM EDTA; 0,5% NP40; 1mM DTT; 2µg/ml Aprotinin; 2µg/ml Leupeptina; 2µg/ml Antipaina; 1mM NaF; 1mM glicerolfosfat; 1mM pirofosfat sòdic; 0,2mM ortovanadat sòdic), 20' en gel. Es van centrifugar els extractes a 14000rpm , 20 minuts a 4°C es van quantificar els µg de proteïna del sobrenedant de cada mostra per Lowry. 300 µg d'extracte es van mesclar amb 0,2 µg d'anticòs monoclonal de ratolí anti-Cdk1 (A17) o policlonal de conill anti-Cdk2 (M2) i 20µl de proteïna G-Agarosa (*Roche*) o proteïna A-Agarosa (*Boehringer*) equilibrada amb tampó de lisis. La mescla es va deixar rotant 3h a 4°C . Rera 3 rentats amb tampó de lisis , els immunoprecipitats es van rentar amb tampó quinasa (50mM Tris-HCl pH7,5; 10mM MgCl_2 ; 1mM DTT) i posteriorment es van incubar a 30°C 30' amb 20µl de tampó quinasa amb 20uM ATP, 10uCi [γ - ^{32}P -ATP), 2µg histona H1 (H1). Es van afegir 7,5 µl de 5X tampó de càrrega, es van bullir les mostres 5 minuts i es van carregar en un gel del 12% SDS-poliacrilamida. Rera l'electroforesi el gel es va tenyir amb Coomassie, es va destenyir amb solució fixadora (10% acètic, 30% metanol) per tal de visualitzar la H1

(27KDa). Es va assecat el gel i es va exposar a films autoradiogràfics (Agfa-Curix) entre 12h i 24h a -80°C .

12. ASSAIGS DE *Pull Down*

Per tal d'avaluar la possible interacció entre Tribbles i Snail, vam transfectar cèl·lules RWP1 crescudes en plaques de 57cm^2 amb $4\mu\text{g}$ de pcDNA3/pcDNA3-TRB-HA segons el protocol habitual. Rera 40h d'expressió, vam lisar les cèl·lules amb $200\mu\text{l}$ /placa de tampó no desnaturalitzant (50mM Tris-HCl pH7.4; 150mM NaCl; 1mM DTT; 1mM EGTA; 1mM MgCl_2 ; 0,5% NP-40; $1\mu\text{g/ml}$ Leupeptina, $1\mu\text{g/ml}$ Pepstatina, 2mM Pefablock). Vam deixar el lisat en agitació durant 30' a 4°C , vam centrifugar-lo 10' a 16000g i vam recollir el sobrenedant. El lisat fou preacclarit amb $40\mu\text{l}$ efectius de resina glutatió-sefarosa (GS4B, Amersham) durant 3h a 4°C en agitació i el sobrenedant es va utilitzar per a l'experiment. $50\mu\text{l}$ de lisat van ser incubats amb $2\mu\text{g}$ de proteïna de fusió SNA-GST, completant la reacció amb tampó de lisi fins a un volum de $200\mu\text{l}$. Després de deixar-ho en agitació O/N a 4°C , vam afegir $20\mu\text{l}$ efectius de resina GS4B equilibrada amb el tampó de lisi i vam deixar incubar la reacció 30' més a temperatura ambient. Vam centrifugar la reacció a 16000g i vam descartar els sobrenedants. La resina resultant del *Pull Down* fou rentada 3 cops en tampó de lisi, bullida amb tampó de càrrega i resolta per SDS-PAGE en gels del 12%, per després fer els *Westerns Blot* corresponents.

13. AMPLIFICACIÓ DE mRNA PER RT-PCR

Aïllament de RNAtotal de cèl·lules en cultiu

L'aïllament del RNAtotal de les diferents línies cel·lulars es va fer seguint el protocol estàndar del kit *Gen Elute Mammalian Total RNA Miniprep kit*. Sigma, a partir de cèl·lules crescudes en medi complert. La concentració del RNAtotal es va determinar mesurant la densitat òptica a 260nm i es va comprovar la seva integritat tot visualitzant l'estat dels mRNAs ribosomals (18S i 28S) separats per electroforesi en un gel d'agarosa del 1,5%.

Aïllament de RNAtotal i fraccionat de cèl·lules en cultiu

PARISTM (de *Protein And RNA Isolation System*) és un sistema ràpid, per aïllar a petita escala, RNA i proteïna directament de cultius cel·lulars. Dit sistema ofereix la possibilitat de dividir el contingut cel·lular en fraccions citoplasmàtiques i en fraccions nuclears. La concentració del RNAtotal es va determinar mesurant la densitat òptica a 260nm i es va comprovar la seva integritat tot visualitzant l'estat dels mRNAs ribosomals (18S i 28S) separats per electroforesi en un gel d'agarosa del 1,5%. Vam analitzar l'expressió de CDC25A en els clons estables MDCK.

RT-PCR semiquantitativa

Els RNAs van ser "transcrits reversament" i amplificats amb el kit *One-Step RT-PCR System*, (*Invitrogen*) segons el protocol de la casa comercial.

hTribbles: La seqüència codificant de hTribbles2 va ser amplificada a partir de 500ng de RNAtotal aïllat de les HT-29 M6 amb el kit *GenElute mammalian RNA total* (*Sigma*).

Els oligonucleòtids emprats foren:

S-TribblesH	5'-GGCGGATCCACCATGAACATACACAGGTCT-3'
AS-TribblesH	5'-AGTTAAAGAAAGGGTCCAAGTTCTTCCAT-3'

Les condicions de RT-PCR foren:

Extensió RT	1 cicle	50°C	30'
Hot start	1 cicle	94°C	2'
Deshibridació	38 cicles	94°C	15''
Anellament	38 cicles	55°C	30''
Extensió polimerasa	38 cicles	72°C	90''
Extensió final	1 cicle	72°C	7'

Per analitzar els nivells de mRNATribbles2 de les diferents línies cel·lulars es va seguir exactament el mateix protocol.

HPRT: Per normalitzar les mostres es van determinar els nivells constants del producte gènic *hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase* de 300ng de RNAtotal aïllat de les diferents línies cel·lulars amb el kit *GenElute mammalian RNA total* (*Sigma*).

Els oligonucleòtids emprats foren:

HPRT-Forward	5'-GGCCAGACTTTGTTGGATTTG-3'
HPRT-Reverse	5'-TGCGCTCATCTTAGGCTTTGT-3'

Les condicions de RT-PCR foren:

Extensió RT	1 cicle	50°C	30'
Hot start	1 cicle	94°C	2'
Deshibridació	30 cicles	94°C	30''
Anellament	30 cicles	57°C	30''
Extensió polimerasa	30 cicles	72°C	30''
Extensió final	1 cicle	72°C	7'

SNA: Per analitzar els nivells de mRNA de mmSnail, es va fer RT-PCR de 500ng de RNAtotal aïllat de les diferents línies cel·lulars amb el kit *GenElute mammalian RNA total* (Sigma).

Els oligonucleòtids emprats foren:

mmSNA-S	5'-GGCGGATCCACCATGCCGCGCTCCTTCCT-3'
mmSNA-AS	5'-CAAGATATCCGCCTCCGGAGCA-3'

Les condicions de RT-PCR foren:

Extensió RT	1 cicle	50°C	30'
Hot start	1 cicle	94°C	2'
Deshibridació	35 cicles	94°C	15''
Anellament	35 cicles	60°C	30''
Extensió polimerasa	35 cicles	72°C	30''
Extensió final	1 cicle	72°C	7'

CDC25A:

Per analitzar els nivells de mRNA de CDC25A en la línia HT-29 M6 es va fer RT-PCR de 500ng de RNAtotal aïllat amb el kit *GenElute mammalian RNA total* (Sigma).

Els oligonucleòtids emprats foren:

CDC25A-S-1	5'-GGCGGATCCACCATGGAACTGGGCCCCGGAG -3'
CDC25A-AS-592	5'-CTGAAGAGGAGCCATTCTGATTCTTTGAC-3'

Les condicions de RT-PCR foren:

Extensió RT	1 cicle	50°C	30'
Hot start	1 cicle	94°C	2'
Deshibridació	40 cicles	94°C	15''
Anellament	40 cicles	55°C	30''
Extensió polimerasa	40 cicles	72°C	30''
Extensió final	1 cicle	72°C	7'

Per analitzar els nivells de mRNA de CDC25A en la línia MDCK es va fer RT-PCR de 500ng de RNAtotal aïllat amb el kit PARIS™ (). El mateix anàlisi fet amb RNA aïllat amb el kit *GenElute mammalian RNA total* (Sigma) donava resultats molt similars.

Els oligonucleòtids emprats foren:

CDC25A-S-490	5'-CACCAACCTGACCGTCA -3'
CDC25A-AS-1008	5'-GGTCCACGAAGCCATCAT-3'

Les condicions de RT-PCR foren:

Extensió RT	1 cicle	50°C	30'
Hot start	1 cicle	94°C	2'
Deshibridació	40 cicles	94°C	15''
Anellament	40 cicles	55°C	30''
Extensió polimerasa	40 cicles	72°C	30''
Extensió final	1 cicle	72°C	7'

Per analitzar els nivells de mRNA de GFP-hCDC25A 1-1575 i GFP-hCDC25A 1-562 en la línia MDCK es va fer RT-PCR de 500ng de RNAtotal aïllat amb el kit *GenElute mammalian RNA total (Sigma)*.

Els oligonucleòtids emprats foren:

CDC25A-S-1	5'-GGCGGATCCACCATGGAAGTGGGCCCGGAG -3'
CDC25A-AS-592	5'-CTGAAGAGGAGCCATTCTGATTCTCTTGAC-3'

Les condicions de RT-PCR foren:

Extensió RT	1 cicle	50°C	30'
Hot start	1 cicle	94°C	2'
Deshibridació	18 cicles	94°C	15''
Anellament	18 cicles	55°C	30''
Extensió polimerasa	18 cicles	72°C	30''
Extensió final	1 cicle	72°C	7'

Per analitzar els nivells de mRNA de GFP-hCDC25A 542-1575 en la línia MDCK es va fer RT-PCR de 500ng de RNAtotal aïllat amb el kit *GenElute mammalian RNA total (Sigma)*.

Els oligonucleòtids emprats foren:

CDC25A-S-1205	5'-GAGGAGTCTCCACCTGGAAGTACA-3'
CDC25A-AS-1555	5'- -3'

Les condicions de RT-PCR foren:

Extensió RT	1 cicle	50°C	30'
Hot start	1 cicle	94°C	2'
Deshibridació	18 cicles	94°C	15''
Anellament	18 cicles	55°C	30''
Extensió polimerasa	18 cicles	72°C	30''
Extensió final	1 cicle	72°C	7'

Per analitzar els nivells de mRNA nuclear i mRNA citosòlic de CDC25A en la línia MDCK es va fer RT-PCR de 500ng de RNA total aïllat amb el kit PARIS™ ().

Els oligonucleòtids emprats foren:

CDC25A-S-490	5'-CACCAACCTGACCGTCA -3'
CDC25A-AS-1008	5'-GGTCCACGAAGCCATCAT-3'

Les condicions de RT-PCR foren:

Extensió RT	1 cicle	50°C	30'
Hot start	1 cicle	94°C	2'
Deshibridació	40 cicles	94°C	15''
Anellament	40 cicles	55°C	30''
Extensió polimerasa	40 cicles	72°C	30''
Extensió final	1 cicle	72°C	7'

DAZL: Per analitzar els nivells de mRNA de DAZL en les diferents línies cel·lulars, es va fer RT-PCR de 500ng de RNA total aïllat amb el kit *GenElute mammalian RNA total (Sigma)*.

Els oligonucleòtids emprats foren:

DAZL-S-431	5'-GGAATTGATGTTAGGATGGATG-3'
DAZL-AS-586	5'-CTACTATCTTCTGCACATCCAC-3'

Reconeixen la seqüència humana i la canina.

Les condicions de RT-PCR foren:

Extensió RT	1 cicle	50°C	30'
Hot start	1 cicle	94°C	2'
Deshibridació	40 cicles	94°C	15''
Anellament	40 cicles	55°C	30''

Extensió polimerasa	40 cicles	72°C	30''
Extensió final	1 cicle	72°C	7'

RT-PCR quantitativa

Per analitzar els nivells de mRNA de CDC25A en les línies HT-29 M6 i MDCK transfectades establement amb mmSnail es va fer RT-PCR quantitativa de 250ng de RNA total aïllat amb el kit *GenElute mammalian RNA total (Sigma)*.

La determinació quantitativa dels nivells de RNA es va fer per triplicat utilitzant el kit *QuantiTect SYBR green reverse Transcription –PCR, (Qiagen)* segons el protocol de la casa comercial.

Els oligonucleòtids emprats foren:

CDC25A-S-1	5'-GGCGGATCCACCATGGAACTGGGCCCGGAG -3'
CDC25A-AS-592	5'-CTGAAGAGGAGCCATTCTGATTCTCTTGAC-3'

Condicions de RT-PCR segons protocol de la casa comercial. La temperatura d'anellament va ser de 55°C i es van fer 40 cicles.

Totes les quantificacions van ser normalitzades amb el control endogen HPRT (oligonucleòtids descrits en l'apartat de RT-PCR semiquantitativa).

BIBLIOGRAFIA

- Abbott, C., & Proud, C. (2004). Translation factors: in sickness and in health. *Trends Biochem Sci* 29, 25-31.
- Ashraf, S., & Ip, Y. (2001). The Snail protein family regulates neuroblast expression of inscuteable and string, genes involved in asymmetry and cell division in *Drosophila*. *Development* 128, 4757-4767.
- Auersperg, N., Pan, J., Grove, B., Peterson, T., Fisher, J., Maines-Bandiera, S., Somasiri, A., & Roskelley, C. (1999). E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6249-6254.
- Baldin, V., Cans, C., Knibiehler, M., & Ducommun, B. (1997). Phosphorylation of human CDC25B phosphatase by CDK1-cyclin A triggers its proteasome-dependent degradation. *J Biol Chem* 272, 32731-32734.
- Baldin, V., Cans, C., Superti-Furga, G., & Ducommun, B. (1997). Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control? *Oncogene* 14, 2485-2495.
- Ballester, A., Frampton, J., Vilaboa, N., & Calés, C. (2001). Heterologous expression of the transcriptional regulator escargot inhibits megakaryocytic endomitosis. *J Biol Chem* 276, 43413-43418.
- Barrallo-Gimeno, A., & Nieto, M. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151-3161.
- Barreau, C., Paillard, L., & Osborne, H. (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* 33, 7138-7150.
- Battle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., & García De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-89.
- Bernardi, R., Liebermann, D., & Hoffman, B. (2000). Cdc25A stability is controlled by the ubiquitin-proteasome pathway during cell cycle progression and terminal differentiation. *Oncogene* 19, 2447-2454.
- Bienz, M., & Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103, 311-320.
- Blanco, M., Peña-Melián, A., & Nieto, M. (2002). Expression of EphA receptors and ligands during chick cerebellar development. *Mech Dev* 114, 225-229.
- Blomberg, I., & Hoffmann, I. (1999). Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 19, 6183-6194.
- Bolós, V., Peinado, H., Pérez-Moreno, M., Fraga, M., Esteller, M., & Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 116, 499-511.
- Bonneton, C., Sibarita, J., & Thiery, J. (1999). Relationship between cell migration and cell cycle during the initiation of epithelial to fibroblastoid transition. *Cell Motil Cytoskeleton* 43, 288-295.
- Boutros, R., Dozier, C., & Ducommun, B. (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* 18, 185-191.
- Boutros, R., Lobjois, V., & Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* 7, 495-507.
- Bowers, A., Scully, S., & Boylan, J. (2003). SKIP3, a novel *Drosophila* tribbles ortholog, is overexpressed in human tumors and is regulated by hypoxia. *Oncogene* 22, 2823-2835.
- Brembeck, F., Schwarz-Romond, T., Bakkers, J., Wilhelm, S., Hammerschmidt, M., & Birchmeier, W. (2004). Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 18, 2225-2230.
- Burstyn-Cohen, T., & Kalcheim, C. (2002). Association between the cell cycle and neural crest delamination through specific regulation of G1/S transition. *Dev Cell* 3, 383-395.
- Busino, L., Chiesa, M., Draetta, G., & Donzelli, M. (2004). Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* 23, 2050-2056.
- Cai, Y., Chia, W., & Yang, X. (2001). A family of snail-related zinc finger proteins regulates two distinct and parallel mechanisms that mediate *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *EMBO J* 20, 1704-1714.
- Cano, A., Pérez-Moreno, M., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M., del Barrio, M., Portillo, F., & Nieto, M. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.

- Carver, E., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K., & Gridley, T. (2001). The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 21, 8184-8188.
- Chen, M., Ryan, C., & Piwnica-Worms, H. (2003). Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol* 23, 7488-7497.
- Cheung, M., Chaboissier, M., Mynett, A., Hirst, E., Schedl, A., & Briscoe, J. (2005). The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Dev Cell* 8, 179-192.
- Ciruna, B., & Rossant, J. (2001). FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell* 1, 37-49.
- Conacci-Sorrell, M., Simcha, I., Ben-Yedidia, T., Blechman, J., Savagner, P., & Ben-Ze'ev, A. (2003). Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 163, 847-857.
- Craig, A., & Hupp, T. (2004). The regulation of CHK2 in human cancer. *Oncogene* 23, 8411-8418.
- Dalal, S., Schweitzer, C., Gan, J., & DeCaprio, J. (1999). Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Mol Cell Biol* 19, 4465-4479.
- del Barrio, M., & Nieto, M. (2002). Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development* 129, 1583-1593.
- Domínguez, D., Montserrat-Sentís, B., Virgós-Soler, A., Guaita, S., Grueso, J., Porta, M., Puig, I., Baulida, J., Francí, C., & García de Herreros, A. (2003). Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 23, 5078-5089.
- Donzelli, M., & Draetta, G. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* 4, 671-677.
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R., & Montminy, M. (2003). TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 300, 1574-1577.
- Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouché, J., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., Monsarrat, B., Prigent, C., & Ducommun, B. (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci* 117, 2523-2531.
- Edgar, B., & O'Farrell, P. (1990). The three postblastoderm cell cycles of Drosophila embryogenesis are regulated in G2 by string. *Cell* 62, 469-480.
- Edgar, B., & Orr-Weaver, T. (2001). Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* 105, 297-306.
- Edgar, B., Sprenger, F., Duronio, R., Leopold, P., & O'Farrell, P. (1994). Distinct molecular mechanisms regulate cell cycle timing at successive stages of Drosophila embryogenesis. *Genes Dev* 8, 440-452.
- Elloul, S., Elstrand, M., Nesland, J., Tropé, C., Kvalheim, G., Goldberg, I., Reich, R., & Davidson, B. (2005). Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 103, 1631-1643.
- Escrivà, M., Peiró, S., Herranz, N., Villagrasa, P., Dave, N., Montserrat-Sentís, B., Murray, S., Francí, C., Gridley, T., Virtanen, I., & García de Herreros, A. (2008). Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 28, 1528-1540.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R., Bartek, J., & Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410, 842-847.
- Ferguson, A., White, L., Donovan, P., & Piwnica-Worms, H. (2005). Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases. *Mol Cell Biol* 25, 2853-2860.
- Foe, V. (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in Drosophila embryos. *Development* 107, 1-22.
- Francí, C., Takkunen, M., Dave, N., Alameda, F., Gómez, S., Rodríguez, R., Escrivà, M., Montserrat-Sentís, B., Baró, T., Garrido, M., Bonilla, F., Virtanen, I., & García de Herreros, A. (2006). Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene* 25, 5134-5144.
- Fuse, N., Hirose, S., & Hayashi, S. (1994). Diploidy of Drosophila imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by escargot. *Genes Dev* 8, 2270-2281.
- Gabrielli, B., Clark, J., McCormack, A., & Ellem, K. (1997). Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity toward cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2. *J Biol Chem* 272, 28607-28614.
- Gabrielli, B., De Souza, C., Tonks, I., Clark, J., Hayward, N., & Ellem, K. (1996). Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. *J Cell Sci* 109 (Pt 5), 1081-1093.
- Galaktionov, K., Chen, X., & Beach, D. (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 382, 511-517.
- Grego-Bessa, J., Díez, J., Timmerman, L., & de la Pompa, J. (2004). Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw. *Cell Cycle* 3, 718-721.
- Grosshans, J., & Wieschaus, E. (2000). A genetic link between morphogenesis and cell division during

- formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell* 101, 523-531.
- Grotegut, S., von Schweinitz, D., Christofori, G., & Lehembre, F. (2006). Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *EMBO J* 25, 3534-3545.
 - Guaita, S., Puig, I., Franci, C., Garrido, M., Dominguez, D., Batlle, E., Sancho, E., Dedhar, S., De Herreros, A., & Baulida, J. (2002). Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem* 277, 39209-39216.
 - Guilford, P. (1999). E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today* 5, 172-177.
 - Hanahan, D., & Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
 - Hay, E. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154, 8-20.
 - Hayashi, S. (1996). A Cdc2 dependent checkpoint maintains diploidy in *Drosophila*. *Development* 122, 1051-1058.
 - Hayashi, S., & Yamaguchi, M. (1999). Kinase-independent activity of Cdc2/cyclin A prevents the S phase in the *Drosophila* cell cycle. *Genes Cells* 4, 111-122.
 - Hegedus, Z., Czibula, A., & Kiss-Toth, E. (2006). Tribbles: novel regulators of cell function; evolutionary aspects. *Cell Mol Life Sci* 63, 1632-1641.
 - Hegedus, Z., Czibula, A., & Kiss-Toth, E. (2007). Tribbles: a family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cell Signal* 19, 238-250.
 - Hemavathy, K., Ashraf, S., & Ip, Y. (2000). Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* 257, 1-12.
 - Iavarone, A., & Massagué, J. (1997). Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature* 387, 417-422.
 - Iavarone, A., & Massagué, J. (1999). E2F and histone deacetylase mediate transforming growth factor beta repression of cdc25A during keratinocyte cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 19, 916-922.
 - Ip, Y., & Gridley, T. (2002). Cell movements during gastrulation: snail dependent and independent pathways. *Curr Opin Genet Dev* 12, 423-429.
 - Iwasaki, T., Shinkai, K., Mukai, M., Yoshioka, K., Fujii, Y., Nakahara, K., Matsuda, H., & Akedo, H. (1995). Cell-cycle-dependent invasion in vitro by rat ascites hepatoma cells. *Int J Cancer* 63, 282-287.
 - Jamora, C., DasGupta, R., Kocieniewski, P., & Fuchs, E. (2003). Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* 422, 317-322.
 - Jiao, X., Trifillis, P., & Kiledjian, M. (2002). Identification of target messenger RNA substrates for the murine deleted in azoospermia-like RNA-binding protein. *Biol Reprod* 66, 475-485.
 - Johnston, L. (2000). The trouble with tribbles. *Curr Biol* 10, R502-504.
 - Jung, A., Schrauder, M., Oswald, U., Knoll, C., Sellberg, P., Palmqvist, R., Niedobitek, G., Brabletz, T., & Kirchner, T. (2001). The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. *Am J Pathol* 159, 1613-1617.
 - Kajita, M., McClinic, K., & Wade, P. (2004). Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 24, 7559-7566.
 - Kanemori, Y., Uto, K., & Sagata, N. (2005). Beta-TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and Cdc25B phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6279-6284.
 - Karlsson, C., Katich, S., Hagting, A., Hoffmann, I., & Pines, J. (1999). Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis. *J Cell Biol* 146, 573-584.
 - Karlsson-Rosenthal, C., & Millar, J. (2006). Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol* 16, 285-292.
 - Knoblich, J. (2001). Asymmetric cell division during animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 11-20.
 - Kristjánssdóttir, K., & Rudolph, J. (2004). Cdc25 phosphatases and cancer. *Chem Biol* 11, 1043-1051.
 - Kumagai, A., & Dunphy, W. (1999). Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes Dev* 13, 1067-1072.
 - Källström, H., Lindqvist, A., Pospisil, V., Lundgren, A., & Rosenthal, C. (2005). Cdc25A localisation and shuttling: characterisation of sequences mediating nuclear export and import. *Exp Cell Res* 303, 89-100.
 - LaBonne, C., & Bronner-Fraser, M. (1998). Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Development* 125, 2403-2414.
 - LaBonne, C., & Bronner-Fraser, M. (2000). Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev Biol* 221, 195-205.
 - Lammer, C., Wagerer, S., Saffrich, R., Mertens, D., Ansorge, W., & Hoffmann, I. (1998). The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 16), 2445-2453.

- Lee, J., Dedhar, S., Kalluri, R., & Thompson, E. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172, 973-981.
- Leptin, M. (1999). Gastrulation in *Drosophila*: the logic and the cellular mechanisms. *EMBO J* 18, 3187-3192.
- Leptin, M., & Grunewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* 110, 73-84.
- Lewis, B., Burge, C., & Bartel, D. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.
- Lindqvist, A., Källström, H., Lundgren, A., Barsoum, E., & Rosenthal, C. (2005). Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J Cell Biol* 171, 35-45.
- Mailand, N., Podtelejnikov, A., Groth, A., Mann, M., Bartek, J., & Lukas, J. (2002). Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J* 21, 5911-5920.
- Maines, J., & Wasserman, S. (1999). Post-transcriptional regulation of the meiotic Cdc25 protein Twine by the Dazl orthologue Boule. *Nat Cell Biol* 1, 171-174.
- Manzanares, M., Locascio, A., & Nieto, M. (2001). The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends Genet* 17, 178-181.
- Martínez-Alvarez, C., Blanco, M., Pérez, R., Rabadán, M., Aparicio, M., Resel, E., Martínez, T., & Nieto, M. (2004). Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates. *Dev Biol* 265, 207-218.
- Mata, J., Curado, S., Ephrussi, A., & Rørth, P. (2000). Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell* 101, 511-522.
- Mauhin, V., Lutz, Y., Dennefeld, C., & Alberga, A. (1993). Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res* 21, 3951-3957.
- Mendez, R., & Richter, J. (2001). Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 521-529.
- Miyoshi, A., Kitajima, Y., Kido, S., Shimonishi, T., Matsuyama, S., Kitahara, K., & Miyazaki, K. (2005). Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 92, 252-258.
- Mizuno, S., Kurosawa, T., Matsumoto, K., Mizuno-Horikawa, Y., Okamoto, M., & Nakamura, T. (1998). Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J Clin Invest* 101, 1827-1834.
- Molinari, M., Mercurio, C., Dominguez, J., Goubin, F., & Draetta, G. (2000). Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Rep* 1, 71-79.
- Morgan, D. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134.
- Morris, M., Heitz, A., Mery, J., Heitz, F., & Divita, G. (2000). An essential phosphorylation-site domain of human cdc25C interacts with both 14-3-3 and cyclins. *J Biol Chem* 275, 28849-28857.
- Moustakas, A., & Heldin, C. (2007). Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 98, 1512-1520.
- Murray, S., & Gridley, T. (2006). Snail family genes are required for left-right asymmetry determination, but not neural crest formation, in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10300-10304.
- Nabel-Rosen, H., Toledano-Katchalski, H., Volohonsky, G., & Volk, T. (2005). Cell divisions in the *drosophila* embryonic mesoderm are repressed via posttranscriptional regulation of string/cdc25 by HOW. *Curr Biol* 15, 295-302.
- Nagata, Y., Muro, Y., & Todokoro, K. (1997). Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *J Cell Biol* 139, 449-457.
- Nakakura, E., Watkins, D., Schuebel, K., Sriuranpong, V., Borges, M., Nelkin, B., & Ball, D. (2001). Mammalian Scratch: a neural-specific Snail family transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4010-4015.
- Nakayama, H., Scott, I., & Cross, J. (1998). The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev Biol* 199, 150-163.
- Navarro, P., Lozano, E., & Cano, A. (1993). Expression of E- or P-cadherin is not sufficient to modify the morphology and the tumorigenic behavior of murine spindle carcinoma cells. Possible involvement of plakoglobin. *J Cell Sci* 105 (Pt 4), 923-934.
- Nelson, W., & Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483-1487.
- Nieto, M. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3,

- 155-166.
- Nieto, M., Sargent, M., Wilkinson, D., & Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264, 835-839.
 - Oda, H., Tsukita, S., & Takeichi, M. (1998). Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev Biol* 203, 435-450.
 - Oloumi, A., McPhee, T., & Dedhar, S. (2004). Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochim Biophys Acta* 1691, 1-15.
 - Palmqvist, R., Rutegård, J., Bozoky, B., Landberg, G., & Stenling, R. (2000). Human colorectal cancers with an intact p16/cyclin D1/pRb pathway have up-regulated p16 expression and decreased proliferation in small invasive tumor clusters. *Am J Pathol* 157, 1947-1953.
 - Pavitt, G. (2005). eIF2B, a mediator of general and gene-specific translational control. *Biochem Soc Trans* 33, 1487-1492.
 - Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M., & Cano, A. (2004). Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol* 24, 306-319.
 - Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7, 415-428.
 - Peinado, H., Portillo, F., & Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48, 365-375.
 - Peinado, H., Quintanilla, M., & Cano, A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 278, 21113-21123.
 - Peng, C., Graves, P., Thoma, R., Wu, Z., Shaw, A., & Piwnicka-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 277, 1501-1505.
 - Perl, A., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., & Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392, 190-193.
 - Peña, C., García, J., Silva, J., García, V., Rodríguez, R., Alonso, I., Millán, I., Salas, C., de Herreros, A., Muñoz, A., & Bonilla, F. (2005). E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations. *Hum Mol Genet* 14, 3361-3370.
 - Prevost, G., Brezak, M., Goubin, F., Mondesert, O., Galcera, M., Quaranta, M., Alby, F., Lavergne, O., & Ducommun, B. (2003). Inhibitors of the CDC25 phosphatases. *Prog Cell Cycle Res* 5, 225-234.
 - Ratner, S. (1992). Lymphocyte migration through extracellular matrix. *Invasion Metastasis* 12, 82-100.
 - Reed, R. (2003). Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Curr Opin Cell Biol* 15, 326-331.
 - Ross, J. (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 59, 423-450.
 - Rørth, P., Szabo, K., & Texido, G. (2000). The level of C/EBP protein is critical for cell migration during *Drosophila* oogenesis and is tightly controlled by regulated degradation. *Mol Cell* 6, 23-30.
 - Saka, Y., & Smith, J. (2004). A *Xenopus* tribbles orthologue is required for the progression of mitosis and for development of the nervous system. *Dev Biol* 273, 210-225.
 - Sampath, D., Shi, Z., & Plunkett, W. (2002). Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by the Chk1-Cdc25A pathway during the S-phase checkpoint activated by fludarabine: dysregulation by 7-hydroxystaurosporine. *Mol Pharmacol* 62, 680-688.
 - Savagner, P. (2001). Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 23, 912-923.
 - Savagner, P., Kusewitt, D., Carver, E., Magnino, F., Choi, C., Gridley, T., & Hudson, L. (2005). Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol* 202, 858-866.
 - Schlessinger, K., & Hall, A. (2004). GSK-3beta sets Snail's pace. *Nat Cell Biol* 6, 913-915.
 - Seher, T., & Leptin, M. (2000). Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Curr Biol* 10, 623-629.
 - Seher, T., Narasimha, M., Vogelsang, E., & Leptin, M. (2007). Analysis and reconstitution of the genetic cascade controlling early mesoderm morphogenesis in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* 124, 167-179.
 - Sela-Donenfeld, D., & Kalcheim, C. (1999). Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development* 126, 4749-4762.
 - Shook, D., & Keller, R. (2003). Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* 120, 1351-1383.
 - Shyu, A., Belasco, J., & Greenberg, M. (1991). Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes Dev* 5, 221-231.
 - Solnica-Krezel, L. (2005). Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation. *Curr Biol* 15, R213-228.

- Stoker, M., & Perryman, M. (1985). An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J Cell Sci* 77, 209-223.
- Svensson, S., Nilsson, K., Ringberg, A., & Landberg, G. (2003). Invade or proliferate? Two contrasting events in malignant behavior governed by p16(INK4a) and an intact Rb pathway illustrated by a model system of basal cell carcinoma. *Cancer Res* 63, 1737-1742.
- Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7, 619-627.
- Takemasa, I., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Ohue, M., Noura, S., Miyake, Y., Matsumoto, T., Aihara, T., Tomita, N., Tamaki, Y., Sakita, I., Kikkawa, N., Matsuura, N., Shiozaki, H., & Monden, M. (2000). Overexpression of CDC25B phosphatase as a novel marker of poor prognosis of human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 60, 3043-3050.
- Takizawa, C., & Morgan, D. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol* 12, 658-665.
- Tan, C., Costello, P., Sanghera, J., Dominguez, D., Baulida, J., de Herreros, A., & Dedhar, S. (2001). Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells. *Oncogene* 20, 133-140.
- Tarin, D., Thompson, E., & Newgreen, D. (2005). The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res* 65, 5996-6000; discussion 6000-5991.
- Terada, Y., Tatsuka, M., Jinno, S., & Okayama, H. (1995). Requirement for tyrosine phosphorylation of Cdk4 in G1 arrest induced by ultraviolet irradiation. *Nature* 376, 358-362.
- Thiery, J. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15, 740-746.
- Thiery, J., & Sleeman, J. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-142.
- Théveneau, E., Duband, J., & Altabef, M. (2007). Ets-1 confers cranial features on neural crest delamination. *PLoS ONE* 2, e1142.
- Turner, F., Broad, S., Khanim, F., Jeanes, A., Talma, S., Hughes, S., Tselepis, C., & Hotchin, N. (2006). Slug regulates integrin expression and cell proliferation in human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 281, 21321-21331.
- Valdés, F., Alvarez, A., Locascio, A., Vega, S., Herrera, B., Fernández, M., Benito, M., Nieto, M., & Fabregat, I. (2002). The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes. *Mol Cancer Res* 1, 68-78.
- van de Wetering, M., Barker, N., Harkes, I., van der Heyden, M., Dijk, N., Hollestelle, A., Klijn, J., Clevers, H., & Schutte, M. (2001). Mutant E-cadherin breast cancer cells do not display constitutive Wnt signaling. *Cancer Res* 61, 278-284.
- van Vugt, M., Brás, A., & Medema, R. (2004). Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *Mol Cell* 15, 799-811.
- Vega, S., Morales, A., Ocaña, O., Valdés, F., Fabregat, I., & Nieto, M. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev* 18, 1131-1143.
- Vigo, E., Müller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M., & Helin, K. (1999). CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol* 19, 6379-6395.
- Vićovac, L., & Aplin, J. (1996). Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta Anat (Basel)* 156, 202-216.
- Vleminckx, K., Vakaet, L.J., Mareel, M., Fiers, W., & van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66, 107-119.
- Wegener, S., Hampe, W., Herrmann, D., & Schaller, H. (2000). Alternative splicing in the regulatory region of the human phosphatases CDC25A and CDC25C. *Eur J Cell Biol* 79, 810-815.
- Wisdom, R., & Lee, W. (1991). The protein-coding region of c-myc mRNA contains a sequence that specifies rapid mRNA turnover and induction by protein synthesis inhibitors. *Genes Dev* 5, 232-243.
- Wu, W., Fan, Y., Kemp, B., Walsh, G., & Mao, L. (1998). Overexpression of cdc25A and cdc25B is frequent in primary non-small cell lung cancer but is not associated with overexpression of c-myc. *Cancer Res* 58, 4082-4085.
- Wu, W., Heinrichs, S., Xu, D., Garrison, S., Zambetti, G., Adams, J., & Look, A. (2005). Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell* 123, 641-653.
- Xiao, Z., Chen, Z., Gunasekera, A., Sowin, T., Rosenberg, S., Fesik, S., & Zhang, H. (2003). Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 278, 21767-21773.
- Yang, J., Mani, S., Donaher, J., Ramaswamy, S., Itzykson, R., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I.,

- Richardson, A., & Weinberg, R. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939.
- Yang, Y., Pan, X., Lei, W., Wang, J., & Song, J. (2006). Transforming growth factor-beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis via a cell cycle-dependent mechanism. *Oncogene* 25, 7235-7244.
 - Yap, A., Crampton, M., & Hardin, J. (2007). Making and breaking contacts: the cellular biology of cadherin regulation. *Curr Opin Cell Biol* 19, 508-514.
 - Yen, P. (2004). Putative biological functions of the DAZ family. *Int J Androl* 27, 125-129.
 - Zavadil, J., & Böttinger, E. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24, 5764-5774.
 - Zhou, B., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y., Gunduz, M., & Hung, M. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 6, 931-940.
 - Zolotukhin, A., Tan, W., Bear, J., Smulevitch, S., & Felber, B. (2002). U2AF participates in the binding of TAP (NXF1) to mRNA. *J Biol Chem* 277, 3935-3942.
 - Zybina, T., & Zybina, E. (2005). Cell reproduction and genome multiplication in the proliferative and invasive trophoblast cell populations of mammalian placenta. *Cell Biol Int* 29, 1071-108

Abreviacions

ABREVIACIONES

ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

INTRODUCCIÓ

Figura I-1 : Unions intercel·lulars de les cèl·lules epitelials.....	5
Figura I-2: EMT i MET en cèl·lules epitelials.....	6
Figura I-3: Transicions EMT i MET en la progressió d'un carcinoma	8
Figura I-4: Xarxa molecular que regula la EMT	9
Figura I-5: Arbre filogenètic de la superfamília Snail	13
Figura I-6: Dominis funcionals dels membres de la superfamília Snail.	14
Figura I-7: Model hipotètic d'export nuclear de Snail. Regions implicades.	16
Figura I-8. Esquema de la interrelació dels repressors de l'E-cadherina i el microambient durant la progressió tumoral.....	18
Figura I-9: Senyals inductores i dianes moleculars de Snail en els processos EMT.....	19
Figura I-10: Rol inhibidor de membres de la família Snail en el procés d'endoreduplicació.	23
Figura I-11: Procés de divisió asimètrica en neuroblasts de Drosophila.	25
Figura I-12: Delaminació de les cèl·lules de la cresta neural i del mesoderm durant el desenvolupament embrionari, per un procés EMT	26
Figura I-13: Delaminació de les NCC troncal en el contexte del cicle cel·lular en el neuroepiteli.	28
Figura I-14: Activitats gèniques maternals i zigòtiques que dirigeixen la gastrulació en Drosophila....	29
Figura I-15: Primers estadis del desenvolupament embrionari de Drosophila	30

RESULTATS

Figura R-1: L'expressió de Snail en les línies cel·lulars de mamífer fa disminuir la proliferació cel·lular.	44
Figura R-2: El percentatge de cèl·lules en G1 incrementa en les cèl·lules MDCK que expressen Snail.	45
Figura R-3: Les cèl·lules MDCK que expressen Snail presenten un retard en l'entrada a la fase S del cicle cel·lular.	46
Figura R-4: No hi ha canvis significatius en les fases de cicle cel·lular en els clons de la línia HT-29 M6 que expressen Snail respecte les control.	47
Figura R-5: Les cèl·lules HT-29 M6 que expressen Snail presenten un retard en l'entrada a la fase S del cicle cel·lular.....	48
Figura R-6: Els clons de la línia HT-29 M6 que expressen Snail presenten un elevat nombre de cèl·lules suspeses.	49
Figura R-7: Les cèl·lules HT-29 M6 no adherides presenten elevats nivells de Snail fosforilat, baixos nivells d'E-cadherina i no són apoptòtiques	49
Figura R-8: Les cèl·lules no adherides dels clons HT-29 M6 que expressen Snail estan majoritàriament en les fases S i G2/M del cicle cel·lular.....	51
Figura R-10: Després del tractament amb nocodazol, a les cèl·lules HT-29 M6 que expressen Snail els costa més entrar en mitosi.....	53
Figura R-11: Les cèl·lules HT-29 M6 que expressen Snail, presenten un retard en l'arribada a la mitosi i són més susceptibles a desunir-se del substrat.....	54
Figura R-12: GFP-SNA I el mutant GFP-SNA-Δ24 retarden l'arribada a la fase S del cicle cel·lular i els mutants GFP-SNA-Ct i GFP-SNA-Nt no.	55
Figura R-13: En les NIH-3T3 Snail deixa d'expressar-se al treure el sèrum del medi i ho torna a fer de forma oscil·latòria al completar de nou el medi amb 10%FBS..	56
Figura R-14: La pujada dels nivells de Snail a l'afegir sèrum al medi es dona també quan les cèl·lules estan majoritàriament en G2/M.	57
Figura R-15: L'expressió de Snail va oscil·lant, i dita oscil·lació concorda amb les fases del cicle cel·lular.	59
Figura R-16: Les cèl·lules que expressen Snail presenten més CDK1 inactiva que les cèl·lules control.	61
Figura R-17: Les cèl·lules que expressen Snail presenten menys activitat CDK1 que les cèl·lules control.....	61

Figura R-18: Els nivells de CDC25A disminueixen en les línies HT-29 M6 i MDCK transfectades establement amb Snail.....	63
Figura R-19: Les cèl·lules HT-29 M6 que expressen Snail aturades en G0/G1 presenten nivells inferiors de CDC25A i triguen més en reiniciar el cycle cel·lular.....	65
Figura R-20: La fracció de cèl·lules en G0/G1 presenta nivells inferiors de CDC25A quan les cèl·lules expressen Snail.....	66
Figura R-21: Els nivells de CDC25A endògena disminueixen en les cèl·lules MDCK tranfectades transitòriament amb quantitats creixents de Snail.....	67
Figura R-22: Els nivells del mRNA de CDC25A no disminueixen en les cèl·lules que expressen Snail.....	68
Figura R-24: En els clons estables MDCK i HT-29 M6, Snail no inestabilitza la CDC25A.....	70
Figura R-25: Els nivells de CDC25A exògena disminueixen en les cèl·lules MDCK tranfectades transitòriament amb Snail i els nivells no es recuperen al tractar les cèl·lules amb un inhibidor del proteosoma.....	71
Figura R-26: La vida mitja de CDC25A és inferior a 5h, de manera que 5h de tractament amb MG132 són suficients per poder veure que els nivells de CDC25A s'equiparen als de les cèl·lules control, en el cas hipotètic que Snail participés en la degradació via proteosoma de CDC25A.....	72
Figura R-27 : No hi ha correlació entre els nivells d'expressió de Tribbles i de Snail a nivell de mRNA.....	74
Figura R-28: Tribbles i Snail no interaccionen in vitro.....	75
Figura R-29: Caracterització de la línia MDCK transfectada establement amb Snail-HA, cotransfectada amb pREP4/pREP4-TRB-HA.....	76
Figura R-30 : En els clons estables MDCK que expressen elevats nivells de Tribbles, Tribbles-HA es distribueix de forma difosa pel nucli i pel citoplasma, i provoca binucleació.....	77
Esquema R-1: Representació de l'estructura primària de Snail.....	81
Figura R-33: Els nivells de CDC25A disminueixen quan les cèl·lules expressen Snail sencer (SNA) o el mutant SNA-P2A i encara disminueixen més quan expressen els mutants SNA-SA i SNA-LA.....	82
Figura R-34: Estudi de la localització subcel·lular dels diferents mutants GFP-SNA.....	83
Figura R-35: La important davallada de CDC25A en les cèl·lules MDCK tranfectades transitòriament amb els mutants nuclears SNA-SA i SNA-LA no es deu a una major degradació de CDC25A via proteosoma, ja que al tractar les cèl·lules amb MG132 no es recuperen els nivells de CDC25A.....	84
Figura R-36: La major davallada de CDC25A en les cèl·lules transfectades amb el mutant SNA-LA no es deu a una menor estabilitat de la proteïna.....	85
Figura R-37: Els nivells del mRNA de CDC25A endògena incrementen en les cèl·lules que expressen Snail.....	86
Esquema R-2 : Seqüència codificant i UTRs de hCDC25A.....	87
Figura R-38: DAZL només s'expressa en la línia germinal.....	89
Figura R-39: Snail fa baixar els nivells de CDC25A. La regió de CDC25A implicada està en la meitat N-terminal.....	91
<i>Figura R-40: Els nivells del mRNA de CDC25A exògena no incrementen en les cèl·lules que expressen Snail.....</i>	<i>92</i>
Figura R-41: En les cèl·lules que expressen Snail, els nivells de mRNA de CDC25A de la fracció nuclear incrementen i els de la fracció citosòlica disminueixen.....	93

RESULTATS

Figura D-1: Les cèl·lules del front tumoral dels càncers colorectals presenten en general baixa activitat proliferativa.....	96
Figura D-2: Els nivells de proteïna de p21CIP1 són més alts en les cèl·lules que expressen Snail.....	102
Figura D-3: Snail colocalitza amb el factor U2AF65.....	107
Figura D-4: Model d'actuació de Snail com a repressor de cycle cel·lular.....	108

